



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CIDCA

TESIS DOCTORAL

**Galacto-oligosacáridos y Lactulosa como Protectores en la  
Preservación de Bacterias Lácticas. Utilización de Métodos  
Espectroscópicos y de Análisis Multivariante para la  
Determinación de su Eficiencia.**

**Bioq. Mauricio Santos**

Directora: Doctora Andrea Gómez-Zavaglia  
Co-Directora: Doctora Elizabeth Tymczyszyn

LA PLATA, AÑO 2015

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CONICET



C I D C A

C I D C A



CCT La Plata  
CONICET

## ***Agradecimientos***

*Desde el comienzo tuve la dicha de conocer personas sin las cuales esta experiencia, llena de expectativas, no hubiese sido igual. Gracias Ana!*

*A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado.*

*Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de alimentos (CIDCA) por haberme permitido desarrollar la tarea experimental de esta tesis.*

*Al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca que me permitió llevar a cabo este trabajo.*

*Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCYT) y al Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CyTED) por aportar los medios económicos que permitieron realizar mis estadías en el exterior.*

*A mi directora de tesis Dra. Andrea Gómez-Zavaglia, porque desde el principio confió en mi haciéndome sentir parte de su equipo y transmitiéndome su apoyo y confianza desde cualquier punto del Universo donde se encontrara. Gracias Andrea, te admiro profundamente.*

*A mi codirectora de tesis Dra. Elizabeth Tymczyszyn, porque fue quien me guio en todo momento transmitiéndome sus conocimientos y su capacidad práctica de resolver todos los contratiempos que se fueron presentando. El humor y la calidad de persona siempre hicieron que las horas de trabajo juntos fueran un placer.*

*Al Dr. Esteban Gerbino, con quién crecí, compartí y aprendí desde el comienzo, tanto en el laboratorio como fuera de él. Gracias por soportarme y ayudarme en esta última etapa.*

*Al Dr. Cuauthemoc Araujo-Andrade de la Universidad de Zacatecas, por su calidad humana, por transmitirme sus conocimientos de Multivariante que tantos dolores de cabeza me generaron y, fundamentalmente por los momentos compartidos tanto en México como en sus viajes a Buenos Aires.*

*A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología del CIDCA y de la Cátedra de Micro, por su buena predisposición y por hacer más fácil y más agradable el trabajo diario. En especial a Paula, Marian, Lisi y María, gracias por todos los momentos compartidos.*

*A mis compañeros de BC del Malbran que me tuvieron paciencia en la etapa más difícil de esta Tesis que fue la escritura y supieron comprender mis momentos de psicosis.*

*A todos mis amigos de Entre Ríos, Santa Fe, La Plata y Buenos Aires. Especialmente a los que me acompañaron en todo este proceso y son incondicionales: gracias Twe, Vicky, Agu, Aye, Ro, Magu, Topo, Chizo, Puma, Daia, Laika, Gus, Herno, Maruja, Rafita, Nico, Tincho, Milu y Chan's Family.*

*Finalmente, esto no hubiera sido posible sin mi familia, son ellos los que me dan el motor para seguir. A mis padres, Guillermo y Adriana, les agradezco y les dedico esta Tesis. A mi abuelo Delis que es el*

*ejemplo de lucha y fortaleza, y a mis hermanos, Maty, Fetito y Cachá que son las personas más importantes para mí, y me hacen sentir que con ellos todo es más fácil.*

***“Para una voluntad firme, nada es imposible, no hay fácil ni difícil; fácil es lo que ya sabemos hacer, difícil, lo que aún no hemos aprendido a hacer bien”***

***Bernardo Houssay (1887-1971)***

Los resultados del presente trabajo han sido publicados en:

### **Artículos**

1) **"Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy"**. Food Research International (2014) 59:53-60.

Autores: M.I. Santos, E. Gerbino, C. Araujo-Andrade, E.E. Tymczyszyn and A. Gómez-Zavaglia.

2) **"Determination of amorphous/rubbery states in freeze-dried prebiotic sugar using a combined approach of near infrared spectroscopy and multivariate analysis"**. Food Research International (2014) 64: 514–519

Autores: M.I. Santos, C. Araujo-Andrade, E.E. Tymczyszyn and A. Gómez-Zavaglia.

3) **"Galacto-oligosaccharides and lactulose as protectants against desiccation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*"**. Biotechnology Progress. (2014) 30: 1231-1238.

Autores: M.I. Santos, C. Araujo-Andrade, E. Esperanza-Ibarra, E.E. Tymczyszyn and A. Gómez-Zavaglia.

4) **"Use of whey permeate containing in situ synthesized galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*"**. Journal of Dairy Research (2013) 80: 374-381.

Autores: M. Golowczyc, C. Vera, M. Santos, C. Guerrero, P. Carasi, A. Illanes, A. Gómez-Zavaglia and E.E. Tymczyszyn

### **Capítulos de libro y reviews**

5) **"Applications of infrared and Raman spectroscopies to probiotic investigation"** (2015) Foods. 4: 283-305.

Autores: M.I. Santos, E. Gerbino, E.E. Tymczyszyn and A. Gomez-Zavaglia

6) **"Probiotic cell cultivation"** en "Advances in Probiotic Technology". CRC Press/Taylor & Francis. Editores: Petra Först y Chalat Santivarangkna. 350 páginas.

Autores: M.I. Santos, E.E. Tymczyszyn, M. Golowczyc, P. Mobili and A. Gomez-Zavaglia (2015) Parte 1. Capítulo 3. Págs 45-76. ISBN: 9781498734530.

7) **"History, synthesis, properties, applications and regulatory issues of prebiotic oligosaccharides"**

Autores: E.E. Tymczyszyn, M.I. Santos, M.C. Costa, A. Illanes and A. Gómez-Zavaglia. En Carbohydrates Applications in Medicine. Editor: Helena Gil. (2014) Capítulo 5. Págs. 127-154. ISBN: 978-81-308-0523-8. Research Signpost, 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India.

## **Presentaciones a Congresos**

### **1) Prebiotics as protectants of lactic acid bacteria**

Autores: Mauricio Santos, Esteban Gerbino, Elizabeth Tymczyszyn, Andrea Gómez-Zavaglia.

CRYO 2015 - 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology. 26-29 Julio 2015. Ostrava. República Checa.

### **2) Estudio por FTIR de los efectos de galactooligosacáridos y lactulosa sobre bicapas lipídicas hidratadas de DPPC**

Autores: Norma M. Ale, Mauricio Santos, Aida Ben Altabef, Elizabeth Tymczyszyn, Andrea Gomez-Zavaglia, Sonia B. Díaz.

XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica de la Asociación Argentina de Investigación Fisicoquímica (AAIFQ). 12-15 abril 2015. Buenos Aires. Argentina.

### **3) Monitoring the composition of short chain fructo-oligosaccharides produced during transfructosylation reactions by means of infrared spectroscopy**

Autores: Nelson Romano, Mauricio Santos, Pablo Mobili, María Elvira Zúñiga-Hansen, Andrea Gomez-Zavaglia.

16th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM). 6-11 Septiembre 2015. Bochum. Alemania.

### **4) Prebiotics as lyoprotectants of lactic acid bacteria as determined by infrared spectroscopy.**

#### **A perspective with potential health benefits.**

Autores: Mauricio Santos, Cuauhtémoc Araujo-Andrade, Elizabeth Tymczyszyn, Andrea Gómez-Zavaglia.

SPEC 2014. Shedding new light on disease. 17-23 Agosto 2014. Cracovia, Polonia.

### **5) Galacto-oligosaccharides as protective agents in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.**

Autores: Mauricio Santos, Elizabeth Tymczyszyn, Esteban Gerbino, Natalia Sosa, Cuauhtemoc Araujo-Andrade, Carolina Schebor, Andrea Gómez-Zavaglia.

New frontiers in Anhydrobiosis. 23-27 Marzo 2014. Pornichet. Francia

**6) "Evaluation of the relative humidity of bacterial samples embedded in a GOS matrix by means of NIR spectroscopy and chemometric".**

Autores: Mauricio Santos, Cuauhtémoc Araujo-Andrade, Elizabeth Tymmczyczyn, Andrea Gomez-Zavaglia.

European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. 25-30 August 2013. Oxford, UK.

**7) "Use of Near infrared spectroscopy (NIR) to monitor the efficiency of oligosaccharides as protectants".**

Autores: Mauricio Santos, Cuauhtémoc Araujo-Andrade, Elizabeth Tymmczyczyn, Andrea Gomez-Zavaglia.

European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. 25-30 August 2013. Oxford, UK.

**8) "Use of Near infrared spectroscopy (NIR) to monitor the efficiency of polyhidroxylated compounds as protectants".**

Autores: Mauricio Santos, Cuauhtemoc Araujo-Andrade, Elizabeth Tymczyszyn, Andrea Gomez-Zavaglia.

IX Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. 5-6-7/08/2013. Rosario, Argentina.

**9) "Desarrollo de un producto deshidratado, conteniendo prebióticos y probióticos, a partir de permeado de suero".**

Autores: Mauricio Golowczyc, Carlos Vera-Vera, Mauricio Santos, Carlos Guerrero, Paula Carasi, Andrés Illanes, Andrea Gómez-Zavaglia, Elizabeth Tymczyszyn.

XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. 26-29/11-2012. Buenos Aires, Argentina.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....  | 11 |
| <b>1. BACTERIAS LÁCTICAS</b> .....   | 12 |
| 1.1. Bacterias Lácticas como Probióticos.....  | 12 |
| 1.2. Bacterias Lácticas como <i>Starters</i> .....   | 14 |
| <b>2. PROCESOS DE PRESERVACIÓN</b> .....   | 15 |
| 2.1. Congelación .....   | 16 |
| 2.2. Liofilización.....  | 17 |
| 2.3. Otros Métodos de Preservación.....  | 18 |
| <b>3. DAÑOS PRODUCIDOS DURANTE LOS PROCESOS DE PRESERVACIÓN</b> .....  | 21 |
| 3.1. Daño a Membranas .....  | 23 |
| 3.2. Daño a Proteínas .....  | 25 |
| 3.3. Daño en el Material Genético .....  | 26 |
| 3.4. Alteración de las Propiedades Superficiales .....   | 26 |
| <b>4. AZÚCARES COMO PROTECTORES</b> .....  | 27 |
| 4.1. Hipótesis de Reemplazo de Agua .....  | 28 |
| 4.2. Vitricación .....   | 30 |
| 4.3. Estado Vítreo y Almacenamiento .....  | 31 |
| <b>5. PREBIÓTICOS</b> .....  | 31 |
| 5.1. Evaluación de los Prebióticos como Promotores de la Salud .....   | 33 |
| 5.2. Síntesis de Prebióticos .....   | 34 |
| <b>6. ALIMENTOS SIMBIÓTICOS</b> .....  | 42 |
| <b>7. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL</b> .....   | 43 |
| 7.1. Absorción en el Infrarrojo .....  | 43 |
| 7.2. Modos Vibracionales .....   | 45 |
| 7.3. Aspecto de las Bandas .....   | 47 |
| 7.4. Espectroscopía Vibracional en el Estudio de Biomoléculas .....  | 49 |
| 7.5. Espectroscopias Vibracionales en el Estudio de Microorganismos .....  | 55 |
| 7.6. Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIR).....   | 57 |
| 7.7. Pre-procesamiento de los Espectros .....  | 60 |
| 7.8. Métodos de Análisis Multivariante (Métodos Quimiométricos) .....  | 62 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 71 |
| <b>CAPÍTULO I- Galacto-oligosacáridos y lactulosa como protectores frente a la deshidratación de <i>Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus</i></b> ..... | 72 |



|  |            |
|--|------------|
| INTRODUCCIÓN .....   | 73         |
| MATERIALES Y METODOS .....   | 79         |
| Microorganismos utilizados: .....  | 79         |
| Medios de cultivo: .....   | 79         |
| Condiciones de crecimiento: .....  | 79         |
| Azúcares protectores: .....  | 80         |
| Deshidratación sobre sílica gel. ....  | 80         |
| Cinética de crecimiento.....   | 80         |
| Análisis de Datos.....   | 81         |
| Análisis por Citometría de Flujo Multiparamétrica. ....  | 81         |
| Reproducibilidad de los resultados .....   | 82         |
| RESULTADOS .....   | 83         |
| DISCUSIÓN.....   | 91         |
| CONCLUSIONES.....  | 95         |
| <b>CAPÍTULO II- Determinación de los estados amorfos y <i>rubbery</i> de azúcares prebióticos liofilizados utilizando espectroscopia de infrarrojo cercano y análisis multivariante.....</b> | <b>96</b>  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 97         |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 102        |
| Galacto-oligosacáridos y lactulosa.....  | 102        |
| Procedimiento de liofilización .....   | 102        |
| Análisis estructural .....   | 102        |
| Procedimiento de humidificación.....   | 102        |
| Temperaturas de transición vítrea .....  | 103        |
| Espectroscopia de infrarrojo cercano .....   | 103        |
| Análisis de Datos.....   | 103        |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 105        |
| Análisis estructural de los azúcares. Espectros FTIR y Raman .....   | 105        |
| Efecto de la RH en los Espectros NIR .....   | 107        |
| PLS.....   | 112        |
| CONCLUSIONES.....  | 114        |
| <b>CAPÍTULO III-Efecto de la humedad relativa sobre muestras de bacterias liofilizadas en matrices de azúcares utilizando espectroscopia NIR y análisis multivariante.....</b>               | <b>115</b> |
| INTRODUCCIÓN .....   | 115        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>                       | <b>118</b> |
| <b>Microorganismos utilizados .....</b>                 | <b>118</b> |
| <b>Procedimiento de Liofilización .....</b>             | <b>118</b> |
| <b>Procedimiento de humidificación.....</b>             | <b>118</b> |
| <b>Determinación del número de sobrevivientes .....</b> | <b>118</b> |
| <b>Espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR).....</b>  | <b>119</b> |
| <b>Espectros NIR.....</b>                               | <b>119</b> |
| <b>Análisis de los espectros NIR .....</b>              | <b>119</b> |
| <b>Temperaturas de transición vítrea .....</b>          | <b>120</b> |
| <b>Reproducibilidad de los resultados .....</b>         | <b>120</b> |
| <b>RESULTADOS .....</b>                                 | <b>121</b> |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>                                   | <b>131</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>                                | <b>134</b> |
| <b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>                          | <b>135</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                | <b>141</b> |
| <b>ANEXO: Termogramas.....</b>                          | <b>XXX</b> |

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1. BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo de microorganismos que incluye diferentes géneros con determinadas características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos GRAM positivos no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes; oxidasa y catalasa negativas, carecen de citocromos y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002). Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer a valores bajos de pH ( $\text{pH} \leq 4$ ). Entre los principales géneros de BAL se encuentran: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (König *et al.*, 2009). Algunos autores incluyen también al género *Bifidobacterium*. Sin embargo, este género es diferente tanto desde el punto de vista filogenético como desde el punto de vista bioquímico (König *et al.*, 2009).

Las BAL en general, y los lactobacilos en particular, juegan un papel importante en la salud y bienestar humano y animal. Fueron consideradas por la FDA (Food and Drug Administration de EEUU) como GRAS (Generally Recognized as Safe) y representan los microorganismos más ampliamente utilizados como *starters* en la industria, en la fabricación de varios alimentos como queso, yogurt, carnes fermentadas, pescado y vegetales, y también como inoculantes para ensilados (Albano *et al.*, 2009; Gerez, Torino, Rollán, & Font de Valdez, 2009; Giraffa, Chanishvili, & Widyastuti, 2010).

### 1.1. Bacterias Lácticas como Probióticos

Los probióticos son, según la definición de la FAO (Food and Agriculture Organization), microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas (FAO/WHO 2002).

Cuando se administran bacterias probióticas de manera exógena, éstas deberían llegar intactas y viables al intestino grueso y así contribuir a mantener el balance de la microbiota intestinal (Manning & Gibson, 2004).

Una gran parte de las cepas que se emplean como probióticos pertenecen al género *Lactobacillus*, que son comensales humanos y que han sido aplicadas históricamente de forma segura en la fermentación de alimentos. Estos aspectos garantizan *a priori* su

inocuidad. Sin embargo, a pesar de que estas bacterias se consideran seguras (GRAS), se recomienda que sean sometidas a pruebas que garanticen que su aplicación no afecta negativamente la salud del huésped (Romanin *et al.*, 2010; Carasi, Ambrosio, *et al.*, 2014; Carasi, Díaz, *et al.*, 2014).

Algunos de los lactobacilos más utilizados como probióticos se listan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** *Lactobacillus* utilizados como probióticos [extraída de Shah (2007)]

| Especie  | Cepa                                |
|--|-------------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i>                          | LA-1/LA-5 (Chr. Hansen)             |
| <i>L. acidophilus</i>                          | NCFM (Rhodia)                       |
| <i>L. acidophilus ohnsonii</i>                 | La1 (Nestle)                        |
| <i>L. acidophilus</i>                          | DDS-1 (Nebraska Cultures)           |
| <i>L. acidophilus</i>                          | SBT-2062 (Snow Brand Milk Products) |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | Lb12 L1A (Essum AB)                 |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>     | Lp01                                |
| <i>L. casei immunitas</i>                      | (Danone)                            |
| <i>L. plantarum</i>                            | 299v                                |
| <i>L. rhamnosus</i>                            | GR-1 (Urex Biotech)                 |
| <i>L. rhamnosus</i>                            | LB21 (Essum AB)                     |
| <i>L. rhamnosus</i>                            | SD2112/MM2 (Biogaia)                |
| <i>L. reuteri</i>                              | 271 (Probi AB)                      |
| <i>L. rhamnosus</i>                            | (Probi AB)                          |
| <i>L. plantarum</i>                            | SD2112 (MM2)                        |
| <i>L. reuteri</i>                              | (Yakult)                            |
| <i>L. casei shirota</i>                        | CRL 431 (Chr. Hnasen)               |
| <i>L. paracasei</i>                            | RC-14 (Urex Biotech)                |
| <i>L. fermentum</i>                            | B02                                 |
| <i>L. helveticus</i>                           |                                     |

Además, un gran número de bacterias y levaduras utilizadas como probióticos pertenecen a los géneros *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Saccharomyces* (Shah, 2007).

Los beneficios potenciales del consumo de probióticos incluyen una mayor resistencia a infecciones, reducción del colesterol sérico, reducción de la concentración de sustancias tóxicas a nivel intestinal, competencia favorable con microorganismos patógenos, etc. (Nemcová, 1997; Patel & Goyal, 2012).

El conocimiento acerca de los efectos benéficos de los probióticos sobre la salud humana incentivó su mayor consumo en los últimos años, principalmente en la forma de productos lácteos. Asimismo, se han intensificado los estudios para incorporar bacterias probióticas en alimentos no lácteos como jugos, golosinas y cereales (Saarela *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011) y alimentos de origen vegetal ricos en fibras (Sendra *et al.*, 2008; Tavera-Quiroz *et al.*, 2015).

## **1.2. Bacterias Lácticas como *Starters***

Los *starters* se obtienen a partir de cultivos de microorganismos específicos que son incubados en determinadas condiciones, posteriormente cosechados por centrifugación y finalmente preservados a través de procesos que permiten mantenerlos viables durante la comercialización y almacenamiento.

El primer *starter* comercial (*Lactococcus lactis*) fue producido por Christian Hansen a fines del siglo XIX, y fue introducido en Alemania y Dinamarca para la producción industrial de queso y leche acidificada. Dada la larga tradición y los estándares alcanzados, estos cultivos usados por la industria láctea, sirvieron como modelo de aplicación en otras industrias alimentarias. En nuestros días, los *starters* de BAL tienen un gran impacto por el valor económico de los productos finales fermentados (Leroy & De Vuyst, 2004; Kongo, 2013).

Existen tres tipos de *starters*: los constituidos por una sola cepa, las mezclas de cepas (compuestos por varias cepas cuya su composición es desconocida) y los multicepa de composición definida (Foerst, Reitmaier, & Kulozik, 2010).

Los *starters* son generalmente producidos y distribuidos en todo el mundo por proveedores especializados; de ahí que la estabilización de los mismos es crucial (Foerst *et al.*, 2010). Además, el cultivo debe contener una concentración máxima de microorganismos viables, ser altamente activo en condiciones de producción y estar libre de contaminantes. En la industria, los concentrados de BAL deben ser preservados, siendo por lo general distribuidos en forma líquida, congelados o

deshidratados. Todas estas preparaciones pueden ser utilizadas para la inoculación de los tanques de cultivos madres. Sin embargo, existe un gran interés industrial en la producción de *starters* destinados a la inoculación directa de contenedores de fermentación. En consecuencia, los métodos de preservación adquieren especial relevancia ya que deberán garantizar una elevada actividad y viabilidad bacteriana.

La supervivencia bacteriana y actividad son dependientes de la cepa, de la concentración y de las tecnologías de preservación empleadas. Los diferentes pasos en la manufactura, almacenamiento y eventual uso de *starters* de BAL representan un estrés ambiental similar al que ocurre cuando los microorganismos son expuestos a altas o bajas temperaturas, bajo pH, baja actividad de agua o presencia de flora competitiva. Estos ambientes desfavorables son responsables de la disminución de la viabilidad celular y la actividad bacteriana. Por consiguiente, la preservación adecuada de las bacterias representa un punto crucial en la producción de *starters*.

## **2. PROCESOS DE PRESERVACIÓN**

El éxito en la preservación de los cultivos microbianos es esencial tanto para investigación como para la industria. La preservación adecuada de las bacterias es fundamental tanto para la producción de *starters* como para la elaboración de alimentos funcionales deshidratados. Dicha preservación es el resultado de una apropiada protección de las diferentes estructuras bacterianas, las cuales son biomoléculas desde el punto de vista químico.

El objetivo general de estabilizar biomoléculas (o biomateriales) es obtener productos que puedan ser conservados a largo plazo, manteniendo la actividad que tenían antes de la preservación. En general, los procesos de conservación permiten reducir la actividad de agua del material a preservar inhibiendo las reacciones químicas y biológicas responsables de su degradación (Lodato *et al.*, 1999; Jagannath *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta las afirmaciones expresadas anteriormente, un *starter* de aplicación industrial debería:

- 1) contener el máximo número de células viables (viabilidad),
- 2) estar libre de contaminantes (pureza) y

3) ser genéticamente estable (estabilidad).

Por esta razón, es de suma importancia la conservación y el mantenimiento de los cultivos microbianos.

La elección del método de conservación dependerá de la naturaleza del cultivo y de las ventajas e inconvenientes de dicho método.

Los métodos de preservación de microorganismos más utilizados son la liofilización y la congelación. Sin embargo, debido a los altos costos de producción y almacenamiento, se han estudiado métodos alternativos tales como el secado por atomización (secado *spray*), el secado por vacío y secado en lecho fluidizado. Si bien estos métodos son ampliamente utilizados para la obtención de alimentos deshidratados, la utilización de altas temperaturas para remover el agua produce, no sólo estrés hídrico, sino también estrés térmico, lo cual disminuye su eficiencia en el mantenimiento de la viabilidad bacteriana (Coulibaly *et al.*, 2011).

### **2.1. Congelación**

En este proceso la mayor tasa de destrucción bacteriana ocurre inmediatamente después de la congelación, luego se reduce notablemente hasta estabilizarse, por lo que resulta un buen método para mantener la viabilidad de los microorganismos. Las temperaturas más utilizadas son  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cuanto menor es la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de las bacterias (Fonseca, Béal, & Corrieu, 2001). La congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido ( $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) constituye un método que permite obtener una mejor actividad y viabilidad celular (Thunell, Sandine, & Bodyfelt, 1984; Zheng & Sun, 2006). Sin embargo, es una técnica muy cara y en general, la infraestructura no está preparada para su implementación a escala de laboratorio ni a escala industrial.

Las velocidades de congelación y descongelación son determinantes para garantizar la actividad y viabilidad celular luego de dichos procesos. La congelación rápida acompañada de una rápida descongelación es una estrategia favorable para la supervivencia celular (Thammavongs, Poncet, Desmasure, Guéguen, & Panoff, 2004). En la sección **3.2** se analizarán detalladamente las consecuencias de la velocidad de congelación/descongelación sobre las estructuras celulares.



Además, la morfología bacteriana afecta la supervivencia durante la congelación y liofilización. Se ha propuesto que los cocos son más resistentes a la congelación debido a una baja relación superficie/volumen (pequeño tamaño y forma esférica), lo que facilita el eflujo de agua de las células durante la congelación (Fonseca et al., 2001; Velly, Fonseca, Passot, Delacroix-Buchet, & Bouix, 2014).

## 2.2. Liofilización

La liofilización es un método reconocido hace mucho tiempo para el almacenamiento y preservación de bacterias (Perry, 1998; Cimander *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009; Gautier *et al.*, 2013), incluyendo *starters* (Yao *et al.*, 2009) y probióticos (M Saarela *et al.*, 2005; Kurtmann *et al.*, 2009; Jagannath *et al.*, 2010). En el proceso de liofilización, el agua es removida por sublimación del hielo de la muestra congelada. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. El proceso consta de tres etapas: congelación, sublimación y desorción (Perry, 1998). Luego de estas etapas, el material es obtenido como un concentrado en polvo. Para preservar la viabilidad celular durante la deshidratación y subsecuente almacenamiento es necesario realizar las siguientes consideraciones:

**-Fase de crecimiento celular.** Los cultivos en fase logarítmica tardía o estacionaria temprana sobreviven mejor a la liofilización que aquellos en fase exponencial media (Silva *et al.*, 2005; Velly *et al.*, 2014).

**-pH de crecimiento.** Los cultivos crecidos a pH no controlado son más resistentes a la liofilización (Li *et al.*, 2009; Golowczyc *et al.*, 2013).

**-Composición de ácidos grasos de membrana.** Las condiciones de crecimiento determinan la composición de ácidos grasos bacterianos (Tymczyszyn *et al.*, 2005) y se ha relacionado el contenido de ácidos grasos cíclicos (*i.e.*: ácido lactobacílico) en la membrana de *L. bulgaricus* con la supervivencia a la liofilización (Li *et al.*, 2009; Velly *et al.*, 2014).

**- Temperatura de almacenamiento.** El deterioro del producto liofilizado y la pérdida de viabilidad se ven favorecidas a elevadas temperaturas de almacenamiento (por encima de la temperatura ambiente) (Higl *et al.*, 2007; Tymczyszyn *et al.*, 2012).

La resistencia bacteriana a la liofilización es cepa dependiente. Así, las distintas especies y cepas pueden exhibir un comportamiento diferente (variabilidad inter cepa) durante la liofilización y subsecuente almacenamiento, aun en condiciones comparables (Carvalho *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2009).

La liofilización de biomoléculas presenta numerosas ventajas:

- la temperatura de trabajo es muy baja (el producto se congela a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por lo que las estructuras termolábiles no se alteran,
- no hay presencia de oxígeno durante el proceso por lo que se evita la oxidación de biomoléculas bacterianas,
- no hay agua libre, por lo tanto no hay peligro de hidrólisis ni de crecimiento microbiano,
- la humedad residual es baja,
- los productos pueden ser estables durante el almacenamiento por períodos prolongados.
- los productos liofilizados ocupan poco volumen en comparación con los congelados, lo que representa una ventaja en términos de transporte y almacenamiento.

Para garantizar la máxima viabilidad y actividad de los cultivos liofilizados deben optimizarse las condiciones de humedad y temperatura de almacenamiento y transporte (Coulibaly *et al.*, 2010).

### **2.3. Otros Métodos de Preservación**

Secado por atomización (secado spray): El secado *spray* es un método basado en la nebulización de la suspensión bacteriana en millones de microgotas individuales dentro de una cámara sometida a una corriente controlada de aire caliente ( $150\text{-}200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Este proceso permite aumentar enormemente el área de la superficie de contacto del producto pulverizado, lo cual facilita una rápida vaporización del agua. De esta manera, las pequeñas gotas de suspensión de bacterias se arrastran y deshidratan en la corriente de aire caliente obteniéndose un polvo seco que luego es colectado.

Las condiciones operativas se seleccionan de acuerdo a las características del microorganismo a deshidratar. Los parámetros más importantes a tener en cuenta son

la temperatura de salida, temperatura de entrada, presión de atomización y medio de suspensión del microorganismo. Es importante determinar estos parámetros para conservar principalmente los productos sensibles al calor (enzimas, compuestos volátiles, etc.).

La preservación de cultivos por esta técnica ofrece una serie de ventajas, tales como la producción de grandes cantidades de cultivos deshidratados a bajo costo, los cuales pueden ser almacenados por períodos prolongados de manera estable (Teixeira *et al.*, 1995; Gardiner *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005). Sin embargo, la principal limitación del secado por atomización es la baja supervivencia que se obtiene durante la deshidratación de los cultivos (Gardiner *et al.*, 2000; Desmond *et al.*, 2002; Corcoran *et al.*, 2004). La utilización de altas temperaturas para eliminar el agua limita la utilización de este método (Gardiner *et al.*, 2000).

Secado por vacío: El secado por vacío es bien conocido como un proceso adecuado para la preservación de materiales sensibles al calor. En las operaciones de secado bajo vacío, la humedad puede ser retirada a bajas temperaturas. En este proceso, las reacciones de oxidación pueden ser minimizadas, lo cual representa una ventaja para la preservación de bacterias lácticas sensibles al oxígeno. El secador básico de vacío consiste en una cámara que contiene estantes con calefacción. Las bandejas que tienen los materiales húmedos son colocadas sobre los estantes, y el agua es removida por una bomba de vacío y recolectada en un condensador. Son pocos los estudios sobre el uso de este proceso en *starters* de bacterias lácticas. No obstante, han sido publicados resultados de viabilidad comparables a los obtenidos por liofilización (Tymczynyn *et al.*, 2007; Tymczynyn *et al.*, 2008). Una de las limitaciones del secado por vacío es el tiempo de exposición relativamente prolongado en comparación con el secado por atomización o en lecho fluidizado (desde 20 a más de 100 horas). Sin embargo, estas desventajas pueden ser superadas mediante el uso de secadores de vacío continuos.

Otra opción para reducir el tiempo requerido en la deshidratación del secado por vacío es el uso de energía de microondas. En esta variación, el agua se elimina mediante microondas (también llamada “energía radiante” o “radiación no ionizante”) bajo vacío (Scaman & Durance, 2005). La energía electromagnética penetra en el material a deshidratar y se convierte en energía térmica, lo cual

actúa como un mecanismo de calentamiento rápido. Así, se produce calor sin que se rompan los enlaces químicos. Las microondas son absorbidas por moléculas polares o cargadas eléctricamente (Santivarangkna *et al.*, 2007).

Secado en Lecho Fluidizado: El procesamiento en lechos fluidizados implica el secado, enfriamiento, aglomeración, granulación y revestimiento de los materiales en gránulos. Un lecho fluidizado es un lecho de partículas sólidas en donde una corriente de aire o gas sopla en forma ascendente a través de las partículas a una velocidad lo suficientemente alta como para ponerlas en movimiento. Como el aire viaja a través de una cama con perforaciones donde se depositan las partículas sólidas, se imparte al lecho un comportamiento de fluido, lo cual proporciona una rápida mezcla de sólidos. Las partículas son suspendidas libremente en la corriente de aire y deshidratadas al mismo tiempo por un intercambio rápido de calor y masa (Baker, 2000).

Los costos de secado en lecho fluidizado son comparables o ligeramente inferiores a los de secado por atomización, y el proceso es también viable a gran escala de producción continua. El tiempo de secado en lecho fluidizado (de 1 minuto a 2 horas) es mayor que el de secado por atomización, pero el calor de inactivación se puede minimizar y controlar fácilmente mediante el uso de temperaturas de aire relativamente bajas. Sin embargo, el uso de secadores de lecho fluidizado para muchos tipos de alimentos es limitado a causa del tamaño irregular de la partícula y de la naturaleza pegajosa de los materiales granulados, que puede conducir a una cama no homogénea, aglomerados de partículas, y una disminución de la tasa de secado (Strasser *et al.*, 2009).

El secado de microorganismos en lecho fluidizado se ha estudiado en levaduras y se logró una producción satisfactoria a nivel comercial. A pesar de ello, sólo unos pocos estudios se han realizado sobre *starters* de fermentos lácticos (Beker & Rapoport, 1987; Bayrock & Ingledew, 1993).

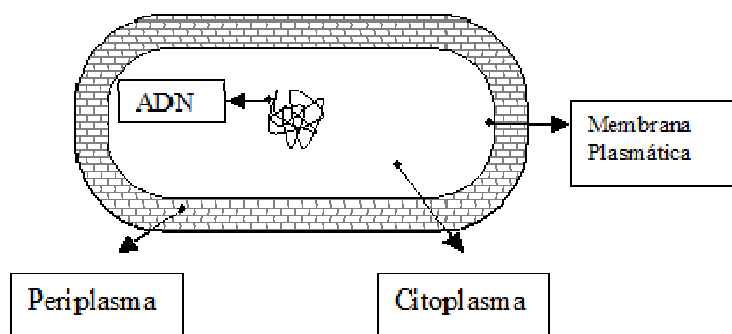
### **3. DAÑOS PRODUCIDOS DURANTE LOS PROCESOS DE PRESERVACIÓN**

Durante los procesos de preservación, las bacterias están expuestas a diferentes situaciones de estrés (térmico, osmótico, oxidativo) que inducen importantes daños celulares. Estos daños provocan disminución de la actividad funcional y pérdida de viabilidad de los cultivos (Coulibaly *et al.*, 2010; Velly *et al.*, 2014).

### Rol del Agua en la Preservación

El agua es un componente crítico en la estructura y funciones celulares. Contribuye a estabilizar las estructuras proteicas, ADN, membranas y lípidos. Es un dipolo resultante de la diferencia de electronegatividad entre el oxígeno y el hidrógeno, lo que le confiere la capacidad de formar puentes de hidrógeno intermoleculares. Esta propiedad la convierte en un solvente muy versátil y estructurado. Puede disolver gases (como el oxígeno), sales y compuestos no iónicos como alcoholes, azúcares, proteínas (Clark, Martinko, Madigan, & Dunlap, 2009).

Las células están constituidas por aproximadamente 70% de agua, la cual se distribuye en compartimentos estructuralmente distintos, el citoplasma y el periplasma (**Figura 1**). En dichos compartimentos se pueden definir principalmente dos tipos de agua: “**agua unida**” o agua intersticial, que hidrata los grupos polares de las moléculas presentes en la bacteria (proteínas, lípidos de membrana, ADN); y “**agua libre**”, que puede intercambiarse osmóticamente a través de la membrana (Potts, 1994).



**Figura 1:** Esquema de compartimentos celulares.

A pesar de que el agua es esencial para el desarrollo celular, los procesos de conservación se caracterizan por una reducción de la actividad de agua del medio, a fin de inhibir las reacciones de degradación. Esta reducción de la actividad de agua se puede dar por congelación o deshidratación. La pérdida de *agua libre* en primer lugar, y de *agua unida* en procesos más drásticos, permite obtener productos con bajo contenido de humedad. Las condiciones de tiempo y

temperatura del proceso de preservación al que son expuestas las bacterias determinarán qué tipo de agua es la que se está eliminando. La pérdida de *agua libre* puede provocar la disminución del volumen celular y la detención del crecimiento, pero la pérdida de *agua unida* puede dañar irreversiblemente las estructuras celulares, provocando la pérdida de la viabilidad (Potts, 1994).

Consecuencias de la congelación: las cepas de bacterias lácticas tienen diferentes sensibilidades a la congelación y subsecuente descongelación. Inmediatamente después de la descongelación es posible observar la presencia de células dañadas, no dañadas y muertas. La capacidad de recuperarse es cepa dependiente.

Cuando una suspensión de células se somete a enfriamiento lento, la cristalización de hielo comienza en el medio externo, mientras que su interior se mantiene en estado sobre-enfriado hasta aproximadamente -10 °C. En ese rango de temperatura el agua sobre-enfriada tiene mayor presión de vapor que el hielo y el agua intracelular sale al exterior, causando la deshidratación progresiva de las células. El agua que sale de las células se congela en el exterior al encontrarse con cristales ya formados. Si el enfriamiento es lento, el sistema se equilibra con la expulsión de agua y las células se encogen por pérdida de agua intracelular.

En un enfriamiento rápido, se puede producir la cristalización del agua intracelular generando daño en la membrana y salida de material intracelular. La velocidad de congelación ideal, es aquella a la cual se produce un rápido crecimiento de hielo extracelular, generando un gradiente osmótico entre el interior y exterior de la célula (Fonseca *et al.*, 2006). Sin embargo, las bajas temperaturas y el aumento de la viscosidad producen el sobreenfriamiento del interior celular e impiden la difusión de agua intracelular (Santivarangkna, Higl, & Foerst, 2008; Santivarangkna, Kulozik, & Foerst, 2008a).

Consecuencias de la deshidratación: tanto en la liofilización como en los métodos alternativos de secado, la salida de agua expone a las bacterias a un medio en donde la actividad de agua de la fase gaseosa es inferior a la del interior celular, ya sea por aplicación de vacío o circulación de aire caliente. La exposición de las células a estas condiciones por un tiempo limitado produce un rápido encogimiento del citoplasma, precipitación de sales y oxidación de compuestos. Las propiedades intrínsecas de los microorganismos y su estado fisiológico en el momento del secado pueden influenciar

el tipo de macromoléculas involucradas (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de membrana). La alteración de estas estructuras es la responsable de la pérdida de la viabilidad celular (Teixeira *et al.*, 1997).

### **3.1. Daño a Membranas**

La membrana plasmática es una estructura fina que separa el interior de la célula de su medio externo. Está compuesta principalmente por lípidos (fosfolípidos) y proteínas. Los fosfolípidos poseen tanto regiones altamente hidrofóbicas (ácidos grasos) como regiones relativamente hidrofílicas (cabeza polar), por lo que adoptan estructura de bicapa, con las porciones hidrofílicas expuestas hacia la fase acuosa.

Las principales proteínas de la membrana poseen regiones altamente hidrofóbicas que interaccionan con las zonas apolares de los ácidos grasos, y atraviesan la bicapa presentando regiones superficiales tanto en el exterior como en el interior de la célula. La estructura global de la membrana se estabiliza mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Además, algunos cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  también contribuyen a la estabilización de la membrana a través de interacciones iónicas con los grupos polares de carga negativa presentes en los fosfolípidos (Clark *et al.*, 2009).

La membrana funciona como una barrera de permeabilidad, evitando la pérdida pasiva de componentes citoplasmáticos y la entrada indiscriminada de constituyentes del medio externo. Además, muchas de las proteínas de membrana son enzimas o están implicadas de una u otra manera en el transporte de sustancias hacia el interior y hacia el exterior de la célula (Clark *et al.*, 2009).

Los lípidos de membrana pueden existir en fase gel o fase líquido-cristalino. La transición de una fase a la otra está dada por la temperatura de fusión o de transición de fase ( $T_m$ ). Cuando la temperatura se encuentra por debajo de la  $T_m$ , la bicapa se encuentra en estado de gel, cuando está por encima de la  $T_m$ , se encuentra en estado líquido-cristalino (Mateos, 2011). El valor de la  $T_m$  está determinado por las propiedades de los lípidos de la bicapa. En el caso de bicapas constituidas por un solo tipo de lípidos la  $T_m$  está bien definida. Sin embargo, las membranas biológicas son mezclas lipídicas complejas y en ellas la transición de un estado a otro se produce en un intervalo de temperaturas. Un elevado contenido de ácidos grasos insaturados se

asocia a bajos valores de  $T_m$ . Del mismo modo, un elevado contenido de ácidos grasos cíclicos ( $\Delta C19:0$ ) disminuye la  $T_m$  (Oldenhof *et al.*, 2005; Gautier *et al.*, 2013).

Las bacterias lácticas presentan una composición lipídica muy particular rica en fosfatidilglicerol, cardiolipina (condensación de dos moléculas de fosfatidilglicerol) y glicolípidos, en especial glicosil-diacil-gliceroles (Gómez-Zavaglia *et al.*, 2000).

Los ácidos grasos mayoritarios en el género *Lactobacillus* son de cadenas largas de 16 y 18 átomos de carbono, saturadas (16:0 y 18:0) o insaturadas (16:1 y 18:1), así como también ácidos grasos que contienen ciclos en las cadenas hidrocarbonadas ( $\Delta C19:0$ ). De estos últimos, el único característico de BAL es el  $\Delta C19:0$  o “lactobacílico”, ya que los otros están presentes en otros tipos de membranas bacterianas. La composición lipídica de la membrana de las células procariontes está determinada por las condiciones de crecimiento. Así, variaciones en el pH, tensión de oxígeno, concentración de sales, temperatura, etc., modifican el perfil de ácidos grasos de los microorganismos, originando alteraciones en las propiedades viscoelásticas y de permeabilidad de la membrana. Este fenómeno se conoce como “adaptación homoviscosa” (Fernández Murga *et al.*, 1999 ; Gomez-Zavaglia *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2002; Gautier *et al.*, 2013; Velly *et al.*, 2014).

La pérdida de agua durante los procesos de preservación produce la disminución del espacio lateral entre las cabezas polares y las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de membrana. Esto provoca un aumento de la  $T_m$  (disminución de la fluidez), alterando las propiedades de barrera de la misma. En estado deshidratado puede haber fenómenos de autooxidación, lo cual genera especies reactivas del oxígeno dañinas, que pueden producir la oxidación de los dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos provocando cambios en la fluidez de la bicapa lipídica. En algunas bacterias, la desecación y rehidratación producen cambios en la permeabilidad de la membrana que llevan a la muerte celular (Crowe, Crowe, & Chapman, 1984; Gautier *et al.*, 2013; Shafiei, Delvigne, Babanezhad, & Thonart, 2013).

El mantenimiento de la integridad de la membrana frente al estrés hídrico representa el mecanismo central de tolerancia a la desecación.

La alteración del tipo de lípidos en la membrana es la respuesta de mayor importancia al estrés ambiental. Se han reportado cambios en la fluidez de la



membrana y la composición lipídica asociados con la resistencia a la desecación de algunos microorganismos (Olie & Potts, 1986; Gomez Zavaglia *et al.*, 2000; Santivarangkna, Kulozik, *et al.*, 2008a). Sin embargo, en ciertos microorganismos se observó que la alteración de las propiedades de la membrana no es crítica para el mantenimiento de la viabilidad. En este sentido, ha sido informado que bacterias deshidratadas que presentan daño a nivel de la membrana son capaces de reparar el daño y volver a crecer cuando son rehidratadas (Teixeira *et al.*, 1997; Tymczynszyn *et al.*, 2007; Tymczynszyn *et al.*, 2008b).

### **3.2. Daño a Proteínas**

Las proteínas cumplen muy variados roles en el funcionamiento celular (proteínas transportadoras, enzimas, etc.) y cada una de ellas puede encontrarse en pocas o miles de copias. Esas proteínas están distribuidas en un ambiente acuoso en los compartimientos celulares. La distribución de agua en la proteína se correlaciona directamente con la topografía de la superficie a escala local y global. También hay moléculas de agua dentro de la estructura terciaria de las proteínas y la velocidad de intercambio de estas moléculas es mucho más lenta que las de la superficie. En procesos de deshidratación, la pérdida de agua lleva a la pérdida de la estructura terciaria, lo cual está determinado por la temperatura y velocidad de secado a las que las bacterias son expuestas. Si la deshidratación es rápida, se produce la pérdida de toda el agua libre y las proteínas son altamente desnaturalizadas. Por el contrario, si la deshidratación es lenta, se produce pérdida de parte del agua libre y parte del agua ligada. En este caso las proteínas son parcialmente desnaturalizadas (Sashi *et al.*, 2014).

Si bien la membrana es el primer sitio de daño en los procesos de deshidratación bacteriana, ésta puede ser reparada sin afectar la viabilidad celular. En estos casos ha sido propuesto que el mantenimiento de la viabilidad bacteriana está íntimamente ligado a la conservación de la estructura de las proteínas (Teixeira *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha descrito que ciertos microorganismos pueden ser pre-adaptados al estrés térmico cuando son expuestos a temperaturas sub-letales. Este tratamiento ha sido asociado a cambios en el perfil de proteínas, entre las que se puede destacar el

aumento de las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) (Prasad *et al.*; 2003).

### **3.3. Daño en el Material Genético**

El daño producido en los ácidos nucleicos durante la deshidratación se debe principalmente a la acumulación de mutaciones durante el tiempo en el cual la bacteria no crece debido al estado deshidratado. El daño puede producirse a través de modificaciones químicas (alquilación u oxidación), entrecruzamiento o remoción de bases nitrogenadas (depurinización) y ruptura del ADN (Bieger-Dose *et al.*, 1992).

Debido a que es improbable que el mecanismo de reparación opere en estado deshidratado, es posible que el daño producido durante los procesos de preservación sobre los ácidos nucleicos, sea reparado después de la rehidratación (Potts, 1994).

### **3.4. Alteración de las Propiedades Superficiales**

La superficie celular bacteriana es de fundamental importancia para la supervivencia de los microorganismos ya que a través de ésta la célula interactúa con su medio ambiente. La caracterización de la superficie, a través de las propiedades fisicoquímicas, ofrece información relacionada con la fisiología bacteriana (Fernández Murga *et al.*, 2000; Gautier *et al.*, 2013). El análisis de la viabilidad y de los parámetros fisicoquímicos requiere la rehidratación de las células deshidratadas. Este proceso puede causar daños considerables al microorganismo. De acuerdo a estudios de microscopía electrónica, durante la deshidratación severa se produce el colapso de las estructuras biológicas superficiales. Sin embargo, si la conformación de las estructuras celulares es previamente preservada en estado deshidratado, la integridad celular no debería verse afectada luego de la rehidratación (Pembrey *et al.*, 1999; Gautier *et al.*, 2013).

Las células deshidratadas presentan movilidad electroforética reducida. Esta reducción está asociada a la disminución de cargas superficiales. Pembrey *et al.* (1999) atribuyen esta característica a la capacidad que tienen los polímeros superficiales de reorientarse en la superficie celular. La superficie de las células deshidratadas queda expuesta a ambientes hidrofóbicos (como lo son el aire y el

vacío). Por lo tanto, se produce una reorientación de manera que los grupos hidrofóbicos quedan expuestos en la interfase. Cuando estas células son rehidratadas, las macromoléculas de la interface en equilibrio con el medio hidrofóbico pueden no ser capaces de revertir rápidamente a una interfase hidrofílica (característica de un medio hidratado). Por esta razón, esas células pueden tener menos carga y ser más hidrofóbicas que las células originales (Pembrey *et al.*, 1999; Gautier *et al.*, 2013).

Estudios llevados a cabo mediante espectroscopia de infrarrojo y microscopia de fuerza atómica confirman que los cambios en las propiedades superficiales son en gran medida responsables de la pérdida de viabilidad durante los procesos de preservación (Santivarangkna *et al.*, 2008).

#### **4. AZÚCARES COMO PROTECTORES**

Como se describió anteriormente, la pérdida de agua de membranas y proteínas es la responsable de los daños que llevan a la disminución de la viabilidad celular. Para evitar estos daños, resulta fundamental la adición de sustancias protectoras durante los procesos de preservación, tanto para procesos llevados a cabo a altas como a bajas temperaturas. Estas sustancias son “solutos compatibles”, como aminoácidos (glutamato, prolina, glicina, betaína) o azúcares (trehalosa, lactosa, sacarosa, etc.). La elección correcta del protector en las concentraciones adecuadas es de gran importancia. En este sentido, la utilización de azúcares ha sido ampliamente investigada en la preservación de proteínas, enzimas, liposomas o productos farmacéuticos (Oldenhof *et al.*, 2005; Santivarangkna *et al.*, 2008; Payton *et al.*, 2014). La capacidad protectora de la trehalosa y la sacarosa es ampliamente reconocida (Crowe *et al.*, 1984; Leslie *et al.*, 1995; Gomez Zavaglia *et al.*, 2003). En los últimos años, los oligo y polisacáridos como la inulina, los fructo-oligosacáridos (FOS) y los galacto-oligosacáridos (GOS), han demostrado ser eficaces protectores (Cacela & Hinch, 2006; Hinch, Rennecke, & Oliver, 2008; Schwab, Vogel, & Gänzle, 2007; Tymczynszyn *et al.*, 2011).

Cacela & Hinch (2006) reportaron el efecto protector de diferentes familias de oligosacáridos (fructanos, malto-oligosacáridos y manano-oligosacáridos) sobre liposomas liofilizados (Cacela & Hinch, 2006). Estos autores encontraron que las características

estructurales de los diferentes oligosacáridos y su grado de polimerización (DP) determinan su capacidad protectora durante la deshidratación. Recientemente se han informado las propiedades protectoras de los GOS sobre bacterias lácticas (Tymczyszyn *et al.*, 2011). Diversos estudios fisicoquímicos respaldan las propiedades termofísicas de estos protectores (Torres *et al.*, 2011; Tymczyszyn *et al.*, 2012).

La capacidad protectora está relacionada con la composición química y con las propiedades físicas de los protectores. En general, todos los compuestos polihidroxiados son potenciales protectores, y esta propiedad se podría explicar sobre la base de dos hipótesis diferentes:

- Reemplazo de agua
- Vitricación

#### **4.1. Hipótesis de Reemplazo de Agua**

El agua tiene la capacidad de estabilizar fosfolípidos y proteínas de membrana. Esto se debe a su capacidad para formar puentes de hidrógeno con los grupos polares de estas macromoléculas.

Hay evidencias de que los azúcares pueden reemplazar el agua que rodea los residuos polares de fosfolípidos y proteínas, formando puentes de hidrógeno con dichos grupos y manteniendo, por lo tanto, su integridad en ausencia de agua (Milhaud, 2004; Beck *et al.*, 2007).

Liposomas compuestos de fosfolípidos puros, pueden preservarse en estado deshidratado cuando son secados en presencia de disacáridos (Crowe *et al.*; 1998; Oldenhof *et al.*, 2005). En estado deshidratado los liposomas se empaquetan apretadamente, aumentando la temperatura de transición de fases de los lípidos ( $T_m$ ), debido a la pérdida de hidratación de la cabeza polar de los fosfolípidos (Crowe *et al.*, 1998). En presencia de azúcares, como trehalosa o sacarosa, la  $T_m$  se mantiene como si estuviera en estado hidratado; esto se debe a que los azúcares son capaces de formar puentes de hidrógeno con las cabezas polares de los fosfolípidos ocupando el lugar que tenía el agua en el estado hidratado (reemplazo de moléculas de agua), y previniendo alteraciones de la permeabilidad (Crowe *et al.*, 1998; Cyril *et al.*; 2002; Ricker *et al.*, 2003; Oldenhof *et al.*, 2005).

La interacción de oligo y polisacáridos con membranas lipídicas depende en gran medida de la flexibilidad estructural de los mismos. La interacción de las estructuras rígidas con las membranas está directamente relacionada con el grado de polimerización (DP) de los azúcares. Esto explica que la rafinosa (DP3) sea más eficaz que la trehalosa y este último, que la glucosa en la disminución de la  $T_m$  de membranas ricas en dipalmitoil fosfatidilcolina (Crowe *et al.*, 1998). Hinchá *et al.* (2003) llevaron a cabo un estudio sistemático sobre la estabilización de las membranas de fosfatidilcolina de huevo utilizando azúcares de la familia de la rafinosa, incluyendo sacarosa (DP2), rafinosa (DP3), estaquiosa (DP4) y verbascosa (DP5). Ellos encontraron que los azúcares previenen la agregación y el *leakage* (ruptura) de liposomas con mayor eficiencia conforme aumenta el grado de polimerización. Esta estabilización se explica sobre la base de la capacidad que tienen los oligosacáridos superiores para interactuar con las membranas lipídicas, disminuyendo la  $T_m$  (Hinchá *et al.*, 2003).

La acción protectora de los azúcares fue también confirmada en polipéptidos y enzimas termolábiles expuestos a liofilización (Carpenter *et al.*, 1987; Carpenter & Crowe, 1989a; Oldenhof *et al.*, 2005). El análisis de la región amida mediante espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) muestra que las proteínas deshidratadas en presencia de azúcares presentan un espectro similar al de las proteínas hidratadas. En contraste, cuando las proteínas se deshidratan en ausencia de azúcares, los espectros cambian drásticamente. Estos resultados indican que la trehalosa y la sacarosa pueden proteger polipéptidos y proteínas al mantener la conformación nativa de las mismas, y de esta manera mantener sus funciones biológicas (Carpenter & Crowe, 1989; Allison *et al.*, 1999; Crowe *et al.*, 1993; Leslie *et al.*, 1995).

#### **4.2. Vitrificación**

Los azúcares tienen la propiedad de formar vidrios (sólidos amorfos) en determinadas condiciones. El estado vítreo se define como líquido subenfriado de alta viscosidad, en el cual los movimientos rotacionales y vibracionales están disminuidos (Lodato *et al.*, 1999; Tymczynszyn *et al.*, 2012; Golowczyc *et al.*, 2013). Por esta razón, durante el almacenamiento de células deshidratadas, una matriz en estado vítreo favorece el

retraso de las reacciones de deterioro, que son dependientes de los movimientos moleculares.

El pasaje del estado vítreo al estado *rubbery* se conoce como transición vítrea. En estado *rubbery* disminuye la viscosidad, se pueden dar reacciones de deterioro y se produce pérdida de actividad del material biológico. El método comúnmente utilizado para determinar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), es la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Crowe *et al.*, 1998). La  $T_g$  se observa en el termograma como un cambio en la capacidad calorífica del producto. El valor de  $T_g$  es altamente dependiente del contenido de agua de la muestra, siendo ésta la principal molécula plastificante (que disminuye la  $T_g$ ).

Se ha observado que cuando los microorganismos se deshidratan en presencia de azúcares y se almacenan a temperaturas inferiores a la  $T_g$  (es decir en estado vítreo), la cinética de inactivación es muy lenta, mientras que si el contenido de agua o la temperatura de almacenamiento son inadecuadas (temperatura de almacenamiento superior a la  $T_g$ ), la pérdida de viabilidad se da de manera muy rápida (Higl *et al.*, 2007).

La  $T_g$  es un parámetro que depende de la estructura y el peso molecular de la muestra. Por lo tanto, los diferentes azúcares presentan diferentes valores de  $T_g$  para el mismo contenido de agua. Los azúcares de elevado peso molecular tienen una mayor  $T_g$ . Sin embargo, se ha reportado que los disacáridos y trisacáridos son mejores protectores que algunos polisacáridos de mayor grado de polimerización, como la maltodextrina (Santivarangkna *et al.*, 2008). Este fenómeno se debe a que ambas hipótesis (hipótesis del reemplazo de agua y de la vitrificación) son complementarias. Es decir, los azúcares más pequeños pueden interactuar mejor con los grupos polares de las macromoléculas que protegen y los azúcares de mayor peso molecular, con mayor  $T_g$ , favorecen la estabilización del producto debido a su capacidad de formar estados amorfos (Tymczyszyn *et al.*, 2011).

#### **4.3. Estado Vítreo y Almacenamiento**

Como se describió anteriormente, la alta viscosidad que caracteriza el estado vítreo estabiliza a las biomoléculas debido a la disminución de las velocidades de degradación (Buitink *et al.*; 2000; Kawai *et al.*; 2004).

La habilidad de los azúcares para formar una matriz vítrea mejora la estabilidad de los productos deshidratados durante el almacenamiento. En el caso particular de la preservación de cultivos bacterianos, el agregado de azúcares aumenta la  $T_g$  del sistema y por lo tanto permite una mejor supervivencia durante el almacenamiento bajo ciertas condiciones de humedad y temperatura (Higl *et al.*, 2007).

La estabilidad de los productos deshidratados a lo largo del tiempo es favorecida a temperaturas de almacenamiento ( $T$ ) por debajo de la  $T_g$ , cuanto más baja es  $T$ , más estable es la muestra. El parámetro  $T-T_g$  se utiliza por lo general para determinar la capacidad que tiene un determinado compuesto para ser un adecuado protector a lo largo del tiempo. Cuanto menor (más negativo) sea el valor de  $T-T_g$ , más estable será el producto (Higl *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2008).

## 5. PREBIÓTICOS

La primera referencia relacionada con el concepto de prebiótico data de 1954. Gyorgy informó que la N-acetil-glucosamina, un componente de la leche humana, promovía el crecimiento de una cepa de *Bifidobacterium*. En 1957, Petuely reconoció a la lactulosa como factor bifidus. Algunos años más tarde, en las décadas del setenta y ochenta del siglo XX, investigadores japoneses informaron que varios oligosacáridos no digeribles formaban parte de los factores bifidus. Esto abrió una nueva visión en el estudio de la microbiota intestinal. El término prebiótico fue definido por primera vez en 1995 (G R Gibson & Roberfroid, 1995).

Los prebióticos se han definido como "componentes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y / o actividad de un número limitado de bacterias en el colon, mejorando de esta manera la salud del huésped" (G R Gibson & Roberfroid, 1995). Por lo tanto, la ingestión de ingredientes alimentarios con propiedades prebióticas conocidas puede modular positivamente la microbiota intestinal (Marcel Roberfroid *et al.*, 2010).

Para que un ingrediente alimentario pueda considerarse como prebiótico existen diferentes requisitos, a saber:

a) debe resistir la hidrólisis y absorción en la parte superior del tracto gastrointestinal (TGI),

- b) debe promover selectivamente el crecimiento de bifidobacterias y / o lactobacilos en el colon y así modificar la microbiota intestinal a una composición más saludable,
- c) sus productos de fermentación deben inducir efectos beneficiosos para la salud del huésped y
- d) debe soportar las condiciones del proceso de elaboración del alimento del cual formen parte.

Desde un punto de vista químico, la mayoría de los prebióticos conocidos hasta ahora están constituidos por oligosacáridos no digeribles (NDO).

Si bien los efectos prebióticos han sido principalmente descritos para el colon, cada vez hay más evidencias de que también ejercen su efecto a otros niveles (Lenoir-Wijnkoop *et al.*, 2007). En este sentido, los prebióticos pueden estimular directamente la inmunidad, generar protección contra patógenos y facilitar la captación, absorción y metabolismo de minerales (Lenoir-Wijnkoop *et al.*, 2007).

La investigación de los genes responsables de la fermentación de los prebióticos por parte de los lactobacilos y las bifidobacterias, ha demostrado el papel de transportadores y enzimas específicas en la degradación de los prebióticos (Barrangou *et al.*, 2006; Saulnier *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008; Romanin *et al.*, 2010). La fermentación de prebióticos da lugar, entre otros productos, a la producción de ácido láctico y ácido acético que pueden ser posteriormente utilizados por otros microorganismos para sintetizar ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (*i.e.*: propiónico y butírico). Estos ácidos constituyen una fuente de energía para el huésped y además inhiben el crecimiento excesivo de bacterias putrefactivas.

Por otro lado, los prebióticos pueden facilitar la exclusión competitiva de patógenos potenciales y así modular el sistema inmune. Los AGCC son la principal fuente de energía para las células del colon, regulando su desarrollo y diferenciación. Además, tienen efectos tróficos sobre el epitelio intestinal, lo que es de gran importancia para la recuperación de la integridad del epitelio en caso de daño, reduciendo el riesgo de translocación bacteriana que puede ocurrir en situaciones donde la barrera intestinal está alterada (Lomax & Calder, 2009). En particular, el butirato de metilo (producto de fermentación de azúcares prebióticos) tiene la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de células de cáncer de colon (Pool-Zobel & Sauer, 2007).



Se ha sugerido que los prebióticos pueden actuar como ligandos de los receptores de patógenos en el intestino (Shoaf-Sweeney & Hutkins, 2009). Además, existe cierta evidencia de que algunos prebióticos pueden tener un efecto potencial en la reducción del riesgo de contraer enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Paul L H McSweeney & Fox, 2009).

Finalmente, el contenido de prebióticos en los alimentos puede ofrecer beneficios adicionales, tales como mejorar la absorción de minerales (calcio o magnesio) y contribuir a otros atributos físico-químicos de la matriz del alimento (Saulnier, Kolida, & Gibson, 2009; Delphine *et al.*, 2009).

### 5.1. Evaluación de los Prebióticos como Promotores de la Salud

Los efectos prebióticos de los oligosacáridos pueden ser influenciados por diferentes factores:

-**Composición:** están fundamentalmente constituidos por monosacáridos de glucosa, galactosa, xilosa y fructosa.

-**Enlaces glucosídicos:** son cruciales en los procesos de fermentación y digestión que se llevan a cabo en el intestino delgado.

-**Peso Molecular:** los prebióticos más comunes son oligosacáridos de bajo grado de polimerización (DP), a excepción de la inulina, cuyo efecto prebiótico es menos significativo que el de los oligosacáridos de bajo peso molecular.

En los adultos, la ingesta de prebióticos induce un aumento, entre 10 a 100 veces, de la población de bifidobacterias durante el período de ingestión. Sin embargo, la dosis diaria de prebióticos es determinada por la población basal de bifidobacterias intestinales. Cuando ésta es alta [ $\sim 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) / g de heces], el consumo de prebióticos no aumenta el número de las mismas (Crittenden & Playne, 2009). Además, el efecto prebiótico de los diferentes compuestos se hace difícil de comparar si no se utilizan herramientas cuantitativas.

Para facilitar esta comparación se ha definido un parámetro cuantitativo, conocido como índice prebiótico (PI), definido como “la relación entre el incremento en número absoluto del número de bifidobacterias y la dosis diaria de prebiótico ingerido” (Palframan *et al.*, 2003; Manderson *et al.*, 2005; Roberfroid, 2007). Palframan *et al.* (2003) propusieron otro parámetro que tiene en cuenta tanto el efecto estimulante

sobre las bacterias promotoras de la salud (bifidobacterias y lactobacilos), como el efecto depresivo sobre las bacterias putrefactivas (clostridios y bacteroides).

La siguiente ecuación describe el PI:

$$PI: Bf_t/Bf_0 - Bac_t/Bac_0 + Lac_t/Lac_0 - Cl_t/Cl_0 \quad (1)$$

Donde  $Bf_0$  y  $Bf_t$ ,  $Bac_0$  y  $Bac_t$ ,  $Lac_0$  y  $Lac_t$  y  $Cl_0$  y  $Cl_t$  corresponden al número de bifidobacterias, bacteroides, lactobacilos y clostridios, respectivamente, antes ( $_0$ ) y después ( $_t$ ) de la ingesta de un determinado prebiótico.

Esta ecuación considera un efecto positivo asociado al aumento de poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos, y un efecto negativo relacionado con el aumento de bacteroides y clostridios. La expresión del número de bacterias en términos relativos (referido a la población inicial) permite obtener un índice independiente de los niveles iniciales de cada población.

Empleando la ecuación de PI, Rycroft *et al.* (2001) compararon los perfiles de fermentación de prebióticos comercialmente disponibles, encontrando que los GOS y la lactulosa son los que tienen mayores efectos prebióticos. Los isomalto-oligosacáridos y oligosacáridos de soja también presentan valores altos de PI, mientras que el PI de FOS e inulina es considerablemente menor que el de los GOS.

Por último, hay que destacar que el PI también representa una herramienta útil en el desarrollo de nuevos prebióticos. Además, este parámetro cuantitativo puede facilitar el desarrollo y producción de prebióticos más potentes y activos, a dosis más bajas (Palframan *et al.*, 2003).

## 5.2. Síntesis de Prebióticos

En principio, cualquier alimento que alcanza el colon es un prebiótico potencial. Sin embargo, los oligosacáridos no digeribles (NDOs) son los que mejor cumplen los requisitos para ser considerados como tales (Mussatto & Mancilha, 2007; Roberfroid & Slavin, 2000). Más allá de su naturaleza prebiótica, estos compuestos están dotados de otras propiedades interesantes como ingredientes alimentarios, es decir, no son cariogénicos, presentan bajo valor calórico y además se han asociado con la reducción de riesgos de contraer enfermedades infecciosas y diarreas, a través de la estimulación del sistema inmune del hospedador (de Vrese & Marteau, 2007). Dentro de los NDOs, hay una amplia variedad de compuestos que comparten calificaciones

prebióticas. Ellos incluyen: inulina (Roberfroid, 2007), fructo-oligosacáridos (Biedrzycka & Bielecka, 2004), xilo-oligosacáridos (Bakier, 2009; Maalej-Achouri *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2014), isomalto-oligosacáridos (Nakakuki, 2002), galacto-oligosacáridos (Splechna *et al.*, 2006; Gibson & Rastall, 2012) que incluyen galacto-oligosacáridos de soja (Espinosa-Martos & Rupérez, 2006; Gibson & Rastall, 2012), lactulosa (Kim *et al.*, 2006), lactitol (Piva *et al.*, 1996; Kummel & Broks, 2001) y lactosucrosa (Ohkusa *et al.*, 1995; Playne & Crittenden, 2004), y algunos otros como genti-oligosacáridos (Mussatto & Mancilha, 2007; Crittenden & Playne, 2009), ácido lactobiónico (Saarela *et al.*, 2003) y tagatosa (Schaafsma, 2008). Se ha publicado un trabajo completo sobre los efectos beneficiosos y los posibles riesgos de los NDOs como potenciales prebióticos (Crittenden & Playne, 2009). Entre ellos, los GOS, FOS y la lactulosa han demostrado de manera concluyente sus características prebióticas (Gibson *et al.*, 2004). Rycroft *et al.* (2001) realizaron un exhaustivo estudio comparativo sobre la eficacia prebiótica de los NDOs. La mayoría se producen por síntesis (ya sea química o enzimática). A continuación se describen los más relevantes en términos de potencial prebiótico.

### **5.2.1. Fructo-oligosacáridos (FOS)**

Los FOS son oligosacáridos de cadena corta compuestos por unidades de fructosa unidas por enlaces (2→1)- $\beta$ -glucosídico, y una sola unidad D-glucosilo en el extremo no reductor de la cadena. En su mayoría están formados por una mezcla del trisacárido 1-kestosa, tetrasacáridos, nistosa y el pentasacárido fructosilnistosa (Campbell *et al.*, 1997). Si bien los FOS se han definido como prebióticos, su índice de prebiótico es significativamente menor que el de los GOS y la lactulosa (Rycroft *et al.*, 2001).

La producción industrial de FOS se puede realizar por dos vías. Por un lado, a través de la hidrólisis de inulina, donde ésta se obtiene a partir de raíces de plantas (por extracción con agua caliente) y luego es sometida a hidrólisis enzimática parcial con endo-inulinasa (Franck, 2002). Por el otro, los FOS pueden obtenerse por transfructosilación enzimática de la sacarosa utilizando transferasas de origen bacteriano o fúngico (Sangeetha *et al.*, 2005) o bien,  $\beta$ -fructofuranosidasa fúngica (Nguyen *et al.*, 1999). En general, los FOS de mayor peso molecular son producidos por hidrólisis de la inulina, mientras que los de cadena corta se obtienen por síntesis

enzimática. Los FOS de cadena corta tienen un mayor efecto prebiótico (Biedrzycka & Bielecka, 2004) de modo que, si el propósito es utilizarlos con ese fin, la síntesis enzimática con transferasas o  $\beta$ -fructofuranosidas es el método de elección.

Se han propuesto varias estrategias para la síntesis enzimática de FOS a partir de sacarosa. Los procesos industriales más utilizados son la producción discontinua con enzimas libres (en *batch*) (Yun, 1996); o bien, la síntesis continua llevada a cabo en reactores (ya sea con enzimas o células inmovilizadas) (Biedrzycka & Bielecka, 2004). Los FOS comerciales son productos bastante impuros, que contienen al menos 45% de glucosa, fructosa y sacarosa residual. Las proporciones de 1-kestosa (DP3), nistosa (DP4) y fructosilnistosa (DP5) son variables, dependiendo de la fuente de enzima usada para la síntesis. Un producto típico contiene 25-30% (w/w) de 1-kestosa, 10-15% (w/w) de nistosa y 5-10% (w/w) de fructosilnistosa (Casci & Rastall, 2006). La eliminación selectiva de monosacáridos se ha logrado en columnas de relleno de lecho sólido de zeolita (Kuhn & Filho, 2010) y carbón activado (Nobre *et al.*, 2012). Los jarabes de FOS con elevada pureza (98%) se obtienen mediante la eliminación de glucosa residual, empleando una mezcla enzimática con glucosa-oxidasa (Sheu *et al.*, 2001). La eliminación simultánea de glucosa, fructosa y sacarosa se ha intentado mediante el tratamiento de FOS comerciales con células inmovilizadas de *Zymomonasmobilis*, lo que reduce significativamente la concentración de monosacáridos (Crittenden & Playne, 2002). Entre los FOS comerciales se encuentran el *Neosugar* japonés y el *Actilight* americano, ambos producidos por síntesis enzimática con enzimas derivadas de *Aspergillus niger* (Casci & Rastall, 2006). El diseño e impacto económico de la producción industrial de FOS han sido descritos por Vaňková *et al.* (2008). Más allá de su condición prebiótica, los FOS son anti-cancerígenos, controlan la diabetes, reducen la uremia y ejercen un efecto sistémico en el metabolismo de los lípidos hepáticos. Se utilizan en diferentes productos alimenticios como agentes endulzantes no calóricos y en mezclas con inulina para mejorar las propiedades organolépticas y funcionales de los yogures (Sangeetha *et al.*, 2005). En relación a sus propiedades estrictamente prebióticas, los FOS están siendo utilizados en mezclas con GOS para la formulación de leches especiales para bebés y personas mayores.

### **5.2.2. Galacto-oligosacáridos Derivados de Lactosa**

La lactosa ( $\beta$ -D-galactosil-D-glucosa) es un disacárido formado por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa. Constituye la porción de carbohidratos más abundante de la leche (su única fuente natural). La lactosa y los productos derivados de ella están presentes en el suero de leche (lactosuero) (Marwaha & Kennedy, 2007; Zadow, 1984).

El lactosuero es un efluente de la industria quesera que contiene aproximadamente 80% de lactosa (en base seca) y 10% de proteínas (en base seca), representadas principalmente por la  $\alpha$ -lactoglobulina (58%) y la  $\beta$ -lactoglobulina (13%). Su procesamiento como residuo es muy caro debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno [(DBO) (35 000 mg/L)]. La comparación de este valor con la DBO de aguas cloacales, por ejemplo (120 a 300 mg/L) refleja la magnitud del problema que representan estos efluentes. Otra comparación interesante es considerar el poder contaminante de un individuo (70 000 mg/día de DBO) con el del suero de quesería (35000 mg/L DBO). Con un volumen de 1 000 000 litros diarios de suero, el grado de contaminación de una fábrica equivaldría al de una población de 500 000 habitantes, dando así una idea clara de la magnitud de la contaminación ambiental que puede producir una sola fábrica si no se utiliza ese efluente (Canale, 1971). Si bien el lactosuero deshidratado constituye un producto valioso, su mercado es muy inestable por lo que el desarrollo de una plataforma industrial para su uso es altamente deseable. Debido a su elevado valor nutricional, las proteínas del lactosuero han sido usadas como sustrato para la obtención de aislados y concentrados proteicos para la preparación de yogures y otros productos lácteos, productos de confitería, fórmulas infantiles etc. La utilización de las proteínas de suero deja un nuevo efluente que es el **permeado de suero**, con alto contenido de lactosa, y altamente contaminante. El aprovechamiento del permeado de suero contribuye a reducir el problema de contaminación ambiental valorizando excedentes de suero que económicamente no son factibles de secar (Andres Illanes, 2011).

El permeado de suero puede ser empleado para producir jarabes edulcorantes mediante hidrólisis e isomerización enzimáticas. Debido a su elevado contenido de lactosa también puede usarse como materia prima para la producción de oligosacáridos no digeribles derivados de lactosa (NDOs) potencialmente prebióticos, tales como lactitol, ácido lactobiónico, lactosacarosa, tagatosa, lactulosa y GOS. De la

lista anterior, sólo los GOS y la lactulosa se han considerado prebióticos eficaces (Barreteau *et al.*, 2006). Los demás, a pesar de no cumplir con todos los requisitos para ser considerados como prebióticos, son reconocidos como NDOs promotores de la salud y muchos de ellos también se comercializan para mejorar las propiedades organolépticas y funcionales de los alimentos que los contienen y, en algunos casos, de productos farmacéuticos. Los principales NDOs derivados de la lactosa se describen a continuación. Algunos de ellos son producidos por catálisis enzimática, mientras que otros por síntesis química (Illanes, 2011).

### **5.2.3. Lactitol**

El lactitol es un alcohol de azúcar (4- $\beta$ -galactopiranosil-sorbitol) producido por hidrogenación química de la lactosa (Gänzle *et al.*, 2008). La mayor parte del lactitol es metabolizado por la microbiota del colon dando origen a ácidos grasos de cadena corta (Dills, 1989), razón por la cual puede considerarse como prebiótico. El lactitol también ha sido utilizado como una alternativa a la lactulosa para el tratamiento de encefalopatía hepática (Als-Nielsen *et al.*, 2004) y como edulcorante no calórico en diabéticos (Young, 2006).

### **5.2.4. Ácido Lactobiónico**

El ácido lactobiónico es un ácido de azúcar (4-O- $\beta$ -galactopiranosil-D-gluconato) producido por oxidación química de lactosa, aunque también se puede sintetizar por oxidorreducción de glucosa-fructosa (Satory *et al.*, 1997). Si bien es resistente a las enzimas digestivas, no se absorbe en el intestino delgado y es fermentado en el colon, su efecto prebiótico no se ha demostrado de manera concluyente (Saarela *et al.*, 2003). También se utiliza como potente agente quelante en suplementos de calcio, como secuestrante en detergentes y también en la conservación de órganos para transplantes (Gänzle *et al.*, 2008).

### **5.2.5. Lactosacarosa**

La lactosacarosa es un trisacárido ( $\beta$ -D-fructofuranosil 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil- $\alpha$ -D-gluco-piranosido) obtenido a partir de la lactosa por transfructosilación. Para su síntesis se puede utilizar transfructosiltransferasas bacterianas o fúngicas (Li *et al.*,

2009; Pilgrim *et al.*, 2014), o bien, utilizar células que presentan estas enzimas. A pesar de que presenta un efecto bifidogénico e inhibitorio del crecimiento de clostridios, todavía no cumple con todos los requisitos de un prebiótico (Gänzle *et al.*, 2008).

#### **5.2.6. Tagatosa**

La tagatosa es un isómero de la galactosa que se obtiene por hidrólisis de la lactosa (glucosa y galactosa) y posterior separación de la glucosa. La galactosa resultante de esta hidrólisis es luego isomerizada a tagatosa por acción de la arabinosa isomerasa (P. Kim *et al.*, 2001; Kim, 2004; Ryu *et al.*, 2003). La tagatosa resiste la hidrólisis y absorción en la parte superior del TGI, y es fermentada en el colon, por lo que se la considera un candidato a prebiótico (Bertelsen *et al.*, 1999). La tagatosa ya recibió el estatus GRAS (Generally recognized as safe) y está siendo utilizada como edulcorante de bajas calorías (Levin, 2002).

#### **5.2.7. Lactulosa**

La lactulosa es un disacárido (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-fructosa) ausente en la naturaleza, aunque es producido por isomerización de la lactosa durante el tratamiento térmico de los alimentos que la contienen (Marconi *et al.*, 2004). También se produce a partir de la lactosa por isomerización química en condiciones alcalinas (Aider & Halleux, 2007; Zokaee *et al.*, 2002). Sin embargo, la producción de enzimática de lactulosa utilizando  $\beta$ -galactosidasa y fructosa como aceptor de galactosil, constituye un proceso eficiente (mayor conversión y menor consumo energético) y más ecológico (efluentes menos contaminantes) (Guerrero *et al.*, 2011). Recientemente, Him & Oh (2012) han sintetizado lactulosa utilizando celobiosa-2-epimerasa de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, lo que representa un significativo adelanto para la síntesis enzimática a nivel industrial.

La lactulosa se destaca entre los NDOs y ha sido considerada como un prebiótico a pesar de que su efecto bifidogénico es menos pronunciado que el de los GOS (Gänzle *et al.*, 2008). Más allá de su condición prebiótica, la lactulosa se utiliza como laxante para el tratamiento de estreñimiento agudo y crónico (Tamura *et al.*, 1993) y para el tratamiento de la hiperamonemia y encefalopatía hepática crónica (Als-Nielsen *et al.*, 2004; Crittenden & Playne 2009). Recientemente se ha realizado un examen

exhaustivo de las propiedades medicinales de la lactulosa, así como su condición prebiótica (Schuster-Wolff-Bühning *et al.*, 2010). La lactulosa es además, más dulce y soluble que la lactosa, resultando efectiva como ingrediente en panaderías y confiterías (Mizota *et al.*, 1987).

#### **5.2.8. Galacto-oligosacáridos (GOS)**

Los GOS son NDOs constituidos por un número variable de monosacáridos de galactosa (por lo general de dos a diez) y una molécula de glucosa terminal, unidos principalmente por enlaces  $\beta$ 1-4 y  $\beta$ 1-6 (Casci & Rastall, 2006; Vera *et al.*, 2011). El efecto prebiótico de los GOS se asocia fundamentalmente a los trisacáridos (DP3) y tetrasacáridos (DP4). A diferencia de otros prebióticos derivados de la lactosa, los GOS se producen comercialmente mediante biocatálisis utilizando  $\beta$ -galactosidasas de origen fúngico y bacteriano (Gänzle *et al.*, 2008), un método considerablemente más simple que la engorrosa síntesis química (Monsan & Paul, 1995; Sears, 2001). Actualmente un gran número de empresas japonesas y europeas producen y comercializan GOS utilizando tecnologías enzimáticas, algunas de las más relevantes son Yakult Honsha Co Ltd ([www.yakult.co.jp](http://www.yakult.co.jp)) y Nissin Azúcar Manufacturing Co Ltd ([www.nisin-sugar.co.jp](http://www.nisin-sugar.co.jp)) en Japón, y Friesland Foods ([www.borculodomo.com](http://www.borculodomo.com)) en los Países Bajos. Las enzimas más adecuadas para la producción industrial de GOS son las  $\beta$ -galactosidasas, obtenidas de hongos del género *Aspergillus* y de levaduras del género *Kluyeromyces*, ambos con estatus GRAS (Illanes *et al.*, 1993). También han sido propuestas cepas de microorganismos termófilos y psicrófilos (Sheik Asraf & Gunasekaran, 2010) y varios lactobacilos probióticos (Roy *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2011) como productores de  $\beta$ -galactosidasas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estas enzimas son utilizadas por su capacidad hidrolítica. Esto significa que un punto a considerar es cuál es su eficiencia para catalizar reacciones reversas (de síntesis), como es el caso de la transglicosilación.

En este sentido, las  $\beta$ -galactosidasas de *Aspergillus oryzae* (Nedim Albayrak & Yang, 2002; Guerrero *et al.*, 2011) y *Bacillus circulans* (Panesar *et al.*, 2006), son en la actualidad, la mejor opción para la síntesis de GOS. Los rendimientos en la producción de GOS a partir de lactosa, utilizando la enzima de *A. oryzae* son los mejores. Además,



se la considera la mejor opción por su bajo costo, estabilidad y excelente perfil de GOS producido.

La inmovilización de  $\beta$ -galactosidasas permite un aumento significativo de su estabilidad, lo que mejora la producción industrial de GOS (Albayrak & Yang, 2002; Sakai *et al.*, 2008; Huerta *et al.*, 2011). Sin embargo, la inmovilización no resuelve el problema de la pureza del producto, por lo que la síntesis con  $\beta$ -galactosidasa inmovilizada no es una buena alternativa respecto al uso de la enzima disuelta en el medio de reacción. Además, la optimización del uso del biocatalizador no es un paso crítico en el costo de la síntesis. Por el contrario, el procesamiento posterior del producto sí lo es. De hecho, los GOS comerciales son bastante impuros (<50% de sólidos). En efecto, la composición, tipo de enlace y tamaño molecular del producto varía significativamente según el origen de la enzima (Casci & Rastall, 2006). En función del uso que se les quiera dar a los GOS, la glucosa y la galactosa residual son las principales impurezas a remover. Actualmente se emplean técnicas cromatográficas para la purificación de GOS, aunque se trata de métodos caros y difíciles de escalar (Sanz *et al.*, 2002; Gosling *et al.*, 2010). Se han propuesto otras opciones de purificación como la fermentación selectiva (Cheng *et al.*, 2006; Z. Li *et al.*, 2008), la nanofiltración (Goulas *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2009; Botelho-Cunha *et al.*, 2010) y la purificación *in situ* utilizando técnicas de adsorción (Boon *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2009) o precipitación (Sen *et al.*, 2011).

La condición prebiótica de los GOS está fuera de toda duda. Sus efectos beneficiosos sobre la salud se han demostrado en ensayos *in vitro* (Palframan *et al.*, 2003) e *in vivo*, en modelos animales (Djouzi & Andlueux, 1997), humanos adultos (Bouhnik *et al.*, 1997) y en lactantes (Ben *et al.*, 2004).

Los GOS son particularmente adecuados como prebióticos en leche y productos lácteos: son componentes naturales de la leche materna por lo que su adición a leches maternizadas (Savino *et al.*, 2007) y yogures, como mezcla prebiótica o simbiótica con probióticos, es una práctica muy aplicada en Japón y Europa (Lamoureux *et al.*, 2002; Sairanen *et al.*, 2007).

Los GOS son ligeramente dulces (40% en relación a la sacarosa) y bastante estables, incluso a altas temperaturas y pHs bajos (Voragen, 1998). Más allá de su condición prebiótica, los GOS son importantes ingredientes en alimentos funcionales: no son

cariogénicos, de excelente sabor, resistentes a ácidos y su bajo dulzor los hacen atractivos como edulcorantes funcionales en productos de reducido contenido calórico (Sako *et al.*, 1999; Splechtna *et al.*, 2006).

Como consecuencia, el papel de los GOS resulta de suma importancia para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas, nutricionales y la capacidad protectora de los GOS (Ver sección 1, apartado 4.2), su interacción con los probióticos puede ser útil para el desarrollo de productos simbióticos comerciales, con lo que ambos (GOS y probióticos) podrían ser incorporados en diferentes alimentos como la leche maternizada.

## **6. ALIMENTOS SIMBIÓTICOS**

El término “simbiótico” se refiere a un producto alimenticio que contiene, en forma combinada, probióticos y prebióticos, los cuales actúan en forma sinérgica para modular la microbiota intestinal del consumidor e impactar positivamente sobre su salud (Sekhon & Jairath, 2010).

Existen evidencias de que los prebióticos podrían actuar como sustrato específico de los microorganismos probióticos, mejorando la supervivencia y actividad de los mismos (Gibson & Roberfroid, 1995; Nagpal & Kaur, 2011). Por lo tanto, esta combinación hace que el prebiótico se encuentre fácilmente disponible para su fermentación.

Para el ser humano, el paradigma del alimento simbiótico es la leche materna, la cual contiene tanto lactobacilos y bifidobacterias como oligosacáridos y nucleótidos (probióticos y prebióticos). Con el objetivo de acercarse más a la composición de la leche materna, las fórmulas infantiles han ido incorporando probióticos, prebióticos y a veces mezclas de ambos (simbióticos) en su formulación (Brunser *et al.*, 2006; Mugambi *et al.*, 2012).

Un factor importante en el momento de desarrollar un simbiótico es determinar la compatibilidad entre la cepa probiótica y el tipo de prebiótico utilizado. También es importante tener en cuenta que el componente prebiótico puede ser incorporado con más facilidad a un gran número de matrices alimenticias mientras que el componente probiótico, por ser un microorganismo vivo, es un factor limitante al uso de simbiótico

en dichas matrices. Los principales alimentos con simbióticos son productos lácteos, ya que la leche es la matriz más adecuada y fácil de usar para los probióticos que, en su mayoría, son bacterias lácticas (Puccio *et al.*, 2007; Sekhon & Jairath, 2010; Mugambi *et al.*, 2012).

## 7. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

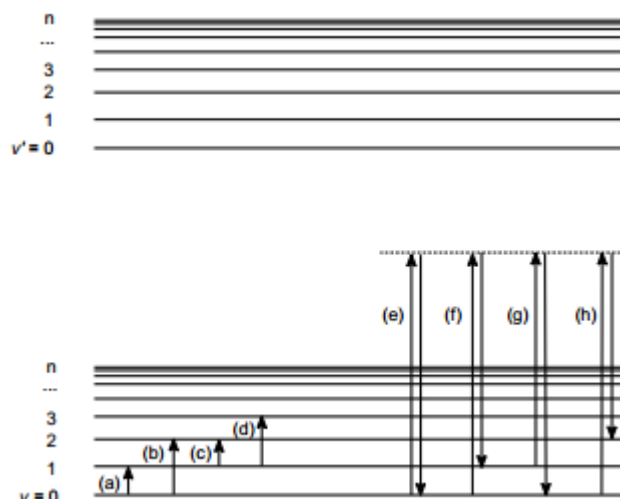
Las técnicas de espectroscopia vibracional, que incluyen tanto la espectroscopía Raman como la de infrarrojo, son herramientas muy eficaces para el estudio de la estructura y la reactividad molecular, tanto en moléculas de pequeña dimensión como en biomoléculas más complejas. Un espectro de infrarrojo o de Raman contiene información detallada sobre la naturaleza del sistema en estudio, su composición, las interacciones intra e intermoleculares más importantes que en él operan, la estereoquímica, etc. Asimismo, su evolución con el tiempo permite, en muchos casos, monitorear procesos y reacciones químicas en tiempo real y extraer información útil para establecer los mecanismos involucrados (Schultz & Naumann, 1991; Naumann *et al.*, 1991; Cervera *et al.*, 2009; Cámara-Martos *et al.*, 2011).

### 7.1. Absorción en el Infrarrojo

El espectro es un gráfico que muestra la cantidad de radiación transmitida, reflejada o difundida por una muestra, en función de la energía (E) o de una magnitud proporcional a ésta. En espectroscopia vibracional es usual expresar la energía de la radiación en números de onda ( $\tilde{\nu}$ ), definido como la inversa de la longitud de onda

( $\lambda$ ). Como la E está definida como:  $E = h\nu$  y  $\nu = \frac{c}{\lambda}$  siendo  $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$  entonces  $E = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu}$  (2)

Donde E es la energía,  $\lambda$  es la longitud de onda,  $\nu$  es la frecuencia,  $\tilde{\nu}$  el número de onda,  $h$  es la constante de Planck y  $c$ , la velocidad de la luz



**Figura 2:** Diagrama de niveles de energía donde se muestran diferentes tipos de transiciones observables por espectroscopía de IR (a: transición fundamental; b: 1° *overtone*; c, d: transiciones calientes) y espectroscopía de dispersión Raman (e: dispersión de Rayleigh; f: dispersión de Raman, línea de Stokes correspondiente a la transición vibracional fundamental; g: dispersión de Raman, línea de anti-Stokes correspondiente al 1° *overtone*); h: dispersión de Raman, línea de Stokes correspondiente al 1° *overtone*).

En la **Figura 2** se muestran dos conjuntos de líneas que representan los niveles vibracionales del estado electrónico fundamental y del primer estado electrónico excitado, siendo  $v$  y  $v'$  los respectivos números cuánticos vibracionales.

En espectroscopía de IR las transiciones involucran sólo un fotón, que se obtiene del haz de radiación IR policromática que incide en la molécula. La absorción infrarroja está asociada a excitaciones vibracionales y rotacionales, sin que se produzcan transiciones electrónicas (**Figura 2**). Así, los espectros IR se originan a partir de transiciones entre niveles vibracionales de la molécula en el estado electrónico fundamental ( $v_{0 \rightarrow 1}$ , **Figura 2**) y son, por lo general, observados como espectros de absorción en la región del infrarrojo. Desde un punto de vista cuántico, una vibración es activa en el IR cuando existe una variación del momento dipolar de la molécula respecto de la coordenada del modo de vibración.

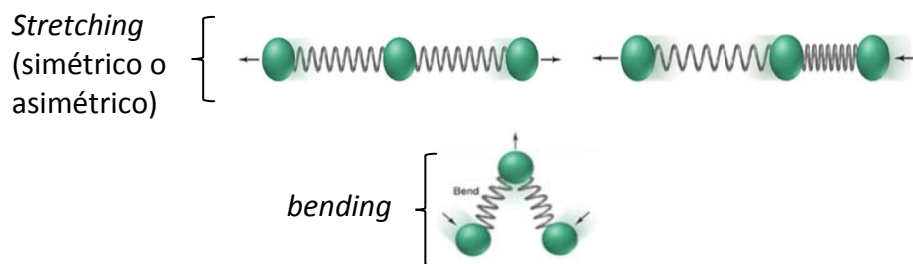
En el caso de la espectroscopia Raman, están involucrados dos fotones: el primero excita vibracionalmente la molécula a un nivel vibracional virtual (línea discontinua en

la **Figura 2**), y el segundo es emitido por la molécula, con la misma energía que el primero en el caso de la difusión de Rayleigh (dispersión elástica), o con energías diferentes, en el caso de la dispersión Raman (dispersión inelástica). En general, el primer fotón se obtiene de un láser. En el caso de la dispersión Raman, las diferencias de energía entre el fotón incidente y los emitidos corresponden a diferencias de energía entre niveles vibracionales de la molécula, es decir, la luz incidente induce un cambio en la polarizabilidad molecular que es una propiedad relacionada con la tendencia de un enlace para deformarse (Long, 2002). A su vez la dispersión Raman contiene líneas Stokes y anti-Stokes; sus frecuencias corresponden a la suma y diferencia de las frecuencias vibracionales moleculares permitidas. Como se muestra en la **Figura 2**, la luz dispersada pierde una energía equivalente a la energía dada a las vibraciones moleculares (efecto Raman Stokes). Si la molécula se encontraba inicialmente en un estado excitado, es posible que la luz dispersada tenga mayor energía que la incidente (efecto Raman anti-Stokes), siempre y cuando el sistema decaiga a un estado de menor energía que la del estado inicial (Pelletier, 1999).

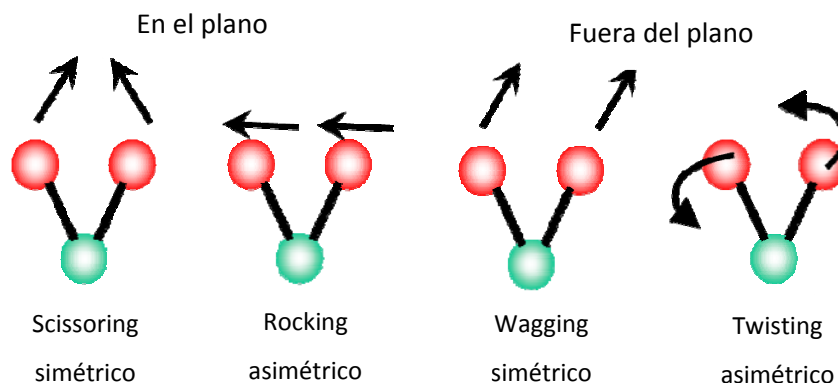
De lo explicado se desprende que los espectros Raman surgen de la dispersión inelástica de la luz (transiciones Stokes y anti-Stokes). Es importante señalar que el efecto Raman ocurre espontáneamente en 1 de cada  $10^7$  fotones incidentes, lo cual refleja la debilidad intrínseca de las bandas. Es por ello que los equipos deben ser capaces de incrementar la intensidad de las bandas, de manera tal que permitan su análisis.

## 7.2. Modos Vibracionales

Una molécula aislada tiene  $3N-6$  modos vibracionales (o  $3N-5$ , si es lineal), asociados a las transiciones  $v_{0 \rightarrow 1}$  ( $v$ = número cuántico vibracional; **Figura 2**), donde  $N$  representa el número de átomos de la molécula. Estos modos normales son por tanto movimientos particulares del conjunto de átomos que conforman la molécula, los cuales son independientes unos de otros y tienen una frecuencia de vibración característica. Aunque estos movimientos sean colectivos, en muchos casos es posible identificar la vibración como principalmente de tipo *stretching* o de tipo *bending* (**Figura 3**).



Otros modos vibracionales:



**Figura 3:** Esquema simplificado de los principales modos vibracionales

El número máximo de modos vibracionales *stretching* para un enlace dado está dado por el número de enlaces en la molécula. Así, en el caso del H<sub>2</sub>O, existen dos enlaces O-H que dan lugar a dos modos *stretching*  $\nu(\text{O-H})$ . Sin embargo, los dos enlaces no vibran de forma independiente, sino que sus movimientos se acoplan y vibran en fase o en oposición de fase, dando lugar a un modo simétrico y otro asimétrico de las vibraciones ( $\nu_1 = 3652 \text{ cm}^{-1}$  y  $\nu_3 = 3756 \text{ cm}^{-1}$ ) con números de onda similares porque ambos modos suponen el estiramiento de los enlaces O-H. De forma análoga, sólo un ángulo define esta molécula y genera un único modo vibracional *bending* para el H<sub>2</sub>O ( $\nu_2 = 1595 \text{ cm}^{-1}$ ).

Es importante mencionar que a la hora de estudiar los modos vibracionales de una molécula, las espectroscopias Raman e IR son técnicas complementarias. Por ejemplo, la banda correspondiente al *stretching* simétrico del CO<sub>2</sub> sólo es observable en el Raman (debido al cambio en la polarizabilidad), mientras que las bandas correspondientes al *bending* y *stretching* asimétrico sólo lo son en el IR (debido a la variación del momento dipolar). Teniendo en cuenta que sólo los modos vibracionales

que modifican el momento dipolar pueden interactuar con la luz, el *stretching* asimétrico del CO<sub>2</sub> no es activo en el IR porque los momentos dipolares se anulan.

En espectroscopía vibracional, la **Regla de exclusión mutua** indica que si una molécula tiene un centro de simetría, entonces ningún modo vibracional puede ser activo en el Raman e IR al mismo tiempo. Los sistemas biológicos están constituidos por moléculas poliatómicas y por lo tanto, son mucho más complejos que en moléculas simples. Por esta razón, la casi totalidad de estas biomoléculas es asimétrica y por lo tanto, las 3N-6 vibraciones fundamentales son activas tanto en espectroscopia IR como en espectroscopia Raman, originando bandas en los correspondientes espectros. Asimismo, pueden ocurrir transiciones de orden superior (*overtones* y modos de combinación) y vibraciones correspondientes a transiciones cuyo estado inicial es un estado vibracional excitado (transiciones calientes -ver **Figura 2-**), las cuales originan señales espectroscópicas, en general de baja intensidad, aumentando así el número de bandas observadas en los espectros.

Todas estas características convierten a los espectros IR y Raman de sistemas biológicos en conjuntos de bandas complejas y solapadas que constituyen verdaderas huellas digitales y que contienen una gran cantidad de información, pero que requieren un análisis adecuado para la obtención de resultados confiables.

### 7.3. Aspecto de las Bandas

El aspecto de las bandas observadas en los espectros es variable y depende de diferentes factores. Sus intensidades dependen del número de moléculas que interactúa con la radiación usada para obtener el espectro y de la probabilidad intrínseca de las transiciones correspondientes. En espectroscopia IR, eso está relacionado con la magnitud de la variación del momento dipolar de la molécula ( $\mu$ ) y, en espectroscopia Raman, con la variación del tensor polarizabilidad molecular ( $\alpha$ ):

$$I_k(IR) = \frac{\pi N_A g_k}{3000c^2 \times 2.302581} |\partial\mu/\partial Q_k|^2 \quad (3)$$

$$\partial_k(R) = \frac{2^7 \pi^5 g_k}{3^2 c^4} (v_0 \pm v_k)^4 |\partial\alpha/\partial Q_k|^2 \quad (4)$$

En la ecuación (2)  $I_k(\mathbf{IR})$  es la intensidad de la señal asociada a la coordenada vibracional  $Q_k$  en el espectro IR,  $N_A$  es el número de Avogadro ( $\text{mol}^{-1}$ ),  $c$  la velocidad de la luz ( $\text{cm s}^{-1}$ ),  $g_k$ , el grado de degeneración del nivel vibracional inicial y  $\partial\mu/\partial Q_k$ , la derivada del momento dipolar en relación a la coordenada vibracional  $Q_k$  ( $\text{cm}^{3/2} \text{s}^{-1}$ ). En el sistema de unidades internacional,  $I_k(\mathbf{IR})$  se expresa en  $\text{cm}^{-2} \text{L mol}^{-1} = 10 \text{ m mol}^{-1}$ , a pesar de que es más común usar la unidad  $\text{km mol}^{-1}$ . Experimentalmente  $I_k(\mathbf{IR})$  se puede obtener de forma aproximada a través de la ley de Lambert-Beer:

$$I_k(\mathbf{IR}) = \frac{1}{cL} \int \log(I_0/I) dv \quad (5)$$

Donde  $C$  y  $L$  representan la concentración de la muestra ( $\text{mol L}^{-1}$ ) y el camino óptico (cm), respectivamente, e  $I_0/I$ , la razón de las intensidades de la radiación incidente y transmitida. La integral se extiende a todo el dominio de número de onda ( $\nu$ ) en el cual la absorción es significativa.

En la ecuación (3),  $\partial_k(\mathbf{R})$  es la sección eficaz de la dispersión Raman asociada a la coordenada  $Q_k$  y  $\nu_0$ , el número de onda de la radiación láser excitadora. El signo positivo dentro de los paréntesis se aplica para transiciones anti-Stokes y el negativo, para transiciones Stokes (**Figura 2**). La intensidad integrada de una banda observada en un espectro R es aproximadamente proporcional a la concentración molecular y se puede obtener experimentalmente a partir de:

$$I_k(\mathbf{R}) = \int I_0/I dv \quad (6)$$

Donde  $I_0$  e  $I$  son las intensidades de la radiación excitadora y dispersada por la muestra.

El hecho de que la intensidad de las bandas de un espectro IR depende de la variación del momento dipolar y, en espectroscopia Raman, de la variación del tensor polarizabilidad molecular, explica la usual mayor intensidad de las bandas asociadas a vibraciones de grupos más polares (por ejemplo el grupo carbonilo, C=O) en



espectroscopia IR. Por su parte, en espectroscopia Raman, los modos vibracionales correspondientes a elementos de número atómico elevado (S, Cl, Br) son normalmente los más intensos.

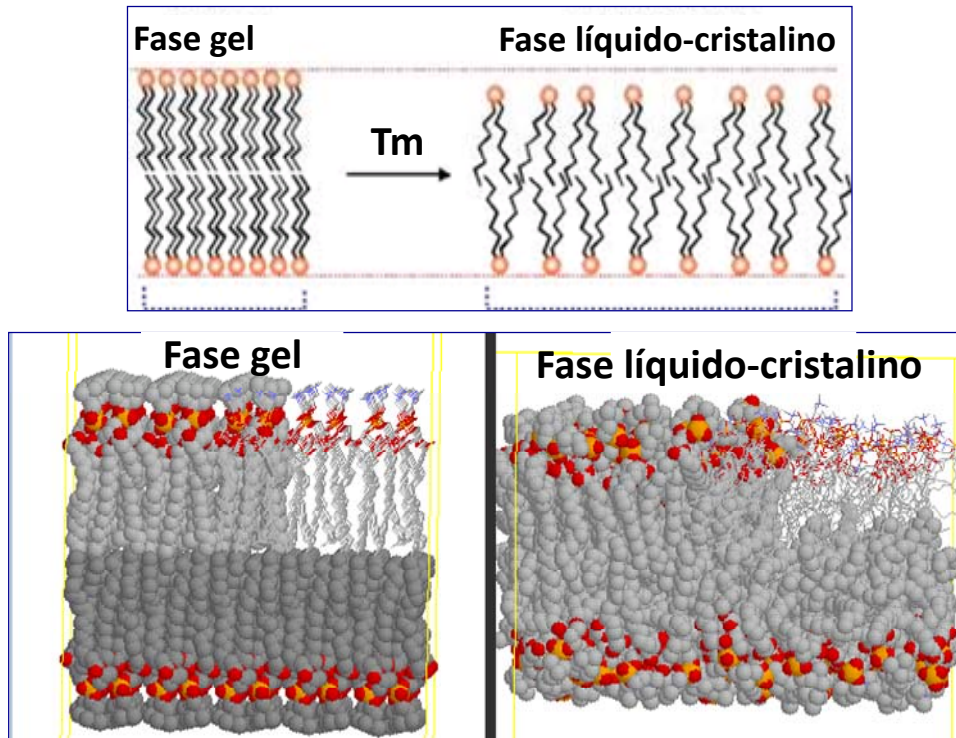
El valor de energía correspondiente al máximo de una banda se relaciona directamente con la energía de transición vibracional. Para la mayoría de las transiciones fundamentales, ese valor es del orden de magnitud de la energía de la radiación IR, es decir, entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  (infrarrojo medio). Por debajo de 400  $\text{cm}^{-1}$  (IR lejano; 400-10  $\text{cm}^{-1}$ ) se observan vibraciones fundamentales de más baja energía. Por encima de los 4000  $\text{cm}^{-1}$ , en la región normalmente designada por infrarrojo cercano (NIR: near infrared; 12800-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), se pueden observar *overtones* y modos de combinación que involucran por lo menos una coordenada vibracional cuya transición fundamental ocurre por arriba de 2000  $\text{cm}^{-1}$  (Skoog *et al.*, 2001).

#### **7.4. Espectroscopía Vibracional en el Estudio de Biomoléculas**

##### **7.4.1. Lípidos**

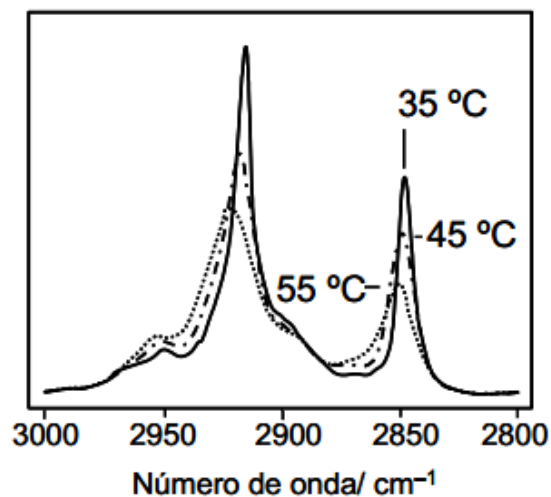
La utilización de la espectroscopia vibracional en el estudio de lípidos se ha centrado en la caracterización de la estructura de las fases que las membranas lipídicas pueden exhibir, y en el estudio de los mecanismos de transición de fases.

Tal como se indicó en la sección 3.1 (Daño a membranas, página 23), los lípidos de membrana pueden existir en fase gel o fase líquido-cristalino. A nivel estructural, las diferencias entre ambas fases están asociadas a la conformación de las cadenas hidrocarbonadas. En estado gel (por debajo de la  $T_m$ ), los ángulos dihedros definidos en torno a los enlaces C-C de las cadenas hidrocarbonadas se encuentran en conformación *trans*. En esta conformación, el sistema está relativamente ordenado, existe poca movilidad lateral de lípidos, y éstos ocupan poca área lateral en el plano de la membrana. En la fase líquido-cristalino (por encima de la  $T_m$ ) dichos ángulos dihedros se encuentran predominantemente en conformación *gauche* ( $60^\circ$ ), aumentan los grados de libertad del sistema, aumenta la fluidez, el área y la movilidad lateral de lípidos (**Figura 4**) (Garidel *et al.*, 2000; Szalontai *et al.*, 2000).



**Figura 4:** Esquema de la transición de fases de los lípidos de membrana.

En términos espectroscópicos, la transición de fases se caracteriza por un ensanchamiento de las bandas y la reducción general de las intensidades (**Figura 5**).



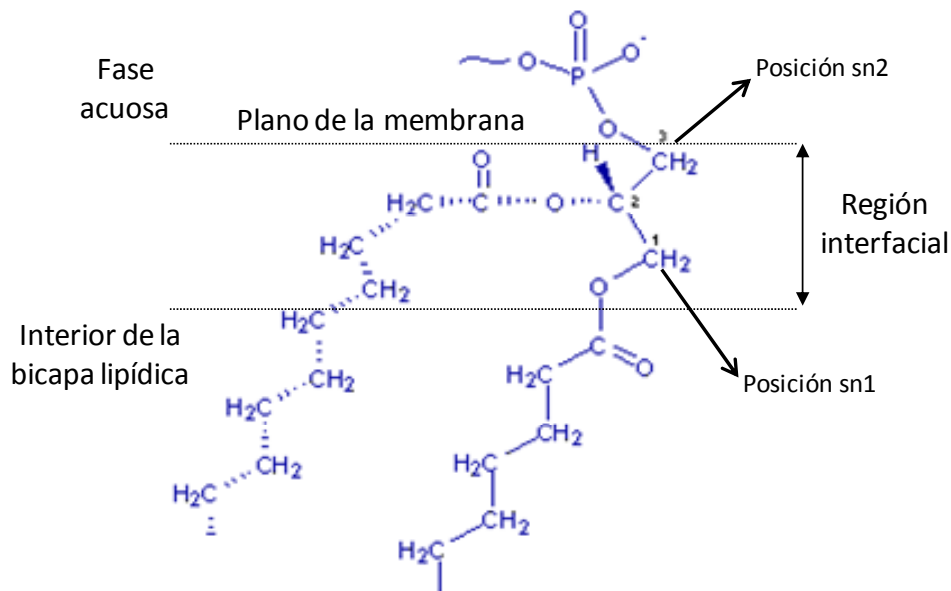
**Figura 5:** Espectros IR (región de *stretching*  $\nu$ CH) de un derivado de la fosfatidilcolina en función de la temperatura. La transición de fase ocurre cerca de los 42 °C. (Adaptado de Mantsch, 1985).

De esta manera, las alteraciones espectroscópicas que ocurren en la transición de fase se ven reflejadas claramente en las bandas correspondientes al *stretching* de CH. Los

grupos metileno originan bandas características a  $2850$  y  $2920\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes al *stretching* simétrico y asimétrico ( $\nu\text{CH}_2\text{s}$  y  $\nu\text{CH}_2\text{as}$ ), respectivamente. Un aumento del desorden conformacional desvía la banda  $\nu\text{CH}_2\text{s}$  de  $2$  a  $3\text{ cm}^{-1}$  a mayores números de onda y la torna considerablemente más ancha (**Figura 5**).

Por su parte, los grupos carbonilos y fosfatos son muy sensibles a las propiedades de su entorno y sus bandas de absorción en el IR representan un excelente instrumento para estudiar la interacción de las membranas con el agua (Binder, 2007).

El *stretching* del carbonilo se observa en el rango de  $1745\text{-}1717\text{ cm}^{-1}$  y es muy sensible a los cambios conformacionales y a las condiciones del entorno. La banda observada en el espectro se compone de dos subpoblaciones de carbonilos: C=O libre y C=O unido, las cuales representan poblaciones con diferente grado de hidratación y pueden ser resueltas fácilmente por deconvolución (ver sección 7.7). Tanto el grupo C=O en posición sn1 como el de la posición sn2 originan las dos subpoblaciones. Esto puede explicarse como consecuencia de un intercambio dinámico de agua en el plano interior de la membrana, y de la fluctuación de los grupos C=O con respecto a dicho plano (Arrondo *et al.*, 1988; Hubner & Blume, 1998).

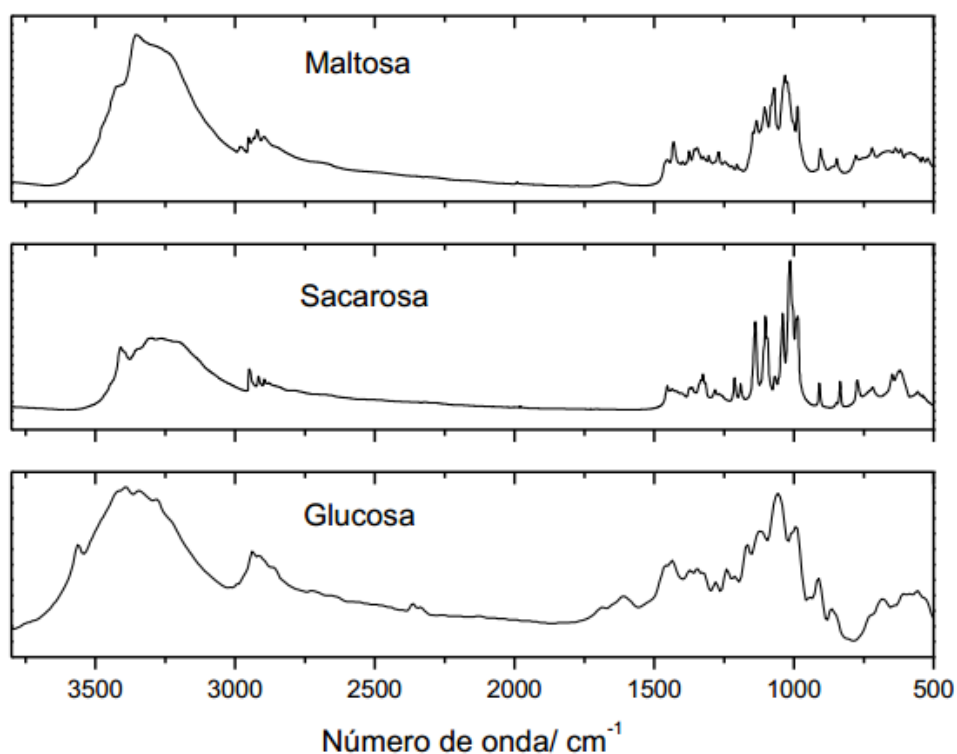


**Figura 6:** Esquema general de la conformación de un fosfolípido en una membrana.

Como se mencionó anteriormente, otro grupo extremadamente sensible a la hidratación, incluso más sensible que el carbonilo, es el fosfato. El *stretching* simétrico y asimétrico del grupo  $\text{PO}_2^-$  se da a  $1225$  y  $1085\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (Garidel *et al.*, 2000). Cuando los lípidos se encuentran hidratados, el *stretching* asimétrico del  $\text{PO}_2^-$  se da en el rango de  $1225\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ , mientras que en lípidos deshidratados ocurre a  $1250\text{ cm}^{-1}$ , es decir, ocurre un corrimiento drástico de  $25\text{-}50\text{ cm}^{-1}$ . Por su parte, el *stretching* simétrico de este grupo sólo se desplaza unos  $5\text{ cm}^{-1}$  en lípidos deshidratados (Garidel *et al.*, 2000). Por otro lado, se observa una ligera disminución en la definición de las bandas al pasar del estado gel a líquido-cristalino. Estas bandas además de ser fuertemente dependientes del grado de hidratación del lípido, son sensibles a los puentes de hidrógeno. En consecuencia, compuestos que forman puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno de estos grupos conducen a una disminución de las constantes de fuerza vibracional y por lo tanto, a una disminución en su número de onda.

#### **7.4.2. Hidratos de Carbono**

Los hidratos de carbono presentan en su estructura un gran número de grupos OH. Estos grupos son muy flexibles conformacionalmente y pueden participar en enlaces de hidrógeno como aceptores o dadores de electrones. La similitud de los grupos sustituyentes y su naturaleza hacen que los espectros vibracionales de las diferentes formas de una molécula de hidrato de carbono sean similares entre sí (**Figura 7-**) (Huang *et al.*, 2008).



**Figura 7:** Espectros IR de la  $\alpha$ -D-glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ),  $\beta$ -D-fructofuranosil- $\alpha$ -D-glucopiranósido (sacarosa;  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) y 4-o-  $\alpha$ -D-glucopiranosil-  $\alpha$ -D-glucosa (maltosa;  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (temperatura ambiente; pastillas de KBr).

Una de las regiones espectrales que mayor información estructural proporciona es la región  $1200-800\text{ cm}^{-1}$ , considerada como *fingerpint* porque permite diferenciar los azúcares entre sí. En esta región, las bandas características de un anillo del tipo furanosa o piranosa (principalmente debido a vibraciones  $\nu C-C$ ) pueden ser diferenciadas ya que son observadas a  $875$  y  $825\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (Mathlouthi & Koenig, 1986). Asimismo, el *stretching* simétrico  $\nu COC$ , asociado al enlace glicosídico ( $1150-820\text{ cm}^{-1}$ ), se ha usado, por ejemplo, en la caracterización de diferentes tipos de celulosa (Kataoka & Kondo, 1999; Oldenhof et al., 2005).

Por otro lado, el grado de cristalinidad de un azúcar en fase sólida y el empaquetamiento de sus moléculas puede ser evaluado por análisis de las regiones donde se observan las bandas correspondientes a vibraciones localizadas de los grupos OH, y las debidas al *bending*  $\delta CCO$  ( $\approx 650-500\text{ cm}^{-1}$ ). De esta manera, la transición vítrea de los hidratos de carbono se puede observar como un cambio brusco en el *stretching* del OH (región  $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ ) en función de la temperatura. Dicho cambio es una medida de la intensidad de las interacciones puente de hidrógeno del sistema

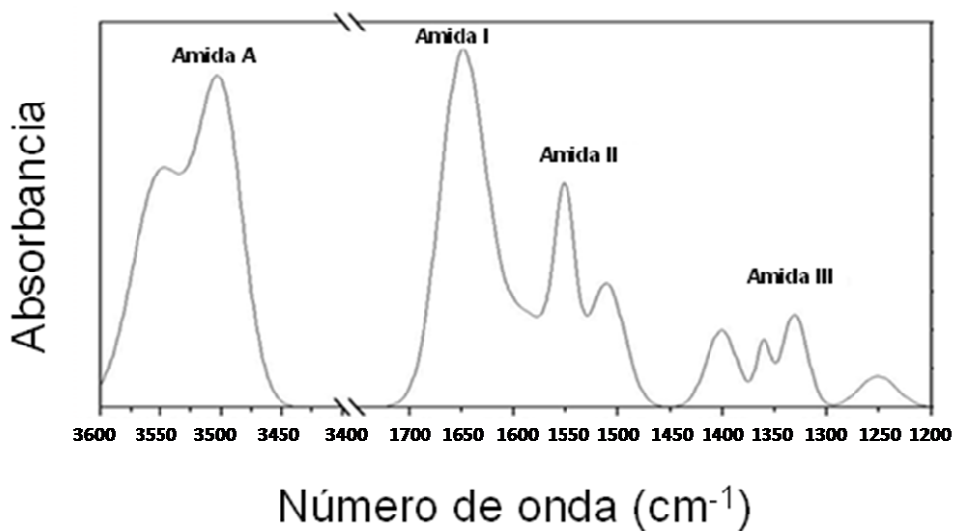
(Wolkers *et al.*, 2004). En el caso de la trehalosa, estudios por FTIR permitieron establecer patrones espectroscópicos para la identificación de los estados vítreos y *rubbery*.

### 7.4.3. Proteínas

La espectroscopia vibracional se ha utilizado para el estudio de proteínas, en especial para el análisis de la estructura secundaria (Matheus *et al.*, 2006; Barth, 2007).

Se han identificado diferentes bandas con números de onda característicos que se originan a partir de los modos vibracionales de los grupos amida de los enlaces peptídicos de las proteínas. Las principales bandas son la **amida A** ( $\approx 3200\text{ cm}^{-1}$ ), originada principalmente por el *stretching* N-H, la **amida I** ( $1720\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ), originada principalmente por el *stretching* C=O del grupo amida del enlace peptídico, la **amida II** ( $1600\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$ ) y la **amida III** ( $1350\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ) ambas originadas por el acoplamiento del *bending* N-H y el *stretching* C-N, con algunas contribuciones de otros modos vibracionales (Krimm & Bandekar, 1986) (**Figura 8**). Los modos amida A, I y II originan bandas intensas en IR y débiles en Raman. De todas estas bandas, la amida I ha sido la más utilizada en estudios estructurales de proteínas. El modo amida A es importante para evaluar la magnitud de los enlaces de hidrógeno en la proteína, pero no es particularmente sensible a la estructura secundaria (Barth, 2007; Arrondo, 1993).

El análisis de la forma y la posición de las bandas en la región amida I del espectro permite obtener valiosa información estructural de las proteínas estudiadas, en particular en lo referente a su estructura secundaria (Barth, 2007; Smith, 1996).



**Figura 8:** Espectro IR de una proteína, indicando algunas de las bandas características más comúnmente utilizadas en análisis estructurales de proteínas.

### 7.5. Espectroscopias Vibracionales en el Estudio de Microorganismos

La identificación, caracterización, discriminación y/o clasificación de microorganismos, es un tema de relevancia en diversos sectores, entre los cuales se encuentran la industria farmacéutica, alimentaria, el sector médico y medio ambiente, entre otros.

La mayor parte de los métodos utilizados para la identificación y clasificación de microorganismos se basa esencialmente en el análisis morfológico, la evaluación e interpretación de reacciones bioquímicas, la capacidad de crecer en diferentes medios y condiciones de cultivo. Por su parte, los avances de la Biología Molecular han provisto de metodologías que pueden ser usadas adecuadamente con criterios taxonómicos. Entre ellos pueden citarse la homología de ADN-ADN, ARNr 16S, RAPD-PCR, ribotipificación, perfil de ácidos grasos, perfil de proteínas solubles, etc. Las ventajas de estas técnicas han sido ampliamente difundidas en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de estos métodos necesitan reactivos de biología molecular costosos o requieren una utilización combinada de los mismos para obtener información completa (Al-Khaldi & Mossoba, 2004).

En base a lo expresado, la búsqueda de métodos alternativos confiables, rápidos y económicos para la identificación, discriminación y/o clasificación de microorganismos,

es un tema de investigación sumamente activo (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011; Bosch *et al.*, 2006). Así, en las últimas tres décadas se han propuesto métodos alternativos de identificación y caracterización de microorganismos, basados en la espectroscopía vibracional. En particular, la espectroscopía de infrarrojo y la espectroscopía Raman han sido ampliamente utilizadas debido a su capacidad de proveer información química, bioquímica y estructural de materiales biológicos, entre los que se encuentran los microorganismos (Naumann, 2000).

Su implementación se basa en la capacidad de aportar información global sobre la composición molecular de la bacteria (*i.e.*: ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y componentes de la pared celular) permitiendo de esta manera extender su aplicación más allá de la taxonomía bacteriana (Naumann *et al.*, 1991).

Dichas metodologías presentan diversas ventajas sobre los métodos convencionales utilizados en Microbiología. Entre ellas, pueden mencionarse:

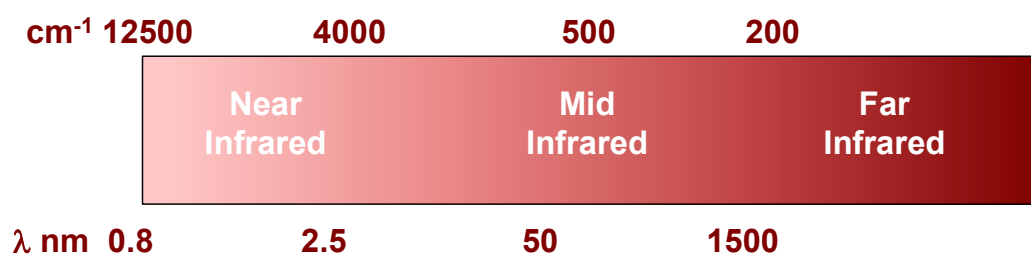
- 1) las muestras en estudio requieren una mínima o nula preparación para su análisis;
- 2) a diferencia de otros métodos espectroscópicos, los métodos basados en la espectroscopía vibracional no requieren de la utilización de agentes externos (sondas), que pueden llegar a interferir con lo que se desea medir;
- 3) permiten una rápida caracterización de cepas microbianas *in situ*, de una manera no destructiva y en tiempo real, lo que a su vez permite utilizarlas para monitorear la producción de determinados metabolitos (Bosch *et al.*, 2006, Naumann *et al.*, 1991);
- 4) debido a la gran cantidad de información química y bioquímica que proveen, pueden ser utilizadas con propósitos diversos tales como, detección, clasificación e identificación de microorganismos a diferentes niveles taxonómicos (serotipo, cepa, especie o género), proporcionando patrones que se correlacionan con los árboles filogenéticos construidos a partir del análisis de la secuencia de ADNr (Baena & Lendl, 2004; Mobili *et al.*, 2011; Naumann, 2000).

Considerando las ventajas de los métodos basados en la espectroscopía vibracional en términos de sencillez, simplicidad y reproducibilidad, no resulta sorprendente su crecimiento como métodos de *screening* a gran escala o como métodos alternativos en aplicaciones clínicas (Naumann, 2000; Naumann *et al.*, 1991) y en la discriminación e identificación de patógenos o contaminantes de alimentos (Alexandrakis *et al.*, 2008, Lefier *et al.*, 2000; Naumann, 2000).



## 7.6. Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIR)

La región infrarroja del espectro electromagnético comprende tres subregiones diferentes: el infrarrojo medio (MIR), cercano (NIR) y lejano (FIR). El MIR, explicado en las secciones anteriores, se extiende desde 2500 a 25000 nm (números de onda: 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) y es donde se dan las transiciones fundamentales. La región del NIR comprende el rango de  $\sim 780$  nm a 2500 nm (números de onda: 1280-400  $\text{cm}^{-1}$ ) y en ella tienen lugar *overtones* y modos de combinación. El FIR se extiende desde 25000 a 100000 nm (números de onda: 400-10  $\text{cm}^{-1}$ ) y se asocia a fenómenos de rotación molecular (**Figura 9**).



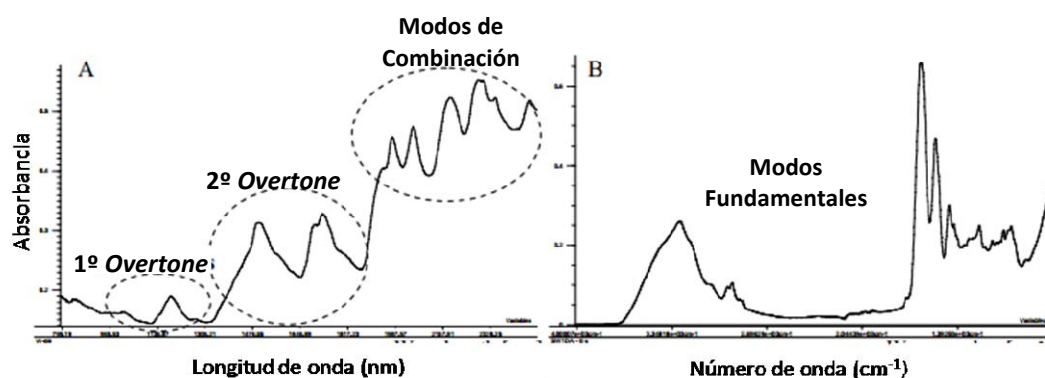
**Figura 9:** Rango de longitudes de onda que comprende la radiación infrarroja.

El NIR es una técnica rápida, precisa y no destructiva, ampliamente conocida y aplicada en biotecnología, alimentación, salud, entre otros campos, que permite identificar y cuantificar componentes bioquímicos de diferentes muestras. Desde 1970, esta técnica es aplicada para control de calidad y análisis de composición química en distintos productos de la industria agroalimentaria (Osborne, 2006). En los últimos años la espectroscopia NIR fue utilizada para el monitoreo y control de calidad de procesos en la industria farmacéutica y se la considera una herramienta prometedora para diagnóstico médico (Ahmad *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2008; Scarff *et al.*, 2006; Reich, 2005).

Las transiciones entre estados vibracionales no contiguos dan lugar a bandas de absorción conocidas como *overtones* [primer y segundo *overtone*, respectivamente, ver **Figura 2** (b)]. Estas bandas aparecen entre 780 y 2000 nm, dependiendo del orden

de *overtone* y de la fuerza y naturaleza de los enlaces, y están asociados a las vibraciones  $\nu\text{OH}$ ,  $\nu\text{CH}$ ,  $\nu\text{NH}$  (**Figura 10**).

En moléculas poliatómicas, dos o más modos de vibración pueden interactuar originando cambios de energía simultáneos y dando lugar a bandas de absorción llamadas bandas de combinación, cuyas frecuencias resultan de las sumas de cada frecuencia de la interacción. Las bandas de combinación NIR aparecen entre 1900 nm y 2500 nm (**Figura 10**).



**Figura 10:** Espectro infrarrojo del gluten. A) Región NIR, contiene el 1º y 2º *overtones* y modos de combinación. Para los espectros NIR es más común usar unidades de longitud de onda ( $\lambda$ ), mientras que los espectros MIR se expresan en número de onda ( $\nu$ ). Modificado de Bruun, 2006.

Dado que las probabilidades de *overtones* y modos de combinación son bajas, las absorptividades en el NIR son 10 a 100 veces más débiles que en el MIR, las cuales se van haciendo progresivamente más débiles al aumentar el nivel de *overtones*.

Las interacciones intermoleculares, como los puentes de hidrógeno, producen desplazamientos en las bandas de absorción existentes, lo que permite estudiar propiedades físicas y diferenciar estructuras cristalinas. De esta manera, el espectro NIR no sólo es útil para determinar la composición de las muestras, sino que también permite determinar las propiedades físicas de las mismas (*i.e.*: transiciones vítreas).

### 7.6.1. Tipos de Medidas en la Región NIR

Una de las grandes ventajas de la espectroscopía NIR es la versatilidad y adaptabilidad que presenta para analizar muestras de distinta naturaleza. Para muestras sólidas, los

espectros son registrados por reflectancia difusa. En cambio, en muestras líquidas suelen medirse por transmisión de la radiación. Un caso intermedio es el de las muestras que se miden por transflectancia, en el que parte de la luz incidente es reflejada en la muestra y otra parte la atraviesa, para ser reflejada por un dispositivo transflectante, diseñado de tal forma que también delimita el camino óptico (Scarff *et al.*, 2006).

#### **7.6.1.1. Medidas por Reflectancia**

La espectroscopia de reflectancia estudia la radiación reflejada por una muestra que ha sido previamente irradiada. Consta de dos componentes: la especular y la difusa. La componente especular aporta poca o nula información acerca de la composición de la muestra. El detector se coloca en un ángulo determinado frente a la muestra de manera que se minimizan las radiaciones especulares.

La componente difusa se genera en todas las direcciones y predomina cuando la superficie irradiada es débilmente absorbente a la longitud incidente y la penetración de la radiación es mayor en relación con la longitud de onda. La señal analítica medida se expresa como absorbancia aparente.

$$A_{ap} = \log \frac{1}{R} = ac \quad (7)$$

siendo  $R$  la reflectancia relativa ( $R = R_{muestra}/R_{estandar}$ ),  $a$  una constante de proporcionalidad y  $c$  la concentración.

#### **7.6.1.2. Medidas por Transmisión**

La absorción de la radiación NIR sigue la ley de Lambert-Beer (ver página sección 7.3, página 48) por lo que las medidas por transmisión pueden ser utilizadas con finalidad cuantitativa. No obstante, de manera análoga a las regiones visibles y el MIR, se pueden producir desviaciones del comportamiento de la ley, debido a cambios en los enlaces puente de hidrógeno, formación de complejos, u otros procesos químicos (Bach, 2012).

### **7.6.1.3. Medidas por Transflectancia**

La muestra, generalmente líquida o semi-líquida, se coloca en una cubeta junto con una superficie reflectante por una de sus caras. El haz de radiación incidente entra por la cara transparente de la cubeta. Así retorna de nuevo atravesando la muestra y la radiación es captada por el detector (Bach, 2012).

### **7.6.2. Instrumentación**

El esquema básico de un instrumento NIR no difiere de cualquier espectrofotómetro. Sus componentes básicos son: fuente de radiación, sistema de selección de longitud de onda, compartimento de muestra y detector (Bach, 2012).

Sin embargo, debido a la débil intensidad de las bandas NIR, el nivel de exigencia de los espectrofotómetros NIR, en términos de nivel de ruido permisible y estabilidad instrumental, debe ser mayor que en otros instrumentos, sobre todo si se pretende aplicar al análisis cuantitativo.

Para obtener información confiable resulta indispensable obtener buenos espectros y realizarles un pre-procesamiento para eliminar o reducir ciertos efectos físicos causados por la dispersión de la luz, variación de la línea de base y el ruido aleatorio [*i.e.*: normalización, suavizado, corrección de la línea de base, derivación, corrección de efectos multiplicativos (MSC), etc.] (Esbensen, 2005; Martens, Nielsen, & Engelsen, 2003). Adicionalmente, existen determinados criterios para la selección de un rango espectral, que son generalmente utilizados para eliminar la información no específica en los modelos de clasificación o predicción. Para esta tarea, se cuenta con diversos métodos ya establecidos que permiten una eficiente selección de estos rangos espectrales (Goicoechea & Olivieri, 2003; Jarvis & Goodacre, 2004).

## **7.7. Pre-procesamiento de los Espectros**

El primer paso en el análisis de los espectros consiste en el pre-procesamiento de los mismos, cuyo objetivo es obtener o aprovechar, la mayor cantidad de información contenida. Sin embargo, si el tratamiento espectral no es el adecuado, la información obtenida será incorrecta, pudiendo alterar parcial o totalmente la integridad de los datos (Stuart, 2004). A continuación se detallan métodos y técnicas para el procesamiento matemático de los espectros:

El **suavizado**, es utilizado para reducir el nivel de ruido en los espectros. El fin es, amplificar la información contenida en los mismos, y que debido al ruido, es difícil de observar.

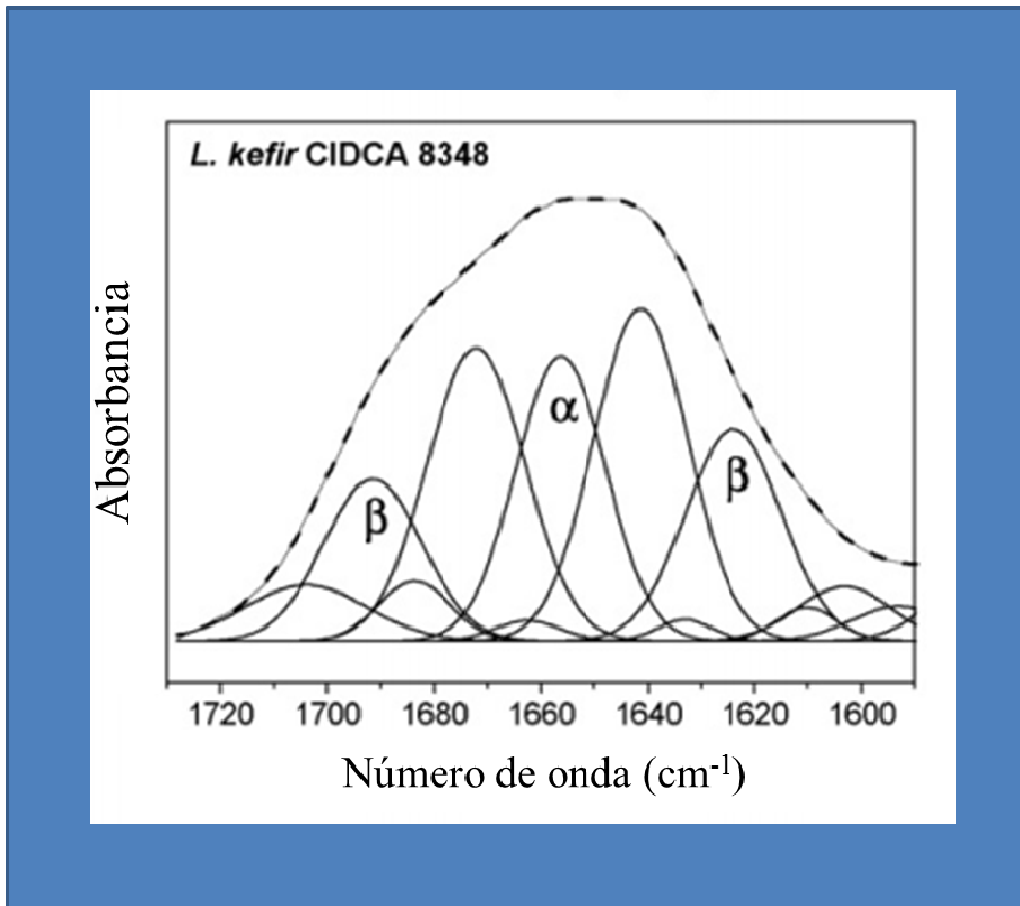
La **diferencia de espectros**, es utilizado cuando se desea obtener el espectro de una componente, en una mezcla. Los espectros deben estar dados en unidades que sean linealmente proporcionales a la concentración. Este método está basado en la siguiente ecuación, que describe el proceso para la resta o substracción de espectros:

$$S_{mezcla} - f(S_{referencia}) = S_{resultado} \quad (8)$$

donde  $S_{mezcla}$ , representa el espectro de la mezcla de componentes;  $S_{referencia}$ , es el espectro de la componente a restar del espectro de la mezcla;  $f$ , es una cantidad adimensional conocida como factor de escala o factor de substracción, y tiene como propósito, escalar el espectro de referencia, y eliminar en un alto porcentaje, la contribución de la componente de referencia en el espectro de la mezcla. Finalmente,  $S_{resultado}$ , es el espectro resultante, sin la contribución de la componente de referencia.

La **derivación** de un espectro, provee información que puede ser útil para su análisis e interpretación. Por ejemplo, la segunda derivada de la banda amida I nos proporciona la posición de cada máximo en el espectro original, y permite identificar el número de bandas superpuestas en una región del espectro.

El proceso de **deconvolución** tiene como principal objetivo, la resolución de bandas superpuestas en un espectro. Esta técnica permite obtener espectros con bandas más estrechas, y discriminar bandas que se encuentran relativamente cercanas. Mediante el *peak-fitting* se realiza el ajuste teórico a un espectro experimental. Los métodos para el *peak-fitting*, generalmente se basan en un ajuste por mínimos cuadrados, asegurando así, que la diferencia entre el espectro experimental y el generado teóricamente, sea mínima. En el caso de la banda de amida I, el ajuste se realiza generalmente utilizando la función resultante de la suma de funciones Gaussianas o Lorentzianas o una combinación de ambas (**Figura 11**).



**Figura 11:** Análisis para la determinación de la estructura secundaria de proteínas de capa-S de *Lactobacillus kéfir* CIDCA 8348, utilizando el método *curve-fitting*. El rango del espectro FTIR analizado, corresponde a la región de la amida I. El *curve-fitting* se realizó mediante la suma de un determinado número de Gausianas, obtenidas de la segunda derivada del espectro original en esta región (Mobili *et al.*, 2009).

El **Multiplicative Scatter Correction** (MSC) es un método de transformación, el cual es utilizado para compensar los efectos multiplicativos y/o aditivos que ocurren en las mediciones espectroscópicas. Estos efectos pueden ser causados por variaciones en el camino óptico, temperatura, cambios en la presión, etc.

### 7.8. Métodos de Análisis Multivariante (Métodos Quimiométricos)

Tal como se mencionó en la sección 7.2 (página 37), las espectroscopias vibracionales generan una gran cantidad de datos, los cuales requieren métodos apropiados de análisis para aprovechar al máximo la información contenida en ellos. En este sentido

la quimiometría permite extraer la información presente en los espectros (conjuntos multivariantes de datos) de un conjunto de muestras, ya sea de forma cualitativa como cuantitativa.

La quimiometría es la parte de la química que utiliza métodos matemáticos, estadísticos y de lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar información química relevante a partir del análisis de señales analíticas y, finalmente, adquirir conocimiento de los sistemas químicos (Massart *et al.*, 1997).

La quimiometría comprende desde el pretratamiento de los espectros (para mejorar la calidad de la señal) hasta la utilización de los métodos multivariantes. El análisis multivariante busca encontrar una relación entre la señal analítica y alguna propiedad de la muestra. Su utilización permite establecer agrupaciones de muestras en función de su similitud y clasificar nuevas muestras entre otras aplicaciones (Martens & Naes, 2000; Kramer, 1998).

En líneas generales, los métodos multivariantes pueden clasificarse como **no supervisados**, cuando no requieren información adicional para el análisis de datos, y **supervisados**, cuando sí requieren de esta información.

Diversos autores han utilizado métodos multivariantes para el análisis de datos espectrales, con fines de discriminación, identificación y/o clasificación de microorganismos y otras muestras biológicas (Mobili *et al.*, 2011; Minnard *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2006). Algunos de los métodos más utilizados para este propósito son: el análisis de componentes principales (PCA), análisis por factores (FA), análisis de discriminación lineal (LDA), análisis de *clusters* (HCA), mínimos cuadrados parciales (PLS), redes neuronales (ANNs), entre otros (Huang *et al.*, 2004; Ghiamati *et al.*, 1992). A continuación, se describen los métodos multivariantes utilizados en esta tesis.

### **7.8.1. Información Cualitativa**

#### **Análisis de Componentes Principales (PCA)**

El PCA es un método de reducción dimensional que opera de forma no supervisada. Permite reducir la correlación espectral y agrupar las muestras analizadas en función de la variabilidad que contienen (Massart *et al.*, 1997). Este método reduce la dimensionalidad del conjunto de datos, encontrando un grupo de ejes coordenadas

alternativas, llamadas componentes principales (PC's) (Esbensen, 2005; Martens & Nielsen, 2003). Estos ejes de coordenadas alternativos tienen la propiedad de que la mayor parte de la información está contenida en unas pocas primeras dimensiones, pudiéndose descartar el resto con muy poca pérdida de información.

Si se considera la matriz de datos  $X$ , donde cada una de las  $n$  filas corresponde al espectro de una muestra, y cada columna es la absorbancia a la longitud de onda (Figura 11), el objetivo del PCA es explicar la misma información contenida en la matriz  $X$  en un número inferior de ejes o dimensiones, que corresponden a las variables de la matriz de datos. Estos nuevos ejes se denominan componentes principales (PC's). Su característica principal es que el primero recoge la máxima variabilidad espectral del conjunto de muestras, el segundo recoge una variabilidad inferior al primero y es ortogonal a él, y así sucesivamente. Los últimos PC's describen esencialmente el ruido en los datos. Por lo tanto, el número de componentes principales se ha de seleccionar de forma tal que contengan información relativa a las muestras y no contengan información relativa al ruido.

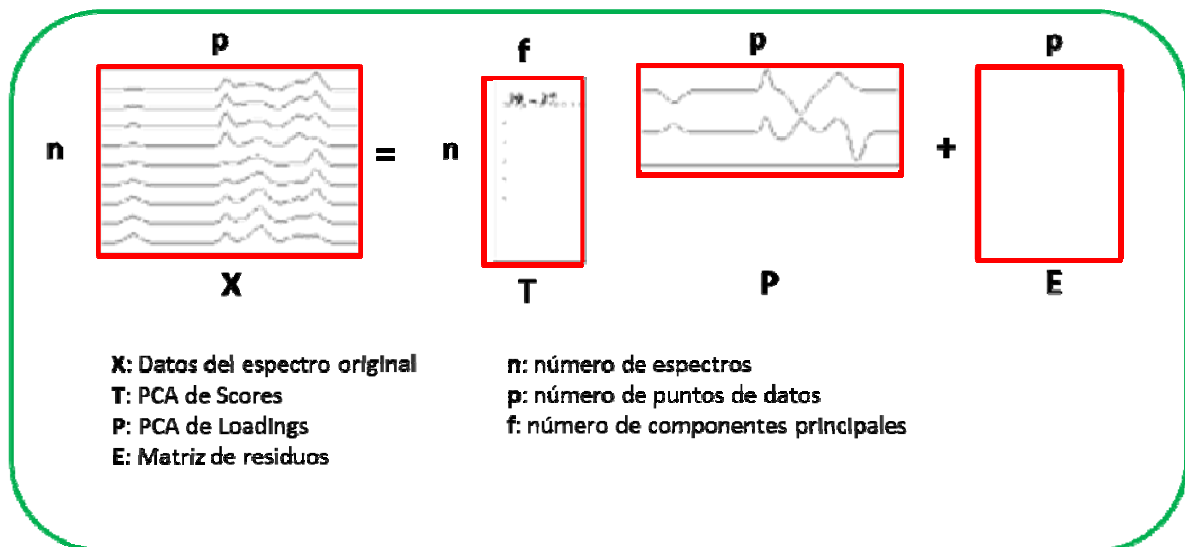


Figura 11. Esquema general del Análisis de Componentes Principales (PCA)

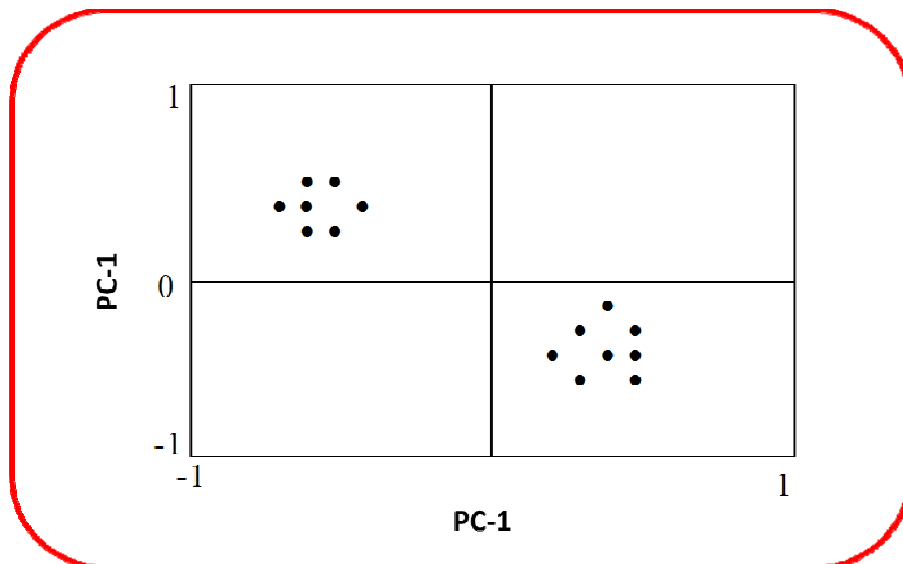
La matriz  $X$  se descompone en el producto de dos matrices, una de *scores* (relacionada con los objetos) y otra de *loadings* (relacionada con las variables), quedando una matriz de residuales  $E$ , con la información no recogida por  $T$  y  $P$ :

$$(9)$$



Donde  $x_i$  son las coordenadas de cada punto respecto a los nuevos ejes (componentes principales) y  $\cos \theta_i$  son los cosenos de los ángulos entre los nuevos ejes y los ejes originales. El conjunto de datos  $X$ , descrito inicialmente por variables correlacionadas, queda ahora definido por un nuevo conjunto de variables no correlacionadas entre sí en un sistema de ejes ortogonales (Wold, 2001).

La interpretación de los resultados obtenidos con el PCA se lleva a cabo a partir de una representación de los scores de las muestras en diferentes PCs. Si existe una relación entre las muestras los puntos aparecerán agrupados, mientras que si las muestras no se asemejan entre sí, los puntos aparecerán dispersos entre sí (**Figura12**). Este análisis permite realizar una selección de muestras que sean representativas del conjunto global de muestras, y usarlas *a posteriori* en la calibración de modelos multivariantes.



**Figura 12:** Gráfico de PCA-scores (PC2 vs PC1) obtenidos del análisis de componentes principales de espectros Raman de dos especies bacterianas filogenéticamente relacionadas. Las agrupaciones observadas a lo largo del eje de la componente principal 1 (PC1), corresponden a los dos grupos de bacterias analizadas, al igual que las dos agrupaciones observadas a lo largo del PC2.

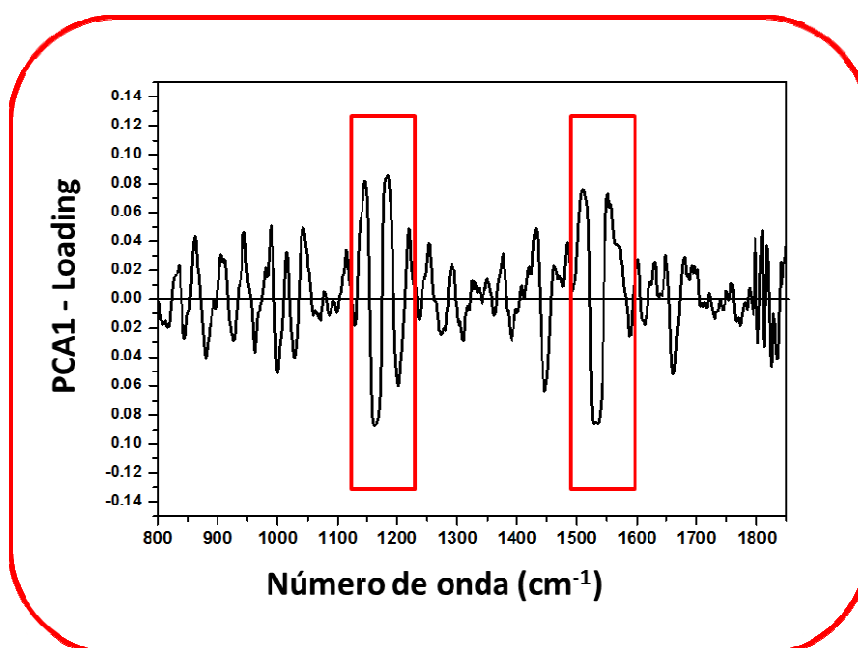
Es importante recordar que PCA actúa de una forma no supervisada, lo que significa que para el análisis de datos no es necesario ningún tipo de información adicional al conjunto de espectros o datos colectados experimentalmente (Gottlieb *et al.*, 2004; Geladi, 2003).

El PCA provee el porcentaje de la varianza explicada por cada PC. Además indica el número de componentes principales (PC's) que retienen la mayor cantidad de información presente en el conjunto de datos, relacionada con su estructura intrínseca (Esbensen, 2005; Martens & Nielsen, 2003).

Los *loadings* muestran el peso (o relevancia) de una determinada variable en el modelo de componentes principales. Son utilizados para entender cuánto contribuye cada variable al significado de la variación de los datos, y de esta manera, interpretar la relación entre variables. También pueden ser utilizados para interpretar el significado de cada componente del modelo.

Teniendo en cuenta que existen menos componentes principales que variables y debido al error de ajuste del modelo con los datos, se produce un error E que se acumula en la matriz

Adicionalmente, los *loadings* proporcionan información referente a las variables de diagnóstico estadísticamente más importantes o influyentes, relacionadas con las principales diferencias encontradas en el conjunto de datos (**Figura 13**). Así, en la **Figura 13**, las regiones 1100-1200 y 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  serán aquellas donde se encuentren las variables más influyentes en ese caso.



**Figura 13:** Gráfico de *loading* del análisis de PCA realizado en todo el rango del espectro Raman (1800-800  $\text{cm}^{-1}$ ) de dos especies bacterianas relacionadas filogenéticamente. Los recuadros en rojo indican las variables más influyentes.

### 7.8.2. Información Cuantitativa

La información contenida en los espectros IR puede correlacionarse con magnitudes físicas o químicas, obteniéndose ecuaciones o modelos de calibración. El fundamento de cualquier calibración es establecer una relación entre la señal instrumental y la propia a determinar, y posteriormente predecir esta propiedad a partir de la señal de medida en una muestra desconocida. Es posible utilizar calibraciones univariantes cuando la señal es selectiva a la propiedad estudiada. Sin embargo, la espectroscopia IR proporciona un gran número de variables respuesta para cada muestra, variables que en general no pueden ser asignadas a un solo analito (Wold *et al.*, 2001). Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad a determinar. Estos métodos son conocidos como Métodos de Calibración Multivariante. Las características principales de estos métodos son:

- Trabajan con un gran número de medidas de cada muestra, normalmente con el espectro completo.
- Son necesarios los valores de la propiedad a determinar para cada muestra.
- Es posible determinar de forma independiente cada una de las propiedades que se desea cuantificar.

#### 7.8.2.1. Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS)

El modelo PLS es un método para la construcción de modelos de predicción cuando las variables son muchas y altamente colineales (no son significativamente redundantes). Se dispone de una matriz de datos espectrales  $X$  y una matriz  $Y$  que contiene los datos de la propiedad a determinar. La regresión PLS se basa en un cálculo de reducción de variables, donde las matrices  $X$  (espectral) e  $Y$  (analito) se descomponen en:

$$X = TP^T + E \quad (10)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (11)$$

Donde las matrices  $T$  y  $U$  son, respectivamente, las matrices de *scores* de  $X$  e  $Y$ . Las matrices  $P^T$  y  $Q^T$  son las matrices de *loadings* de  $X$  e  $Y$ , y  $E$  y  $F$  son las matrices residuales de  $X$  e  $Y$ , respectivamente. El objetivo de PLS es modelar las matrices  $X$  e  $Y$ , de tal forma que el conjunto de valores residuales,  $E$  y  $F$ , sean igual a cero.

En PLS, al igual que en PCA, se han de seleccionar el número de factores adecuado al sistema, recogiendo información cuantitativa pero sin recoger ruido o información espectral relativa a otros parámetros no relacionados con la calibración.

Una vez que se ha establecido el modelo de calibración correcto, es posible predecir el resultado para una nueva muestra o para un conjunto de muestras externo a la calibración. La correcta predicción de las nuevas muestras dependerá de la buena capacidad predictiva del modelo de calibración (Martens & Martens, 2000c).

Este modelo es mejorado mediante el desarrollo de lo que se conoce como “relaciones internas”. Debido a que los vectores base son calculados para ambos conjuntos de datos  $X$  e  $Y$  de manera independiente, éstos pueden tener una débil relación entre ellos. Esta relación interna es mejorada mediante intercambio de los *scores*  $T$  y  $U$ , en un cálculo iterativo. Esto permite que la información de un conjunto de datos pueda ser utilizada para ajustar la orientación de los vectores base o latentes (PC) en otro conjunto de datos y viceversa.

La eficiencia del modelo PLS está definida por el coeficiente de correlación  $r$ , el error normal de predicción [*Standard Error of prediction (SEP)*], la raíz media cuadrada del error de calibración [*Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC)*] y la Raíz Media Cuadrada del Error en la validación Cruzada [*Root Mean Square Error of Cross-Validation (RMSECV)*]. De esta manera, el modelo será eficiente cuando el valor de  $r$  sea alto y los de SEP, RMSEC y RMSECV bajos.

Una descripción más amplia de este proceso, puede ser encontrada en la literatura (Araujo-andrade *et al.*, 2005).

El objetivo del PLS es entonces, obtener un modelo en un espacio de menor dimensión capturando la máxima variación en  $X$  con el número mínimo de variables (PCA) y maximizando la correlación entre  $X$  e  $Y$ .

Es por todo esto que el énfasis del PLS es la predicción de las respuestas y no necesariamente la relación existente entre variables.

#### **7.8.2.2. Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA)**

PLS-DA es una versión del PLS en la cual, una o diversas variables  $Y$  son modeladas simultáneamente, tomando en cuenta las posibles correlaciones o co-linealidades entre las mismas.

Para el análisis discriminante, se considera que la muestra pertenece a un grupo o clase. Cada clase es representada por una variable indicadora “*Dummy variable*”, la cual generalmente es de carácter binario, adquiriendo un valor de 1 para aquellos que pertenecen a una clase, y 0 para aquellos que no. De esta forma, construyendo un modelo mediante PLS con las “*Dummy variable*” ( $Y$ ), es posible predecir el valor que corresponde a la clase que pertenece la muestra desconocida.

Una predicción correcta, idealmente debería dar un valor de  $Y$  igual a 1, para aquellas muestras que son miembros del grupo o clase, y 0 para aquellas que no pertenecen a este. En la práctica, valores  $\geq 0.5$ , indican que el analito en estudio pertenece al grupo que se ha modelado, mientras que valores  $\leq 0.5$ , indican la no pertenencia al grupo o clase en cuestión. Todos los valores predichos son acompañados por su desviación, la cual es una estimación de qué tan confiable es la predicción (Araujo-Andrade & Frausto-Reyes, 2010).

### **7.8.3. Métodos de Validación**

La validación de un modelo de predicción está referida a su capacidad predictiva de datos desconocidos, que no han sido utilizados en la calibración del mismo. Este nuevo conjunto de datos recibe el nombre de “set de validación”, y es utilizado para validar el modelo calibrado bajo una situación real. Sin embargo, en ciertos casos el número de muestras o determinaciones es limitado y no es posible contar con un grupo de muestras para la calibración del modelo, llamado también “set de entrenamiento”, y un “set de validación”. En dichos casos, es necesario recurrir a procedimientos alternativos que proporcionen una aproximación a la validación ideal.

A continuación, en la sección 7.8.3.1 se describe uno de los métodos de validación alternativos y mejor aceptado por los expertos en el tema, cuando no se cuenta con suficiente cantidad de muestras o mediciones para una validación por “set de validación”. Este método, proporciona una validación buena, pero a su vez, aproximada a la validación ideal.

#### **7.8.3.1. Validación Cruzada (LOOCV)**

El método de validación cruzada, es comúnmente conocido por su nombre en inglés como full-cross-validation o leave-one-out-cross-validation (LOOCV). El método

consiste en calibrar tantos sub-modelos como objetos existan, y en donde en cada calibración se excluye de cada sub-modelo un objeto (espectro o muestra), que será predicho por el sub-modelo.

Si existen  $n$  objetos, cada sub-modelo será calibrado con  $n-1$  objetos. El cuadrado de la diferencia entre el valor predicho y el valor de referencia  $Y$  para cada objeto o muestra excluida, es sumado y promediado, dando como resultado la varianza en  $Y$ , en el mismo sentido que si se realizara en un grupo de muestras independiente.

El método de validación cruzada, suele ser la mejor opción cuando no se cuenta con un número suficiente de muestras para tener un set de entrenamiento y otro grupo independiente de muestras de validación. Por lo descrito anteriormente, diversos autores en la literatura recomiendan este método como una buena aproximación para validar un modelo (Martens & Nielsen, 2003; Esbensen, 2005).

Si bien la capacidad protectora de los GOS ha sido recientemente descrita, los GOS comerciales son obtenidos a través de diferentes tipos de síntesis enzimática y métodos de purificación. Esto determina una gran heterogeneidad de los GOS comerciales en cuanto a su composición y grado de polimerización, y por ende, en sus propiedades termofísicas. Por esta razón, resulta interesante estudiar el efecto de GOS de diferente composición sobre la protección de bacterias lácticas deshidratadas, y comparar su efecto protector con el de otros azúcares prebióticos de la familia de los FOS, tales como la lactulosa, cuya capacidad protectora no ha sido abordada aún.

Para ello, es necesaria la implementación de metodologías confiables, rápidas, simples y económicas. En este sentido, y como se describió anteriormente, la espectroscopía vibracional ha sido ampliamente utilizada para el estudio de sistemas biológicos ya que aporta información química, bioquímica y estructural.

En este trabajo de tesis se utilizará la espectroscopia NIR para estudiar por un lado las características estructurales y las propiedades termofísicas de azúcares prebióticos utilizados en la industria, y por el otro el efecto protector de dichos compuestos sobre bacterias deshidratadas. La baja absorptividad del agua y la baja interferencia con otros modos vibracionales en el infrarrojo cercano convierten a esta técnica en una herramienta idónea para el estudio de propiedades termofísicas y de procesos

relacionados con la deshidratación y almacenamiento. Por su parte, el desarrollo de modelos multivariantes a partir de los espectros NIR permitirá definir las condiciones para mejorar la calidad de los *starters* almacenados en el tiempo. De acuerdo a nuestro conocimiento, este abordaje nunca antes había sido utilizado con este fin.

# OBJETIVOS

En el presente trabajo de tesis fueron planteados dos **OBJETIVOS GENERALES**:

- 1- Investigar el efecto protector de galacto-oligosacáridos (GOS) y lactulosa en la preservación de bacterias lácticas
- 2- Desarrollar modelos que permitan determinar la eficiencia de procesos de preservación a partir del uso combinado de métodos espectroscópicos y análisis multivariante.

Para alcanzar dichos objetivos, se plantearon los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

- Evaluar el efecto protector de GOS de diferente composición y de lactulosa sobre la recuperación de *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus* CIDCA 333 expuesta a deshidratación-rehidratación.
- Implementar un método experimental basado en espectroscopia NIR y análisis multivariante para investigar la recuperación bacteriana luego de dicho proceso.
- Obtener información estructural de los GOS utilizados y de la lactulosa a partir de los espectros Raman y FTIR (medio).
- Diseñar un modelo PLS basado en espectroscopia NIR para predecir el parámetro T-Tg de los GOS y de la lactulosa liofilizados y estabilizados a diferentes humedades relativas.
- Obtener información relacionada con la supervivencia y la humedad relativa de *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus* CIDCA 333 liofilizados en presencia de GOS y lactulosa a partir de los espectros NIR correspondientes.



# CAPÍTULO I

**Galacto-oligosacáridos y lactulosa como protectores frente a la deshidratación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.**

## INTRODUCCIÓN

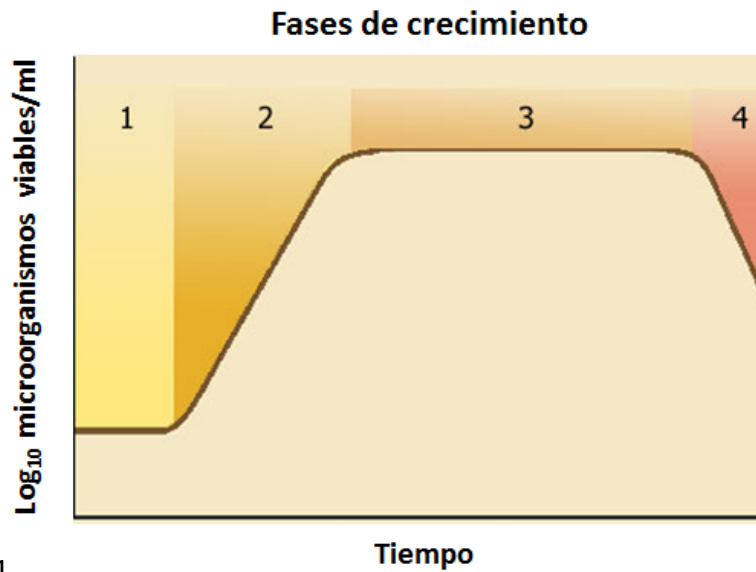
El importante papel de las bacterias lácticas en la elaboración de productos alimenticios resalta la necesidad de una adecuada preservación.

Los diferentes métodos de preservación bacteriana (congelación, liofilización, secado *spray*, etc) producen una deshidratación celular, que es responsable del daño bacteriano. La ausencia de agua puede generar cambios estructurales en las membranas lipídicas, que constituyen el primer sitio de daño durante estos procesos. Esta pérdida de agua es responsable tanto del daño en la membrana como de la pérdida de viabilidad, lo cual retrasa el proceso de fermentación. Por lo tanto, el uso de protectores es crucial para evitar estos daños. Tal como se indicó oportunamente en la introducción general (sección 5.2.7. y 5.2.8.), los GOS han demostrado tener buenas propiedades protectoras.

### Cinéticas de crecimiento

Para evaluar la capacidad protectora de estos azúcares es importante verificar la recuperación de bacterias deshidratadas. Por lo tanto, el seguimiento de la cinética de crecimiento de microorganismos deshidratados proporciona información sobre la evolución de la recuperación bacteriana.

En un sistema cerrado o cultivo en medio no renovado (cultivo monofásico), se obtiene una curva de crecimiento como la de la **Figura 1**. Esta curva de crecimiento puede dividirse en distintas fases llamadas fase de latencia (*lag*), fase exponencial (*log*), fase estacionaria y fase de muerte.



**Figura 1:** Curva de crecimiento típica de una población bacteriana. 1, 2, 3 y 4 corresponden a las fases *lag*, *log*, estacionaria y muerte, respectivamente.

**Fase de latencia (*lag*):** en esta fase las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento y no tienen aún la posibilidad de dividirse. Durante este período se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas. La fase *lag* puede ser más breve o más larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. Entre otras causas, se observa un retraso en la fase *lag* cuando las células del inóculo se encuentran dañadas a causa de diferentes situaciones de estrés (calor, radiaciones, compuestos tóxicos, fuerza iónica, etc.). La reparación de estos daños y recuperación bacteriana requieren un determinado tiempo, lo cual aumenta la duración de la fase *lag*.

**Fase exponencial (*log*):** la fase *log* es un período caracterizado por la duplicación celular. El número de nuevas células que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población existente. En general, las células en crecimiento exponencial son las que están fisiológicamente más activas y, por ello, son a menudo las indicadas para estudios enzimáticos y estructurales.

**Fase estacionaria:** la fase estacionaria comienza por dos motivos: cuando un nutriente esencial del medio de cultivo se consume y llega a ser un factor limitante del crecimiento o bien cuando se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen que cese el crecimiento exponencial. En esta fase

no hay aumento ni descenso neto del número de células. Aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria muchas funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos casos puede haber un crecimiento lento en la fase estacionaria.

**Fase de muerte:** si la incubación continúa luego de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Si ocurre esto último, se dice que la población está en fase de muerte (Clark *et al.*, 2009).

## **Métodos espectroscópicos en el seguimiento de las cinéticas de crecimiento**

### **Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)**

Entre los métodos más utilizados para seguir una cinética bacteriana se encuentra la lectura de absorbancia. Si bien es un método rápido, las bacterias muertas también contribuyen a la absorbancia del cultivo, aumentando falsamente los valores leídos. Para evitar esta desventaja, es posible realizar recuentos en placa durante el crecimiento bacteriano, aunque el monitoreo de este modo se convierte en un método engorroso. Existen otros métodos de monitoreo, tales como impedanciometría, pHmetría, citometría de flujo, etc. (Begot *et al.*, 1996).

Por su parte, los métodos espectroscópicos permiten seguir en tiempo real todos los cambios bioquímicos que ocurren en la curva de crecimiento. En particular, los métodos basados en espectroscopía vibracional, entre los que se encuentra el NIR (ver sección 7.6. en la Introducción General) son particularmente útiles para monitorear procesos biológicos de forma rápida y sin la necesidad de utilizar reactivos exógenos. Los espectros obtenidos en NIR proporcionan una rica fuente de información derivada de *overtones* y modos de combinación de las vibraciones fundamentales asociadas a los grupos C-H, O-H y N-H (Ciurczak, 2007).

### **Citometría de flujo multiparamétrica**

Las técnicas basadas en análisis de fluorescencia entre las que se encuentra la citometría de flujo multiparamétrica (CFM), pueden ser útiles para proporcionar información sobre el estado fisiológico y el deterioro celular durante los procesos de preservación. La CFM es una técnica de análisis celular multiparamétrica cuyo

fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas y de a una por delante de un haz de luz focalizado. La ventaja analítica de la CFM es su capacidad para realizar mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células, permitiendo definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja.

Los parámetros celulares que se miden pueden ser extrínsecos o intrínsecos, dependiendo del reactivo que se utilice. Para los ensayos de fluorescencia intrínseca no se necesita pretratamiento de las muestras, mientras que los estudios sobre componentes celulares específicos utilizando fluoróforos (fluorescencia extrínseca) requieren un tratamiento previo al análisis de las células.

Muchas sondas fluorescentes se han utilizado para analizar diferentes parámetros fisiológicos tales como integridad de membrana, actividad enzimática intracelular, viabilidad celular, potencial de membrana y pH intracelular. El uso combinado de las sondas diacetato de carboxifluoresceína (cFDA) y yoduro de propidio (PI) permite discriminar células viables, muertas y dañadas (Rault, Béal, Ghorbal, Ogier, & Bouix, 2007). El cFDA difunde pasivamente al interior de la bacteria. Los grupos acetato de la sonda se hidrolizan por la acción de las esterasas intracelulares, generando éster de succinimidil carboxifluoresceína, que es altamente fluorescente (verde). Por lo tanto, sólo las bacterias vivas y dañadas serán cFDA+. El PI sólo ingresa a la bacteria cuando las membranas están dañadas dando lugar a una fluorescencia roja. Por lo tanto, las bacterias muertas o dañadas serán PI+. De esta manera, el uso combinado de PI y cFDA permitirá diferenciar:

bacterias vivas: cFDA+ PI-

bacterias muertas: cFDA- PI+

bacterias dañadas: cFDA+ PI+

Teniendo en cuenta que la proporción de bacterias viables, dañadas y muertas es diferente para cada fase de crecimiento, el uso de citometría de flujo multiparamétrica permitiría analizar la recuperación de bacterias dañadas a lo largo del crecimiento, determinando así la eficiencia de cada protector utilizado.

En este capítulo se evaluó el papel de la lactulosa y de dos tipos de GOS como protectores frente a la deshidratación de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333. Para ello los microorganismos cosechados en fase estacionaria fueron deshidratados en desecadores con sílica gel hasta que no se detectaron cambios en la desorción de agua. Luego, los microorganismos fueron rehidratados en cloruro de sodio 0.85% p/v y se monitoreó su recuperación mediante espectroscopía NIR y determinación de la absorbancia a 600 nm. Los resultados se interpretaron utilizando un análisis integrado que incluyó: (a) CFM y (b) Análisis de Componentes Principales de los espectros NIR.

Se seleccionó la cepa *L. bulgaricus* por ser especialmente sensible a diferentes situaciones de estrés. En estudios previos ha sido utilizada como modelo para estudiar agentes protectores frente a procesos de preservación (Teixeira *et al.*, 1995; Gomez Zavaglia *et al.*, 2003; Oldenhof *et al.*, 2005; Tymczyszyn *et al.*, 2007; Tymczyszyn *et al.*, 2008a, 2011).

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismos utilizados

Se utilizó la cepa CIDCA 333 de *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*, aislada a partir de un fermento comercial (Gómez-Zavaglia et al., 1999).

### Medios de cultivo

#### Caldo MRS

(Caldo para *Lactobacillus* según De Man, Rogosa & Sharpe) (De Man et al., 1960)

| Composición                 | (g/litro) |
|-----------------------------|-----------|
| - Peptona universal         | 10.0      |
| - Extracto de carne         | 5.0       |
| - Extracto de Levadura      | 5.0       |
| - D(+) glucosa              | 20.0      |
| - Fosfato dipotásico        | 2.0       |
| - Tween®80                  | 1.0       |
| - Hidrogencitrato diamónico | 2.0       |
| - Acetato de sodio          | 5.0       |
| - Sulfato de Magnesio       | 0.05      |

pH= 6.5 ± 0.1

#### Condiciones de crecimiento

Partiendo del cepario conservado a -80°C, las bacterias se inocularon en caldo MRS (De Man et al., 1960) (inóculo al 1% v/v) y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo, se repicaron en medio MRS (inóculo al 1% v/v), y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

#### Azúcares protectores

**GOS:** Se estudiaron dos tipos de GOS:

- GOS Cup-Oligo H-70®** (Empresa Kowa, Tokio, Japón) un jarabe comercial que fue donado amablemente por Kochi SA (Santiago, Chile) y
- GOS Biotempo**, que fueron sintetizados y donados amablemente por Biotempo SL (Braga, Portugal).

La Tabla 1 muestra la composición de ambos GOS:

Tabla 1: Composición de los GOS (base seca) utilizados en esta tesis

|                       | Cup-Oligo H-70** | Biotempo*** |
|-----------------------|------------------|-------------|
| Producto              | Jarabe           | polvo       |
| Contenido de agua (%) | 25.0             | <5          |
| Glucosa (%)*          | 2                | ----        |
| Galactosa (%)*        | 3                | ----        |
| Lactosa + DP-2 (%)*   | 23               | ----        |
| DP3 (%)*              | 47               | 47          |
| DP4 (%)*              | 21               | 42          |
| DP5 o mayores (%)*    | 4                | 8           |
| Excipientes (%)*      | ----             | ----        |
| GOS totales (%)*      | ≥ 75             | 97          |

\*En base seca

\*\*Obtenido de Tymczyszyn *et al.*, 2011.

\*\*\* Obtenido de Torres *et al.*, 2011).

**Lactulosa:** Se utilizó lactulosa comercial [(4-O-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-fructofuranosa)] (Discovery Fine Chemicals, Dorset, UK).

#### **Deshidratación sobre sílica gel**

Se utilizaron alícuotas de 1 ml de cultivos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 en fase estacionaria (crecidos en MRS a 37°C hasta alcanzar aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml). Los microorganismos fueron cosechados por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos y lavados dos veces con soluciones 20% p/v de GOS Cup-Oligo H-70®, GOS Biotempo y lactulosa (previamente esterilizadas con filtros de 0.2 micrones de diámetro). Como control se utilizaron cultivos lavados 2 veces con cloruro de sodio 0.85% p/v. Los pellets fueron deshidratados en desecadores que contenían sílica gel hasta no detectarse cambios (gravimétricamente) en la desorción de agua (aproximadamente 7 días).

#### **Cinética de crecimiento**

Los microorganismos se rehidrataron con 1 ml de cloruro de sodio 0.85% p/v durante 15 minutos a 25°C. Posteriormente, se inocularon en 10 ml de caldo MRS y se



incubaron a 37°C. Para cada condición ensayada se realizaron cinéticas de crecimiento, determinando cada 60 minutos:

- a) Absorbancia a 600 nm.
- b) Espectros NIR. Cada espectro se registró en la región de 900-1700 nm, utilizando un espectrómetro modelo Ocean Optics NIR Quest 512 equipado con un detector de diodos de arseniuro de galio-indio (InGaAs) Hamamatsu de 512 pixels y alta estabilidad, en un banco óptico compacto con refrigerador termoeléctrico de dos etapas, y electrónica de bajo ruido. La resolución óptica fue de 2 nm (FWHM) y la relación señal:ruido, de 15000:1. Los espectros de absorción NIR se registraron con una configuración de transmisión utilizando dos sondas de fibra óptica de reflexión con bajo contenido de oxhidrilos (400 µm de diámetro de núcleo): una de ellas para transmitir la luz hacia la muestra y la otra (dirigida hacia el detector), para recoger la luz transmitida. La muestra líquida se colocó en una cubeta de cuarzo situado en un soporte conectado a las fibras ópticas. El tiempo de integración se fijó en 5 ms y se registraron 5 espectros para cada tiempo de incubación. La fuente de radiación utilizada fue una lámpara de tungsteno-halógeno, modelo LS-1 de Ocean Optics Company. La potencia de salida de la lámpara fue de 6.5 W. Para el registro de los espectros se utilizó el software SpectraSuite™ de OceanOptics (USA).

### **Análisis de Datos**

Se realizó un PCA sobre los espectros NIR registrados a lo largo de la cinética de crecimiento de las muestras deshidratadas en todas las condiciones, utilizando el software Unscrambler® (versión 9.8, CAMO, Noruega).

### **Análisis por Citometría de Flujo Multiparamétrica**

Se determinó la composición relativa de bacterias viables, dañadas y muertas a lo largo de la cinética de crecimiento mediante citometría de flujo multiparamétrica. Para ello, se utilizaron sondas fluorescentes: diacetato de carboxilfluorosceína (cFDA) y yoduro de propidio (PI) (Molecular Probes. Invitrogen SA, California EE.UU.) (Raoult *et al.*, 2007). Las determinaciones se llevaron a cabo en un equipo FACS Calibur, utilizando el *software Cell Quest* (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.) de acuerdo con Raoult *et al.* (2007). Por cada muestra se adquirieron 10000 eventos (300 eventos/s).

Como primer paso, se analizaron las bacterias sin marcar para localizar la población a estudiar. Previamente, se realizaron simples marcaciones para efectuar la compensación correspondiente. Se utilizó el canal FL1 (530 nm) para ajustar la fluorescencia verde de cFDA y el canal FL3 (670 nm) para establecer la fluorescencia roja de PI. Como control de células muertas fueron utilizadas bacterias tratadas térmicamente a 80°C durante 30 min, y como control de células vivas, bacterias recién cosechadas. Se diferenciaron 4 regiones: Q1 (bacterias muertas): PI+ y cFDA-; Q2 (bacterias con la membrana dañada): PI+ y cFDA+; Q3 (debris): PI- y cFDA-; y Q4 (bacterias viables): PI- y CFDA+.

$$[i / (Q1 + Q2 + Q4)] / 100$$

Donde  $i$  es Q1, Q2 o Q4. Los residuos no fluorescentes (debris) (Q3) fueron excluidos (Hiraoka *et al.*, 2002).

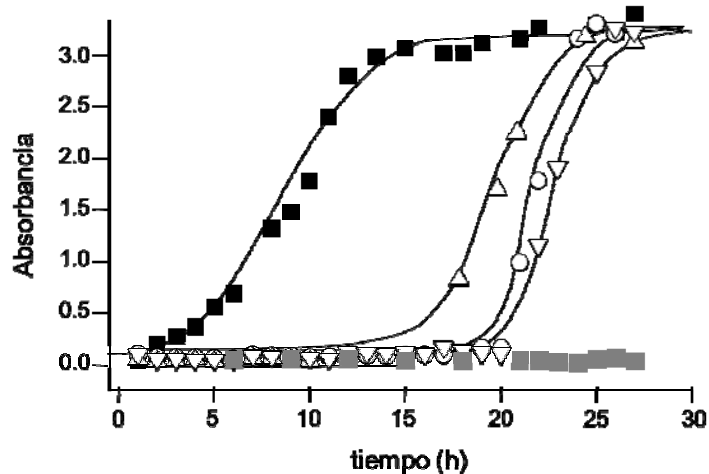
Para cada ensayo se utilizó 1 ml de cultivo lavado dos veces y resuspendido en el mismo volumen de agua milli-Q. Las suspensiones se incubaron con 1µl de cFDA (50g/l) a 28°C en oscuridad durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se añadió PI en una concentración final de 0.5m g/ml y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

### **Reproducibilidad de los resultados**

Se llevaron a cabo 3 sets de experimentos utilizando 3 cultivos de microorganismos diferentes. Las muestras fueron preparadas por duplicado para cada set experimental. Las diferencias relativas fueron reproducibles independientemente del set de cultivo utilizado. Los resultados obtenidos para los duplicados también fueron reproducibles.

## RESULTADOS

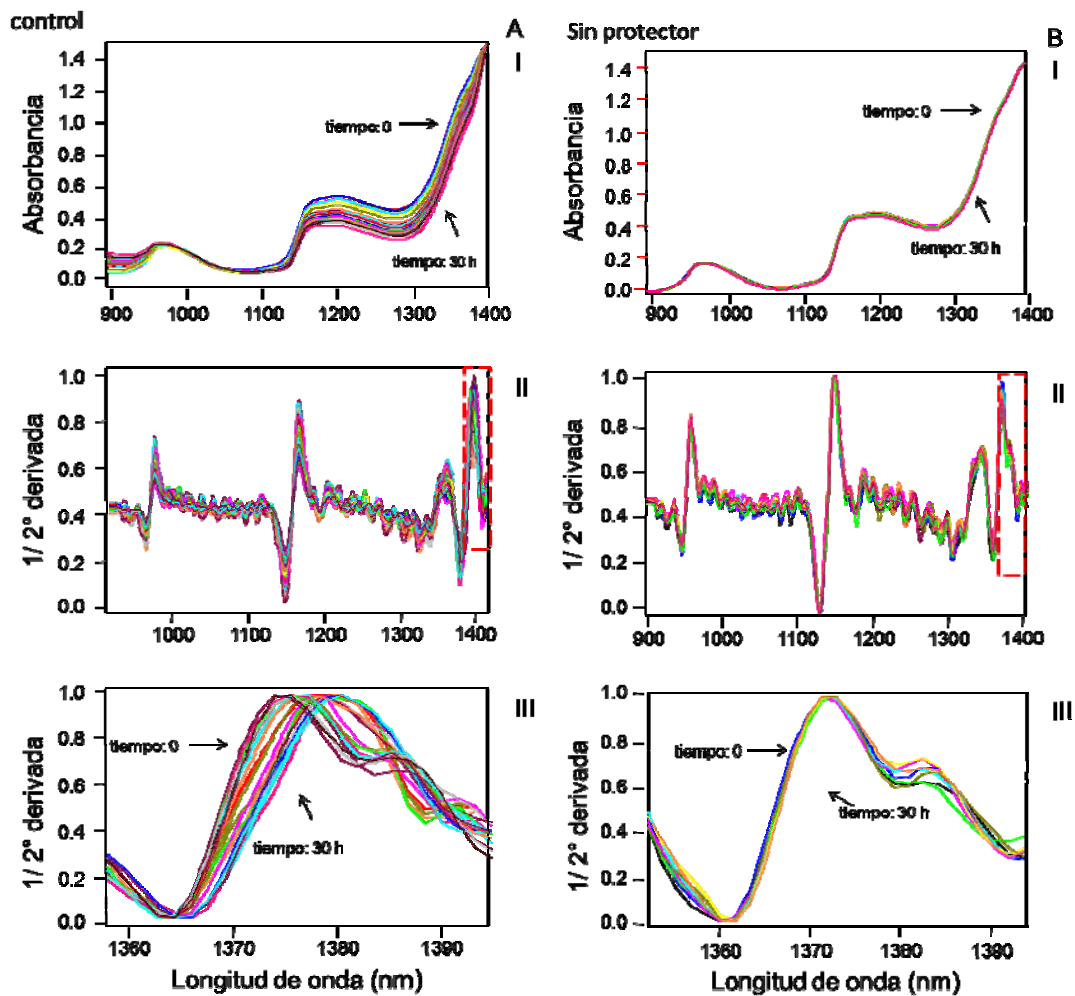
La **Figura 2** muestra la cinética de crecimiento para los microorganismos deshidratados en presencia de GOS Biotempo, GOS Cup-Oligo H-70<sup>®</sup> y lactulosa, obtenida por registro de la absorbancia a 600 nm. Teniendo en cuenta los tiempos *lag*, la eficiencia de los protectores fue: GOS Biotempo > GOS Cup-Oligo H-70<sup>®</sup> > lactulosa (15, 20 y 21 horas respectivamente). Las bacterias deshidratadas en ausencia de protector no fueron capaces de crecer después de 30 horas de incubación.



**Figura 2:** Cinética de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 deshidratada en presencia de GOS Biotempo (triángulos vacíos), GOS Cup-Oligo H-70<sup>®</sup> (círculos vacíos), y lactulosa (triángulos invertidos vacíos). Controles: Microorganismos no deshidratados (cuadrados negros), microorganismos deshidratados en ausencia de protector (cuadrados grises). La cinética fue seguida por determinación de la absorbancia a 600 nm.

En la **Figura 3** se muestran los espectros NIR registrados a lo largo de todas las cinéticas de crecimiento. Los espectros indicados como A, corresponden a los microorganismos control (no deshidratados), los indicados como B, a las bacterias deshidratadas en ausencia de protector, y los indicados con C, D y E, a las bacterias deshidratadas en presencia de GOS Biotempo, Cup-Oligo H-70<sup>®</sup> y lactulosa, respectivamente. Por otro lado, los gráficos indicados con I corresponden a los espectros crudos, los indicados con II, a la inversa de la derivada segunda de los

espectros, y los indicados con III, a la ampliación de la región de 1350 a 1400 nm, que fue la que mostró mayores cambios a lo largo de las cinéticas. La cinética del control mostró un corrimiento continuo de la banda a ~1370 nm hacia números de onda más altos (**Fig. 3AIII**). Por el contrario, no se observaron cambios en los microorganismos deshidratados en ausencia de protectores (los espectros aparecen totalmente superpuestos), lo cual se correlaciona con la ausencia de crecimiento microbiano (**Fig. 3BIII**). Nótese que las bacterias deshidratadas sin protector no fueron capaces de salir de la fase *lag* (cuadrados grises en la **Figura 2**). Para los microorganismos deshidratados en presencia de azúcares, se observó solapamiento de los espectros registrados al comienzo de las cinéticas. Para los tiempos intermedios, el desplazamiento (o corrimiento) de la banda a ~1370 nm fue gradual, tal como se observó para el control. Al final de la cinética, los cambios fueron más leves (**Fig.3AIII**, **CIII**, **DIII** y **EIII**).



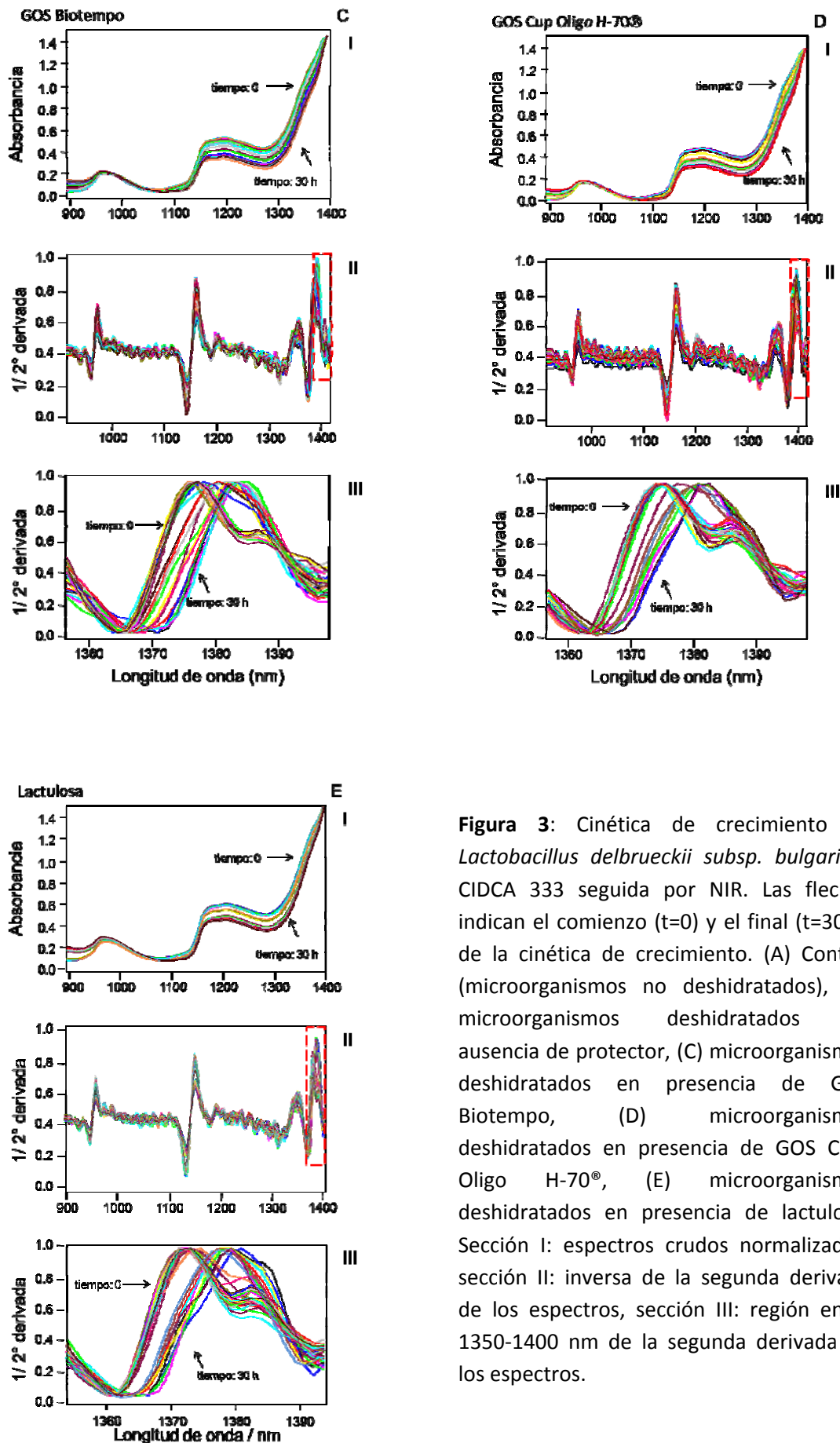
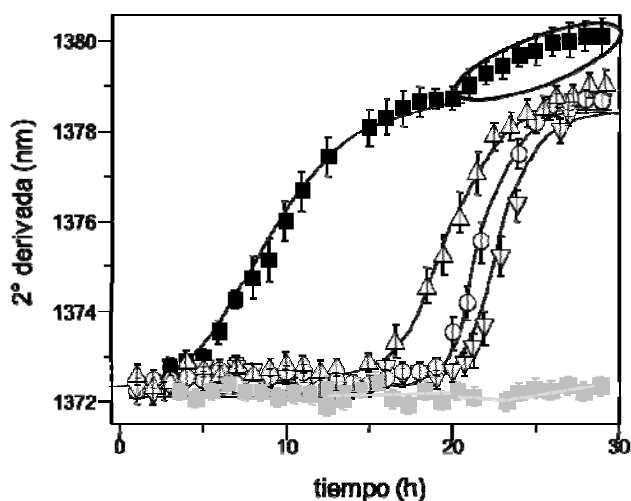


Figura 3: Cinética de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 seguida por NIR. Las flechas indican el comienzo (t=0) y el final (t=30 h) de la cinética de crecimiento. (A) Control (microorganismos no deshidratados), (B) microorganismos deshidratados en ausencia de protector, (C) microorganismos deshidratados en presencia de GOS Biotempo, (D) microorganismos deshidratados en presencia de GOS Cup-Oligo H-70®, (E) microorganismos deshidratados en presencia de lactulosa. Sección I: espectros crudos normalizados, sección II: inversa de la segunda derivada de los espectros, sección III: región entre 1350-1400 nm de la segunda derivada de los espectros.

La **Figura 4** muestra la evolución de la banda a  $\sim 1370$  nm durante la cinética de crecimiento, la cual reproduce correctamente la cinética de crecimiento presentada en la **Figura 2** en las fases *lag*, logarítmica y estacionaria temprana. En la fase estacionaria tardía, se observó un ligero desplazamiento de la banda analizada hacia mayores longitudes de onda. Este cambio se observó solamente en la cinética del control, ya que fue la única condición en la que los microorganismos alcanzaron la fase estacionaria tardía después de 30 horas de incubación (ver **Figura 4**: zona delimitada por la elipse).



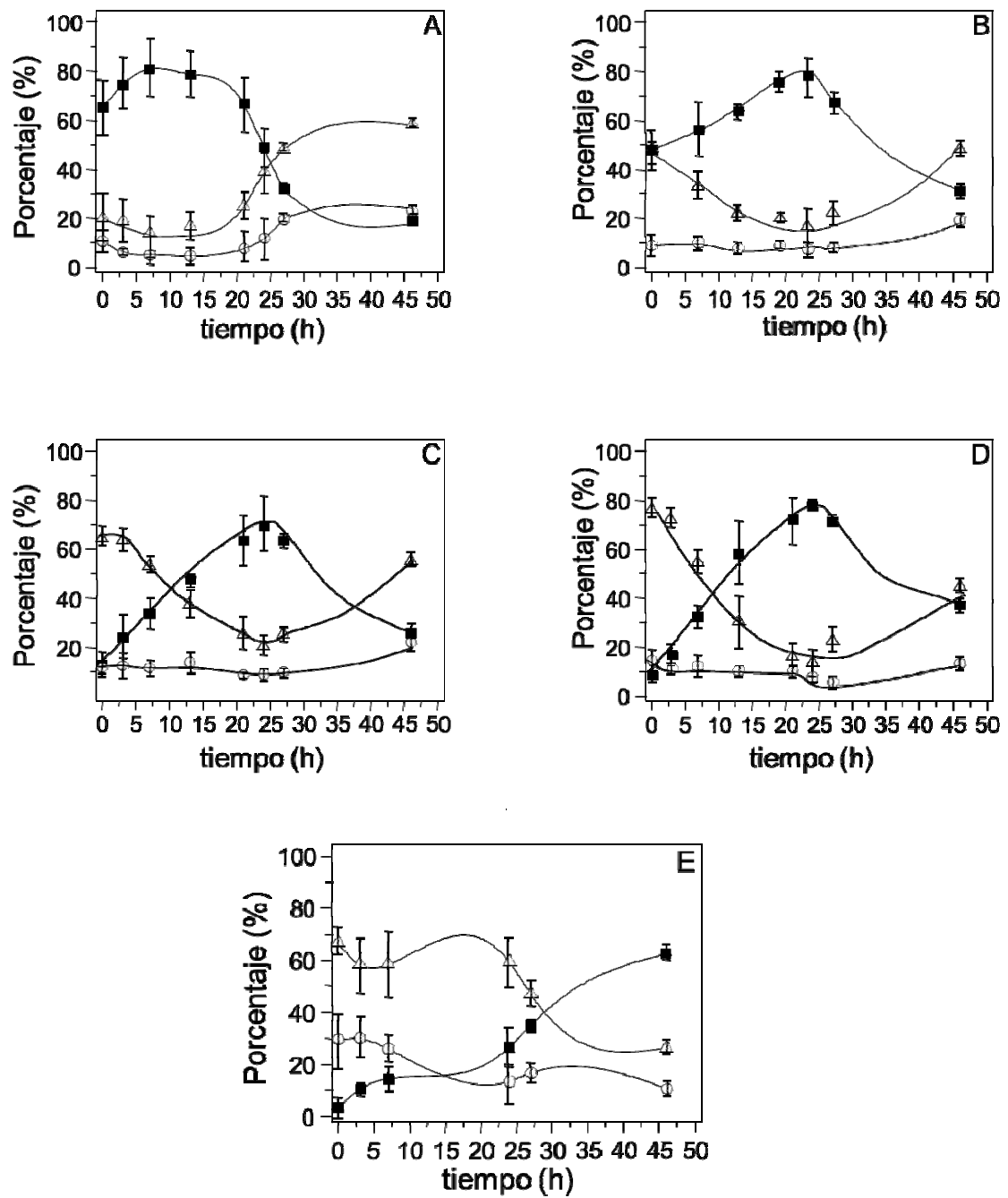
**Figura 4.** Posición de la banda a  $\sim 1370$  nm de la inversa de la segunda derivada en función del tiempo de incubación. Microorganismos deshidratados en presencia de: GOS Biotempo (triángulos vacíos), Cup-Oligo H-70® (círculos vacíos), y lactulosa (triángulos invertidos vacíos). Controles: Microorganismos no deshidratados (cuadrados negros), microorganismos deshidratados en ausencia de protector (cuadrados grises). Los símbolos dentro de elipse corresponden a los microorganismos en fase estacionaria tardía.

En la **Figura 5** se presenta la evolución del porcentaje de bacterias viables, dañadas y muertas a lo largo de las cinéticas de crecimiento estudiadas.

Durante las fases *lag*, logarítmica y estacionaria temprana de microorganismos previamente deshidratados con GOS y lactulosa, así como para los controles, se observó una mayor contribución relativa de células vivas y dañadas. En estas fases, el aporte de bacterias muertas no presentó variaciones, siendo de aproximadamente 10% (círculos vacíos en las **Figuras 5A-D**). La contribución de células muertas fue mayor para los microorganismos deshidratados en ausencia de protector (**Figura 5E**).

Inmediatamente después de la rehidratación ( $t=0$ ), las bacterias deshidratadas en presencia de protectores estaban mayoritariamente dañadas (triángulos vacíos en las **Figuras 5B, C y D**). Durante la fase *lag* se produce la reparación de ese daño, lo cual es consistente con el aumento continuo de células viables en esta fase de crecimiento. Al comienzo de la fase logarítmica se observaron los valores más altos de bacterias viables en todas las condiciones ensayadas (70-80%) (cuadrados negros en la **Figura 5**). Estos valores permanecieron sin alteraciones hasta la fase estacionaria temprana. En la fase estacionaria tardía, las células dañadas y muertas (que hasta ese momento permanecían alrededor del 10%) comenzaron a aumentar a expensas de las células viables. Esta observación fue particularmente clara en la cinética del control luego de 30 horas de incubación (**Figura 5A**). Para obtener un panorama completo de la evolución de los microorganismos vivos, dañados y muertos, se realizaron determinaciones hasta las 46 horas de incubación. De esta manera, se logró obtener información sobre el comportamiento de los microorganismos deshidratados en la fase estacionaria tardía.

Es importante mencionar que los ensayos de citometría de flujo multiparamétrica también brindaron información acerca de la capacidad protectora de los GOS y la lactulosa. Así, el porcentaje de células dañadas inmediatamente después de la rehidratación ( $t=0$ ) fue del 44, 65 y 76% para las células deshidratadas en presencia de GOS Biotempo, GOS Cup-Oligo H-70® y lactulosa, respectivamente (**Figuras 5B, C y D**).

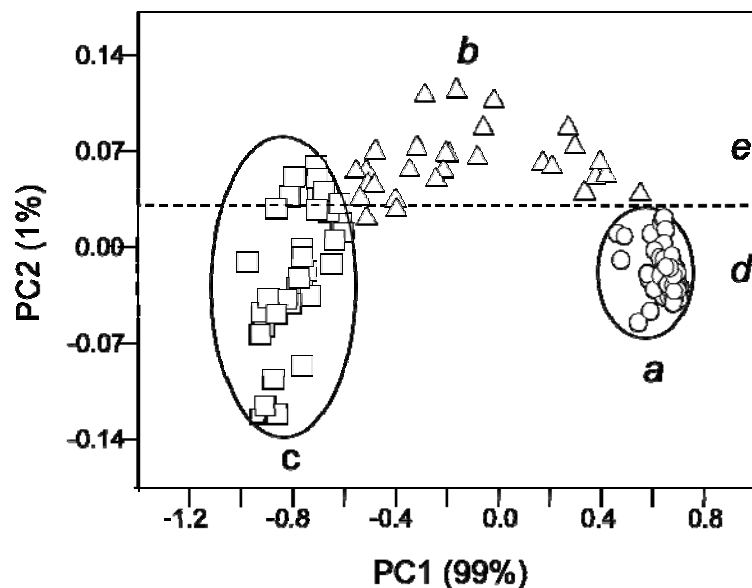


**Figura 5. Evolución de los microorganismos viables, dañados y muertos a lo largo de la cinética de crecimiento.**

(A) Control (microorganismos no deshidratados), (B) microorganismos deshidratados en presencia de GOS Biotempo, (C) microorganismos deshidratados en presencia de GOS Cup-Oligo H-70®, (D) microorganismos deshidratados en presencia de lactulosa y (E) microorganismos deshidratados en ausencia de protector. Los cuadrados negros, triángulos vacíos y círculos vacíos representan los microorganismos viables, dañados y muertos, respectivamente.



Posteriormente se realizó un PCA a partir de los espectros NIR (**Figura 3**) de las 5 cinéticas de crecimiento (control, bacterias deshidratadas en presencia de GOS Biotempo, Cup-Oligo H-70®, lactulosa y bacterias deshidratadas en ausencia de protector). La **Figura 6** muestra el gráfico correspondiente a PC2 vs PC1, donde la componente 1 explica el 99% de la varianza. Se observaron 3 grupos a lo largo del eje de PC1 (**Figura 6**). Uno de ellos contiene una gran cantidad de muestras agrupadas en un espacio restringido, y corresponde a los microorganismos en fase *lag* (**Figura 6a**, círculos vacíos indicados con la letra *a*). El segundo grupo es el más heterogéneo y corresponde a los microorganismos que se encuentran en fase logarítmica (**Figura 6b**, triángulos vacíos indicados con la letra *b*). En el tercer grupo se encuentran las bacterias en fase estacionaria, donde la distribución es bastante homogénea (**Figura 6c**, cuadrados vacíos indicados con la letra *c*). La línea de puntos separa dos grupos a lo largo del eje PC2. El agrupamiento superior (indicado con la letra *e*) corresponde a etapas en las que existe un mayor porcentaje de células viables (fase logarítmica, ver **Figura 5**), y el agrupamiento inferior (indicado con la letra *d*), corresponde a etapas en las que las células están mayoritariamente dañadas (fases *lag* y estacionaria, ver **Figura 5**).



**Figura 6.** Gráfico de PCA realizado a partir de los espectros NIR de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 en diferentes fases de crecimiento.

Se consideraron los espectros registrados a lo largo de las cinéticas de crecimiento de todas las condiciones estudiadas (controles y microorganismos deshidratados en presencia y en ausencia de protectores). Los círculos corresponden a los microorganismos en la fase *lag*, los triángulos, a los microorganismos en fase logarítmica y los cuadrados, a los que se encuentran en fase estacionaria. Las letras *a*, *b* y *c* indican los agrupamientos en la PC1 (correspondientes a las fases *lag*, logarítmica y estacionaria, respectivamente). Las letras *e* y *d*, separadas por la línea de puntos, indican los agrupamientos en la PC2 (correspondientes a células viables y dañadas, respectivamente).

## DISCUSIÓN

El uso de GOS como agentes protectores en la preservación de *starters* es muy reciente y existe poca información al respecto (Golowczyc et al., 2013a; Tymczyszyn et al., 2012, 2011). En el caso de la lactulosa, de acuerdo a nuestro conocimiento no existe información relacionada con sus propiedades protectoras en la bibliografía. Por lo tanto, se hace necesaria la realización de estudios profundos orientados a dilucidar los mecanismos involucrados en su rol como protectores.

Para investigar la eficacia de un compuesto como protector de bacterias frente a la deshidratación, es muy importante evaluar la recuperación de los microorganismos después del proceso deshidratación-rehidratación. Por esta razón, las cinéticas de crecimiento de microorganismos deshidratados y rehidratados son útiles para analizar la recuperación de los mismos. Los resultados obtenidos demuestran que la espectroscopia NIR proporciona información relevante acerca de la recuperación bacteriana luego del proceso de deshidratación-rehidratación (**Figura 3, 4 y 6**).

El PCA realizado en este capítulo permitió no sólo discriminar la fase de crecimiento en la que se encuentran los microorganismos, sino también discriminar los microorganismos de acuerdo al daño que presentan. El alto porcentaje de varianza que explica la PC1 (99%) indica la capacidad del NIR para discriminar la fase de crecimiento en la que se encuentran los microorganismos (**Figura 6**). Los microorganismos en fase *lag* se agruparon en un espacio reducido debido al importante solapamiento de los espectros registrados en esta fase de crecimiento (**Figuras 3 y 6**). En este sentido, el elevado solapamiento observado en los espectros correspondientes a los microorganismos deshidratados en ausencia de protector (que se mantuvieron en fase *lag* durante 30 horas de incubación; **Figura 3BI**) explica claramente la alta densidad del agrupamiento observado para esta fase de crecimiento (**Figura 6a**). Los microorganismos en fase estacionaria también se agruparon de manera homogénea a lo largo del eje de PC1, lo cual se correlaciona con la baja variabilidad de los espectros en esta fase (**Figura 6c**). Por el contrario, la variabilidad de los espectros correspondientes a los microorganismos en fase exponencial resultó en un grupo heterogéneo a lo largo de PC1 (**Figura 6b**).

Por otro lado, la componente PC2, permitió discriminar dos grupos de acuerdo al porcentaje de células viables y dañadas (o muertas) (**Figura 6**, grupos **e** y **d**). El análisis por citometría de flujo multiparamétrica sustenta esta interpretación (**Figura 5**). En la fase exponencial, la mayor parte de los microorganismos estaban viables (70-80%). Esto explica que formen un grupo homogéneo en la PC2 (**Figura 6e**). Por otro lado, en la fase *lag* predominaron las células dañadas (**Figura 5**), lo que explica la agrupación de los microorganismos en esta fase a lo largo del eje de PC2 (**Figura 6**, grupo **d**). En cuanto a los microorganismos en fase estacionaria, éstos se distribuyeron en ambos grupos a lo largo de PC2. La coexistencia de células viables y dañadas en esta fase (con un aumento de dañadas en la fase estacionaria tardía), explica esta observación (**Figuras 5 y 6c, d y e**). Es importante señalar que el desplazamiento de la banda a  $\sim 1370$  nm en la fase estacionaria tardía (**Figura 4**, región limitada por la elipse) se correlaciona con un aumento de las células dañadas y muertas (**Figura 5**). Esto indica que el monitoreo de las cinéticas de crecimiento mediante NIR brinda información adicional acerca del estado fisiológico de las bacterias. Todas estas observaciones refuerzan la utilidad de la espectroscopia NIR para obtener información fisiológica de manera sencilla, en tiempo real y sin la necesidad de reactivos exógenos.

La información proporcionada por los ensayos de citometría de flujo multiparamétrica, explicó también la diferente capacidad protectora de los GOS y la lactulosa. Si se considera que al comienzo de la fase exponencial, las células están mayoritariamente viables (70-80% en todos los casos, incluidos los controles) y que durante la fase *lag* los microorganismos reparan el daño (el porcentaje de células dañadas disminuye durante la fase *lag*) (**Figura 5**), se podría concluir que la extensión de la fase *lag* está determinada por la disminución de las células dañadas, la cual a su vez está condicionada por el porcentaje de células dañadas inmediatamente después de la rehidratación ( $t=0$ ). Por lo tanto, cuanto menor sea porcentaje de células dañadas luego de la rehidratación, menor será el tiempo requerido para reparar el daño. En este sentido, para  $t=0$  se observó un porcentaje de bacterias dañadas de 44, 65 y 75% para los microorganismos deshidratados en presencia de GOS Biotempo, GOS Cup-Oligo H-70<sup>®</sup> y lactulosa, respectivamente (**Figuras 5B, C, D**). Esto explica la mayor capacidad protectora del GOS Biotempo (menor tiempo *lag*) (**Figuras 2, 4 y 5**). El

tiempo reducido de la fase *lag* en la cinética de crecimiento del control (20% de células dañadas para  $t=0$ ) sustenta esta observación.

Tal como se expuso en la Introducción General (sección 4.1. y 4.2.), se han propuesto dos hipótesis para explicar la capacidad protectora de los azúcares: a) la hipótesis de vitrificación (formación de una matriz amorfa o vítrea), y b) la hipótesis del reemplazo de moléculas de agua. Como también se expresó en la Introducción General, estas dos hipótesis no son excluyentes. De hecho, diferentes autores (Schebor *et al.*, 2000; Cerrutti *et al.*, 2000) han informado que en muchos casos, la vitrificación es una condición necesaria pero no suficiente para una adecuada protección de membranas biológicas durante procesos que involucran deshidratación. Esto explica por qué algunos polisacáridos no son buenos protectores a pesar de tener Tg elevadas (*i.e.* maltodextrina, almidón). En este sentido, la combinación de polisacáridos con elevada Tg con azúcares pequeños con Tg más bajas resulta una estrategia adecuada de preservación.

De acuerdo a la información obtenida de bibliografía, los GOS Biotempo tienen una mayor Tg que los GOS Cup-Oligo H-70<sup>®</sup>, lo cual explica su mayor capacidad protectora sobre la base de la hipótesis de vitrificación. La diferente composición de los GOS Biotempo y Cup-Oligo H-70<sup>®</sup> proporciona más información para interpretar los mecanismos protectores. A diferencia de los GOS Cup-Oligo H-70<sup>®</sup>, los GOS Biotempo se obtuvieron luego de remover mono y disacáridos (Torres *et al.*, 2011). Esto resulta en: a) un mayor contenido de DP3 y DP4 en los GOS Biotempo (ver Tabla 1) y b) la presencia de mono y disacáridos en los GOS Cup-Oligo H-70<sup>®</sup>. En función de la hipótesis del reemplazo de moléculas de agua, se puede conjeturar que el mayor contenido de oligosacáridos de mayor grado de polimerización (DP3 y DP4), da lugar a interacciones más fuertes con los grupos polares de las membranas bacterianas. Teniendo en cuenta la vitrificación es una condición necesaria pero no suficiente para explicar la protección, la explicación propuesta parece factible.

En este sentido, Crowe *et al.* (1998), informaron que la capacidad de los azúcares para disminuir la Tm está determinada por su tamaño. De hecho, la rafinosa (DP3) es más eficaz que la trehalosa, y ésta más que la glucosa para disminuir la Tm de membranas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Hinchá *et al.* (2003), llevaron a cabo un estudio sistemático sobre la estabilidad de fosfatidilcolina de huevo (EPC) en presencia de

diferentes azúcares de la familia de la rafinosa: sacarosa (DP2), rafinosa (DP3), estaquiosa (DP4), y verbascosa (DP5). Estos autores encontraron que los azúcares estudiados previenen la fusión de liposomas de EPC, lo cual mejora con el aumento del DP. Esta estabilización se explica teniendo en cuenta la mayor capacidad de los oligosacáridos de mayor DP para interactuar con membranas lipídicas (disminuyendo la  $T_m$ ), y también su mayor  $T_g$  (Hincha *et al.*, 2003).

En el caso de los GOS Cup Oligo H-70®, la presencia de mono y disacáridos junto con oligosacáridos de mayor DP también tiene un efecto de vitrificación, aunque menor que en los GOS Biotempo (Torres *et al.*, 2011; Tymczyszyn *et al.*, 2012). Las células deshidratadas en presencia de lactulosa resultaron más dañadas luego de la rehidratación (76% a  $t=0$ , **Figura 5**). La lactulosa es un prebiótico ampliamente reconocido; sin embargo, sus propiedades físico-químicas no han sido investigadas aún. De acuerdo con los resultados presentados, su menor capacidad protectora podría explicarse sobre la base de su menor capacidad de vitrificación. En el capítulo II se presentarán resultados relacionados con la vitrificación de la lactulosa.

## **CONCLUSIONES**

El impacto de los resultados obtenidos se puede considerar desde dos perspectivas principales: a) la utilidad de NIR para proporcionar información completa acerca de la fisiología bacteriana durante la cinética de crecimiento; b) la eficiencia de GOS y lactulosa como protectores bacterianos durante la deshidratación.

La reparación del daño bacteriano resultante de la deshidratación es crítico para la fermentación. El registro de los espectros NIR es tan simple como la realización de determinaciones turbidimétricas, pero tiene la enorme ventaja de proporcionar información sobre el estado fisiológico de las células. En este sentido, la posibilidad de seguir la evolución de las bacterias viables de una manera rápida y no invasiva sustenta firmemente el uso de NIR para el monitoreo de fermentaciones a nivel industrial.

## CAPÍTULO II

**Determinación de los estados amorfos y *rubbery* de azúcares prebióticos liofilizados utilizando espectroscopia de infrarrojo cercano y análisis multivariante**



## INTRODUCCIÓN

### **Calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía vibracional como métodos válidos para el estudio de estados vítreos**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica termoanalítica que permite monitorear las variaciones de entalpía de la muestra en estudio en relación a las de un material de referencia térmicamente inerte, cuando ambas son sometidas a un programa controlado de temperatura. Se trata de una técnica útil para el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, entre las cuales se encuentran transiciones térmicas como la Tg. En general, el DSC puede operar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos 600 °C. Por esta razón esta técnica de análisis se emplea para caracterizar aquellos materiales que sufren transiciones térmicas en dicho intervalo de temperaturas.

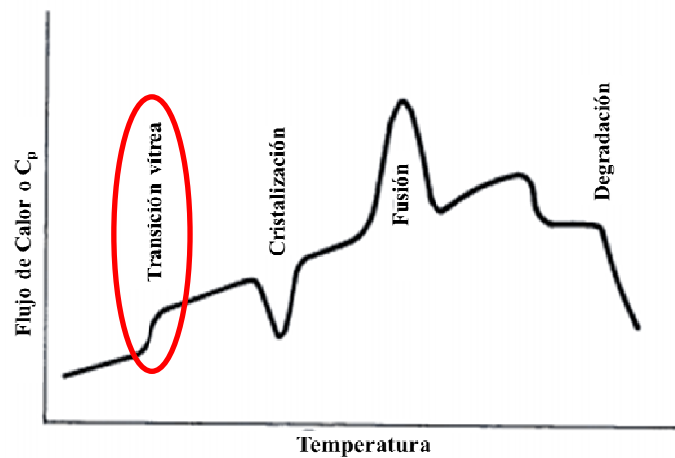
A nivel experimental, el DSC permite determinar el flujo de calor en la muestra a estudiar y en un material inerte de referencia de forma independiente. Ambas celdas que contienen la muestra y la referencia, están equipadas con un sensor para la medida de su temperatura, y una resistencia de calentamiento independiente para cada una de ellas. Estas resistencias mantienen ambas celdas a una temperatura programada  $T_p$ . Las temperaturas instantáneas de cada celda ( $T_m$  y  $T_R$ ) se miden y comparan continuamente con el valor programado  $T_p$ . El sistema trabaja de modo que la energía suministrada en cada momento por cada resistencia de calentamiento, es función de la diferencia entre las temperaturas de cada celda y la temperatura programada, es decir:

$$E_m = W_m \times (T_m - T_p) \quad (1)$$

$$E_R = W_R \times (T_R - T_p)$$

Donde  $E_m$  y  $E_R$  son las energías eléctricas suministradas por las resistencias, y  $W_m$  y  $W_R$  son constantes del sistema, que dependen de las características de cada material, como la masa y su capacidad calorífica ( $C_p$ ). La diferencia de energía,  $\Delta E = E_m - E_R$ , requerida para mantener las dos celdas a la temperatura programada, es la cantidad que se representa en función de la temperatura ( $T_p$ ,  $T_m$  o  $T_R$ ) o en función del tiempo

a temperatura constante. A estas dos representaciones se las denomina termogramas (Suriñach *et al.*, 1992; Roos, 1995).



**Figura 1:** Termograma típico de un polímero semicristalino. En rojo se resaltó cómo se visualiza una transición vítrea en el termograma, ya que este capítulo estará focalizado en este punto. Figura tomada de: Uceta & Horta (1991).

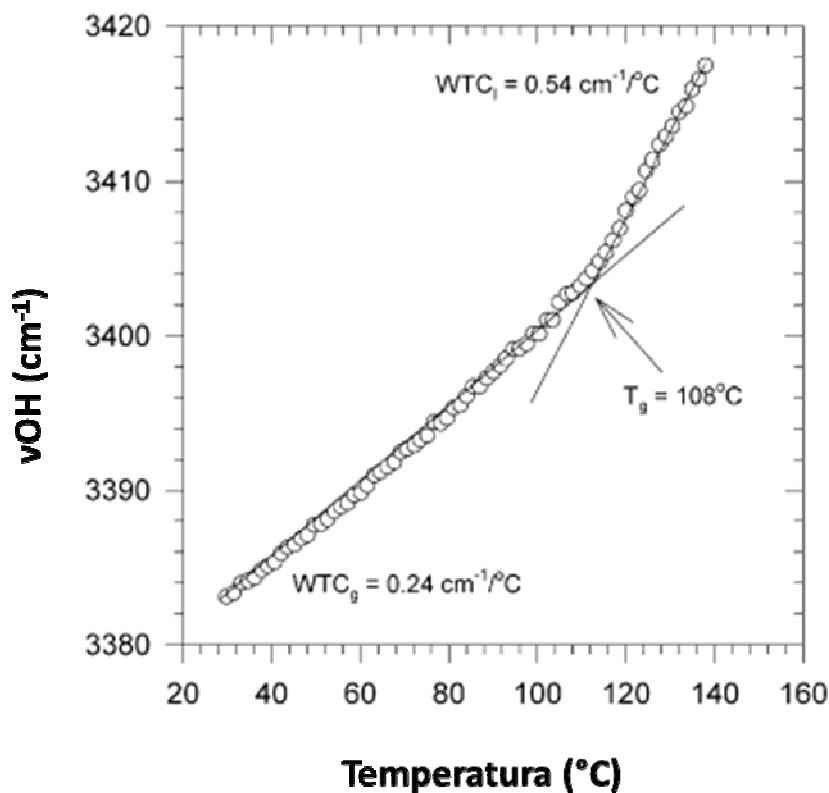
El estado vítreo es un líquido supersaturado termodinámicamente inestable y con una elevada viscosidad donde las reacciones químicas son extremadamente lentas. En el termograma se observa (**Figura 1**) como una transición de segundo orden. Pasada la Temperatura de Transición Vítrea ( $T_g$ ), se produce una marcada disminución de la viscosidad, observándose lo que se llama "líquido sobreenfriado" o estado *rubbery*.

Por otro lado, se ha demostrado que los métodos basados en espectroscopia vibracional proporcionan rápida y valiosa información fisicoquímica. La gran sensibilidad de los modos vibracionales *stretching* del OH ( $\nu_{OH}$ ) a los puentes de hidrógeno, permite diferenciar claramente estados vítreos de estados líquidos (Bonanno *et al.*, 1992; Small, 2006; Alander *et al.*, 2013).

El modo vibracional  $\nu_{OH}$  (*stretching* OH) absorbe en el rango  $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ , dependiendo de las condiciones del entorno. En compuestos cuyos grupos OH forman

puentes de hidrógeno fuertes, esta banda se desplaza considerablemente hacia números de onda más bajos. Por el contrario, cuando el grupo OH no está comprometido en la formación de puentes de hidrógeno, la banda correspondiente al vOH será observada a mayores números de onda. En el estado amorfo, y en presencia de bajas cantidades de agua, los azúcares interaccionan entre sí mediante puentes de hidrógeno débiles. Por encima de la  $T_g$ , estos puentes de hidrógeno azúcar-azúcar son reemplazados por puentes de hidrógeno azúcar-agua, que son más fuertes. Esto explica la observación de la banda correspondiente a vOH a mayores números de onda en el estado líquido y a menores números de onda en el estado vítreo. En base a esta información, Wolkers *et al.* (2004) definieron el coeficiente temperatura número de onda (WTC), a partir del cual es posible determinar la  $T_g$  de los azúcares.

Cuando se grafica la posición de la banda del vOH en función de la temperatura se observa un punto de intersección (**Figura 2**), el cual se asocia con la  $T_g$  del azúcar. Ese punto de intersección se conoce como WTC, es una medida del cambio en la fuerza de enlaces de hidrógeno con la temperatura del sistema.



**Figura 2:** Posición de la banda del vOH de la trehalosa en función de la temperatura. La intersección entre las líneas de regresión lineales en el

estado vítreo y líquido indica la Tg. En la figura se indican la Tg y los coeficientes de temperatura número de onda del estado vítreo (WTCg) y líquido (WTCL). Figura tomada de Wolkers et al., 2004.

El WTC puede determinarse a partir de otros modos vibracionales, como el bending COH ( $\delta\text{COH}$ ), en la región 1020-1030  $\text{cm}^{-1}$ . Sin embargo, en esta región existe un gran solapamiento con bandas correspondientes a otros modos vibracionales, y por ello se prefiere utilizar el  $\nu\text{OH}$  para la determinación de estados vítreos (Walkers *et al.*, 2004). Asimismo, teniendo en cuenta que las bandas observadas en el NIR son el resultado de modos de combinación y *overtone*s de modos vibracionales fundamentales relacionados con la formación de enlaces de hidrógeno (OH, NH, CH, SH) (ver sección 7.6. de la Introducción General), esta técnica también podría ser de gran utilidad a la hora de investigar estados vítreos.

En resumen, y a modo de comparación, es posible finalizar esta sección diciendo que así como el DSC permite determinar estados vítreos a partir de los cambios en la capacidad calorífica, la espectroscopía vibracional permite realizar estudios de vitrificación a partir de los cambios en la fuerza de los puentes de hidrógeno.

### **Estados amorfos y almacenamiento**

El efecto estabilizador de los GOS ha sido descrito recientemente sobre la base de su capacidad para formar matrices vítreas de alta viscosidad y baja movilidad molecular, en las cuales las interacciones moleculares están restringidas (Tymczyszyn *et al.*, 2011, 2012; Golowczyc *et al.*, 2013).

Como se describió anteriormente, la Tg es un parámetro que depende del contenido de agua de la muestra (Roos, 1995). Por lo tanto, la estabilidad de los productos deshidratados en función del tiempo se ve favorecida a temperaturas por debajo de la Tg (Tymczyszyn *et al.*, 2012). Sin embargo, las pequeñas moléculas que se encuentran en estas matrices, tales como agua, gases o moléculas orgánicas pequeñas presentan movilidad y pueden dar lugar a la cristalización con la consecuente desestabilización de los compuestos amorfos (Franks, 1999; Meste *et al.*, 2002; Y. H. Roos, 2009). Por esta razón, la Tg sólo funciona como un parámetro macroscópico, ya que para una

adecuada conservación de alimentos y productos relacionados con la alimentación, se requiere también una baja movilidad molecular. En la práctica, la baja movilidad molecular se alcanza cuando el contenido de agua y las temperaturas de almacenamiento son bajas (Tromp *et al.*, 1997; Schoonman *et al.*, 2002; Tymczynszyn *et al.*, 2012). Por lo tanto, el parámetro T-Tg (siendo T la temperatura de almacenamiento) es más apropiado para evaluar la exactitud de las condiciones de almacenamiento. Este parámetro se utiliza generalmente para determinar la capacidad de un compuesto para estabilizar un determinado producto a lo largo del tiempo. Esto indica que la condición más adecuada de almacenamiento será aquella en que la temperatura de almacenamiento esté por debajo de la Tg. Cuanto mayor sea el valor absoluto de T-Tg, más estable será el producto.

Como T-Tg es independiente del azúcar analizado, la determinación de este parámetro representa una herramienta útil para investigar la estabilidad de los azúcares amorfos en alimentos y productos farmacéuticos. Esto resulta de gran importancia práctica y económica, ya que el deterioro de los mismos afecta diferentes atributos de calidad de los alimentos, tales como, la textura, el aroma, la vida útil, entre otros (Franks, 1999, Le Meste *et al.*, 2002; Roos, 2009).

Teniendo en cuenta la relevancia del parámetro T-Tg para predecir la estabilidad de productos deshidratados en el tiempo y la utilidad de la espectroscopía vibracional para proporcionar de manera rápida y confiable información fisicoquímica acerca de los estados amorfos, el objetivo de este capítulo fue definir un modelo multivariante para predecir el parámetro T-Tg directamente a partir de los espectros NIR. Para este propósito, dos GOS de diferente composición y la lactulosa fueron deshidratados y equilibrados a 4 °C en diferentes condiciones de humedad relativa (RH). Se registraron los espectros NIR de los azúcares en cada una de las condiciones y, con los valores de Tg obtenidos por DSC como referencia, se definió un modelo de mínimos cuadrados parciales (PLS), que permitió determinar el parámetro T-Tg directamente a partir de los espectros.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Galacto-oligosacáridos y lactulosa**

Se estudiaron dos tipos de GOS (GOS Biotempo y GOS Cup-Oligo H-70®), cuya composición fue descrita en la página 79, y lactulosa.

### **Procedimiento de liofilización**

Se prepararon soluciones 20% p/v de GOS Cup-Oligo H-70®, GOS Biotempo y lactulosa. Se transfirió 1 ml de cada solución a viales de vidrio de 5 ml de volumen. Las soluciones fueron congeladas a -80°C durante 48 horas y posteriormente liofilizadas en un equipo Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Denmark) que funciona con un condensador a -50°C a una presión de la cámara de 0.04 mbar. El proceso de liofilización duró 48 horas.

### **Análisis estructural**

Los espectros FTIR fueron registrados en el infrarrojo medio (4000-500  $\text{cm}^{-1}$ ), en pastillas de KBr preparadas con una proporción de 1mg de azúcar liofilizado / 200 mg de KBr. Se realizaron 128 escaneos con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando un espectrómetro Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, MA, EE.UU.).

Los espectros Raman se registraron en un espectrómetro Raman Renishaw 1000B integrado a un microscopio Leica, sobre un sustrato de aluminio que contenía los azúcares liofilizados. El sistema Raman se equilibró con una silicona semiconductor utilizando la banda a 520  $\text{cm}^{-1}$  como *standard* y para optimizar aún más la calibración se usaron muestras de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) (que absorbe a 261, 364 y 667  $\text{cm}^{-1}$ ) y ciclohexano ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ) (que absorbe a 383, 426, 801, 1028, 1157, 1265, 1347 y 1443  $\text{cm}^{-1}$ ). La longitud de onda de excitación fue de 830 nm, y el láser se centró en la superficie de muestra con un objetivo de 50X (tamaño de la mancha: ~20  $\mu\text{m}$ ). La irradiación de energía laser sobre las muestras fue de 45mW.

### **Procedimiento de humidificación**

Los azúcares liofilizados fueron almacenados durante 15 días a 20°C en recipientes que contenían soluciones saturadas de LiCl,  $\text{KCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , NaCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , las cuales les otorgaron una humedad relativa del 11, 22, 33, 44, 52, 75 y 80%, respectivamente.

### **Temperaturas de transición vítrea**

Las temperaturas de transición vítrea de la lactulosa liofilizada y almacenada a las diferentes HR se determinaron por DSC utilizando un calorímetro Q100 (TA instruments, USA), calibrado con indio, plomo y zinc (velocidad de calentamiento: 10°C/min). Se utilizaron cápsulas de 40 µl, selladas herméticamente a presión (se usó una cápsula vacía como referencia). El valor informado es el promedio de dos determinaciones con una desviación estándar de  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

Para los GOS Cup Oligo H-70® y GOS Biotempo, se utilizaron los valores reportados en Tymczynsyn *et al.* (2012) y en Torres *et al.* (2011), respectivamente, determinados en las mismas condiciones que las descritas.

### **Espectroscopia de infrarrojo cercano**

Los espectros NIR de las muestras fueron registrados en la región espectral de 900 a 1700 nm utilizando un espectrómetro modelo Ocean Optics NIRQuest512, equipado con un detector de diodos de arseniuro de galio-indio (InGaAs) Hamamatsu de 512 elementos y alta estabilidad, en un banco óptico compacto, con refrigerador termoeléctrico de dos etapas y electrónica de bajo ruido. Se trabajó con una resolución óptica de 3 nm (FWHM) y una relación señal:ruido de 15000:1. Para iluminar la muestra y recoger la luz retrodispersada, se utilizó una sonda de fibra óptica de reflexión con bajo contenido de oxhidrilos, 400 µm de diámetro de núcleo, y apertura numérica de 0.22 en una configuración sonda/muestra de 45°. Se utilizó como fuente de radiación una lámpara de tungsteno-halógeno, modelo LS-1 de Ocean Optics Company. La potencia de salida de la lámpara fue de 6.5 W, trabajando en el rango visible/NIR (360-2500 nm). La operación del espectrómetro fue controlada mediante el software SpectraSuite™ de OceanOptics. El tiempo de integración se fijó en 600 ms y se registraron 5 espectros para cada muestra.

### **Análisis de Datos**

El Análisis Multivariante y el pre-procesamiento de los espectros NIR (corrección de dispersión multiplicativa extendida –EMSC-) se llevó a cabo utilizando el software The Unscrambler® (versión 10.0, CAMO, Noruega).

Con el fin de evaluar las diferencias espectrales entre azúcares equilibrados a diferentes HR, se realizó un PCA de los espectros NIR registrados a dichas HR (11-80% RH). Luego se calibró un modelo PLS, lo cual permitió determinar los valores de T-Tg (Martens, & Næs 1989; Esbensen, 2005). El modelo fue calibrado utilizando 34 espectros NIR, seleccionados de manera tal de cubrir todo el rango de T-Tg en estudio. Estos espectros seleccionados incluyeron espectros obtenidos a partir de experimentos y repeticiones independientes. Para calcular el parámetro de referencia T-Tg, se utilizaron los valores de Tg obtenidos por DSC. La robustez del modelo calibrado fue determinada en función del valor de correlación  $R^2$  y de los errores de calibración y predicción (RMSEC y RMSEP). Valores de correlación elevados y errores bajos indicarán una buena capacidad de clasificar o predecir muestras desconocidas (**Tabla 1**). Para validar el modelo se utilizó un conjunto de 35 espectros, recogidos de forma independiente de los utilizados para la calibración (y en las mismas condiciones que los espectros utilizados en la calibración).

**Tabla 1:** Información utilizada para definir el modelo PLS

| Muestra  |               |
|--|---------------|
| Nº total de espectros registrados  | 68            |
| Nº de espectros usados para la calibración                                   | 34            |
| Nº de espectros usados para la validación                                    | 34            |
| Nº de espectros no tenidos en cuenta para la calibración ( <i>outliers</i> ) | 0             |
| Método de validación   | Independiente |
| Tratamiento matemático   | Ninguno       |
| Factores PLS usados para la predicción                                       | 8             |



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis estructural de los azúcares. Espectros FTIR y Raman

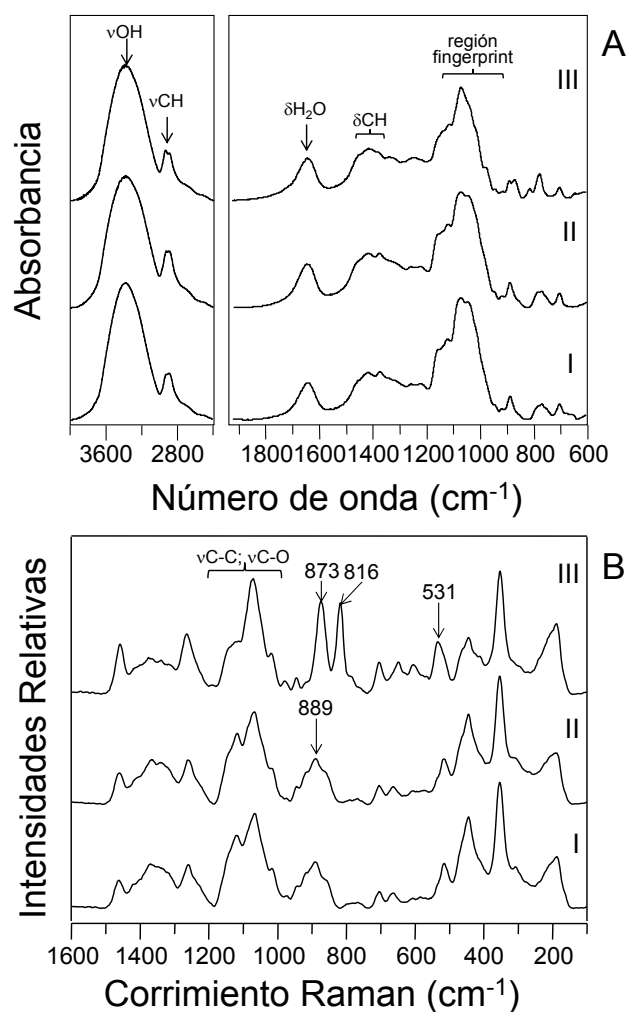
La espectroscopía vibracional (FTIR y Raman) representa una herramienta útil en el estudio de azúcares porque proporciona información tanto química como física de las muestras. Las **Figuras 3A y B** muestran los espectros FTIR y Raman de los GOS Cup-Oligo H-70, GOS Biotempo y lactulosa después de la liofilización. A diferencia de los espectros de azúcares cristalinos, cuya estructura es organizada y los espectros presentan bandas estrechas y bien resueltas (Ahlgvist & Taylor, 2002), en las **Figuras 3A y B** se observan bandas anchas y poco resueltas, típicas de los estados amorfos (estructuras desordenadas).

Los espectros FTIR de los 3 azúcares son similares en la mayoría de las regiones (**Figura 3A**). La intensa banda observada a  $3380\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo vibracional  $\nu\text{OH}$ , las bandas a  $2935$  y  $2886\text{ cm}^{-1}$  a los modos vibracionales  $\nu\text{CH}$ , y el grupo de bandas a  $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ , a  $\delta\text{CH}$  (**Figura 3A**) (Sekkal *et al.*, 1995). La banda a  $1643\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las moléculas de agua presentes en la matriz de azúcar amorfo. Las principales diferencias espectrales se observaron en la región denominada *fingerprint* (huella digital) de los azúcares ( $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ) (Sekkal *et al.*, 1995). Esta región es rica en bandas que proporcionan, colectivamente, un patrón característico del azúcar estudiado. Los principales modos vibracionales de absorción en esta región están relacionados con el enlace glicosídico C-O-C, y con los modos vibracionales  $\delta\text{COH}$  y  $\nu\text{C-C}$ . En el espectro de la lactulosa, se observa una banda más estrecha en esta región. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la estructura de este azúcar es más simple que la de los GOS (es un disacárido con un solo enlace glicosídico). Los espectros FTIR de otros disacáridos como la maltosa y la celobiosa, también presentan regiones *fingerprint* más estrechas que los azúcares de mayor grado de polimerización (Sekkal *et al.*, 1995).

La espectroscopía Raman también es una fuente rica de información sobre los azúcares. A pesar de ello, ha sido poco utilizada para evaluar la estructura de azúcares amorfos (Söderholm *et al.*, 1999; Connolly *et al.*, 2010). Los modos vibracionales de absorción en el Raman no difieren significativamente de los modos vibracionales en el FTIR. Sin embargo, los espectros Raman mostraron mayores diferencias entre la lactulosa y los GOS (**Figura 3B**).

Las bandas observadas en la región de 1200 a 1000  $\text{cm}^{-1}$  se pueden atribuir a los modos vibracionales  $\nu\text{C-C}$  y  $\nu\text{C-O}$  (Söderholm *et al.*, 1999). Las principales diferencias espectrales entre la lactulosa y los GOS se observaron en la región 900-800  $\text{cm}^{-1}$ . Esta región forma parte de la llamada “región anomérica”, ya que en ella pueden distinguirse diferentes anómeros de los azúcares (Söderholm *et al.*, 1999). Las bandas de esta región fueron atribuidas a los modos vibracionales del “esqueleto” del carbono anomérico (Söderholm *et al.*, 1999). Esto también explica las diferencias que presentan estas bandas en la lactulosa (873 y 816  $\text{cm}^{-1}$ ) respecto a los GOS (una banda más ancha centrada en 889  $\text{cm}^{-1}$ ). Las bandas presentes en la región de 500 a 300  $\text{cm}^{-1}$  se pueden atribuir a los modos vibracionales  $\delta\text{C-C-C}$ ,  $\delta\text{C-C-O}$ ,  $\delta\text{C-O}$  y  $\tau\text{C-C}$ . Mathlouthi & Luu (1980) informaron que el modo vibracional  $\nu\text{C-C-O}$  de la fructosa se observa a 531  $\text{cm}^{-1}$ . Por lo tanto, la banda de 531  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro Raman de la lactulosa (disacárido compuesto por fructosa y galactosa) se puede atribuir a este modo vibracional (**Figura 3BIII**).

En resumen, se observaron pequeños cambios en las posiciones, anchos e intensidades de las bandas en los espectros de los 3 azúcares. Las mayores diferencias fueron observadas en la lactulosa, y pueden explicarse teniendo en cuenta su estructura de disacárido y la presencia de los anillos de fructo-furanosa en lugar de los anillos de piranosa que presentan los GOS.

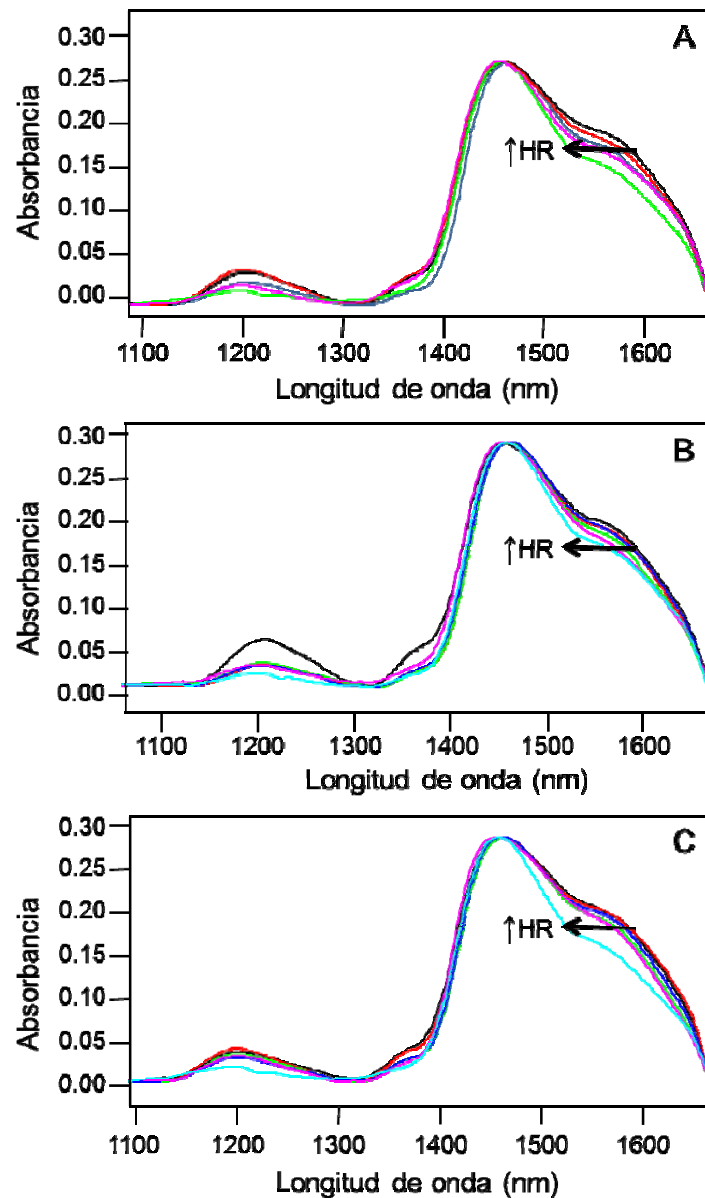


**Figura 3.** A: Espectro FTIR de GOS Biotempo (I), GOS Cup-oligo H-70 (II) y lactulosa (III). B: espectro Raman de GOS Biotempo (I), GOS Cup-oligo (II) y lactulosa (III).

### Efecto de la RH en los Espectros NIR

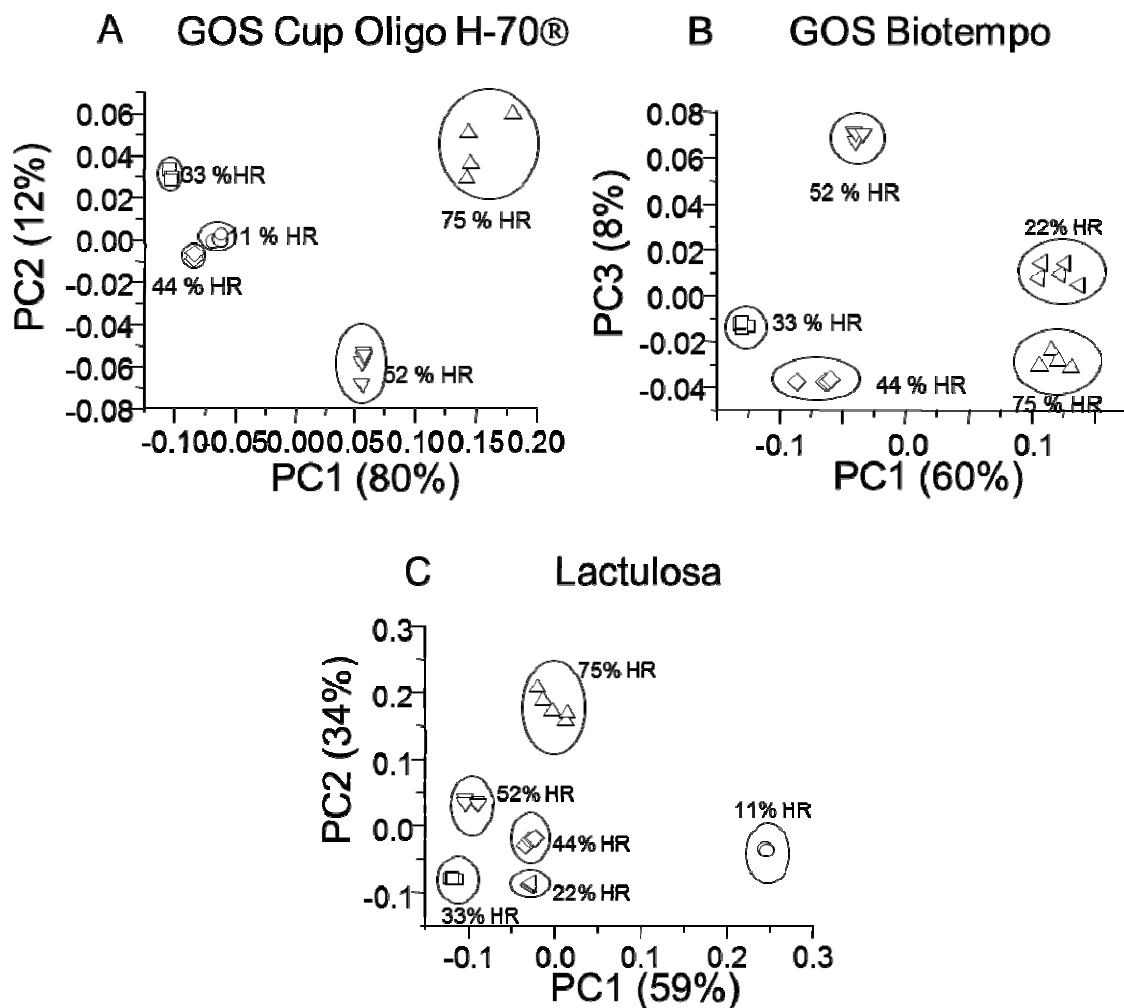
La sensibilidad de la espectroscopía de infrarrojo cercano a las moléculas de agua sustenta el uso de esta metodología para evaluar las propiedades de azúcares en estado amorfo. Debido a la baja capacidad de absorción del agua en el infrarrojo cercano, y teniendo en cuenta que los espectros NIR se originan de combinaciones y *overtones* de modos vibracionales fundamentales relacionados con los enlaces de hidrógeno (OH, NH, CH, SH) (ver sección 7.6. de la Introducción General, e introducción de este capítulo), se seleccionó esta técnica para analizar las propiedades termofísicas de los GOS y la lactulosa.

La **Figura 4** muestra los espectros de los GOS Cup-Oligo H-70, de los GOS Biotempo y de la lactulosa a diferentes HR. Las principales diferencias observadas en los espectros fueron una disminución clara del hombro a  $\sim 1571$  nm y una disminución en la intensidad de la banda a 1204 nm.

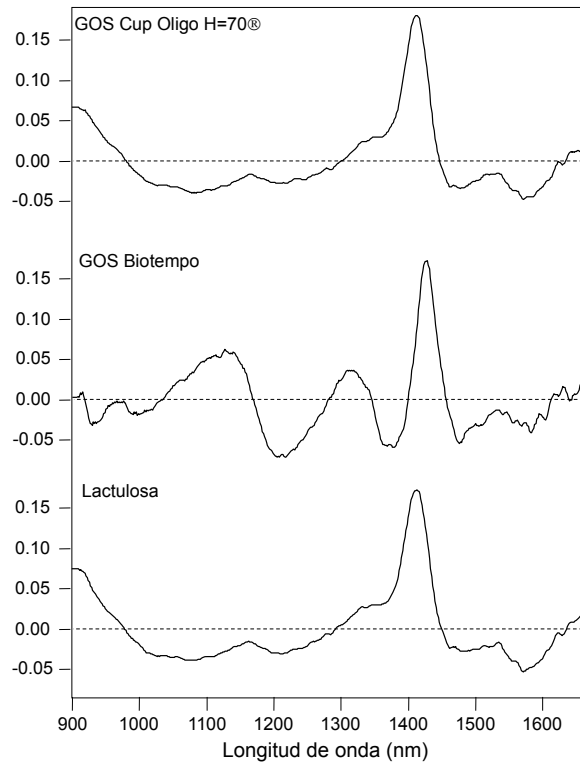


**Figura 4.** Espectros NIR de azúcares liofilizados y equilibrados a diferentes HR. A: GOS Cup-Oligo H-70, B: GOS Biotempo y C: Lactulosa. Las flechas indican aumento de HR.

En la **Figura 5** se muestra el PCA realizado para los tres azúcares equilibrados a diferentes HR. En los tres casos, las agrupaciones se correlacionaron con las HR de las muestras, y las componentes principales que los definen explicaron el 95% de la varianza. De acuerdo a los gráficos de *loadings* (**Figura 6**), la región de 1380 a 1500 nm fue la que aportó mayor información para explicar dichas agrupaciones. Como ya se indicó en la introducción de este capítulo, la capacidad del NIR para discriminar estados amorfos y *rubbery* está directamente relacionada con el tipo de enlaces de hidrógeno. Estos enlaces son más débiles en el estado amorfo (azúcar-agua) que en el estado *rubbery* (agua-agua). Esto explica el hecho de que el primer *overtone* del *stretching* (estiramiento) del grupo OH (2vOH) ocurra a números de onda más bajos en el estado *rubbery* (Gergely & Salgo, 2003; Wolkers *et al.*, 2004; Oldenhof *et al.*, 2005).



**Figura 5:** Gráficos de PCA realizados a partir de los espectros NIR de los 3 azúcares liofilizados y equilibrados a las diferentes RH. A: GOS Cup Oligo H-70®, B: GOS Biotempo, C: Lactulosa.



**Figura 6:** Gráfico de *loading* de la componente principal 1 (PC1), obtenido a partir de los espectros NIR de GOS Cup Oligo H-70®, GOS Biotempo y lactulosa equilibrados a diferentes RH (Figura 5).

Los estados amorfo y *rubbery* tienen implicancias importantes en el almacenamiento de alimentos y productos relacionados con la alimentación. En este sentido, una adecuada conservación alimentos (y también *starters*) requiere bajas movilidades moleculares y bajas temperaturas de almacenamiento. Así, un adecuado almacenamiento estará determinado no solamente por la  $T_g$  sino también por la temperatura de almacenamiento ( $T$ ). En la práctica, esto se consigue cuando la  $T$  está lo más alejada posible de la  $T_g$ , es decir, el valor absoluto del parámetro  $T-T_g$  debe ser lo más alto posible. Por otro lado, el parámetro  $T-T_g$  permite determinar si las

condiciones de almacenamiento son adecuadas, **independientemente del azúcar en cuestión** (Tromp *et al.*, 1997; Schoonman *et al.*, 2002; Tymczyszyn *et al.*, 2012).

Sobre esta base, y teniendo en cuenta la sensibilidad de NIR para determinar estados amorfos y *rubbery*, se definió un modelo PLS con el objeto de determinar T-Tg a partir de los espectros NIR (T: 4°C).

Los valores de Tg necesarios para calcular el parámetro T-Tg y construir el modelo PLS, se determinaron por DSC. Los resultados se muestran en la Tabla 2 (Ver Termogramas en ANEXO, pág. 165)

**Tabla 2:** Temperaturas de transición vítrea de GOS Cup Oligo H-70®, GOS Biotempo y lactulosa a diferentes HR.

| HR | GOS Cup Oligo H-70® <sup>1</sup><br>(°C) | GOS Biotempo <sup>2</sup><br>(°C) | Lactulosa<br>(°C) |
|----|--|-----------------------------------|-------------------|
| 11 | 49.71                                    | 105.71                            | 41.95             |
| 22 | 36.77                                    | 84.76                             | 33.10             |
| 33 | 36.32                                    | 69.08                             | 7.40              |
| 44 | 13.92                                    | 51.43                             | 1.72              |
| 52 | 6.36                                     | 37.62                             | -14.06            |
| 75 | -24.55                                   | n.d.                              | -47.55            |
| 80 | -41.87                                   | n.d.                              | n.d.              |

<sup>1</sup> Valores publicados por Tymczyszyn *et al.*, 2012.

<sup>2</sup> Valores publicados por Torres *et al.*, 2012.

El GOS Biotempo está formado por oligosacáridos de grado de polimerización superior a 3 (Torres *et al.*, 2011). El GOS Cup-Oligo H-70 está constituido además, por mono y disacáridos (Tymczyszyn *et al.*, 2011). Ha sido publicado que un mayor contenido de tri y tetrasacáridos en mezclas de oligosacáridos está relacionado con una mayor Tg (Higl *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2008). La lactulosa es un disacárido cuyas propiedades prebióticas han sido documentadas. Sin embargo, ésta es la primera vez que se estudian sus propiedades físico-químicas. La Tg de este azúcar, representada en la **Tabla 2**, podría explicar su menor efecto protector durante la deshidratación de bacterias lácticas (ver capítulo I de este trabajo de tesis). Los valores de Tg de los GOS

Cup Oligo H-70® son similares a los de otros azúcares utilizados ampliamente como protectores (trehalosa y lactosa), y superiores a la Tg de la sacarosa (Miao et al., 2008). Sin embargo, son inferiores a la Tg de los GOS Biotempo informada por Torres *et al.* (2011). Esto se podría explicar teniendo en cuenta la mayor proporción de DP4 y DP5 de los GOS Biotempo (Tabla 1 del capítulo 1 de esta tesis). Con respecto a la lactulosa, los valores de Tg determinados resultaron más bajos que los de la trehalosa y la lactosa pero superiores a la sacarosa (Miao et al., 2008).

## PLS

El modelo PLS fue calibrado y validado utilizando un conjunto de 34 espectros independientes (**Tabla 1**). Los espectros utilizados para la validación fueron registrados en las mismas condiciones de HR que los usados para calibrar el modelo. La **Figura 7** representa los valores de T-Tg predichos por el modelo. El error cuadrático medio de predicción (RMSEP) se representa en las barras de error-Y. Los espectros de los tres azúcares utilizados tanto para la calibración como para la validación, cubren un amplio rango de valores de T-Tg, lo cual otorga una mayor robustez al modelo de predicción. Los valores de T-Tg predichos por el modelo se correlacionan muy bien con los obtenidos por DSC (**Tabla 2**), dando validez al uso del modelo PLS para el estudio de muestras desconocidas. En la **Tabla 3** se muestran los parámetros estadísticos correspondientes a la calibración y validación del modelo.

**Tabla 3:** Parámetros estadísticos de los sets de calibración y validación del modelo PLS.

|                         | Set de calibración       |                         | Set de validación |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|
| Correlación             | 0.994                    | Correlación             | 0.966             |
| R-cuadrado <sup>1</sup> | 0.989                    | R-cuadrado <sup>1</sup> | 0.934             |
| RMSEC <sup>2</sup>      | 3.131 °C                 | RMSEP <sup>3</sup>      | 8.051 °C          |
| SEC <sup>4</sup>        | 3.178 °C                 | SEP <sup>5</sup>        | 8.148 °C          |
| Bias                    | 9.58x10 <sup>-5</sup> °C | Bias                    | -0.618 °C         |

<sup>1</sup>R-cuadrado: Coeficiente de determinación.

<sup>2</sup>RMSEC: Root Mean Square Error of Calibration.

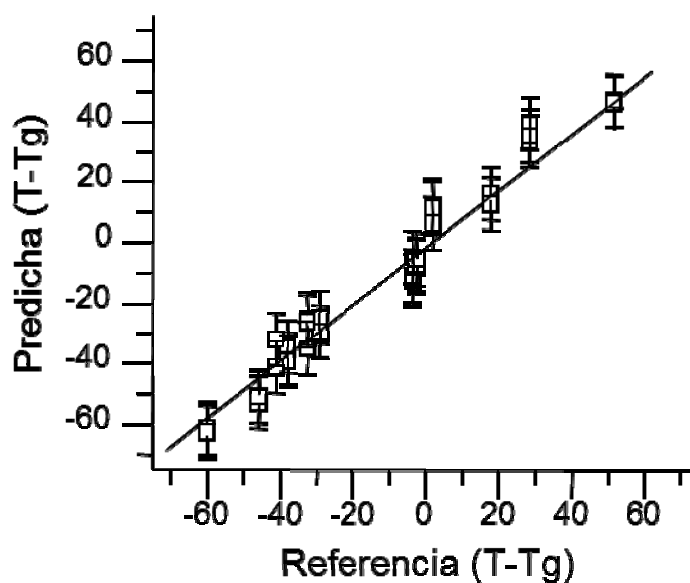
<sup>3</sup>RMSEP: Root Mean Square Error of Prediction.

<sup>4</sup>SEC: Error *standard* para la calibración.

<sup>5</sup>SEP: Error *standard* para la predicción.



Los estados amorfos son muy sensibles a los cambios de temperatura y de humedad. La  $T_g$  es específica para cada azúcar y depende de variables experimentales (Roos & Karel, 1991). Por encima del valor de  $T_g$ , la movilidad molecular aumenta en gran medida, y muchos compuestos amorfos sufren reacciones de deterioro. En el estado vítreo pueden ocurrir movimientos de rotación y vibración de moléculas pequeñas. Por esta razón cuando se utilizan azúcares como protectores en la preservación de microorganismos deshidratados se producen cambios conformacionales en proteínas y precipitación de sales, con efectos nocivos sobre los microorganismos. Esto demuestra la relevancia del modelo PLS desarrollado para determinar el parámetro  $T-T_g$ , el cual tiene en cuenta la temperatura de almacenamiento y la humedad de la muestra. Como los espectros NIR se correlacionan con  $T-T_g$ , el modelo es capaz de predecir no sólo el comportamiento de diferentes azúcares, sino también el comportamiento de los azúcares almacenados a diferentes temperaturas o HR.



**Figura 7.** Valores de predicción vs valores de referencia ( $T-T_g$ ). T: temperatura de almacenamiento ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Los valores de  $T_g$  descritos en la Tabla 2 (determinados por DSC) se utilizaron para determinar el parámetro de referencia ( $T-T_g$ ).

## CONCLUSIONES

Este capítulo proporciona información estructural sobre dos tipos de GOS y lactulosa a partir de los espectros Raman y FTIR (medio). La espectroscopía NIR permitió agrupar muestras equilibradas a diferentes HR (PCA).

Como una movilidad molecular baja es crucial para evitar reacciones de deterioro de azúcares durante el almacenamiento, la determinación del parámetro T-Tg (directamente relacionado con la movilidad de agua e independiente del azúcar considerado), es muy útil para predecir el comportamiento de productos alimenticios almacenados. La sensibilidad de NIR a T-Tg es de gran importancia para determinar la vida útil de alimentos y productos relacionados con la alimentación. Por lo tanto, la aplicación del modelo PLS para predecir T-Tg contribuirá a ahorrar tiempo en la determinación de las condiciones adecuadas de almacenamiento de alimentos y *starters*.

## **CAPÍTULO III**

**Efecto de la humedad relativa sobre muestras de bacterias liofilizadas en presencia de azúcares utilizando espectroscopia NIR y análisis multivariante.**

## INTRODUCCIÓN

Como se vió en el capítulo I, la eficiencia de los GOS y la lactulosa como agentes protectores fue variable dependiendo del grado de polimerización.

Como se mencionó en la introducción, la capacidad protectora de un determinado compuesto puede explicarse en base a dos hipótesis, la vitrificación y el reemplazo de agua. En el capítulo I se comprobó mediante citometría de flujo que tanto los GOS como la lactulosa protegen la membrana del daño producido por desecación, siendo los GOS de mayor pureza (GOS Biotempo, 97% GOS, ver Tabla 1 página 79), los más efectivos. Por otro lado, la capacidad de formar estados vítreos de los GOS fue estudiada recientemente (Torres *et al.*, 2011; Tymczyszyn *et al.*, 2011), y en el capítulo II se estudió la capacidad de la lactulosa para formar estados vítreos y se determinaron sus propiedades termofísicas a distintas humedades relativas.

La espectroscopía NIR resultó una herramienta muy útil para explicar cambios termofísicos que ocurren como consecuencia de los cambios en la fuerza de los puentes de hidrógeno (capítulo II), así como los cambios fisiológicos que ocurren a lo largo de la cinética de crecimiento (capítulo I). Por ejemplo, resultó particularmente útil para determinar el parámetro T-Tg en muestras liofilizadas y almacenadas en distintas condiciones.

Teniendo en cuenta la importancia de los estados vítreos para la preservación bacteriana, y la sensibilidad de la espectroscopia NIR a los cambios asociados a las moléculas de agua, el objetivo de este capítulo fue analizar mediante espectroscopia NIR la estabilidad de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CIDCA 333 durante la liofilización en presencia de tres azúcares (GOS Biotempo, GOS Cup Oligo H-70® y lactulosa) y posterior almacenamiento durante 21 días a 4°C, en diferentes condiciones de humedad relativa. La pérdida de viabilidad se determinó mediante recuentos en placa y se refirió a la viabilidad de la cepa antes de la liofilización. Se determinó la temperatura de transición vítrea mediante DSC para cada condición de almacenamiento. La información proporcionada por los espectros NIR se analizó en términos de viabilidad y HR, y se correlacionó con los resultados obtenidos a partir de los recuentos en placa y el DSC. Finalmente se definió un modelo basado en PLS-DA para clasificar muestras desconocidas en amorfas o *rubbery*. Debido a que el estado

físico de los *starters* está relacionado con su vida útil, este modelo permite determinar, a partir de los espectros NIR, si los *starters* están almacenados adecuadamente o no.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Microorganismos utilizados:**

Se utilizó la cepa CIDCA 333 de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*.

### **Procedimiento de Liofilización:**

Los microorganismos fueron crecidos en MRS a 37°C y cosechados por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos, una vez alcanzada la fase estacionaria.

Se tomaron alícuotas de 1 ml de cultivo, las cuales fueron lavadas 2 veces con: GOS Oligo H-70® 20% p/v, GOS Biotempo 20% p/v, Lactulosa 20% p/v o Cloruro de Sodio 0.85% p/v como control sin protector.

Los pellets obtenidos fueron congelados a -80°C durante 48 horas y posteriormente liofilizados en un equipo Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Denmark) que funciona con un condensador a -50°C a una presión de la cámara de 0.04 mbar. El proceso de liofilización duró 48 horas.

### **Procedimiento de humidificación:**

Los pellets liofilizados fueron almacenados a 4°C en recipientes que contenían soluciones de sales saturadas de LiCl, KCH<sub>3</sub>COO, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaCl y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, las cuales les otorgaron una humedad relativa del 11, 22, 33, 44, 52, 75 y 80%, respectivamente.

Después de 7 y 21 días de almacenamiento, los pellets fueron utilizados para determinar: a) Número de sobrevivientes, b) espectros NIR, c) Tg.

### **Determinación del número de sobrevivientes:**

El número de células viables se determinó antes y después del proceso de liofilización, y luego de 7 y 21 días de almacenamiento a las diferentes humedades relativas (HR) por recuento en placa en MRS agarizado (1.5% p/v de agar).

Para ello los microorganismos deshidratados fueron rehidratados al volumen original con solución de cloruro de sodio al 0.85% (p/v) durante 15 minutos. Se realizaron diluciones seriadas al décimo (desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup>) y se sembraron en placas de agar MRS. Las colonias fueron contadas luego de 48 horas de incubación a 37°C.

La pérdida de viabilidad se calculó como  $\log(N/N_0)$ , donde  $N$ , es el número de microorganismos viables en la condición ensayada y  $N_0$ , el número de microorganismos antes del proceso de liofilización (cultivo fresco).

#### **Espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR):**

Se registraron los espectros NIR de las bacterias liofilizadas en presencia y ausencia de los diferentes protectores y se los correlacionó con la viabilidad de las mismas y con la condición de HR a la cual fueron almacenadas.

#### **Espectros NIR:**

Los espectros NIR de las muestras fueron registrados en la región espectral de 900 a 1700 nm utilizando un espectrómetro modelo Ocean Optics NIRQuest512, tal como se explicó en el capítulo anterior (página 103). Se trabajó con una resolución óptica de 3 nm (FWHM) y una relación señal:ruido de 15000:1. Para iluminar la muestra y recoger la luz retrodispersada se utilizó una sonda de fibra óptica de reflexión con bajo contenido de oxhidrilos, 400  $\mu\text{m}$  de diámetro de núcleo, y la apertura numérica de 0.22 en una configuración de 45° (sonda/muestra). Se utilizó como fuente de radiación una lámpara de tungsteno-halógeno, modelo LS-1 de Ocean Optics Company (USA). La potencia de salida de la lámpara fue de 6.5 W, trabajando en el rango visible/NIR (360-2500 nm). La operación del espectrómetro fue controlada mediante el software Spectra Suite™ de Ocean Optics. El tiempo de integración se fijó en 600 ms y se registraron 5 espectros para cada muestra.

#### **Análisis de los espectros NIR:**

El Análisis Multivariante y el pre-procesamiento de los espectros NIR (corrección de dispersión multiplicativa extendida –EMSC-) se llevó a cabo utilizando el software The Unscrambler® (versión 10.0, CAMO, Noruega).

Se realizó la PLS-DA (ver sección 7.8.2.2. de la Introducción General) para definir un modelo que permitiera clasificar muestras desconocidas en “amorfas” o “*rubbery*” directamente a partir del espectro NIR (Martens & Næs, 1989; Esbensen, 2005; Mobili *et al.*, 2011). Tal como se indicó en la Introducción General (sección 7.8.2.2.), los modelos de PLS-DA operan de una manera supervisada, lo que significa que para su

definición se requiere conocimiento previo del estado físico (amorfo o *rubbery*) de las muestras liofilizadas y almacenadas a diferentes HR (Martens & Næs, 1989).

La robustez del modelo fue determinada en función del valor de correlación  $R^2$  y de los errores de calibración y predicción (RMSEC y RMSEP). Elevados valores de correlación y errores de calibración y predicción bajos indicarán una buena capacidad de clasificar o predecir muestras desconocidas (Tabla 1).

#### **Temperaturas de transición vítrea:**

Las temperaturas de transición vítrea de las muestras liofilizadas se determinaron por DSC utilizando un calorímetro Q100 (TA instruments, USA), calibrado con indio, plomo y zinc (velocidad de calentamiento: 10°C/min). Se utilizaron cápsulas de 40  $\mu$ l, selladas herméticamente a presión (se usó una cápsula vacía como referencia). El valor informado es el promedio de dos determinaciones con una desviación estándar de  $\pm$  1°C.

#### **Reproducibilidad de los resultados:**

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado utilizando 3 cultivos independientes de bacterias. Las diferencias fueron reproducibles, independientemente de los cultivos utilizados. Las diferencias entre las muestras fueron determinadas con el test *t* para pares de muestras. Las diferencias entre muestras fueron consideradas como estadísticamente significativas si  $P < 0.05$ .

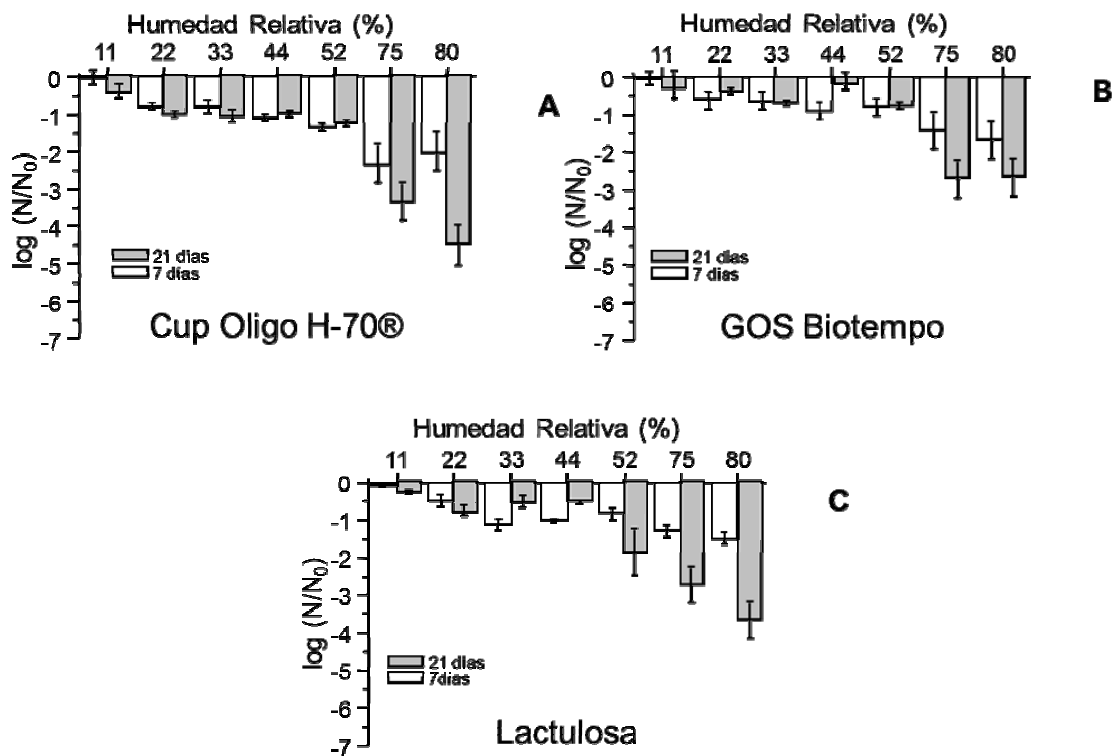


## RESULTADOS

La **Figura 1** muestra la estabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizada en presencia de GOS Cup Oligo H-70®, GOS Biotempo y lactulosa como agentes protectores, y almacenada a diferentes HR durante 7 y 21 días. Las muestras liofilizadas en presencia de los tres azúcares no mostraron pérdidas significativas de viabilidad luego del proceso ( $P < 0.05$ ). Por el contrario, en las muestras liofilizadas sin protector la viabilidad disminuyó 5.0 logaritmos.

Luego de 7 días de almacenamiento, las muestras liofilizadas en presencia de los 3 agentes protectores no mostraron pérdida significativa de la viabilidad a HRs por debajo de 52% ( $P < 0.05$ ) (barras blancas en la **Figura 1**). Cuando se almacenaron a 75 y 80% de HR, la viabilidad disminuyó entre 1.4 y 2.4 logaritmos ( $P < 0.05$ ) (barras blancas en la **Figura 1**).

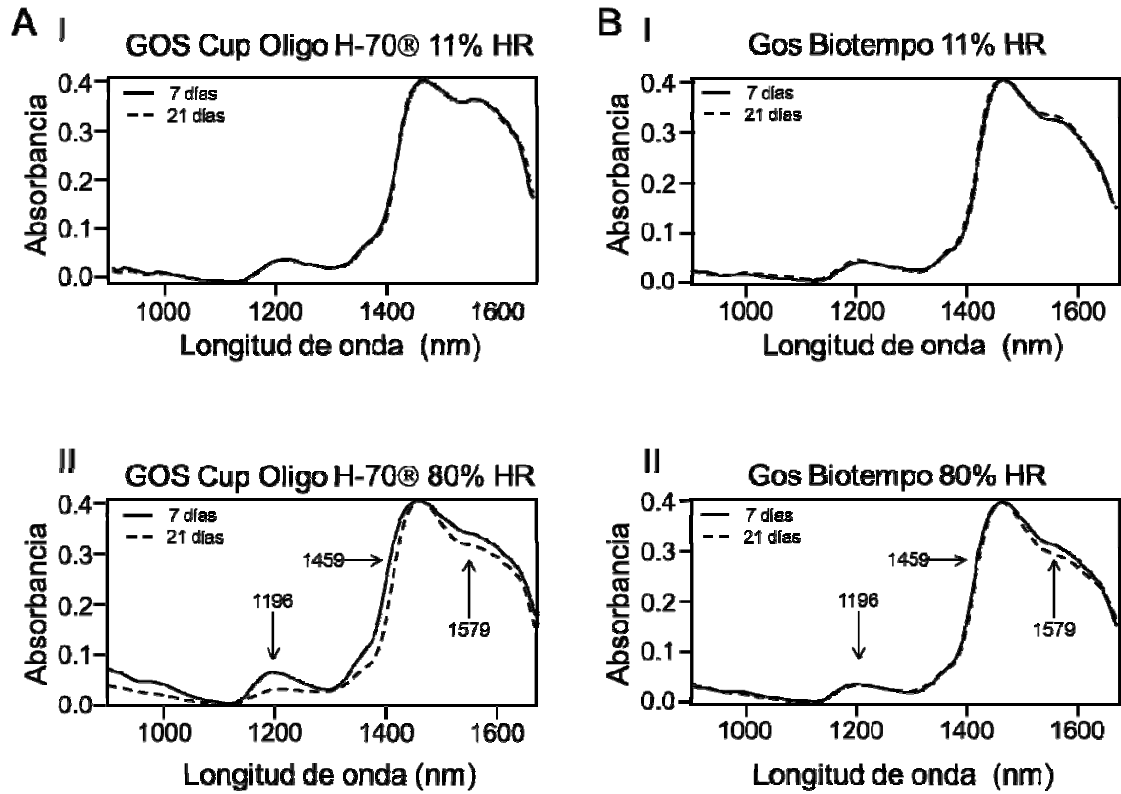
Después de 21 días de almacenamiento, la viabilidad de las células liofilizadas no disminuyó cuando fueron almacenadas a HRs por debajo de 52% ( $P < 0.05$ ) (barras grises en la **Figura 1**). A partir de 52% de HR, la pérdida de viabilidad comenzó a aumentar, haciéndose evidente aHRs de 75 y 80%. Los GOS Biotempo fueron los agentes protectores más efectivos (pérdida de viabilidad de 2.5 logaritmos a HR=80%) ( $P < 0.05$ ) (barras grises en la **Figura 1B**). Para las bacterias liofilizadas en presencia de GOS Cup Oligo H-70® y lactulosa la pérdida de viabilidad fue mayor a 3.6 logaritmos cuando se almacenaron a HR del 80% ( $P < 0.05$ ) (barras grises en la **Figuras 1A y 1C**).

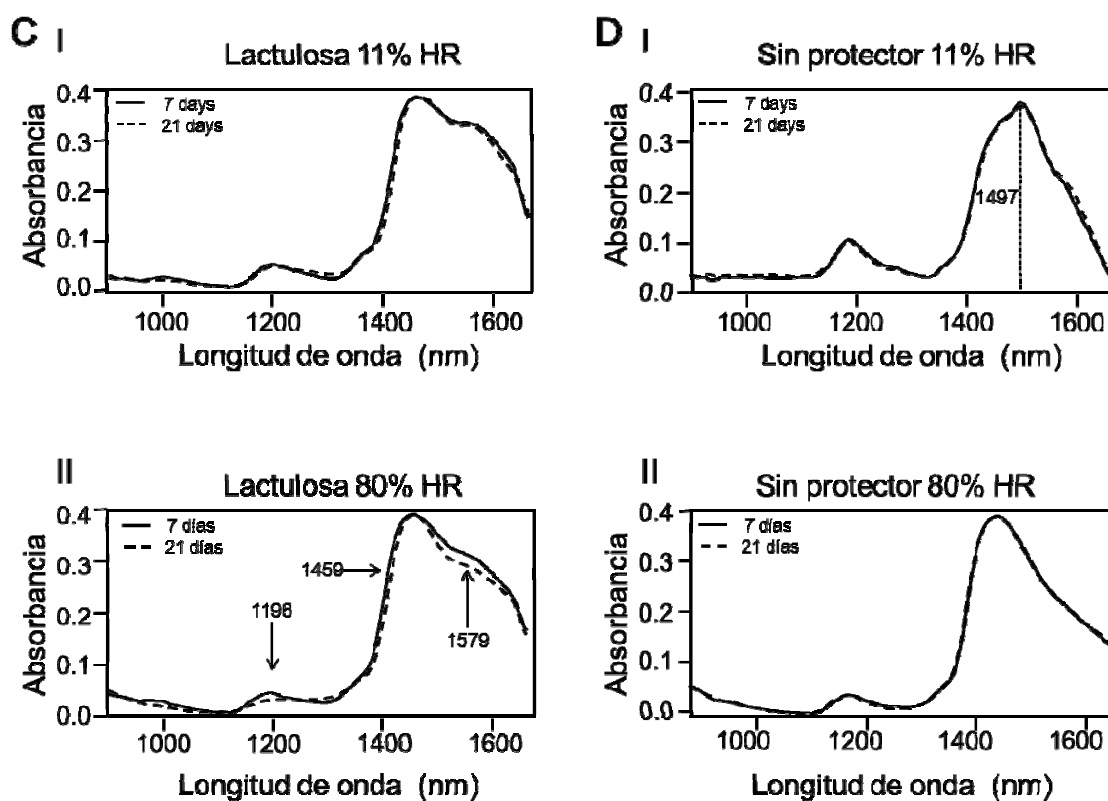


**Figura 1:** Efecto protector de GOS y lactulosa durante la liofilización de *L. bulgaricus* CIDCA 333. Luego de la liofilización, los microorganismos fueron estabilizados en atmósferas de HR desde 11 a 80% y almacenados 7 y 21 días. En los gráficos A, B y C se muestran los log N/N<sub>0</sub> para *L. bulgaricus* CIDCA 333 liofilizado en presencia de GOS Cup Oligo H-70®, GOS Biotempo y lactulosa, respectivamente. En todos los casos se utilizaron concentraciones de azúcar de 20% p/v. N= UFC/ml de muestras equilibradas a la HR en estudio; N<sub>0</sub>= UFC/ml antes del proceso de liofilización (cultivo fresco) (P<0.05). El log N/N<sub>0</sub> para las muestras liofilizadas sin protector fue de -5.0.

La **Figura 2** muestra los espectros NIR de las muestras liofilizadas y almacenadas durante 7 y 21 días a 4°C, a HR comprendidas entre 11 y 80%. Para una mejor comparación, se representaron los espectros correspondientes a las muestras liofilizadas y estabilizadas a la misma HR pero almacenadas durante 7 y 21 días; es decir, los dos espectros representados en cada sección de la **Figura 2** sólo difieren en el tiempo de almacenamiento. Se observó que todas las muestras almacenadas a 11% de HR presentaron espectros altamente superpuestos (**Figuras 2 AI, BI, CI, DI**). Para las muestras almacenadas a 80% de HR se observaron notables diferencias en los espectros. Las principales diferencias fueron: a) una disminución en la intensidad del hombro a 1579 nm, b) estrechamiento de la banda a 1459 nm, y c) una disminución en

la intensidad relativa de la banda a 1196 nm (**Figuras 2AII, BII y CII**). Las muestras liofilizadas en presencia del GOS Biotempo fueron las que representaron las menores alteraciones (**Figura 2 BII**). Los espectros de las muestras liofilizadas en ausencia de protectores fueron de aspecto diferente respecto a las muestras liofilizadas con protectores, pero no mostraron diferencias entre sí a los distintos tiempos de almacenamiento (**Figura 2D**).





**Figura 2.** Espectros NIR de muestras liofilizadas en presencia y en ausencia de protector, almacenadas a HR comprendidas entre 11 y 80% durante 7 (—) y 21 (-----) días a 4°C.

A: muestras liofilizadas en presencia de GOS Cup Oligo H-70®,

B: muestras liofilizadas en presencia de GOS Biotempo,

C: muestras liofilizadas en presencia de lactulosa,

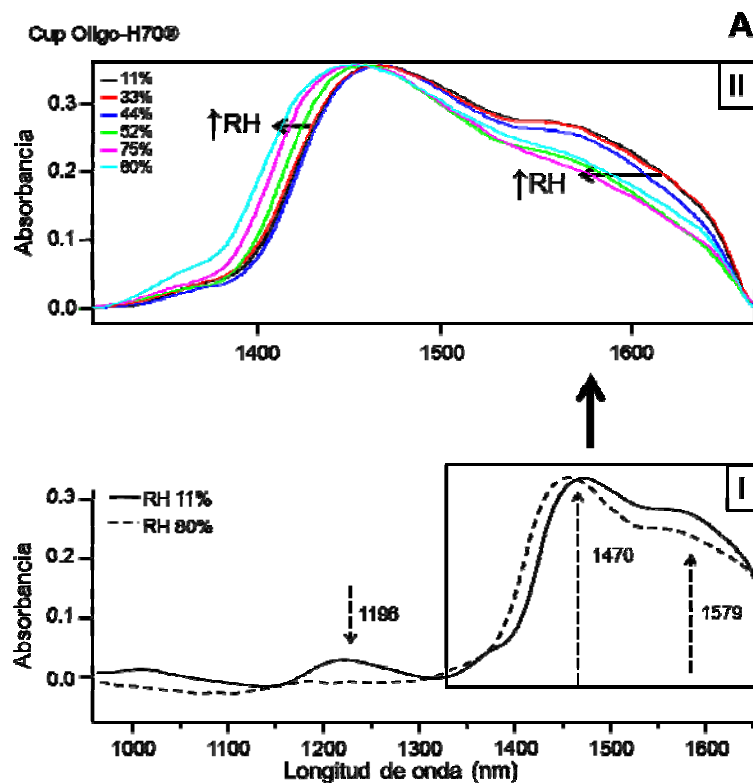
D: muestras liofilizadas en ausencia de protectores.

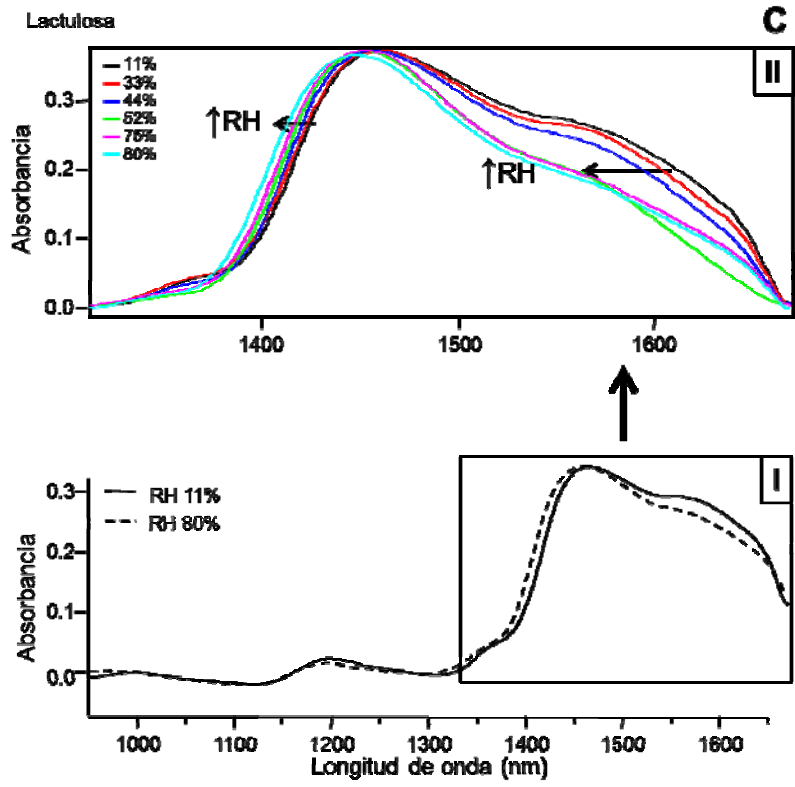
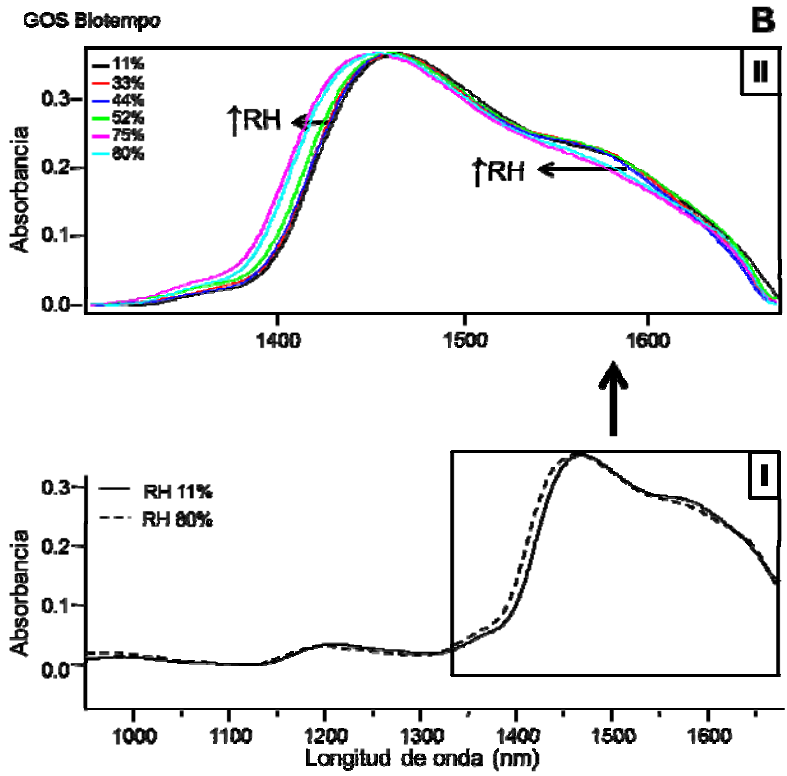
En todos los paneles, I indica las muestras almacenadas a 11% de HR y II, las muestras almacenadas a 80% de HR.

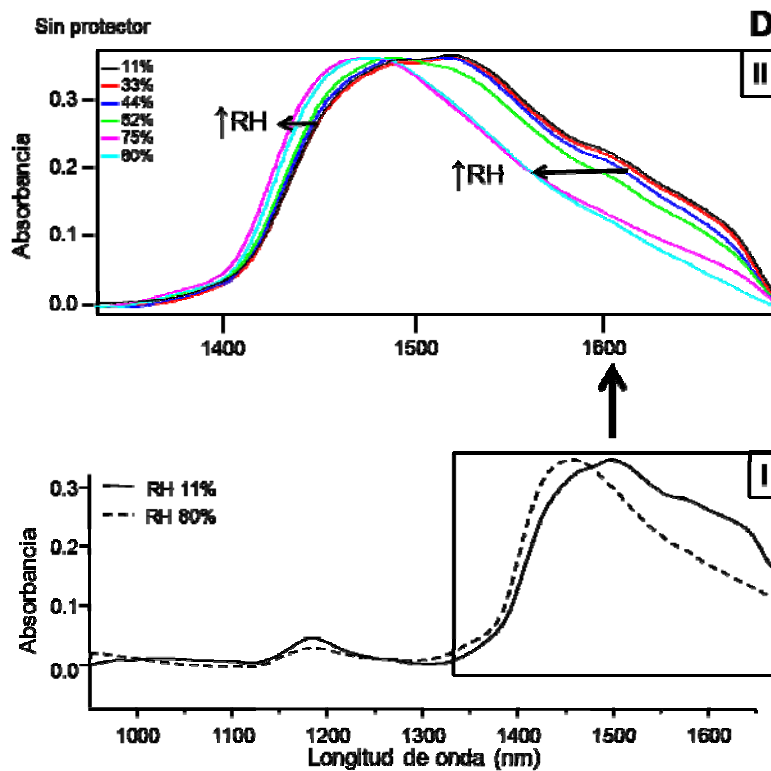
Posteriormente se estudió el efecto de la HR en las muestras de bacterias liofilizadas en presencia y en ausencia de protector. En la **Figura 3** se observan los espectros NIR de los microorganismos liofilizados, equilibrados a diferentes HRs, y almacenados durante 7 días. Se eligió este tiempo de almacenamiento porque en estos casos la HR no afectó la viabilidad en gran medida (**Figura 1**). De esta manera, las diferencias espectrales son el resultado de la variación de la HR. Los principales cambios fueron los siguientes: a) una disminución clara del hombro a ~1579 nm y b) un aumento en la intensidad relativa de la banda a 1196 nm, donde se observa que a medida que aumenta la HR se ensancha la banda en esa región (**Figura 3AI, BI, CI, DI**).

Es importante señalar que los cambios espectrales que resultan del aumento de HR fueron graduales hasta un valor dado. Por encima de este valor, se observó una disminución abrupta del hombro a  $\sim 1579$  nm. Al mismo tiempo, la banda a  $\sim 1470$  nm, que hasta aquel momento no había experimentado cambio alguno, pasó de 1470 nm a 1450 nm (o sea, se corrió alrededor de 20 nm) (**Figuras 3AII, BII, CII y DII**).

Tanto para las muestras liofilizadas en presencia de GOS Cup Oligo H-70® (**Figura 3AII**) como para las bacterias deshidratadas en presencia de lactulosa (**Figura 3CII**), los cambios espectrales antes mencionados se produjeron a HR de 44-52%. En el caso de las muestras liofilizadas en presencia de GOS Biotempo los cambios se produjeron a HRs de 52-75% (**Figura 3BII**), aunque las alteraciones fueron de menor intensidad. Para las muestras liofilizadas en ausencia de agentes protectores, la alteración se observó a 75% de HR (**Figura 3DII**).







**Figura 3.** Espectros NIR de las muestras liofilizadas en presencia o ausencia de agentes protectores, almacenadas a diferentes HR durante 7 días a 4°C.

A: muestras liofilizadas en presencia de GOS Cup Oligo H-70®,

B: muestras liofilizadas en presencia de GOS Biotempo,

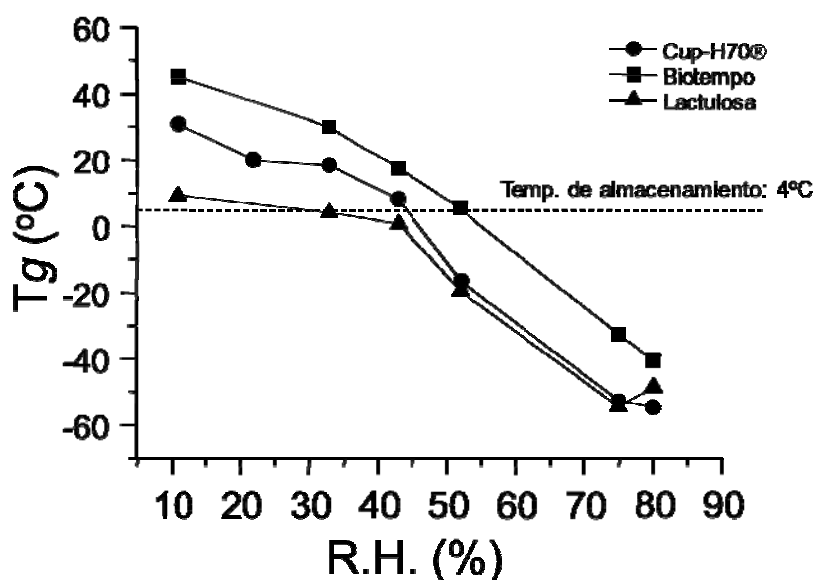
C: muestras liofilizadas en presencia de lactulosa,

D: muestras liofilizadas en ausencia de agentes protectores.

En todas las secciones: I: corresponde al espectro de las muestras almacenadas a HR de 11% (—) y 80% (---). II: *zoom* de la región de 1320-1670 nm de los espectros registrados para cada HR (11, 33, 44, 52, 75 y 80%). Las flechas indican aumento de RH.

La **Figura 4** representa las Tg de todas las muestras analizadas (Ver termogramas en ANEXO, pág. 165). Los microorganismos liofilizados en presencia de GOS Biotempo tuvieron las Tg más altas para todas las HR ensayadas. Estos resultados se pueden correlacionar con los obtenidos en el capítulo anterior para los azúcares puros, donde los GOS Biotempo tuvieron las Tgs más altas seguidos por los Cup Oligo H-70® y luego por la Lactulosa. Si bien los valores de Tg son significativamente inferiores a los obtenidos en el capítulo II, es importante notar que en este capítulo, estos valores de Tg corresponden a los pellets de las bacterias deshidratadas en presencia de los azúcares.

Para HR menores a 33%, las bacterias liofilizadas en presencia de GOS Cup Oligo H-70® presentaron valores ligeramente superiores de Tg en comparación con las bacterias liofilizadas en presencia de lactulosa. Por encima de 44% de HR, las Tgs fueron similares para ambos grupos. Por su parte, los valores de Tgs de las muestras equilibradas a 44 y 52% de HR fueron cercanos a la temperatura de almacenamiento (4°C).



**Figura 4.** Tg de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizadas en presencia de 20% p/v de GOS Cup Oligo H-70® (●); GOS Biotempo (■) y lactulosa (▲) (P<0.05).

Para determinar si una muestra liofilizada se encuentra en estado amorfo o *rubbery* se definió un modelo de predicción multivariante basado en PLS-DA (ver sección 7.8.2.2. de la Introducción General). Una predicción correcta debe tener, idealmente, un valor  $Y = 1$  para las muestras en estado *rubbery* e  $Y = 0$  para las muestras en estado amorfo (Martens & Næs, 1989; Esbensen, 2005). Un valor de  $Y = 0.5$  es el valor de decisión: valores superiores a 0.5 indican que las muestras se encuentran en estado *rubbery* y valores inferiores a 0.5 evidencian muestras amorfas.

El PLS-DA se llevó a cabo utilizando los espectros NIR pre-procesados (incluyendo las repeticiones) utilizando un conjunto independiente de datos para la calibración.

El modelo se calibró utilizando los espectros NIR pre-procesados (incluyendo las repeticiones) correspondientes a las muestras liofilizadas y almacenadas durante 7 días



a las diferentes HRs, mientras que los espectros correspondientes a las muestras almacenadas durante 21 días se utilizaron para validarlo, es decir, se trabajó con conjuntos de datos independientes. Los valores estadísticos de la Tabla 1 (Correlación,  $R^2$ , RMSEC, RMSEP) demuestran la excelente discriminación entre muestras amorfas y *rubbery*.

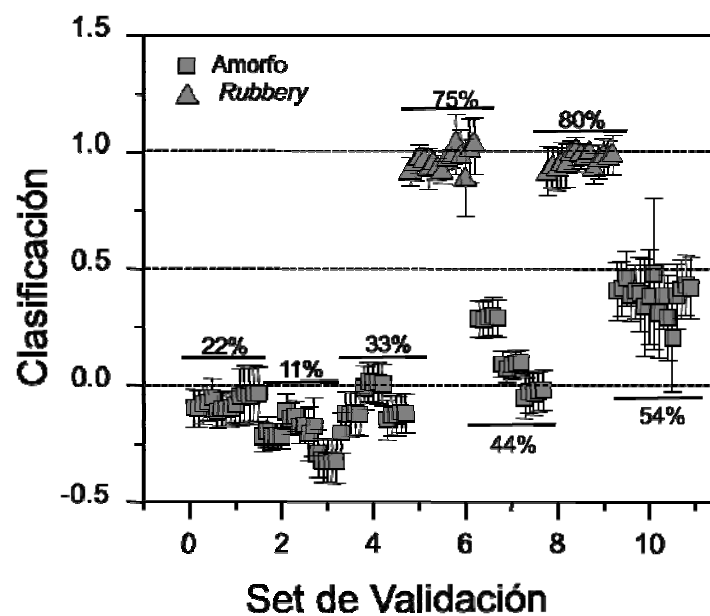
La **Figura 5** muestra los resultados de predicción para los espectros NIR de muestras liofilizadas almacenadas a diferentes HR.

**Tabla 1:** Valores estadísticos calculados en el paso de validación para la calibración del modelo PLS-DA.

| Información proporcionada por PLS-DA           | Configuración del Modelo |
|--|--------------------------|
| Factores de predicción del PLS                 | 3                        |
|  | Corrección de dispersión |
| Pre-procesamiento (calibración y validación)   | multiplicativa           |
|  | Vector normalización     |
| Número de elementos usados para la calibración | 92 <sup>a</sup>          |
| Número de elementos usados para la validación  | 92 <sup>b</sup>          |
| Correlación                                    | 0.97                     |
| Coefficiente de determinación ( $R^2$ )        | 0.95                     |
| Error Cuadrático Medio de Calibración (RMSEC)  | 0.09                     |
| Error Cuadrático Medio de Predicción (RMSEP)   | 0.09                     |
| Método de Validación                           | Conjuntos independientes |
| Tratamiento Matemático                         | Espectros crudos         |

<sup>a</sup>Para calibrar el modelo se utilizaron las muestras liofilizadas en presencia de los 3 protectores y almacenadas durante 7 días a las diferentes HRs.

<sup>b</sup>Para validar el modelo se utilizaron las muestras liofilizadas en presencia de los 3 protectores y almacenadas durante 21 días a las diferentes HRs.



**Figura 5.** Gráfico de PLS-DA con los resultados de la predicción para las muestras de *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* CIDCA 333 liofilizadas y almacenadas a diferentes HRs. Los cuadrados corresponden a las muestras amorfas y los triángulos, a las muestras *rubbery*.

## DISCUSIÓN

La eficiencia de los azúcares como compuestos protectores se debe en parte a su capacidad de vitrificación. Diferentes autores han encontrado una correlación entre la Tg y la viabilidad de numerosos *starters* usados en la industria alimenticia (Hill *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2008; Tymczyszyn *et al.*, 2012). En este capítulo se observó que la supervivencia de los microorganismos también se ve afectada por la HR a la cual son almacenados. Las bacterias conservadas a las HR más altas fueron las más afectadas (**Figura 1**). La **Figura 4** muestra que la capacidad protectora de los 3 azúcares ensayados puede explicarse sobre la base de las Tg a las diferentes HR.

La eficiencia de los GOS Cup Oligo H-70® como agentes protectores ha sido demostrada recientemente (Tymczyszyn *et al.*, 2011, 2012). A las HR más altas (75 y 80%) se observó una mayor eficiencia de los GOS Biotempo como protectores luego de 21 días de almacenamiento (**Figura 1B**). Por otro lado, los valores superiores de Tg de los microorganismos liofilizados con GOS Biotempo en todo el rango de HR estudiadas, explica su mayor capacidad protectora (**Figura 4**).

La información proporcionada por los espectros NIR en este capítulo se pudo correlacionar con dos variables: la viabilidad de los microorganismos y la HR a la que fueron almacenados. Considerando que a los 7 días de almacenamiento las muestras se encuentran equilibradas a las diferentes HR y que estas HR se mantienen en el tiempo, las diferencias espectrales observadas para las muestras liofilizadas en las mismas condiciones pero almacenadas durante diferentes períodos, se han atribuido a la pérdida de la viabilidad y a la diferente capacidad protectora de los azúcares (**Figura 2**). Para las HR más bajas, la superposición de los espectros correspondientes a ambos tiempos de almacenamiento puede asociarse a que en esas condiciones no se observaron variaciones significativas de la viabilidad bacteriana (**Figuras 1 y 2AI, BI, CI**). Las diferencias espectrales más claras se observaron a HR altas, lo que se relaciona con la pérdida de la viabilidad observada después de 21 días de almacenamiento (**Figura 1**). Por otra parte, las diferencias espectrales menos evidentes observadas después de 21 días de almacenamiento a 80% de HR en las muestras liofilizadas en presencia del GOS Biotempo (**Figuras 2 BII vs AII y CII**), se correlacionan con su mejor capacidad protectora (**Figura 1**). La superposición de los espectros de las muestras liofilizadas en ausencia de protector (**Figuras 2 DI y II**) puede explicarse teniendo en cuenta que la

viabilidad de las bacterias disminuyó 5.0 logaritmos después del proceso de liofilización y se mantuvo en valores muy bajos durante el almacenamiento (**Figuras 2DI y DII**).

Como se observó en el capítulo anterior, la capacidad de la espectroscopía infrarroja para discriminar entre estados amorfos o *rubbery* viene dada por las características de los enlaces de hidrógeno en cada estado físico. El estado amorfo se caracteriza por presentar débiles enlaces de hidrogeno azúcar-azúcar, mientras que en el estado *rubbery* predominan enlaces de hidrógenos agua-azúcar y agua-agua fuertes, por lo que se observa desplazamiento de bandas a menores números de onda (Wolkers, Oliver, Tablin, & Crowe, 2004; Oldenhof, Wolkers, Fonseca, Passot, & Marin, 2005). En base a esta información, las modificaciones en la estructura intermolecular de los enlaces de hidrógeno presentes en los grupos funcionales de las macromoléculas bacterianas, explican el drástico cambio observado en los espectros de la **Figura 3**.

Como se observó en el capítulo anterior, diversos artículos han referido el uso de la espectroscopía de infrarrojo medio para la determinación de Tgs, asociados al *stretching* de los grupos OH ( $\nu$ OH) (Wolkers *et al.*, 2004; Oldenhof *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que el modo vibracional  $2\nu$ OH también es sensible a la transición de estado amorfo  $\rightarrow$  *rubbery* (por efecto del incremento de la HR) de pellets bacterianos deshidratados en presencia y ausencia de protectores. Esto se ve reflejado claramente en los cambios espectrales (de alrededor de 20 nm) de la **Figura 3**, lo cual es consistente con las Tgs determinadas por DSC (**Figura 4**).

Respecto al comportamiento de los microorganismos liofilizados en ausencia de protectores (**Figuras 2D y 3D**) se observaron varios comportamientos que llamaron la atención. En primer lugar, la banda asociada al modo vibracional  $2\nu$ OH, se produjo a números de ondas más altos (1497 nm) respecto a las muestras liofilizadas en presencia de azúcares (1459) (**Figura 2D**). Se sabe que los microorganismos deshidratados en ausencia de adecuados agentes protectores exponen sitios hidrofóbicos sobre la superficie causando la desnaturalización de macromoléculas superficiales (Tymczyszyn *et al.*, 2008). Estos cambios estructurales explican las diferencias espectrales observadas para las muestras liofilizadas en ausencia de protectores (**Figura 3D**). El almacenamiento de estas muestras a diferentes HRs

también condujo a cambios espectrales derivados de las transiciones de fases. Se ha informado que estas transiciones de fase involucran a los grupos NH de proteínas intracelulares (Wolkers *et al.*, 2004; Oldenhof *et al.*, 2005). Los cambios espectrales observados a medida que aumenta la HR pueden explicarse teniendo en cuenta la posible contribución de los modos vibracionales *stretching* de los grupos NH (vNH) de las proteínas endógenas, a las transiciones vítreas (**Figura 3D**).

Como se explicó oportunamente (ver sección 4.2. de la Introducción General) los valores de T<sub>g</sub>, además de indicar transiciones de estados (amorfo → *rubbery*), se asocian a la movilidad de moléculas pequeñas dentro de la muestra (agua, gases y moléculas orgánicas pequeñas) (Tromp *et al.*, 1997; Schoonman, Ubbink, Bisperink, Le Meste, & Karel, 2002). El aumento de la movilidad molecular se asocia con la disminución de la viabilidad (Tymczyszyn *et al.*, 2012). De este modo, el contenido de agua y la temperatura de almacenamiento son esenciales para la preservación de bacterias. Los espectros NIR reflejan claramente esta transición (**Figura 3**), y en este contexto, la precisión del PLS-DA permite una buena clasificación de las muestras en amorfas o *rubbery* (**Figura 5 y Tabla 1**). El modelo multivariante desarrollado permitió clasificar claramente a las muestras almacenadas a 11, 22 y 33 de HR en amorfas, y las almacenadas a 75 y 80% en *rubbery* (**Figura 5**). Las muestras almacenadas a 44 y 52% de HR se agruparon cerca del valor de decisión (0.5), lo cual explica la proximidad entre sus valores de T<sub>g</sub> y el de la temperatura de almacenamiento (4°C) (**Figura 4**).

La temperatura de almacenamiento (T) y T<sub>g</sub> son parámetros requeridos para evaluar la viabilidad a largo plazo. Tal como se mostró en el capítulo 2, el parámetro T-T<sub>g</sub> es muy importante, ya que está directamente relacionada con la vida útil de los *starters* independientemente del agente protector utilizado para su conservación (Tymczyszyn *et al.*, 2012). Esto apoya firmemente la utilización del modelo PLS-DA para la clasificación de muestras desconocidas.

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo permitieron obtener las siguientes conclusiones:

- El contenido en tri y tetrasacáridos en la composición de GOS, aumenta su capacidad de protección, lo cual puede explicarse sobre la base de su Tg.
- La sensibilidad de la espectroscopia NIR a la HR permitió realizar un análisis preciso de las propiedades físico-químicas de las muestras liofilizadas a nivel molecular. Dicho análisis brindó información útil para evaluar de forma rápida y precisa, si los *starters* están almacenados correctamente o no.

# DISCUSIÓN GENERAL

## DISCUSIÓN GENERAL

Las bacterias lácticas tienen estatus GRAS, es decir son generalmente reconocidas como seguras, por lo cual pueden ser utilizadas en la producción de alimentos y también, en aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la salud (medicina, industria farmacéutica, nutraceuticos). La elección del método de preservación, de los agentes protectores y de las condiciones de almacenamiento, son etapas críticas para mantener viables estos cultivos. Es por esto que el tema abordado en este trabajo de tesis adquiere especial relevancia en dos aspectos:

- por investigar el efecto protector de GOS y lactulosa en la preservación de bacterias lácticas, y
- por desarrollar modelos basados en espectroscopía NIR y Análisis Multivariante que permiten determinar la eficiencia de los procesos de preservación y de las condiciones de almacenamiento.

Los resultados obtenidos en los CAPÍTULOS I y III permitieron concluir que la presencia de GOS y lactulosa durante la deshidratación aumenta considerablemente la viabilidad de las bacterias. La capacidad de recuperación de bacterias deshidratadas en sílica (CAPITULO I) fue evaluada a partir de las cinéticas de crecimiento de los microorganismos deshidratados y rehidratados. La presencia de GOS y lactulosa durante la deshidratación, además de reducir la fase *lag* respecto a las muestras deshidratadas en ausencia de protector, aumentó el porcentaje de células viables al comienzo de la cinética de crecimiento. Se demostró que el protector más eficaz resultó ser el GOS Biotempo, ya que presentó fase *lag* más corta y un mayor porcentaje de células viables. En relación a la liofilización (CAPITULO III), los GOS Biotempo también demostraron ser más eficientes que los GOS Cup Oligo H70 y la lactulosa.

Los GOS y la lactulosa son ampliamente conocidos por sus propiedades prebióticas, pero sus propiedades como protectores de la deshidratación de bacterias lácticas no habían sido exploradas en el caso de la lactulosa o habían sido escasamente exploradas en el caso de los GOS. La eficiencia de dichos compuestos como protectores, cuya eficiencia es similar a la de otros azúcares tradicionalmente utilizados como protectores de bacterias lácticas (*i.e.*, trehalosa, sacarosa) (Tymczyszyn



*et al.*, 2007, 2008) otorga un valor agregado a los *starters* bacterianos ya que permite la adición de un prebiótico que además contribuye a la preservación.

Las propiedades termofísicas de GOS y lactulosa, presentadas en el CAPÍTULO II, que de acuerdo a nuestro conocimiento no habían sido abordadas hasta el momento, permitieron comprender el comportamiento de estos compuestos cuando son usados como protectores de bacterias lácticas.

El uso de métodos basados en espectroscopia infrarrojo y Raman aplicados en la investigación de sistemas biológicos, entre los que se encuentran bacterias lácticas y probióticos, es cada vez más creciente. De hecho, estudios taxonómicos, monitoreo de la producción de probióticos, evaluación de las propiedades bioquímicas y biofísicas son algunas de las principales aplicaciones de estas metodologías (Karoui *et al.*, 2010). En el CAPÍTULO I estos métodos fueron utilizados para monitorear procesos en tiempo real, permitiendo seguir la evolución de bacterias viables, dañadas y muertas durante la cinética de crecimiento.

Sin duda el desarrollo de equipamientos robustos ha contribuido a satisfacer estas demandas. Tanto la espectroscopia infrarroja como la Raman presentan importantes ventajas para el análisis de muestras biológicas respecto a otras metodologías. Entre dichas ventajas se puede mencionar su versatilidad (ya que permiten analizar muestras sólidas, líquidas y gaseosas), su alta sensibilidad a cambios estructurales sutiles, y su capacidad de operar de forma no invasiva (es decir sin alterar la muestra). Adicionalmente, se requiere una mínima o nula preparación de la muestra en estudio sin la necesidad de reactivos exógenos (Karoui *et al.*, 2010). Asimismo, tanto la espectroscopia NIR como la MIR, son técnicas de análisis rápido, fáciles de usar y permiten evaluar parámetros en tiempo real.

Debido a la baja absorción de agua en la región NIR, esta metodología se ha utilizado ampliamente para el estudio de sistemas acuosos. Las bandas observadas en el NIR surgen de *overtones* y combinaciones de vibraciones fundamentales relacionadas con grupos CH, OH y NH. Por lo tanto, es una herramienta útil para investigar azúcares y otros compuestos polihidroxilados en una región relativamente “limpia”, sin la interferencia de otras bandas espectrales que absorben en la región del infrarrojo medio. Por otra parte, el desarrollo de sondas de fibra óptica, junto con el desarrollo

de novedosos sistemas electrónicos, permite el monitoreo en tiempo real, lo cual representa una herramienta valiosa para el control de calidad en la industria alimenticia (Roychoudhury *et al.*, 2006). El monitoreo de cinéticas de crecimiento mediante NIR (CAPITULO I) representa sólo un ejemplo de las aplicaciones que esta técnica puede tener en la industria alimentaria.

Las espectroscopias vibracionales generan una gran cantidad de datos, tanto cuantitativos (absorción proporcional a la concentración de las especies moleculares que absorben) como cualitativos (grupos funcionales corresponden a bandas). En el análisis estructural de los azúcares realizado en el CAPITULO II, se observaron pequeños cambios en las posiciones, anchos e intensidades de las bandas. Las principales diferencias se observaron en la región *fingerprint* de los espectros. Dicha región es característica de cada azúcar, lo cual explicaría las mayores diferencias observadas en la lactulosa respecto a los GOS.

Desde un punto de vista químico, las bacterias lácticas y los probióticos son sistemas altamente complejos que originan bandas espectrales que se superponen entre sí. Por lo tanto, para su análisis e interpretación es necesario, por un lado realizar pretratamiento de los espectros y, por el otro, aplicar métodos basados en análisis multivariante.

El uso industrial de las bacterias lácticas requiere la optimización de las condiciones de conservación y almacenamiento. La congelación, liofilización y secado por pulverización son los métodos de conservación más ampliamente utilizados. Todos estos métodos conducen a una disminución de la actividad de agua con el objeto de evitar reacciones de deterioro. Sin embargo, esta deshidratación puede conducir a la pérdida de agua estructural, con un daño concomitante de membranas y proteínas, el cual como resultado final, dará lugar a la pérdida de viabilidad bacteriana. En general, los azúcares (trehalosa, sacarosa, maltosa entre otros) y aminoácidos se utilizan para prevenir estos daños.

La liofilización es un método de preservación ampliamente difundido, pero es necesario evaluar, de forma rápida y precisa, si los *starters* están almacenados correctamente o no. En este contexto, el desarrollo de un modelo PLS-DA (CAPITULO

III) robusto, para clasificar las muestras en amorfas o *rubbery*, es de gran utilidad para monitorear las condiciones de almacenamiento de los *starters*.

Además de la información obtenida en relación a aspectos básicos de la protección bacteriana mediada por GOS y lactulosa, los resultados obtenidos en esta tesis pueden analizarse desde un punto de vista tecnológico. Los resultados obtenidos en los capítulos I y III constituyen un sólido soporte para la utilización de los GOS Biotempo en la preservación de bacterias lácticas.

En resumen, el presente trabajo de Tesis, realizó aportes significativos para comprender el rol protector de los GOS y la lactulosa desde el punto de vista estructural y esto alienta su utilización como protectores en la preservación de *starters* industriales. Teniendo en cuenta que tanto los GOS como la lactulosa son oligosacáridos con probada acción prebiótica, el efecto protector demostrado en esta Tesis, otorga un valor agregado a los *starters* bacterianos ya que permite la adición de un prebiótico que además contribuye a la preservación. De esta manera, la aplicación de forma combinada, probiótico y prebiótico, en el desarrollo productos alimenticios actuaría de forma sinérgica para modular la microbiota intestinal del consumidor e impactar positivamente sobre su salud (Bhupinder and Saloni, 2010).

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta Tesis abrieron interesantes perspectivas para el estudio de los posibles mecanismos de protección de GOS y lactulosa sobre membranas lipídicas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Estudios preliminares realizados mediante espectroscopia FTIR permitieron determinar que los grupos OH<sup>-</sup> tanto de los GOS como la lactulosa, serían factores estructurales indispensables para la interacción hidrofílica de estos azúcares con los grupos fosfato de los lípidos (Ale *et al.*, 2015, XIX Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica de la Asociación Argentina de Investigación Físicoquímica (AAIFQ). ver página 6).

Finalmente, se demostró que la aplicación conjunta de espectroscopía de infrarrojo cercano y análisis multivariante permite obtener información confiable para monitorear la calidad de los *starters* almacenados en el tiempo. Teniendo en cuenta que por lo general los GOS se obtienen mediante síntesis a partir de subproductos de la industria alimenticia (permeado de suero, constituido esencialmente por lactosa), y esto puede originar variaciones de lote a lote la implementación de estos métodos permitirá ahorrar mucho tiempo en el análisis y manipulación de las muestras, lo cual resulta de un valor incalculable.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahlqvist, M. U. A., & Taylor, L. S. (2002). Water diffusion in hydrated crystalline and amorphous sugars monitored using H/D exchange. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(3), 690–698. doi:10.1002/jps.10068
- Aider, M., & Halleux, D. de. (2007). Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trends in Food Science and Technology*, 18(7), 356–364. doi:10.1016/j.tifs.2007.03.005
- Alander, J. T., Bochko, V., Martinkauppi, B., Saranwong, S., & Mantere, T. (2013). A Review of Optical Nondestructive Visual and Near-Infrared Methods for Food Quality and Safety. *International Journal of Spectroscopy*, 2013, 1–36. doi:10.1155/2013/341402
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., ... Teixeira, P. (2009). Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. *Food Control*, 20(8), 764–770. doi:10.1016/j.foodcont.2008.09.021
- Albayrak, N., & Yang, S.-T. (2002). Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase on Fibrous Matrix by Polyethyleneimine for Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose. *Biotechnology Progress*, 18(2), 240–251. doi:10.1021/bp010167b
- Albayrak, N., & Yang, S.-T. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1), 8–19. doi:10.1002/bit.1195
- Al-Khaldi, S. F., & Mossoba, M. M. (2004). Gene and bacterial identification using high-throughput technologies: genomics, proteomics, and phonemics. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 20(1), 32–8.
- Allison, S. D., Chang, B., Randolph, T. W., & Carpenter, J. F. (1999). Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365(2), 289–98. doi:10.1006/abbi.1999.1175
- Als-Nielsen, B., Gluud, L. L., & Gluud, C. (2004). Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 328(7447), 1046. doi:10.1136/bmj.38048.506134.EE
- Alvarez-Ordóñez, A., Mouwen, D. J. M., López, M., & Prieto, M. (2011). Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 369–378. doi:10.1016/j.mimet.2011.01.009

- Araujo-andrade, C., Campos-Cantón, I., Martínez, J. R., Ortega, G., & Ruiz, F. (2005). Prediction model based on multivariate analysis to determine concentration of sugar in solution. *Revista Mexicana de Física*, 51, 63–73.
- Araujo-Andrade, C., & Frausto-Reyes, C. (2010). Métodos y Técnicas para el Pre-Procesamiento y Análisis Multivariante de Espectros Vibracionales. In A. Gómez-Zavaglia (Ed.), *Aspectos Probióticos y Tecnológicos de las Bacterias Lácticas* (pp. 299–318). La Plata, Argentina: CyTED.
- Arrondo, J. L., Young, N. M., & Mantsch, H. H. (1988). The solution structure of concanavalin A probed by FT-IR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 952(3), 261–8.
- Bach, M. (2012). *Near Infrared Laser Sensor System for In-Line Detection of Conversion in UV-Cured polymer Coatings*. KIT Scientific Publishing.
- Baena, J. R., & Lendl, B. (2004). Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(5), 534–539. doi:10.1016/j.cbpa.2004.08.014
- Bakier, S. (2009). Capabilities of near-infrared spectroscopy to analyse changes in water bonding during honey crystallisation process. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(3), 519–524. doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01837.x
- Barrangou, R., Azcarate-Peril, M. A., Duong, T., Conners, S. B., Kelly, R. M., & Klaenhammer, T. R. (2006). Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3816–21. doi:10.1073/pnas.0511287103
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., & Bhattarai, T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, 32(3), 501–10.
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J. D., Labadie, J. C., & Lebert, A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 25(3), 225–232. doi:10.1016/0167-7012(95)00090-9
- Ben, X. M., Zhou, X. Y., Zhao, W. H., Yu, W. L., Pan, W., Zhang, W. L., ... Schaafsma, A. (2004). Supplementation of milk formula with galacto-oligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants. *Chin. Med. J.*, 117(6), 927–931.

- Bertelsen, H., Jensen, B. B., & Buemann, B. (1999). D-tagatose--a novel low-calorie bulk sweetener with prebiotic properties. *World Review of Nutrition and Dietetics*, *85*, 98–109.
- Biedrzycka, E., & Bielecka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(3-4), 170–175. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.014
- Bieger-Dose, A., Dose, K., Meffert, R., Mehler, M., & Risi, S. (1992). Extreme dryness and DNA-protein cross-links. *Advances in Space Research*: *The Official Journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*, *12*(4), 265–70.
- Binder, H. (2007). Water near lipid membranes as seen by infrared spectroscopy. *European Biophysics Journal*, *36*(4-5), 265–279. doi:10.1007/s00249-006-0110-6
- Bonanno, A. S., Olinger, J. M., & Griffiths, P. R. (1992). *Near Infra-Red Spectroscopy*. (K. I. Hildrum, Ed.). Chichester, UK: Horwood.
- Boon, M. A., van't Riet, K., & Janssen, A. E. M. (2000). Enzymatic synthesis of oligosaccharides: Product removal during a kinetically controlled reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, *70*(4), 411–420. doi:10.1002/1097-0290(20001120)70:4<411::AID-BIT6>3.0.CO;2-W
- Bosch, A., Golowczyc, M. a., Abraham, A. G., Garrote, G. L., De Antoni, G. L., & Yantorno, O. (2006). Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, *111*(3), 280–287. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.010
- Botelho-Cunha, V. A., Mateus, M., Petrus, J. C. C., & de Pinho, M. N. (2010). Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides. *Biochemical Engineering Journal*, *50*(1-2), 29–36. doi:10.1016/j.bej.2010.03.001
- Bouhnik, Y., Flourie, B., D'Agay-Abensour, L., Pochart, P., Gramet, G., Durand, M., & Rambaud, J.-C. (1997). Administration of Transgalacto-Oligosaccharides Increases Fecal Bifidobacteria and Modifies Colonic Fermentation Metabolism in Healthy Humans. *J. Nutr.*, *127*(3), 444–448.
- Brunser, O., Gotteland, M., Cruchet, S., Figueroa, G., Garrido, D., & Steenhout, P. (2006). Effect of a Milk Formula With Prebiotics on the Intestinal Microbiota of Infants After an Antibiotic Treatment. *Pediatric Research*, *59*(3), 451–456. doi:10.1203/01.pdr.0000198773.40937.61
- Buitink, J., van den Dries, I. J., Hoekstra, F. A., Alberda, M., & Hemminga, M. A. (2000). High critical temperature above T(g) may contribute to the stability of biological systems. *Biophysical Journal*, *79*(2), 1119–28. doi:10.1016/S0006-3495(00)76365-X

- Cacela, C., & Hinch, D. K. (2006). Monosaccharide composition, chain length and linkage type influence the interactions of oligosaccharides with dry phosphatidylcholine membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(5), 680–91. doi:10.1016/j.bbamem.2006.04.005
- Cámara-Martos, F., Zurera-Cosano, G., Moreno-Rojas, R., García-Gimeno, R. M., & Pérez-Rodríguez, F. (2011). Identification and Quantification of Lactic Acid Bacteria in a Water-Based Matrix with Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Regression Modeling. *Food Analytical Methods*, 5(1), 19–28. doi:10.1007/s12161-011-9221-5
- Campbell, J. M., Bauer, L. L., Fahey, G. C., Hogarth, A. J. C. L., Wolf, B. W., & Hunter, D. E. (1997). Selected Fructooligosaccharide (1-Kestose, Nystose, and 1 F - $\beta$ -Fructofuranosyl-nystose) Composition of Foods and Feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3076–3082. doi:10.1021/jf970087g
- Canale, R. (1971). *Biological waste treatment*. New York: Interscience Publishers.
- Carasi, P., Ambrosio, N. M., De Antoni, G. L., Bressollier, P., Urdaci, M. C., & Serradell, M. D. L. A. (2014). Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *The Journal of Dairy Research*, 81(1), 16–23. doi:10.1017/S0022029913000526
- Carasi, P., Díaz, M., Racedo, S. M., Antoni, G. De, Urdaci, M. C., & Serradell, M. D. L. A. (2014). Safety Characterization and Antimicrobial Properties of Kefir-Isolated *Lactobacillus kefir*, 2014.
- Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 28(9), 3916–3922. doi:10.1021/bi00435a044
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281–370. doi:10.1080/1040-840291046759
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2002). Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24(19), 1587–1591. doi:10.1023/A:1020301614728
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2003). Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 947–52.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10), 835–847. doi:10.1016/j.idairyj.2004.02.001



- Casci, T., & Rastall, R. A. (2006). Manufacture of prebiotic oligosaccharides. In G. R. Gibson & R. A. Rastall (Eds.), *Prebiotics: Development and Applications* (pp. 29–55). John Wiley & Sons, Ltd.
- Cervera, A. E., Petersen, N., Lantz, A. E., Larsen, A., & Gernaey, K. V. (2009). Application of near-infrared spectroscopy for monitoring and control of cell culture and fermentation. *Biotechnology Progress*, 25(6), 1561–81. doi:10.1002/btpr.280
- CHEN, K. N., KUO, C. Y., SHIU, J. S., & CHEN, M. J. (2011). PROCESS OPTIMIZATION FOR A NOVEL KEFIR CANDY WITH HIGH PROBIOTIC VIABILITY. *Journal of Food Process Engineering*, 34(2), 427–443. doi:10.1111/j.1745-4530.2009.00367.x
- Cheng, C.-C., Yu, M.-C., Cheng, T.-C., Sheu, D.-C., Duan, K.-J., & Tai, W.-L. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 28(22), 1863–1864. doi:10.1007/s10529-006-9169-5
- Cimander, C., Carlsson, M., & Mandenius, C.-F. (2002). Sensor fusion for on-line monitoring of yoghurt fermentation. *Journal of Biotechnology*, 99(3), 237–48.
- Ciurczak, E. W. (2007). Principles of Near-Infrared Spectroscopy. In D. A. Burns & E. W. Ciurczak (Eds.), *Near-Infrared Analysis* (Third., pp. 9–18). CRC Press.
- Clark, D. P., Martinko, J. M., Madigan, M. T., & Dunlap, P. V. (2009). *Biología De Los Microorganismos 12° Ed - Brock*. Pearson.
- Connolly, B., Patapoff, T. W., Wang, Y. J., Moore, J. M., & Kamerzell, T. J. (2010). Vibrational spectroscopy and chemometrics to characterize and quantitate trehalose crystallization. *Analytical Biochemistry*, 399(1), 48–57. doi:10.1016/j.ab.2009.10.033
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1024–39. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x
- Coulibaly, I., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Fauconnier, M.-L., Lognay, G., & Thonart, P. (2010). The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International Journal of Microbiology*, 2010, 625239. doi:10.1155/2010/625239
- Crittenden, R., & Playne, M. J. (2009). *Handbook of Probiotics and Prebiotics, 2nd Edition*. (J. Wiley, Ed.).
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F., & Crowe, L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 73–103. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.73

- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Carpenter, J. F. (1993). Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. *BioPharm*, *6*, 40–43.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science (New York, N.Y.)*, *223*(4637), 701–3. doi:10.1126/science.223.4637.701
- Cyril, J., Powell, G. L., Duncan, R. R., & Baird, W. V. (2002). Changes in Membrane Polar Lipid Fatty Acids of Seashore Paspalum in Response to Low Temperature Exposure. *Crop Science*, *42*(6), 2031. doi:10.2135/cropsci2002.2031
- De Vrese, M., & Marteau, P. R. (2007). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *The Journal of Nutrition*, *137*(3 Suppl 2), 803S–11S.
- Desmond, C., Ross, R. P., O’Callaghan, E., Fitzgerald, G., & Stanton, C. (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, *93*(6), 1003–11.
- Dills, W. L. (1989). Sugar alcohols as bulk sweeteners. *Annual Review of Nutrition*, *9*, 161–86. doi:10.1146/annurev.nu.09.070189.001113
- Djouzi, Z., & Andlueux, C. (1997). Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*, *78*(02), 313. doi:10.1079/BJN19970149
- Esbensen, K. H. (2005). *Multivariate Data Analysis-In Practice* (5th editio.). Esbjerg, Denmark: CAMO Process AS.
- Espinosa-Martos, I., & Rupérez, P. (2006). Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food. *Nutrición Hospitalaria*, *21*(1), 92–6.
- Feng, Y. M., Chang, X. L., Wang, W. H., & Ma, R. Y. (2009). Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *40*(3), 326–332. doi:10.1016/j.jtice.2008.12.003
- Fernández Murga, M. L., Font de Valdez, G., & Disalvo, A. E. (2000). Changes in the surface potential of *Lactobacillus acidophilus* under freeze-thawing stress. *Cryobiology*, *41*(1), 10–6. doi:10.1006/cryo.2000.2259
- Foerst, P., Reitmaier, J., & Kulozik, U. (2010). <sup>1</sup>H NMR investigation on the role of sorbitol for the survival of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in vacuum-dried preparations. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(3), 841–50. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04491.x
- Fonseca, F., Béal, C., & Corrieu, G. (2001). Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*, *43*(3), 189–98. doi:10.1006/cryo.2001.2343

- Fonseca, F., Marin, M., & Morris, G. J. (2006). Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6474–6482. doi:10.1128/AEM.00998-06
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *The British Journal of Nutrition*, 87 Suppl 2, S287–91. doi:10.1079/BJNBJN/2002550
- Franks, F. (1999). Thermomechanical Properties of Amorphous Saccharides: Their Role in Enhancing Pharmaceutical Product Stability. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 16(1), 281–292. doi:10.1080/02648725.1999.10647979
- Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18(7), 685–694. doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.003
- Gardiner, G. E., O’Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., ... Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2605–12.
- Garidel, P., Blume, A., & Hübner, W. (2000). A Fourier transform infrared spectroscopic study of the interaction of alkaline earth cations with the negatively charged phospholipid 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1466(1-2), 245–59.
- Gautier, J., Passot, S., Pénicaud, C., Guillemin, H., Cenard, S., Lieben, P., & Fonseca, F. (2013). A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5591–602. doi:10.3168/jds.2013-6802
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., & Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20(2), 144–148. doi:10.1016/j.foodcont.2008.03.005
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259–75. doi:10.1079/NRR200479
- Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2012). *Prebiotics: Development & Application*. (G. R. Gibson & R. A. Rastall, Eds.) *Prebiotics: Development & Application*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9780470023150
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–12.

- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6), 480–7. doi:10.1016/j.resmic.2010.03.001
- Goicoechea, H. C., & Olivieri, A. C. (2003). A new family of genetic algorithms for wavelength interval selection in multivariate analytical spectroscopy. *Journal of Chemometrics*, 17(6), 338–345. doi:10.1002/cem.812
- Golowczyc, M., Vera, C., Santos, M., Guerrero, C., Carasi, P., Illanes, A., ... Tymczyszyn, E. (2013a). Use of whey permeate containing in situ synthesised galactooligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Research*, 80(03), 374–381. doi:10.1017/S0022029913000356
- Golowczyc, M., Vera, C., Santos, M., Guerrero, C., Carasi, P., Illanes, A., ... Tymczyszyn, E. (2013b). Use of whey permeate containing in situ synthesised galactooligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *The Journal of Dairy Research*, 80(3), 374–81. doi:10.1017/S0022029913000356
- Gomez Zavaglia, a., Tymczyszyn, E., De Antoni, G., & Anibal Disalvo, E. (2003). Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1315–1320. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02102.x
- Gomez Zavaglia, A., Disalvo, E. A., & De Antoni, G. L. (2000). Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli. *The Journal of Dairy Research*, 67(2), 241–7.
- González, R., Klaassens, E. S., Malinen, E., de Vos, W. M., & Vaughan, E. E. (2008). Differential transcriptional response of *Bifidobacterium longum* to human milk, formula milk, and galactooligosaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4686–94. doi:10.1128/AEM.00122-08
- Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121(2), 307–318. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.063
- Goulas, A. K., Grandison, A. S., & Rastall, R. A. (2003). Fractionation of oligosaccharides by nanofiltration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(7), 675–680. doi:10.1002/jsfa.1335
- Guerrero, C., Vera, C., Plou, F., & Illanes, A. (2011). Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial  $\beta$ -galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3-4), 206–212. doi:10.1016/j.molcatb.2011.06.007
- Hans Tromp, R., Parker, R., & Ring, S. G. (1997). Water diffusion in glasses of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 303(2), 199–205. doi:10.1016/S0008-6215(97)00160-2

- Hernández, O., Ruiz-Matute, A. I., Olano, A., Moreno, F. J., & Sanz, M. L. (2009). Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *International Dairy Journal*, *19*(9), 531–536. doi:10.1016/j.idairyj.2009.03.002
- Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C. U., Ratjen, J., Först, P., Skibsted, L. H., ... Risbo, J. (2007). Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress*, *23*(4), 794–800. doi:10.1021/bp070089d
- Hincha, D. K., Rennecke, P., & Oliver, A. E. (2008). Protection of liposomes against fusion during drying by oligosaccharides is not predicted by the calorimetric glass transition temperatures of the dry sugars. *European Biophysics Journal*: *EBJ*, *37*(4), 503–8. doi:10.1007/s00249-007-0245-0
- Ho, A. L., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Roseiro, L. B., Charalampopoulos, D., & Rastall, R. A. (2014). Production and purification of xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process. *Bioresource Technology*, *152*, 526–529. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.114
- Huang, H., Yu, H., Xu, H., & Ying, Y. (2008). Near infrared spectroscopy for on / in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*, *87*, 303–313. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.12.022
- Hubner, W., & Blume, A. (1998). Interactions at the lipid-water interface. *Chem. Phys. Lipids*, *96*, 99–123.
- Huerta, L. M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2011). Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized  $\beta$ -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry*, *46*(1), 245–252. doi:10.1016/j.procbio.2010.08.018
- Illanes, A. (2011). Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology*, *14*(6). doi:10.2225/vol14-issue6-fulltext-11
- Illanes, A., Ruiz, A., & Zuñiga, M. E. (1993). Análisis comparativo de dos lactasas microbianas inmovilizadas. *Alimentos*, *18*(1), 26–34.
- Iqbal, S., Nguyen, T.-H., Nguyen, H. A., Nguyen, T. T., Maischberger, T., Kittl, R., & Haltrich, D. (2011). Characterization of a Heterodimeric GH2  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus sakei* Lb790 and Formation of Prebiotic Galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(8), 3803–3811. doi:10.1021/jf103832q
- Jagannath, A., Raju, P. S., & Bawa, A. S. (2010). Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(8), 1197–1203. doi:10.1016/j.lwt.2010.03.009

- Jarvis, R. M., & Goodacre, R. (2004). Ultra-violet resonance Raman spectroscopy for the rapid discrimination of urinary tract infection bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 232(2), 127–132. doi:10.1016/S0378-1097(04)00040-0
- Jiang, Z., Cong, Q., Yan, Q., Kumar, N., & Du, X. (2010). Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. *Food Chemistry*, 120(2), 457–462. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.038
- Karoui, R., Downey, G., & Blecker, C. (2010). Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships - a review. *Chemical Reviews*, 110(10), 6144–68. doi:10.1021/cr100090k
- Kataoka, Y., & Kondo, T. (1999). Quantitative analysis for the cellulose I alpha crystalline phase in developing wood cell walls. *International Journal of Biological Macromolecules*, 24(1), 37–41.
- Kawai, K., Hagiwara, T., Takai, R., & Suzuki, T. (2004). Maillard reaction rate in various glassy matrices. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(11), 2285–8. doi:10.1271/bbb.68.2285
- Kim, P. (2004). Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(3), 243–9. doi:10.1007/s00253-004-1665-8
- Kim, P., Yoon, S. H., Roh, H. J., & Choi, J. H. (2001). High production of D-tagatose, a potential sugar substitute, using immobilized L-arabinose isomerase. *Biotechnology Progress*, 17(1), 208–10. doi:10.1021/bp000147u
- Kim, Y.-S., Park, C.-S., & Oh, D.-K. (2006). Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 903–908. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.01.023
- Kongo, J. M. (2013). *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. (J. M. Kongo, Ed.). InTech. doi:10.5772/2825
- König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*.
- Kuhn, R. C., & Filho, F. M. (2010). Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. doi:10.1016/j.jchromb.2010.05.039
- Kummel, K. F., & Broks, S. (2001). Lactitol as a Functional Prebiotic. *Cereal Foods World*.

- Kurtmann, L., Skibsted, L. H., & Carlsen, C. U. (2009). Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(15), 6736–41. doi:10.1021/jf901044u
- Lamoureux, L., Roy, D., & Gauthier, S. F. (2002). Production of Oligosaccharides in Yogurt Containing Bifidobacteria and Yogurt Cultures. *Journal of Dairy Science*, *85*(5), 1058–1069. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74166-0
- Lenoir-Wijnkoop, I., Sanders, M. E., Cabana, M. D., Caglar, E., Corthier, G., Rayes, N., ... Wolvers, D. A. W. (2007). Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutrition Reviews*, *65*(11), 469–89.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(2), 67–78. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004
- Leslie, S., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied*, *61*(10), 3592–3597.
- Levin, G. V. (2002). Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *Journal of Medicinal Food*, *5*(1), 23–36. doi:10.1089/109662002753723197
- Li, C., Zhao, J.-L., Wang, Y.-T., Han, X., & Liu, N. (2009). Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(9), 1659–1665. doi:10.1007/s11274-009-0060-0
- Li, W., Xiang, X., Tang, S., Hu, B., Tian, L., Sun, Y., ... Zeng, X. (2009). Effective Enzymatic Synthesis of Lactosucrose and Its Analogues by  $\beta$ -d-Galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(9), 3927–3933. doi:10.1021/jf9002494
- Li, Z., Xiao, M., Lu, L., & Li, Y. (2008). Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. *Process Biochemistry*, *43*(8), 896–899. doi:10.1016/j.procbio.2008.04.016
- Lodato, P., Segovia de Huergo, M., & Buera, M. P. (1999). Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *52*(2), 215–220.
- Lodato, P., Segovia de Huergo, M., & Buera, M. P. (1999). Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *52*(2), 215–220. doi:10.1007/s002530051511

- Lomax, A. R., & Calder, P. C. (2009). Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *The British Journal of Nutrition*, *101*(5), 633–58. doi:10.1017/S0007114508055608
- Long, D. A. (2002). *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. England: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/0470845767
- Maalej-Achouri, I., Guerfali, M., Gargouri, A., & Belghith, H. (2009). Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *59*(1-3), 145–152. doi:10.1016/j.molcatb.2009.02.003
- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, a. T., Widmer, W., ... Rastall, R. a. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8383–8389. doi:10.1128/AEM.71.12.8383-8389.2005
- Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, *18*(2), 287–98. doi:10.1016/j.bpg.2003.10.008
- Marconi, E., Messia, M. C., Amine, A., Moscone, D., Vernazza, F., Stocchi, F., & Palleschi, G. (2004). Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. *Food Chemistry*, *84*(3), 447–450. doi:10.1016/S0308-8146(03)00268-1
- Martens, H., Nielsen, J. P., & Engelsen, S. B. (2003). Light Scattering and Light Absorbance Separated by Extended Multiplicative Signal Correction. Application to Near-Infrared Transmission Analysis of Powder Mixtures. *Analytical Chemistry*, *75*(3), 394–404. doi:10.1021/ac020194w
- MARWAHA, S. S., & KENNEDY, J. F. (2007). Whey-pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science & Technology*, *23*(4), 323–336. doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb00586.x
- Matheus, S., Friess, W., & Mahler, H.-C. (2006). FTIR and nDSC as analytical tools for high-concentration protein formulations. *Pharmaceutical Research*, *23*(6), 1350–63. doi:10.1007/s11095-006-0142-8
- Mathlouthi, M., & Koenig, J. L. (1986). Vibrational spectra of carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *44*, 7–89.
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (2009). *Advanced dairy chemistry*. (P. McSweeney & P. F. Fox, Eds.) *Advanced Dairy Chemistry* (Vol. 3). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-84865-5



- Meste, M. Le, Champion, D., Roudaut, G., Blond, G., & Simatos, D. (2002). Glass Transition and Food Technology: A Critical Appraisal. *Journal of Food Science*, 67(7), 2444–2458. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08758.x
- Miao, S., Mills, S., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Roos, Y., & Ross, R. P. (2008). Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. *Dairy Science and Technology*, 88(1), 19–30. doi:10.1051/dst:2007003
- Milhaud, J. (2004). New insights into water-phospholipid model membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1663(1-2), 19–51. doi:10.1016/j.bbamem.2004.02.003
- Mizota, T., Tamura, Y., Tomita, M., & Okonogi, S. (1987). Lactulose as a sugar with physiological significance. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 212, 69–76.
- Mobili, P., Araujo-Andrade, C., Londero, A., Frausto-Reyes, C., Tzonchev, R. I., De Antoni, G. L., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). Development of a method based on chemometric analysis of Raman spectra for the discrimination of heterofermentative lactobacilli. *The Journal of Dairy Research*, 78(2), 233–41. doi:10.1017/S0022029911000124
- Monsan, P., & Paul, F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(2-3), 187–192. doi:10.1111/j.1574-6976.1995.tb00165.x
- Mugambi, M. N., Musekiwa, A., Lombard, M., Young, T., & Blaauw, R. (2012). Synbiotics, probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants: a systematic review. *Nutrition Journal*, 11(1), 81. doi:10.1186/1475-2891-11-81
- Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 587–597. doi:10.1016/j.carbpol.2006.12.011
- Nagpal, R., & Kaur, A. (2011). Synbiotic Effect of Various Prebiotics on In Vitro Activities of Probiotic Lactobacilli. *Ecology of Food and Nutrition*, 50(1), 63–68. doi:10.1080/03670244.2011.539161
- Nakakuki, T. (2002). Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure Appl. Chem.*, 1245–1251.
- Naumann, D. (2000). Infrared spectroscopy in microbiology. In R. A. Meyer (Ed.), *Encyclopedia of analytical chemistry* (pp. 102–131). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Naumann, D., Helm, D., & Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*, 351(6321), 81–2. doi:10.1038/351081a0

- Nemcová, R. (1997). Criteria for selection of lactobacilli for probiotic use. *Veterinární Medicína*, 42(1), 19–27.
- Nguyen, Q. D., Mattes, F., Hoschke, Á., Rezessy-Szabó, J., & Bhat, M. K. (1999). Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspepgillus niger* IMI 303386. *Biotechnology Letters*, 21(3), 183–186. doi:10.1023/A:1005429525865
- Nobre, C., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2012). Fructo-oligosaccharides purification from a fermentative broth using an activated charcoal column. *New Biotechnology*, 29(3), 395–401. doi:10.1016/j.nbt.2011.11.006
- Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K., & Ikeda, H. (1995). Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. *Digestion*, 56(5), 415–20.
- Oldenhof, H., Wolkers, W. F., Fonseca, F., Passot, S., & Marin, M. (2005). Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: an in situ fourier transform infrared spectroscopy study. *Biotechnology Progress*, 21(3), 885–92. doi:10.1021/bp049559j
- Olie, J. J., & Potts, M. (1986). Purification and Biochemical Analysis of the Cytoplasmic Membrane from the Desiccation-Tolerant Cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4), 706–10.
- Osborne, B. G. (2006). Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. doi:10.1002/9780470027318.a1018
- Palframan, R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37(4), 281–284. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01398.x
- Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(4), 530–543. doi:10.1002/jctb.1453
- Patel, S., & Goyal, A. (2012). The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*, 2(2), 115–125. doi:10.1007/s13205-012-0044-x
- Payton, N. M., Wempe, M. F., Xu, Y., & Anchordoquy, T. J. (2014). Long-term storage of lyophilized liposomal formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(12), 3869–78. doi:10.1002/jps.24171
- Pelletier, M. J. (1999). *Analytical Applications of Raman Spectroscopy*. (M. J. Pelletier, Ed.) (1st Editio.). Wiley-Blackwell.

- Pembrey, R. S., Marshall, K. C., & Schneider, R. P. (1999). Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(7), 2877–94.
- Perry, S. F. (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, *9*(1), 59–64. doi:10.1007/BF02752697
- Pilgrim, A., Kawase, M., Ohashi, M., Fujita, K., Murakami, K., & HASHIMOTO, K. (2014). Reaction Kinetics and Modeling of the Enzyme-catalyzed Production of Lactosucrose using  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. K-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *65*(4), 758–765. doi:10.1271/bbb.65.758
- Piva, A., Panciroli, A., Meola, E., & Formigoni, A. (1996). Lactitol enhances short-chain fatty acid and gas production by swine cecal microflora to a greater extent when fermenting low rather than high fiber diets. *The Journal of Nutrition*, *126*(1), 280–9.
- Playne, M. J., & Crittenden, R. G. (2004). Prebiotics from Lactose, Sucrose, Starch, and Plant Polysaccharides. *Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals*. doi:10.1201/9780203026380.ch7 10.1201/9780203026380.ch7
- Pool-Zobel, B. L., & Sauer, J. (2007). Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *The Journal of Nutrition*, *137*(11 Suppl), 2580S–2584S.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*, *58*(4), 755–805.
- Prasad, N. G., Dey, S., Shakarad, M., & Joshi, A. (2003). The evolution of population stability as a by-product of life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(Suppl\_1), S84–S86. doi:10.1098/rsbl.2003.0020
- Puccio, G., Cajozzo, C., Meli, F., Rochat, F., Grathwohl, D., & Steenhout, P. (2007). Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *23*(1), 1–8. doi:10.1016/j.nut.2006.09.007
- Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J. C., & Bouix, M. (2007). Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, *55*(1), 35–43. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.04.005
- Ricker, J. V., Tsvetkova, N. M., Wolkers, W. F., Leidy, C., Tablin, F., Longo, M., & Crowe, J. H. (2003). Trehalose maintains phase separation in an air-dried binary lipid mixture. *Biophysical Journal*, *84*(5), 3045–51. doi:10.1016/S0006-3495(03)70030-7

- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2), 830S–7S.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., ... Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *The British Journal of Nutrition*, 104 Suppl , S1–63. doi:10.1017/S0007114510003363
- Roberfroid, M., & Slavin, J. (2000). Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(6), 461–80. doi:10.1080/10408690091189239
- Romanin, D., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 102–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014
- Roos, Y. H. (1995). *Phase Transitions in Foods*. *Phase Transitions in Foods*. Elsevier. doi:10.1016/B978-012595340-5/50003-1
- Roos, Y. H. (2009). Solid and liquid states of lactose. In P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advance Dairy Chemistry. Lactosa, water, salts and minor constituents, Vol 3* (pp. 17–33). New York: Springer Science & Business Media.
- Roy, D., Daoudi, L., & Azaola, A. (2002). Optimization of galacto-oligosaccharide production by *Bifidobacterium infantis* RW-8120 using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 281–285. doi:10.1038/sj.jim.7000319
- Roychoudhury, P., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2006). The potential of mid infrared spectroscopy (MIRS) for real time bioprocess monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 571(2), 159–66. doi:10.1016/j.aca.2006.04.086
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 878–87.
- Ryu, S.-A., Kim, C. S., Kim, H.-J., Baek, D. H., & Oh, D.-K. (2003). Continuous D-Tagatose Production by Immobilized Thermostable L-Arabinose Isomerase in a Packed-Bed Bioreactor. *Biotechnology Progress*, 19(6), 1643–1647. doi:10.1021/bp0340739
- Saarela, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T., & Mättö, J. (2003). The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal*, 13(4), 291–302. doi:10.1016/S0958-6946(02)00158-9
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T., & Mättö, J. (2005). Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and

acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6), 1330–9. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02742.x

Saarela, M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A., & Mättö, J. (2006). Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 171–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.019

Sairanen, U., Piirainen, L., Nevala, R., & Korpela, R. (2007). Yoghurt containing galacto-oligosaccharides, prunes and linseed reduces the severity of mild constipation in elderly subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(12), 1423–1428. doi:10.1038/sj.ejcn.1602670

Sakai, T., Tsuji, H., Shibata, S., Hayakawa, K., & Matsumoto, K. (2008). Repeated-batch production of galactooligosaccharides from lactose at high concentration by using alginate-immobilized cells of *Sporobolomyces singularis* YIT 10047. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54(5), 285–293. doi:10.2323/jgam.54.285

Sako, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9(1), 69–80. doi:10.1016/S0958-6946(99)00046-1

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16(10), 442–457. doi:10.1016/j.tifs.2005.05.003

Santivarangkna, C., Higl, B., & Foerst, P. (2008). Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology*, 25(3), 429–441. doi:10.1016/j.fm.2007.12.004

Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008a). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 1–13. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x

Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008b). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 1–13. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x

Santivarangkna, C., Wenning, M., Foerst, P., & Kulozik, U. (2007). Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Journal of Applied Microbiology*, 102(3), 748–756. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x

Sanz, M. L., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2002). Characterization of O-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 56(9-10), 617–622. doi:10.1007/BF02497679

- Sashi, P., Yasin, U. M., Balasubramanian, H., Sree, M. U., Ramakrishna, D., & Bhuyan, A. K. (2014). Preferential water exclusion in protein unfolding. *The Journal of Physical Chemistry. B*, *118*(3), 717–23. doi:10.1021/jp4111103
- Satory, M., Furlinger, M., Haltrich, D., Kulbe, K. D., Pittner, F., & Nidetzky, B. (1997). Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor. *Biotechnology Letters*, *19*(12), 1205–1208. doi:10.1023/A:1018485804167
- Saulnier, D. M. A., Molenaar, D., de Vos, W. M., Gibson, G. R., & Kolida, S. (2007). Identification of Prebiotic Fructooligosaccharide Metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1753–1765. doi:10.1128/AEM.01151-06
- Saulnier, D. M. A., Spinler, J. K., Gibson, G. R., & Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(2), 135–41. doi:10.1016/j.copbio.2009.01.002
- Saulnier, D. M., Kolida, S., & Gibson, G. R. (2009). Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(13), 1403–14.
- Savino, F., Cresi, F., Maccario, S., Cavallo, F., Dalmasso, P., Fanaro, S., ... Silvestro, L. (2007). “Minor” feeding problems during the first months of life: effect of a partially hydrolysed milk formula containing fructo- and galacto-oligosaccharides. *Acta Paediatrica*, *92*, 86–90. doi:10.1111/j.1651-2227.2003.tb00653.x
- Scaman, C. H., & Durance, T. D. (2005). *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier. doi:10.1016/B978-012676757-5/50021-9
- Scarff, M., Arnold, S. A., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2006). Near infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control: current status and future trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, *26*(1), 17–39. doi:10.1080/07388550500513677
- Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, *18*(5), 458–465. doi:10.1016/j.idairyj.2007.11.013
- Schoonman, A., Ubbink, J., Bisperink, C., Le Meste, M., & Karel, M. (2002). Solubility and Diffusion of Nitrogen in Maltodextrin/Protein Tablets. *Biotechnology Progress*, *18*(1), 139–154. doi:10.1021/bp010126f
- Schultz, C., & Naumann, D. (1991). In vivo study of the state of order of the membranes of gram-negative bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). *FEBS Letters*, *294*(1-2), 43–6.

- Schuster-Wolff-Bühning, R., Fischer, L., & Hinrichs, J. (2010). Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *International Dairy Journal*, 20(11), 731–741. doi:10.1016/j.idairyj.2010.05.004
- Schwab, C., Vogel, R., & Gänzle, M. G. (2007). Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*, 55(2), 108–14. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.06.004
- Sears, P. (2001). Toward Automated Synthesis of Oligosaccharides and Glycoproteins. *Science*, 291(5512), 2344–2350. doi:10.1126/science.1058899
- Sekhon, B. S., & Jairath, S. (2010). Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 1(2), 13–36. doi:10.1016/B978-0-443-06839-3.00011-4
- Sekkal, M., Dincq, V., Legrand, P., & Huvenne, J. P. (1995). Investigation of the glycosidic linkages in several oligosaccharides using FT-IR and FT Raman spectroscopies. *Journal of Molecular Structure*, 349, 349–352. doi:10.1016/0022-2860(95)08781-P
- Sen, D., Gosling, A., Stevens, G. W., Bhattacharya, P. K., Barber, A. R., Kentish, S. E., ... Gras, S. L. (2011). Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation. *Food Chemistry*, 128(3), 773–777. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.076
- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Alvarez, J. A. (2008). Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology*, 25(1), 13–21. doi:10.1016/j.fm.2007.09.003
- Shafiei, R., Delvigne, F., Babanezhad, M., & Thonart, P. (2013). Evaluation of viability and growth of *Acetobacter senegalensis* under different stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 204–13. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.011
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11), 1262–1277. doi:10.1016/j.idairyj.2007.01.014
- Sheik Asraf, S., & Gunasekaran, P. (2010). Current trends of  $\beta$ -galactosidase research and application. In A. Mendez Vilas (Ed.), *Current Research, Technology and Education. Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (2nd ed., pp. 880–890). Formatex Research Center.
- Sheu, D. C., Lio, P. J., Chen, S. T., Lin, C. T., & Duan, K. J. (2001). Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of  $\beta$ -fructofuranosidase and glucose oxidase. *Biotechnology Letters*, 23(18), 1499–1503. doi:10.1023/A:1011689531625

- Shoaf-Sweeney, K. D., & Hutkins, R. W. (2009). Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host. *Advances in Food and Nutrition Research*, *55*, 101–61. doi:10.1016/S1043-4526(08)00402-6
- Silva, J., Carvalho, A. S., Ferreira, R., Vitorino, R., Amado, F., Domingues, P., ... Gibbs, P. A. (2005). Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(3), 775–82. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02516.x
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. (C. Fernandez Madrid, Ed.) (5ta. Edici.). Madrid: Sauders College Publishing.
- Small, G. W. (2006). Chemometrics and near-infrared spectroscopy: Avoiding the pitfalls. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *25*(11), 1057–1066. doi:10.1016/j.trac.2006.09.004
- Söderholm, S., Roos, Y. H., Meinander, N., & Hotokka, M. (1999). Raman spectra of fructose and glucose in the amorphous and crystalline states. *Journal of Raman Spectroscopy*, *30*(11), 1009–1018. doi:10.1002/(SICI)1097-4555(199911)30:11<1009::AID-JRS436>3.0.CO;2-#
- Splechna, B., Nguyen, T.-H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W., & Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(14), 4999–5006. doi:10.1021/jf053127m
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., & Danner, H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(1), 167–77. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04192.x
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. New York: John Wiley & Sons, Ltd.
- Suriñach, S., Baró, S., Bordas, S., Clavaguera, N. (Clavaguera P., & Clavaguera-Mora, M. T. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- Szalontai, B., Nishiyama, Y., Gombos, Z., & Murata, N. (2000). Membrane dynamics as seen by fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1509*(1-2), 409–19.
- Tavera-Quiroz, M. J., Romano, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A., & Bertola, N. (2015). Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, *16*, 164–173. doi:10.1016/j.jff.2015.04.024



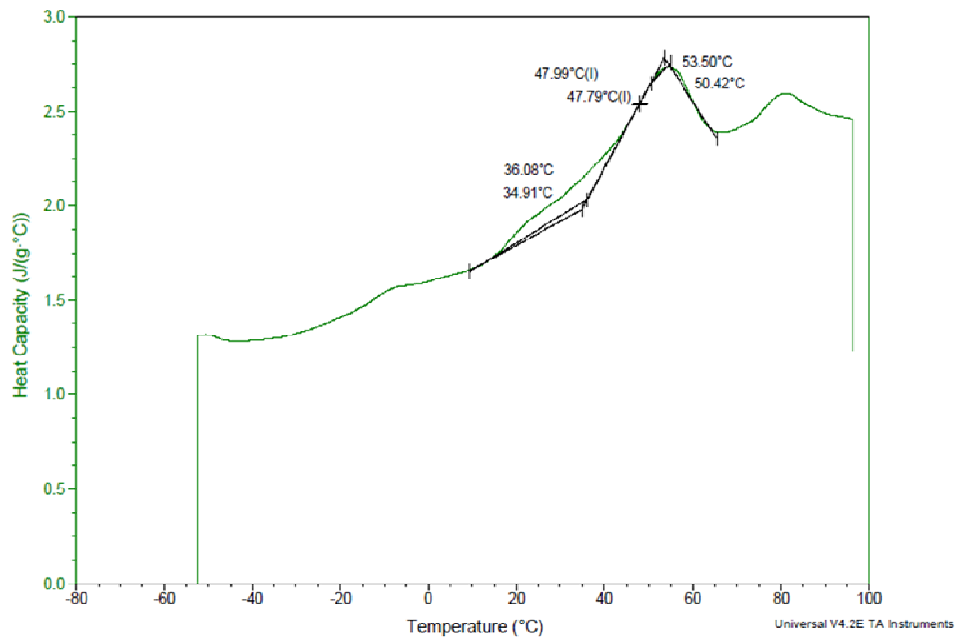
- Teixeira, P. C., Castro, M. H., & Kirby, R. M. (1995). Death kinetics of *Lactobacillus bulgaricus* in a spray drying process. *International Association for Food Protection*.
- Teixeira, P., Castro, H., & Kirby, R. (1995). Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(4), 456–462. doi:10.1111/j.1365-2672.1995.tb03433.x
- Teixeira, P., Castro, H., Mohacsi-Farkas, C., & Kirby, R. (1997). Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology*, 83(2), 219–226. doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00221.x
- Thammavongs, B., Poncet, J.-M., Desmasures, N., Guéguen, M., & Panoff, J.-M. (2004). Resin straw as an alternative system to securely store frozen microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 57(2), 181–6. doi:10.1016/j.mimet.2004.01.003
- Thunell, R. K., Sandine, W. E., & Bodyfelt, F. W. (1984). Frozen Starters from Internal-pH-Control-Grown Cultures. *Journal of Dairy Science*, 67(1), 24–36. doi:10.3168/jds.S0022-0302(84)81262-X
- Torres, D. P. M., Bastos, M., Gonçalves, M. do P. F., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2011). Water sorption and plasticization of an amorphous galacto-oligosaccharide mixture. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 831–835. doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.063
- Tymczyszyn, E. E., del Rosario Díaz, M., Gómez-Zavaglia, a, & Disalvo, E. a. (2007). Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2410–9. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x
- Tymczyszyn, E. E., Díaz, R., Pataro, A., Sandonato, N., Gómez-Zavaglia, A., & Disalvo, E. A. (2008a). Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 342–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.009
- Tymczyszyn, E. E., Díaz, R., Pataro, A., Sandonato, N., Gómez-Zavaglia, A., & Disalvo, E. A. (2008b). Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 342–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.009
- Tymczyszyn, E. E., Gerbino, E., Illanes, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology*, 62(2), 123–9. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.01.013

- Tymczyszyn, E. E., Gómez-Zavaglia, a, & Disalvo, E. a. (2007). Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(3), 845–51. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03108.x
- Tymczyszyn, E. E., Gómez-Zavaglia, A., & Disalvo, E. A. (2005). Influence of the growth at high osmolality on the lipid composition, water permeability and osmotic response of *Lactobacillus bulgaricus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *443*(1-2), 66–73. doi:10.1016/j.abb.2005.09.004
- Tymczyszyn, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., & Schebor, C. (2012). Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(3), 217–21. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008
- Velly, H., Fonseca, F., Passot, S., Delacroix-Buchet, A., & Bouix, M. (2014). Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, *117*(3), 729–40. doi:10.1111/jam.12577
- Vera, C., Guerrero, C., Illanes, A., & Conejeros, R. (2011). A pseudo steady-state model for galacto-oligosaccharides synthesis with  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*(10), 2270–2279. doi:10.1002/bit.23201
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology*, *9*(8-9), 328–335. doi:10.1016/S0924-2244(98)00059-4
- Wolkers, W. F., Oliver, A. E., Tablin, F., & Crowe, J. H. (2004). A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carbohydrate Research*, *339*(6), 1077–85. doi:10.1016/j.carres.2004.01.016
- Yao, A. A., Wathelet, B., & Thonart, P. (2009). Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage, and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *19*(8), 810–7.
- Young, H. (2006). Lactitol. In H. Mitchell (Ed.), *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1002/9780470996003
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, *19*(2), 107–117. doi:10.1016/0141-0229(95)00188-3

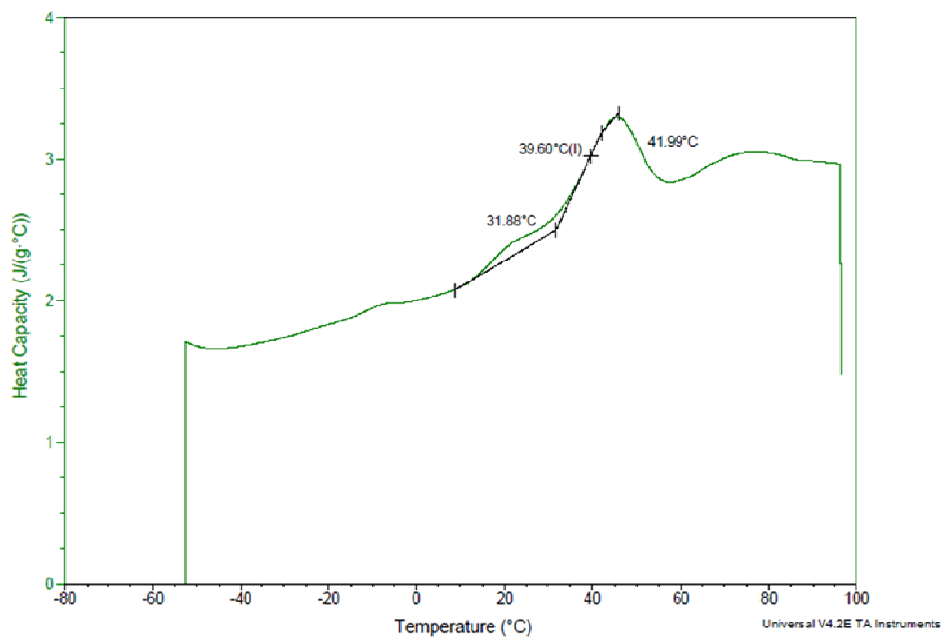
- Zadow, J. G. (1984). Lactose: Properties and Uses. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2654–2679. doi:10.3168/jds.S0022-0302(84)81625-2
- Zavaglia, M. E. Z., Disalvo, E. A., Go, B. A., Antoni, G. L. D. E., Investigacio, C. De, Criotecnologi, T., & De, F. (2000). Fatty acid composition and freeze – thaw resistance in lactobacilli.
- Zheng, L., & Sun, D. W. (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes - A review. *Trends in Food Science and Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2005.08.010
- Zokaee, F., Kaghazchi, T., Zare, A., & Soleimani, M. (2002). Isomerization of lactose to lactulose—study and comparison of three catalytic systems. *Process Biochemistry*, 37(6), 629–635. doi:10.1016/S0032-9592(01)00251-5

# ANEXO

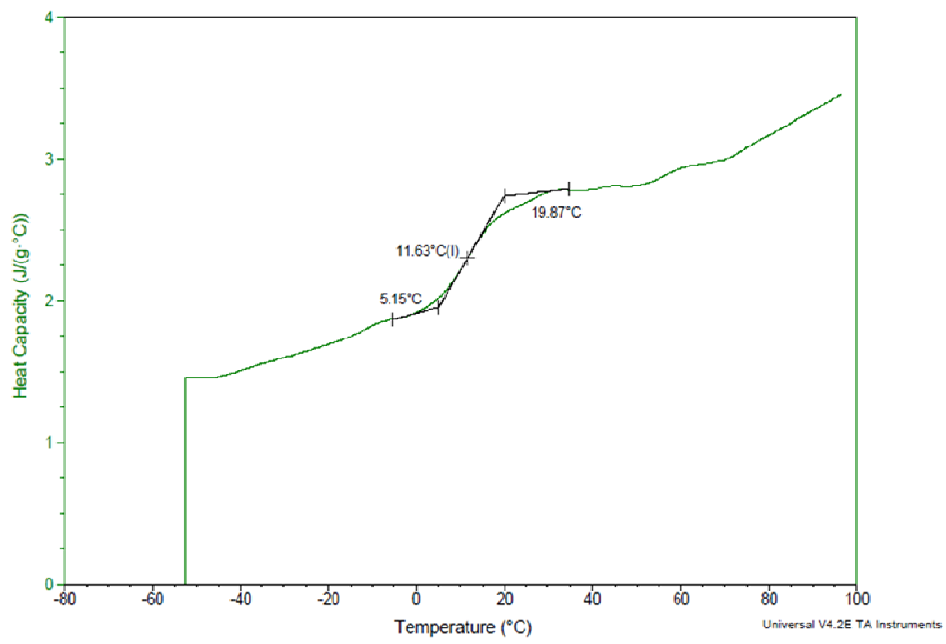
### TG Lactulosa 11% HR



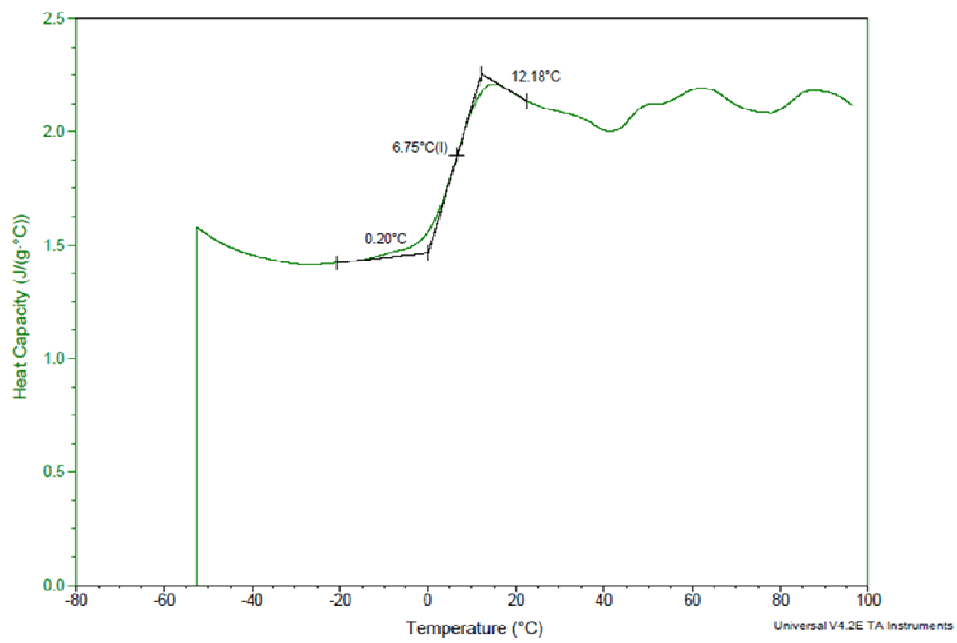
### TG Lactulosa 22% HR



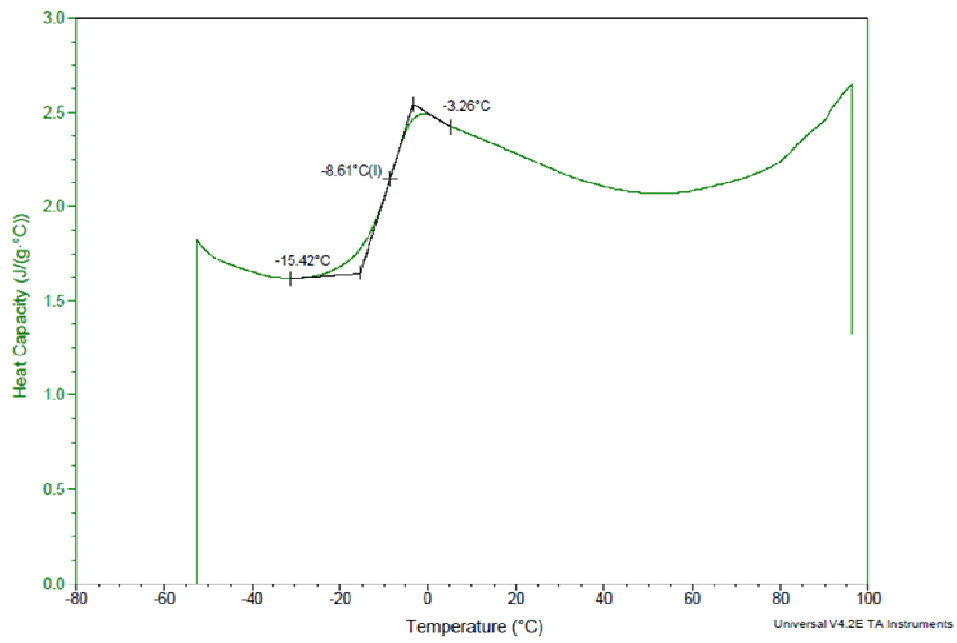
TG Lactulosa 33% HR



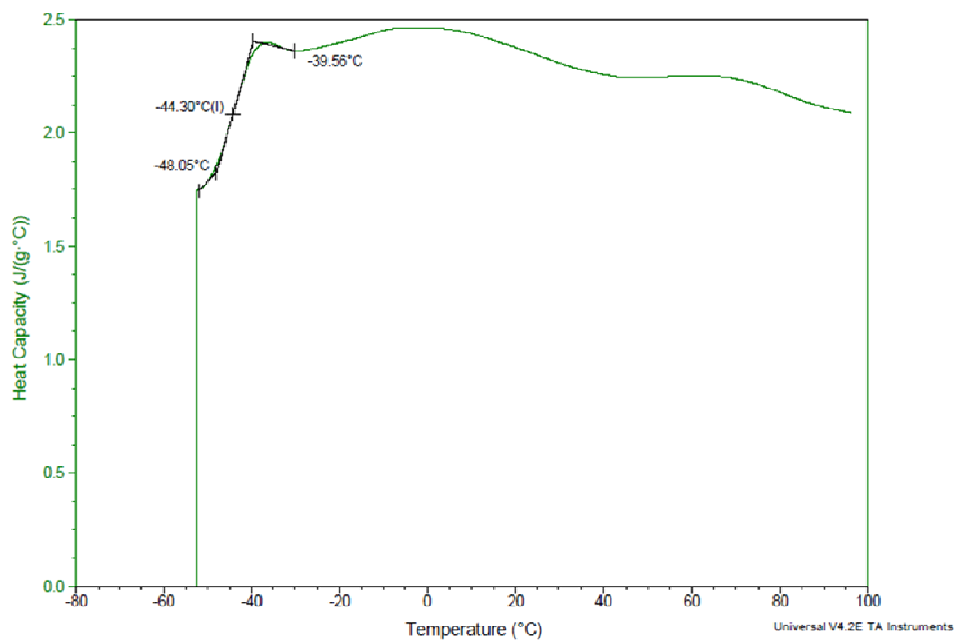
TG Lactulosa 44% HR



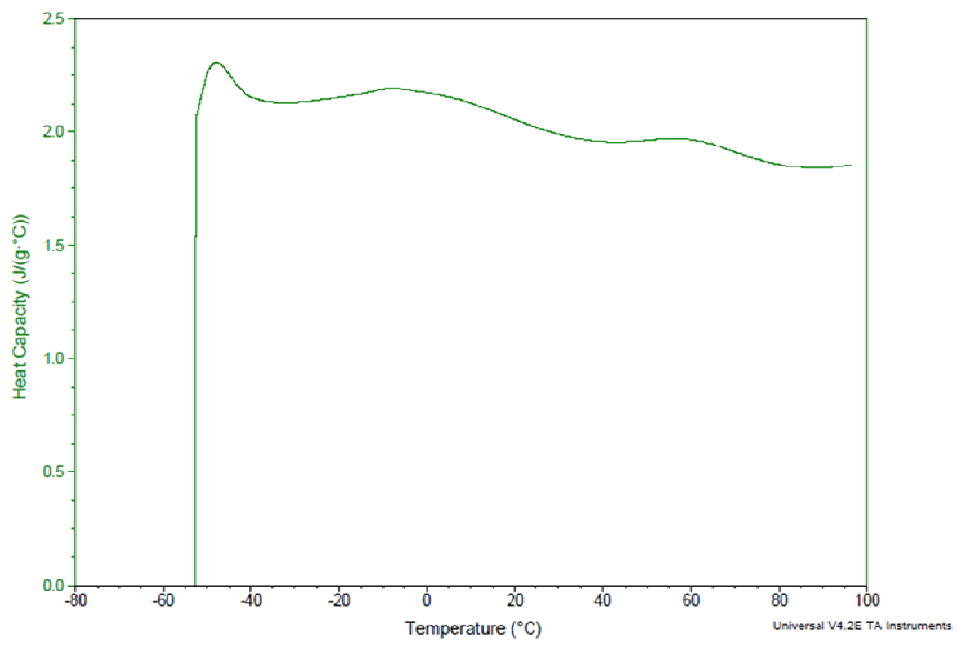
TG Lactulosa 52% HR



TG Lactulosa 75% HR

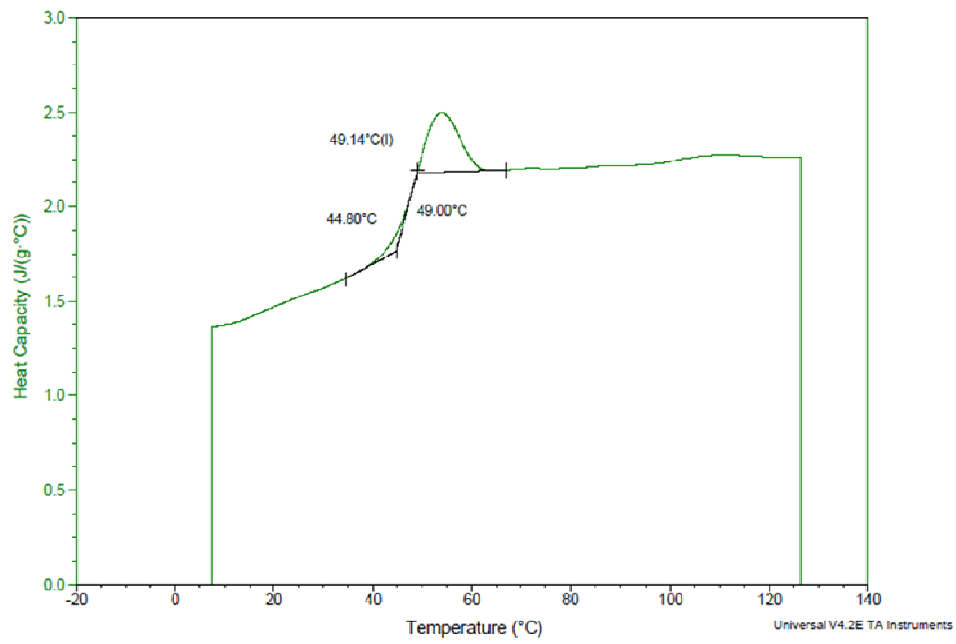


### TG Lactulosa 80% HR

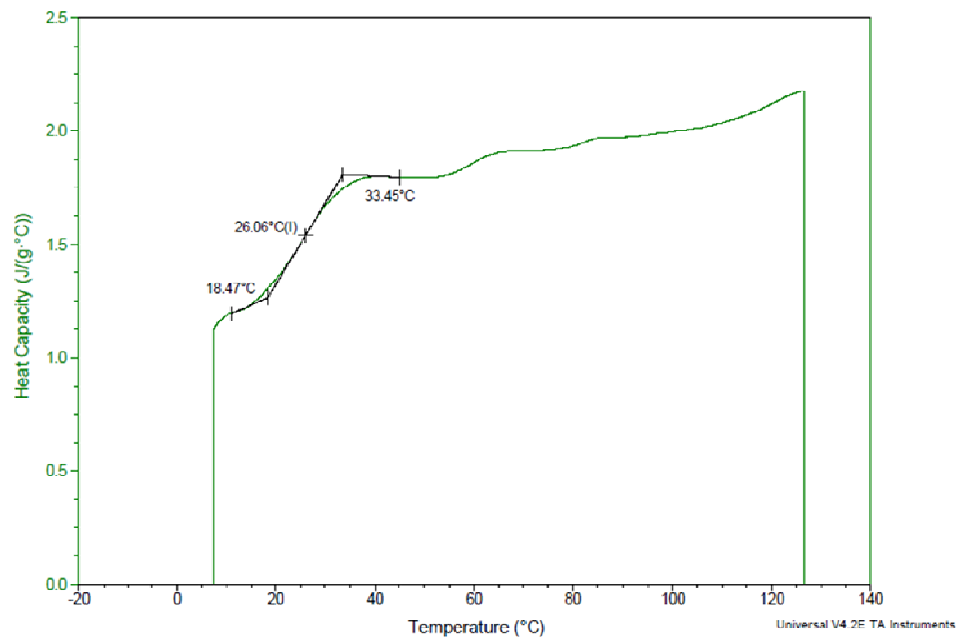




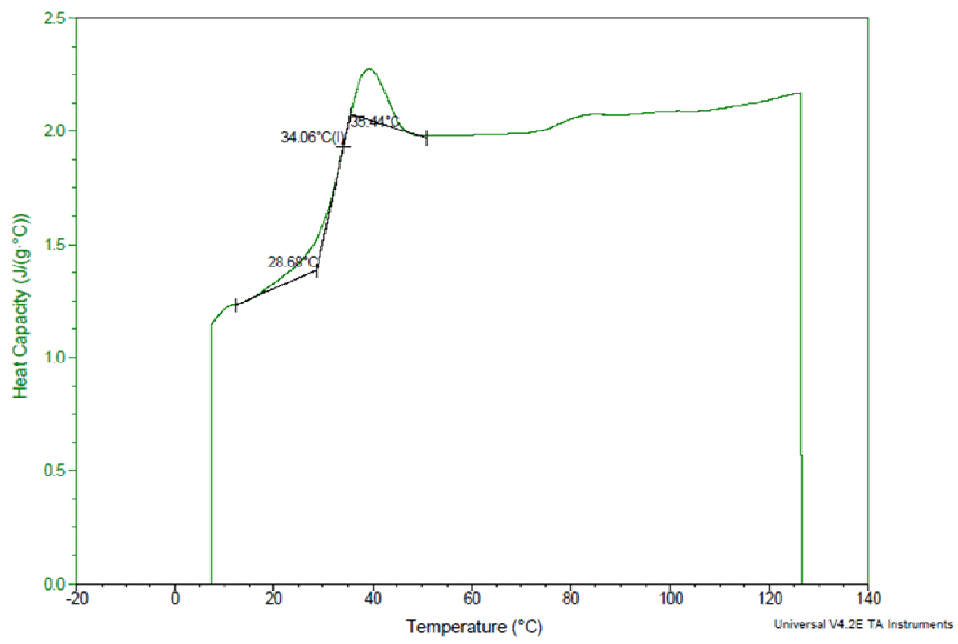
Tg LBR (GOS Biotempo) 11% HR



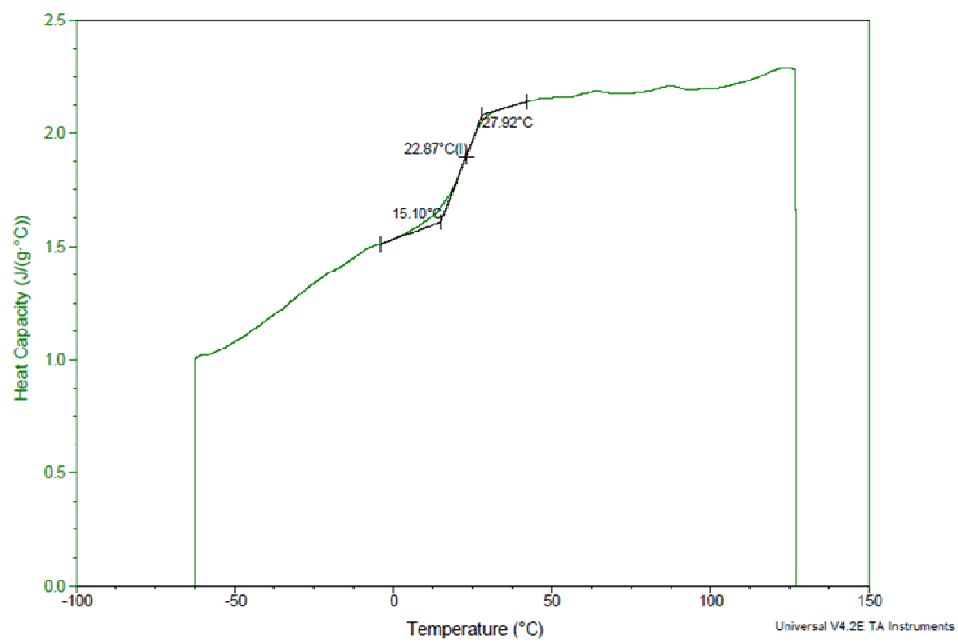
Tg LBR (GOS Biotempo) 22% HR



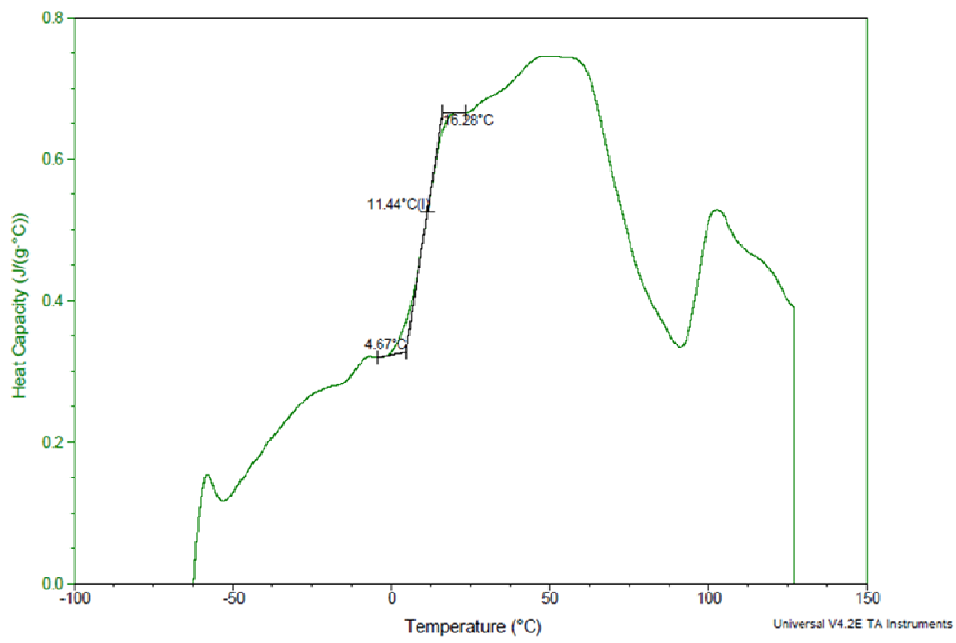
Tg LBR (GOS Biotempo) 33% HR



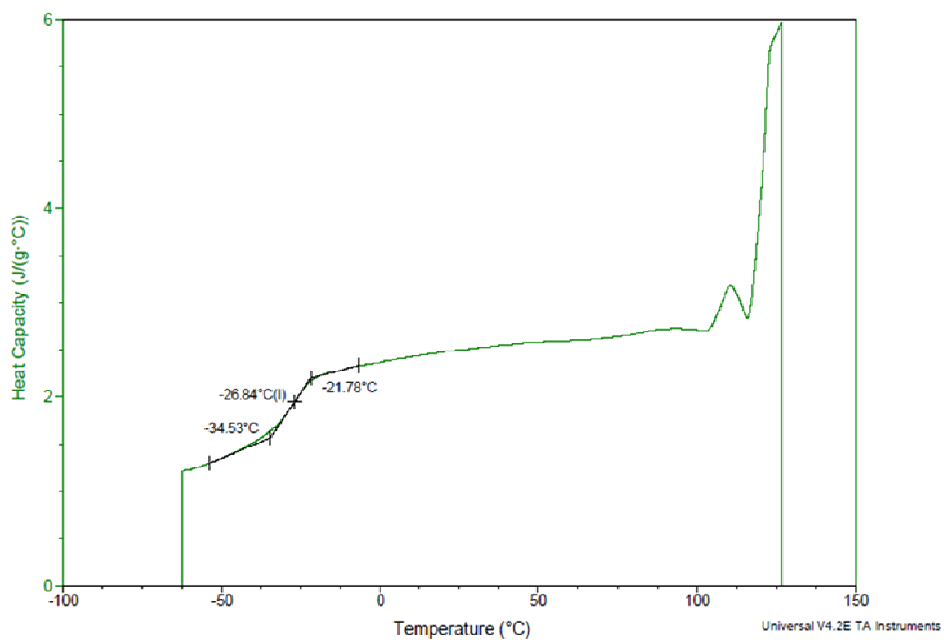
Tg LBR (GOS Biotempo) 44% HR



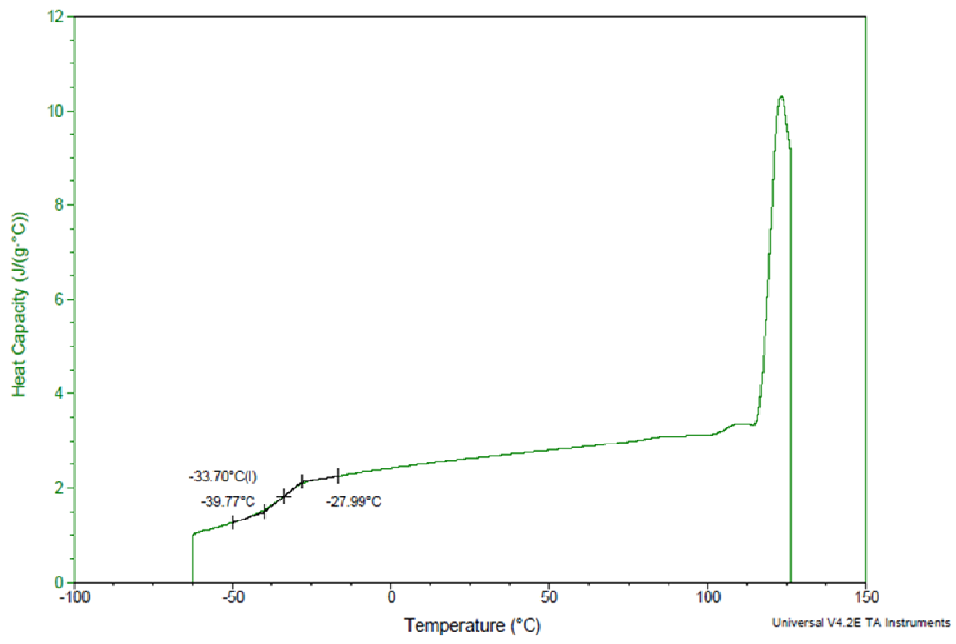
Tg LBR (GOS Biotempo) 52% HR



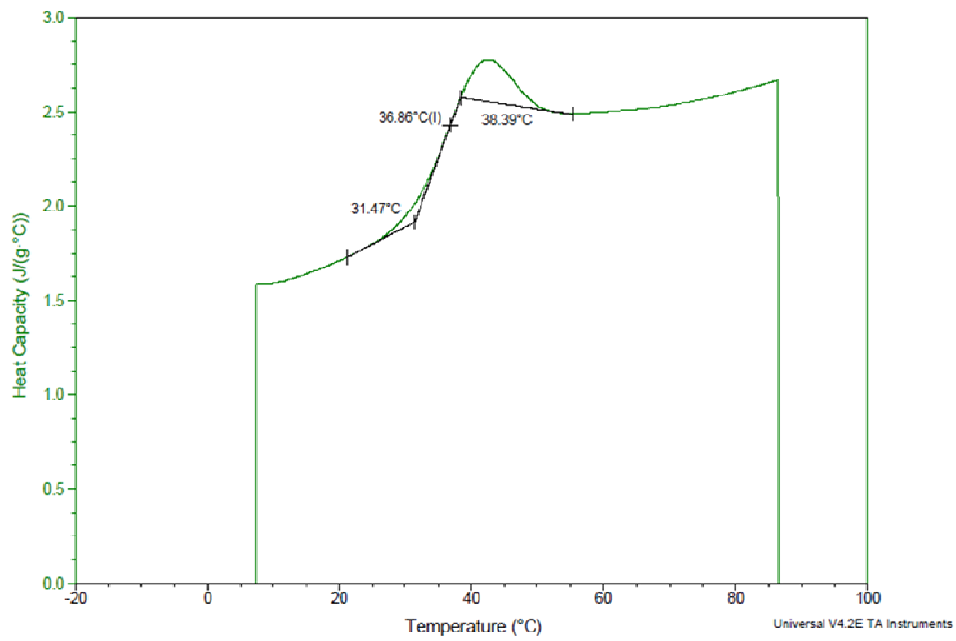
Tg LBR (GOS Biotempo) 75% HR



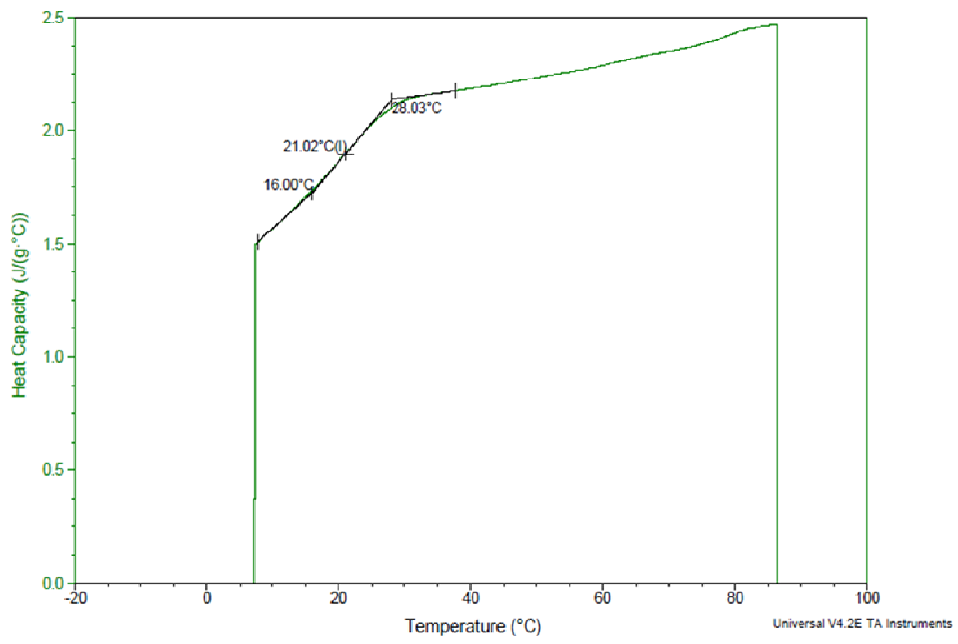
Tg LBR (GOS Biotempo) 85% HR



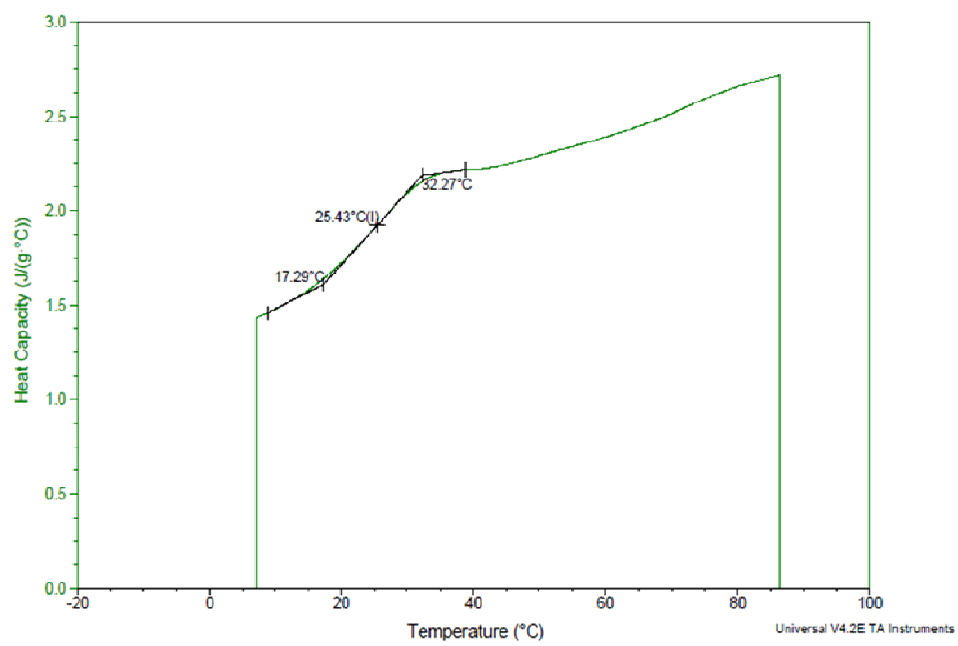
Tg LBR(Cup Oligo H-70®) 11% HR



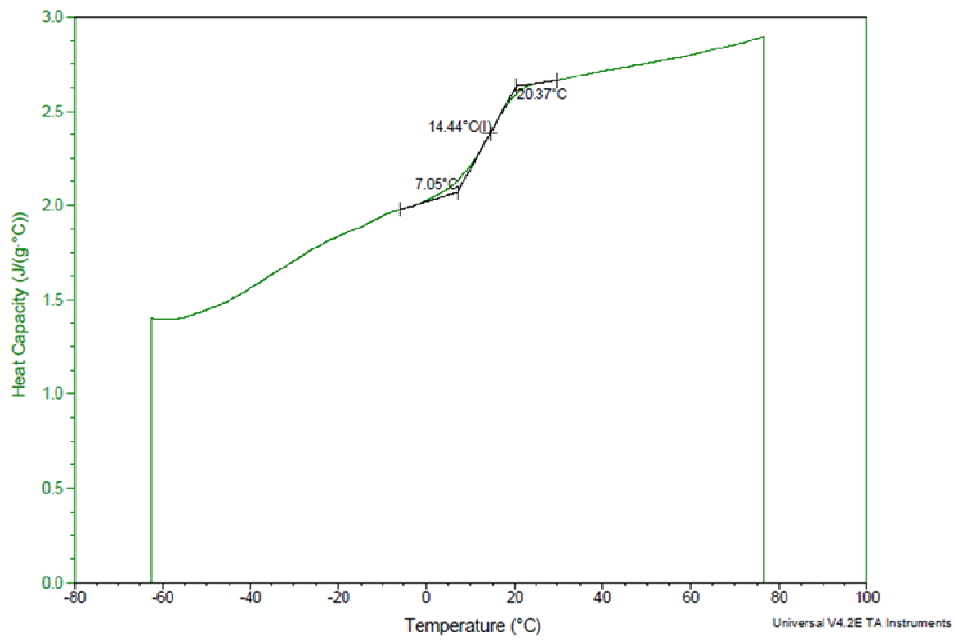
Tg LBR(Cup Oligo H-70®) 22% HR



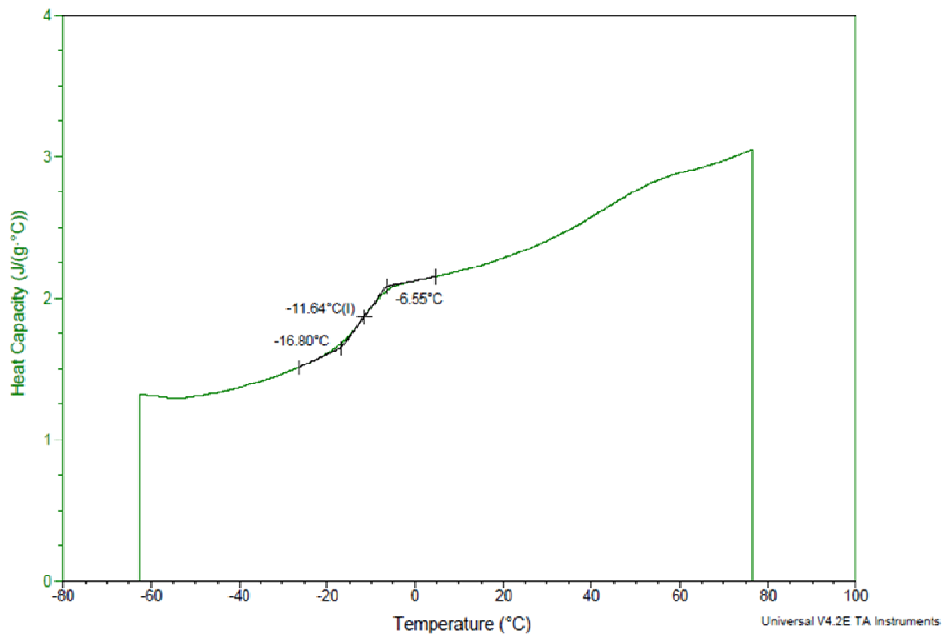
Tg LBR(Cup Oligo H-70®) 33% HR



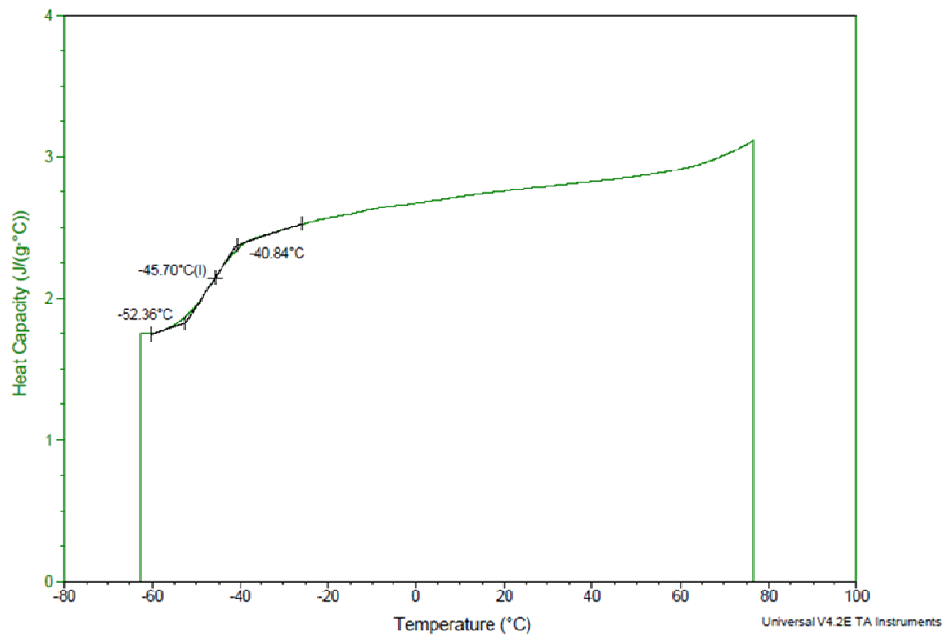
Tg LBR(Cup Oligo H-70®) 44% HR



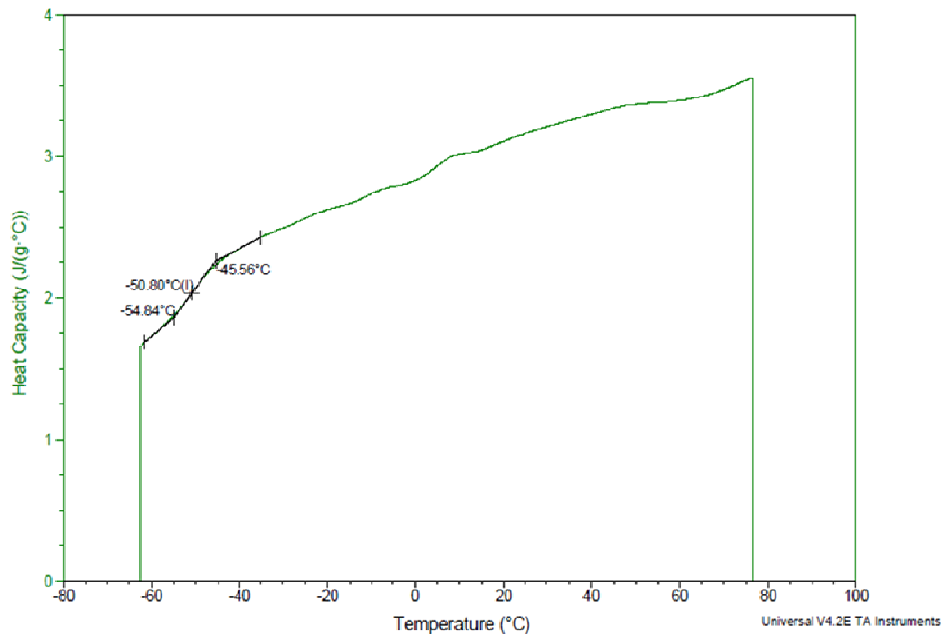
Tg LBR(Cup Oligo H-70®) 52% HR



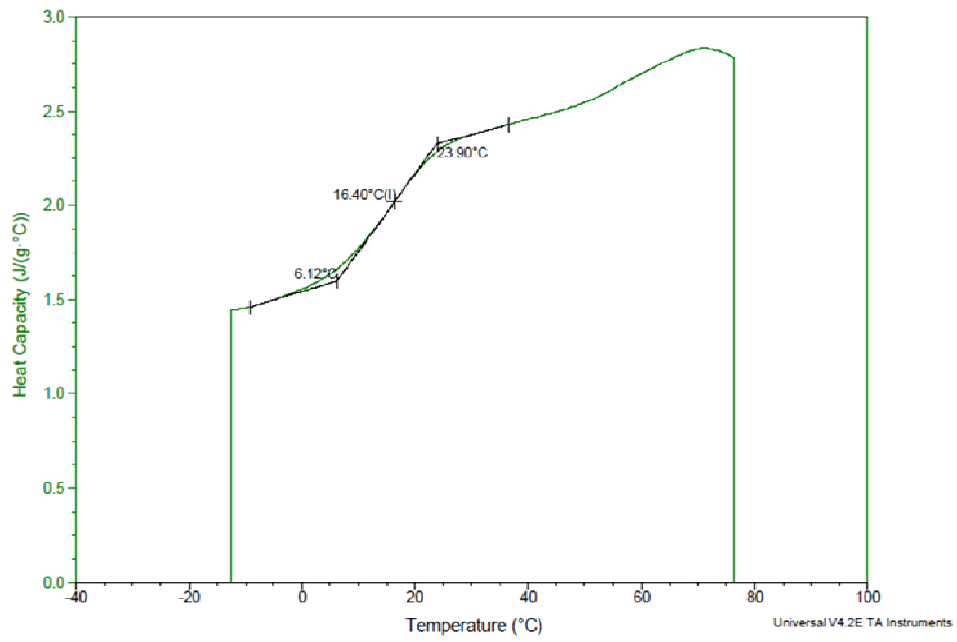
Tg LBR(Cup Oligo H-70®) 75% HR



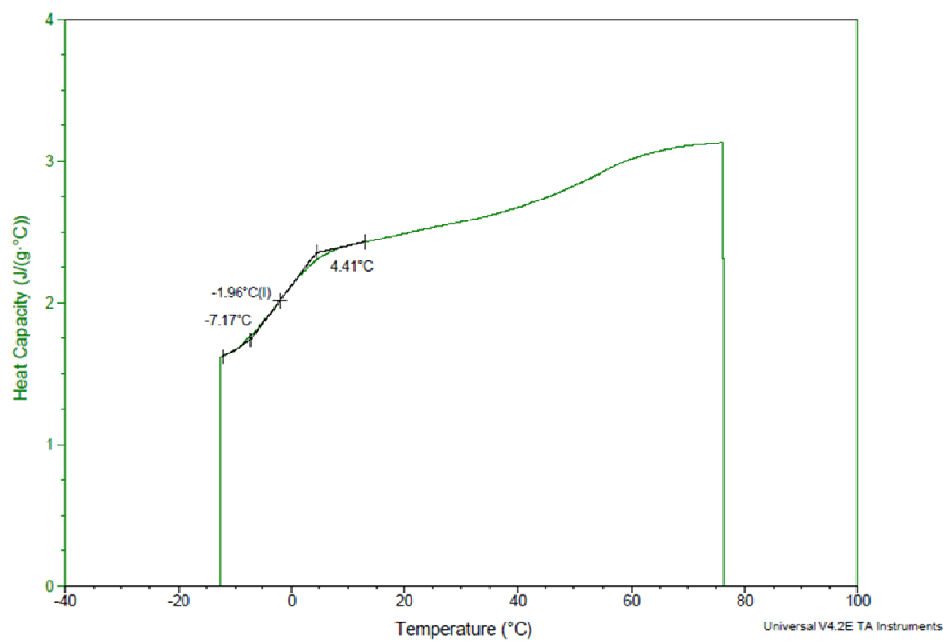
Tg LBR(Cup Oligo H-70®) 85% HR



Tg LBR(Lactulosa) 11% HR

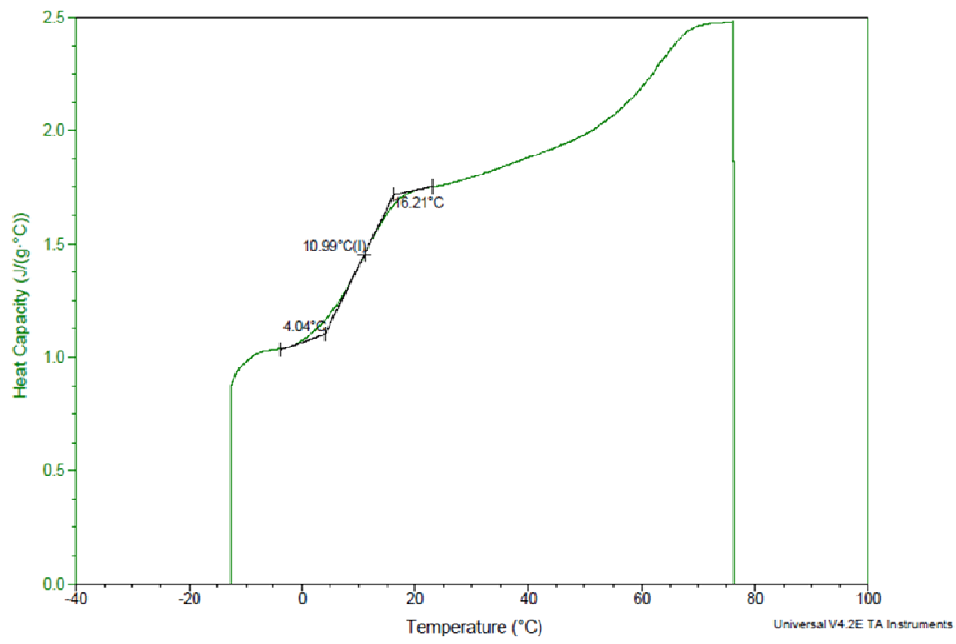


Tg LBR(Lactulosa) 22% HR

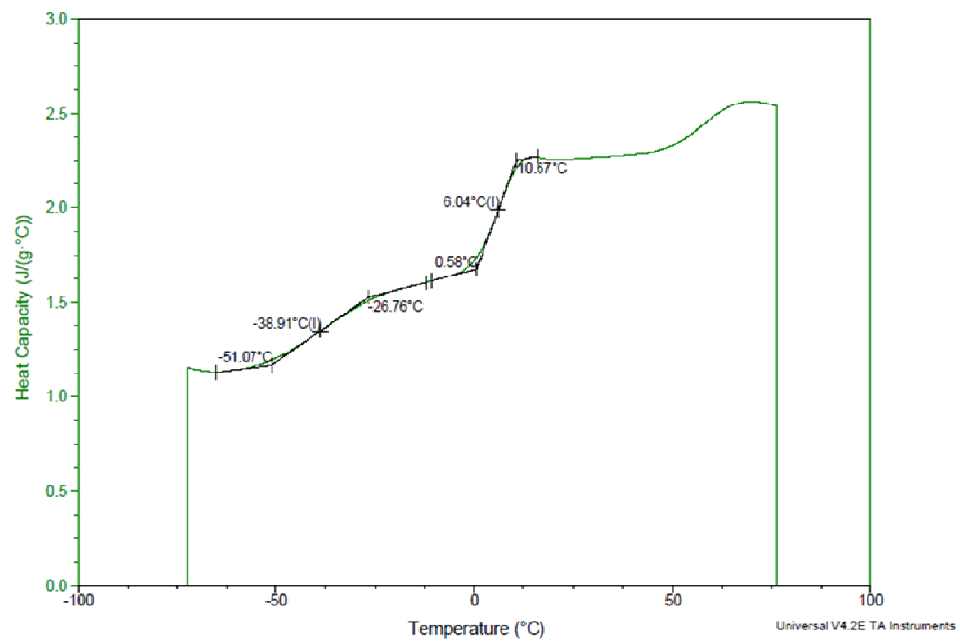




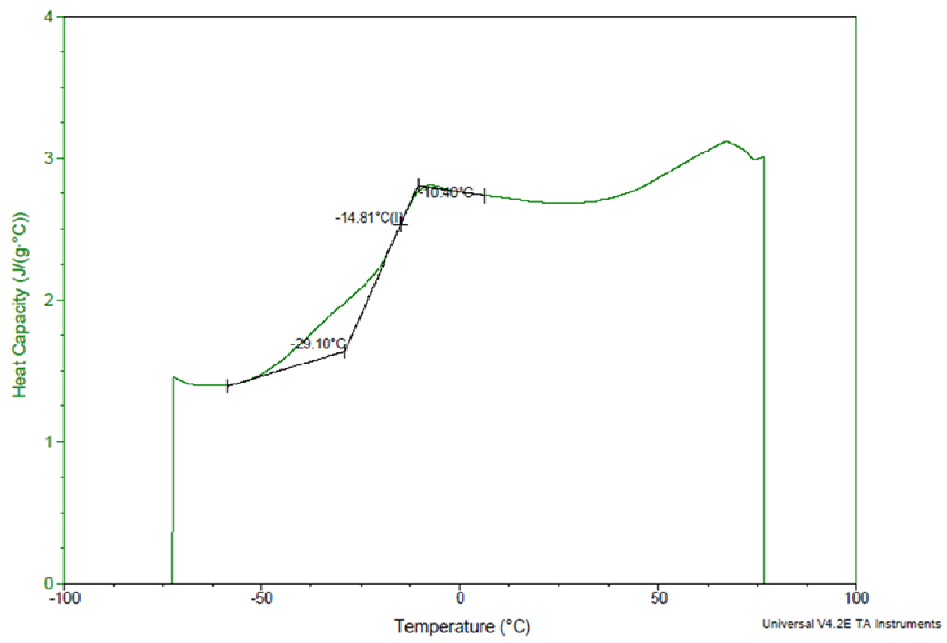
Tg LBR(Lactulosa) 33% HR



Tg LBR(Lactulosa) 44% HR



Tg LBR(Lactulosa) 52% HR



Tg LBR(Lactulosa) 75% HR

