

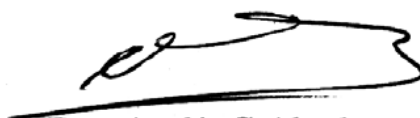
Informe de Beca de entrenamiento

Conservación de bacterias lácticas probióticas con kefiran como protector

Becario: ARREGUI, MICAELA GISELE



Director: Dra. ABRAHAM, ANALÍA G.



Dra. Analía G Abraham

Índice:

➤ <u>Introducción</u>	4
Probióticos	4
Componentes del gránulo de kefir: Biosíntesis	5
Kefiran	6
Preservación de cultivos probióticos	6
Protectores más usados para mantener la viabilidad de cepas probióticas en secado spray	8
➤ <u>Objetivos</u>	10
➤ <u>Materiales y métodos</u>	11
Medios de cultivo y soluciones empleadas	11
Extracción de exopolisacáridos (kefiran) de gránulos de kefir	12
Secado spray	14
-Determinación de humedad	18
-Ensayo de adhesión a células epiteliales	20
Congelación	24
Análisis estadístico	26
➤ <u>Resultados y discusión</u>	27
Secado spray	27
-Humedad de los polvos obtenidos por secado spray	27
-Efecto del secado spray en la viabilidad	28
-Efecto durante el almacenamiento deshidratado	31
-Capacidad de adhesión al epitelio a los 30 días de almacenamiento	33

Congelación	37
-Efecto de los ciclos de congelación en la viabilidad	37
-Efecto de los ciclos de congelación en el pH de los coágulos de leche	39
➤ <u>Conclusiones</u>	46
➤ <u>Bibliografía</u>	48

Introducción:

La conservación de fermentos es un aspecto que aún preocupa a la industria de las fermentaciones industriales acentuándose cuando se trata de cepas con propiedades probióticas cuya actividad promotora de la salud es específica de cepa. Actualmente se utilizan como métodos para preservar y comercializar fermentos la congelación y liofilización y recientemente se ha planteado el secado spray como alternativa. Los protectores mas usados son leche, sacarosa y glicerol.

- **Probióticos**

Los probióticos son definidos como "Microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped" (FAO/WHO, 2001; Código Alimentario Argentino Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011, 2011). Todas las bacterias probióticas exógenas deben llegar intactas y viables al intestino grueso y así ayudar a mantener el balance de la flora intestinal (Manning, 2004). Los microorganismos comúnmente usados como probióticos para alimentación humana son lactobacilos (por ejemplo *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*) y bifidobacterias (*Bifidobacterium adolescentes*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*) (Gibson & Robertfroid, 1995).

Los alimentos probióticos son productos que contienen a estos microorganismos como ingredientes en una matriz adecuada y en cantidad suficiente, de modo tal, que luego de la ingestión se obtienen los beneficios especificados (Schrezanmeir & de Vrese, 2001).

- **Componentes del gránulo de kefir: Biosíntesis.**

El gránulo de kefir contiene aproximadamente 83 % de agua, 4 ± 5 % de proteínas y 9 ± 10 % de un polisacárido denominado kefiran (Abraham & De Antoni, 1999). Durante la fermentación de la leche con gránulos de kefir se produce un incremento de biomasa de gránulo. Esto se debe a que las poblaciones presentes en el gránulo, interaccionando de manera simbiótica (Vedamuthu, 1982, Witthuhn *et al.*, 2005), sintetizan las proteínas y el polisacárido que componen la matriz (Garrote *et al.*, 2010). El gránulo es capaz de incrementar su biomasa cuando utiliza como sustrato suero de leche, sin embargo la formación del mismo se ve afectada por las condiciones de fermentación. El aumento de la temperatura de fermentación produce alteraciones en el aspecto y composición microbiológica de los gránulos así como también se detecta una disolución parcial de los mismos a una temperatura de fermentación superior a 37 °C (Rimada & Abraham 2001; Londero *et al.*, 2012).

El conocimiento sobre las proteínas presentes en el granulo así como también el rol de los microorganismos en la síntesis de los componentes de la matriz es limitada. Bassette y Acosta (1988) reportaron que las proteínas podrían venir del medio de crecimiento, o sea la leche, sin embargo estudios posteriores (Abraham & de Antoni; 1999) demostraron que la proteína es producida por la microbiota de kefir ya que el perfil proteico de los gránulos se mantiene aún después de sucesivos subcultivos en leche de soja.

El exopolisacárido producido por los microorganismos presentes en gránulos de kefir se denomina kefiran (Kooiman, 1968). La responsabilidad sobre la producción de dicho polisacárido fue adjudicada inicialmente a *Lb brevis* (La Rivière *et al.*, 1967), "*atypical Streptobacterium*" (Rosi & Rossi 1978) y finalmente a *Lb kefiranofaciens* sp. Nov (WT-2B, ATCC 43761) (Fujisawa *et al.*, 1988). Recientemente se encontró que las especies *Lb kefiranofaciens*

(Fujisawa *et al.*, 1988) y *Lb kefirgranum* (Takizawa *et al.*, 1994), ambos lactobacilos homofermentativos aislados de gránulos de kefir, son idénticos filogenéticamente (100% de similitud en sus secuencias de DNAr 16S) y fueron reclasificados en dos subespecies de *Lb kefiranofaciens*, subespecie *kefiranofaciens* y subespecie *kefirgranum* (Vancanneyt *et al.*, 2004) siendo la subespecie *kefiranofaciens* la considerada responsable de la producción del kefiran (Fujisawa *et al.*, 1988; Michelli *et al.*, 1999).

- **Kefiran**

El kefiran es un glucogalactano ramificado, soluble en agua, que contiene aproximadamente la misma cantidad de residuos de D-glucosa y D-galactosa (Figura 2). La enzima β ,D (1-6) glucanasa, es capaz de fragmentarlo generando unidades de pentasacáridos y glucosas (La Rivière *et al.*, 1967). La unidad repetitiva del kefiran está compuesta por hexa o heptasacáridos ramificados formados por un pentasacárido lineal y uno o dos residuos de azúcares unidos aleatoriamente al pentasacárido (Kooiman, 1968; Micheli *et al.*, 1999). Otros autores mediante estudios de hidrólisis/metilación demostraron que el kefiran presenta una estructura más compleja que la que se describe anteriormente, indicando la coexistencia de moléculas con microheterogeneidades en su estructura (Mukai *et al.*, 1988).

- **Preservación de cultivos probióticos**

Los cultivos lácticos probióticos para aplicación en alimentos son conservados y distribuidos congelados, liofilizados o deshidratados.

Los cultivos congelados ocupan gran volumen y deben ser mantenidos a temperaturas bajo cero que causan altos costos de almacenamiento, transporte y energía y por lo tanto, es preferible, la conservación en forma deshidratada (Johnson & Etzel, 1995).

La transformación de las bacterias a una forma deshidratada a través de la eliminación física de agua es una etapa crítica, ya que las bacterias requieren una actividad de agua (a_w) de aproximadamente 0,98 en la matriz del producto para la supervivencia y el crecimiento. La preservación de un estado viable requiere a_w alta para la actividad metabólica o bien baja para sobrevivir en estado latente en los polvos (Paul *et al.*,1993). El secado de suspensiones bacterianas se puede realizar mediante liofilización o por atomización.

La técnica más utilizada para la deshidratación de las bacterias lácticas es la liofilización. Es un método eficaz para la conservación de productos biológicos ya que no implica una exposición prolongada a tratamientos térmicos severos. La liofilización es ampliamente utilizada para la formulación de cultivos probióticos pero es un proceso costoso, discontinuo y con bajos rendimientos.

El secado spray, por atomización o por pulverización ofrece una alternativa económicamente más accesible con altas tasas de producción (Zamora *et al.*, 2006). El secado por atomización es un proceso energéticamente eficiente y es una de las herramientas de procesamiento predominante para conservación, ya que puede ser utilizado para producir grandes cantidades de ingredientes lácteos de manera relativamente económica. En comparación, el costo del secado spray es de 5 a 8 veces menor por kilogramo de agua eliminada que el costo de la liofilización.

A pesar de que las condiciones del secado por atomización son restrictivas para los microorganismos (aire de entrada alcanza $T_o \geq 180^\circ C$), la rapidez de secado combinado con la posibilidad de secar grandes cantidades de cultivos de bacterias ha llamado la atención de la investigación y la industria en los últimos años (Zamora *et al.*,2006; Chavez & Ledebøer, 2007; Meng *et al.*, 2008).

El método de secado por pulverización utilizado por sí solo no es completamente adecuado para la preservación de bacterias probióticas, y es necesario la incorporación de varias modificaciones relacionadas a la composición bioquímica del concentrado, los parámetros de secado por pulverización y proceso de secado post-spray para mejorar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas en el polvo. Por ejemplo, con las altas temperaturas implicadas en este proceso, se requiere trabajar con especies con un cierto nivel de termotolerancia.

Los microorganismos deshidratados con actividad biológica tienen amplias aplicaciones industriales y enorme valor comercial internacional. En comparación con un cultivo líquido, el deshidratado ofrece ventajas de transporte y mejor control de calidad. De acuerdo con su actividad biológica, los cultivos deshidratados se pueden utilizar para la producción de pastillas o capsulas de administración oral, cultivos iniciadores para la industria láctea, suplementos funcionales en productos alimenticios y agentes de control biológico, como los biopesticidas y bioconservantes.

- **Protectores más usados para mantener la viabilidad de cepas probióticas en secado spray**

La leche descremada en polvo en una concentración entre 10 y 20% es el protector más efectivo de la viabilidad celular durante la deshidratación, particularmente en el secado spray. Se ha sugerido que esta protección se debe a la lactosa (Corcoran *et al.*, 2004; Ananta *et al.*, 2005) ya que interactúa con la membrana celular y colabora para mantener la integridad de la misma de manera similar a otros disacáridos no reductores como la trehalosa o la sacarosa. Sin embargo, Riveros *et al.* (2009) describieron que al comparar la leche descremada en polvo con permeado de suero, cuyo

componente principal es lactosa, la supervivencia de los probióticos en idénticas condiciones de secado se redujo a la mitad. En ese sentido, se estima que las proteínas de suero tienen también un rol importante en el efecto protector.

Objetivos:

El objetivo de este trabajo es evaluar la resistencia a las condiciones de conservación de microorganismos probióticos (*Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123) utilizando kefirán como agente crio/termoprotector. Se evaluará además viabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento así como la capacidad de recuperar sus propiedades tecnológicas y probióticas después del proceso de conservación.

Objetivos específicos

Para cumplir el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos

- 1) Evaluación del kefirán como agente protector frente a la deshidratación (secado en spray) de cepas seleccionadas.

- 2) Evaluación de la eficiencia de las condiciones de conservación en las características probióticas centrándose en la capacidad de adhesión a células epiteliales .

- 3) Evaluación del kefirán como agente protector frente a la congelación de cepas seleccionadas.

Materiales y métodos:

+ Medios de cultivo y soluciones empleadas

Caldo MRS:

- Polipeptona 10 g/l
 - Extracto de carne 10 g/l
 - Extracto de levadura 5 g/l
 - Glucosa 20 g/l
 - K_2HPO_4 2 g/l
 - Tween 80 1,08 g/l
 - Citrato ácido de amonio 2 g/l
 - Acetato de sodio 5 g/l
 - $MgSO_4$ 0,2 g/l
 - $MnSO_4$ 0,05 g/l
- pH = 6,4 +/- 0,2

Preparación: Para 1 litro de caldo, pesar 55,3 g de medio MRS anhidro y mezclarlo con 1 litro de H_2O destilada. Luego autoclavar.

Agar MRS:

Preparación: Para 1 litro de agar MRS, preparar 1 litro de caldo MRS y agregarle 15 gramos de agar (polvo). Luego autoclavar.

Buffer fosfato:

- NaOH (0,1 M) 29,1 ml
- KH₂PO₄ (0,1 M) 50 ml
- H₂O destilada 20,9 ml

Volumen final = 100 ml

pH = 7 +/- 0,2

Luego de preparado se autoclava.

Triptona 0,1%:

- Triptona 0,1 g
- H₂O destilada 100 ml

Luego de preparado se fracciona en tubos de ensayo (4,5 ml en cada uno) y se autoclava.

✚ Extracción de exopolisacáridos (kefiran) de gránulos de kefir:

Se realizó la extracción de polisacáridos del gránulo de kefir CIDCA AGK1 utilizando el método de precipitación con alcohol en frío descrito por Rimada & Abraham (2001).

Los gránulos lavados, escurridos y pesados (Figura 1) fueron disueltos en agua destilada en una proporción de 10 % p/v y se calentaron a 100 °C durante un periodo de 30 minutos.



Figura 1: Aspecto de los gránulos de kefir.

Luego se centrifugaron a temperatura ambiente por 15 minutos a 10.000 g utilizando una centrifuga Avanti J25 (BeckmanCoulter Inc., USA). El sobrenadante se separó y se le adicionó dos veces su volumen de etanol frío (-20 °C) obteniendose un precipitado como se muestra en la Figura 2.



Figura 2: Aspecto del sobrenadante después del agregado de etanol a -20°C.

Esta solución se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas y el polisacárido formó un gel (Figura 3).

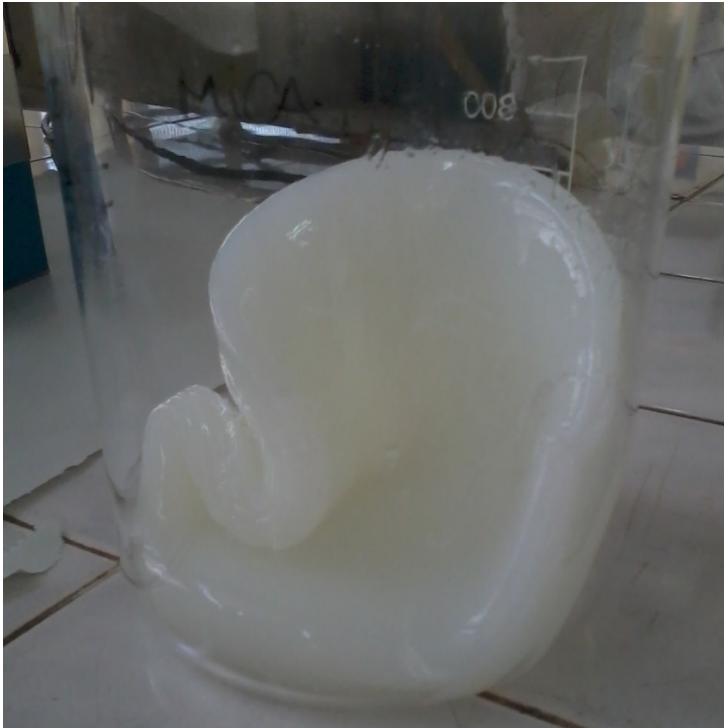


Figura 3: Aspecto del polisacárido precipitado luego de 24 horas a -20°C .

El polisacárido precipitado fue separado por centrifugación ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min, 10.000 g) y resuspendido en agua caliente. Se repitió el proceso de precipitación y disolución y finalmente se dializó con membranas con valor de corte de 1.000 Da (Spectra/Por, Spectrum laboratorios, USA).

Secado spray:

- Protocolo:

Se realizó el secado spray para cada cepa y por duplicado tanto el control sin kefiran como con kefiran.

Para realizar el secado spray se partió de 3 ml de inóculo en fase estacionaria y se colocó en una botella con 300 ml de MRS caldo, incubando esto en estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 hs, obteniéndose 300 ml de

cultivo. El cultivo se fraccionó en 6 tubos Falcon de 50 ml, luego se centrifugó a 5000 rpm durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante, se lavó con 5 ml de Buffer fosfato y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones obteniéndose los pellets bacterianos.

Los pellets bacterianos se disolvieron en 5 ml de leche 11% p/v o de leche 11% p/v y kefirán 0,1% p/v, autoclavados durante 5 minutos a 121 °C. Los pellets disueltos en cada condición se juntaron y se obtuvo un volumen final de 300 ml para someterlo al proceso de secado spray.

A partir de estas botellas que contienen los pellets y la leche 11% p/v o leche 11% p/v y kefirán 0,1% p/v, se hizo un recuento inicial (antes del secado spray). Para los recuentos se necesitaron tubos con 4,5 ml de triptona para hacer las diluciones seriadas 1/10 y placas con agar MRS (6 placas por recuento) para sembrar las últimas tres diluciones por duplicado.

Para la cepa de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 se sembraron las diluciones -4, -5 y -6 en tubo, para tener en placa una dilución 1/10 más, es decir, -5, -6 y -7 en placa.

Para la cepa de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 se sembraron las diluciones -6, -7 y -8 en tubo, para tener en placa una dilución 1/10 más, es decir, -7, -8 y -9 en placa.

Se siembran 100 µl de la dilución correspondiente por placa. La siembra se realizó con ayuda de perlas de vidrio estériles para que la distribución en la placa de agar MRS sea homogénea. Luego se incubaron a 30 °C durante 48 horas y se contaron las colonias.

Una vez realizado el recuento inicial se procedió a realizar el secado spray de las botellas con los pellets y la leche 11% p/v o leche 11% p/v y kefirán 0,1% p/v.

Se realizó primero el secado spray para la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 tanto del control sin kefiran como del que contiene kefiran, y luego se hizo el secado spray de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 para evitar contaminaciones ya que se utilizó el mismo equipo (Figura 4).



Figura 4: Equipo de secado spray utilizado.

El secado spray de las cepas *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 y de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 se realizó en las siguientes condiciones:

- Temperatura de entrada: 169-170 °C
- Temperatura de salida: 73-78 °C
- Aspiración: 100%
- Bomba: 30-35 %

Se realizó el secado spray de los pellets resuspendidos en leche 11 % p/v (C1 y C2) y los pellets resuspendidos en leche 11% p/v adicionada con kefiran 0,1% p/v (K1 y K2) (Figura 5).



Figura 5: Botellas con los pellets resuspendidos en leche 11% p/v o leche 11% p/v adicionada con kefiran 0,1% p/v.

Se recogió el polvo del secado spray de cada botella en un tubo Falcon de 50 ml estéril previamente pesado (Figura 6).

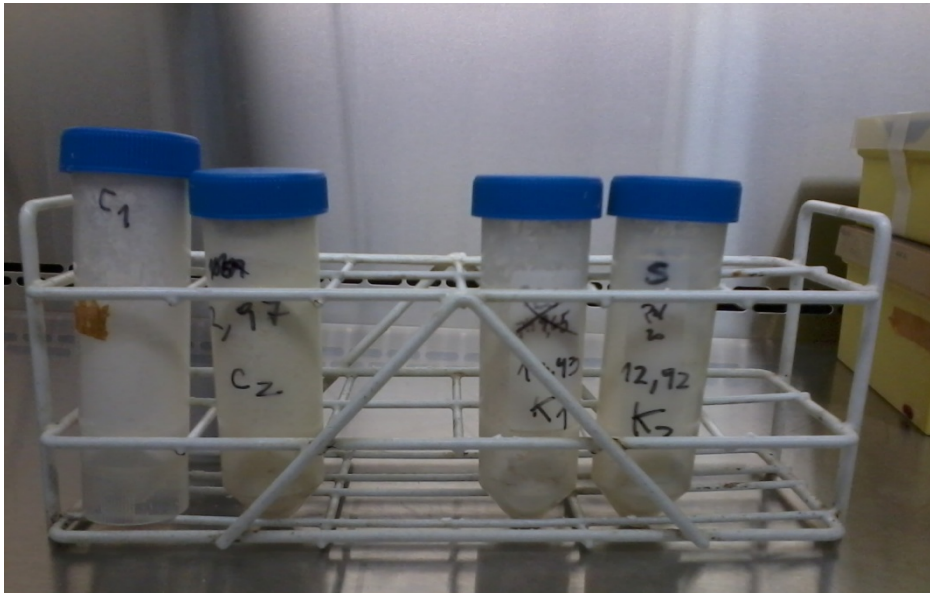


Figura 6: Tubos Falcon de 50 ml con los polvos obtenidos luego del secado spray.

Determinación de humedad:

Una parte del producto obtenido en cada condición se utilizó para determinar la humedad. Para determinar la humedad se utilizó el Método Indirecto. Se prepararon cajitas de papel aluminio que fueron pesadas vacías (Peso _{cajita de aluminio}) y luego con el polvo (por diferencia de pesos se calcula el peso del polvo húmedo). Estas cajitas con polvo se dejaron 24 hs a 100 °C y se volvieron a pesar. Se dejaron otras 24 hs a 100 °C y se realizó un último pesaje (Peso _{cajita de aluminio y polvo seco}). A partir de los datos obtenidos se puede calcular el % p/p Peso seco y % p/p Humedad.

$$\% \text{ p/p Peso seco} = \frac{(\text{Peso}_{\text{cajita de aluminio y polvo seco}} - \text{Peso}_{\text{cajita de aluminio}})}{\text{Peso}_{\text{polvo húmedo}}} \times 100$$

$$\% \text{ p/p Humedad} = 100 - \% \text{ p/p Peso seco}$$

El producto obtenido después del secado spray de cada tubo Falcon fue fraccionado en tubos eppendorf estériles con 0,5 g de polvo en cada uno para su almacenamiento a 4 °C (Figura 7).



Figura 7: Producto obtenido luego del secado spray fraccionado en tubos eppendorf.

Antes del almacenamiento se separó un tubo eppendorf con 0,5 g de polvo de cada condición (C1, C2, K1 Y K2) para realizar el recuento de microorganismos viables post secado spray.

De los tubos eppendorf que fueron almacenados a 4 °C tanto de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 y *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 sin y con kefiran (C1, C2, K1 Y K2) se retiraron del almacenamiento uno de cada condición para realizar recuentos de microorganismos viables a distintos tiempos.

Ensayo de adhesión a células epiteliales:

A los polvos obtenidos por secado spray de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 y *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339, luego de 30 días de almacenamiento a 4 °C se les realizó un ensayo de adhesión a células epiteliales en cultivo Caco 2 /TC-7. También se realizó el ensayo de adhesión a cultivos frescos en fase estacionaria ($\sim 10^9$ ufc/ml) de ambas cepas que se utilizaron como controles.

- Para el ensayo de adhesión se partió de 5 ml de cultivo fresco (control) en fase estacionaria (tanto de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 como de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339) que se colocaron en un tubo Falcon estéril de 15 ml. Éste se centrifugó a 5000 rpm durante 7 minutos, quedando en el pellet las bacterias. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 10 ml de buffer fosfato estéril para realizar un primer lavado. Se centrifugó en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado con 10 ml de buffer fosfato, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Al pellet se lo resuspendió en 5 ml de buffer fosfato (igual volumen que el cultivo original para mantener la concentración $\sim 10^9$ ufc/ml). Se tomaron 0,5 ml de esta suspensión y se la colocaron en 4,5 ml de medio de adhesión (DMEM ADHESIÓN), realizando de esta forma una dilución 1/10 y quedando una concentración de bacterias $\sim 10^8$ ufc/ml.

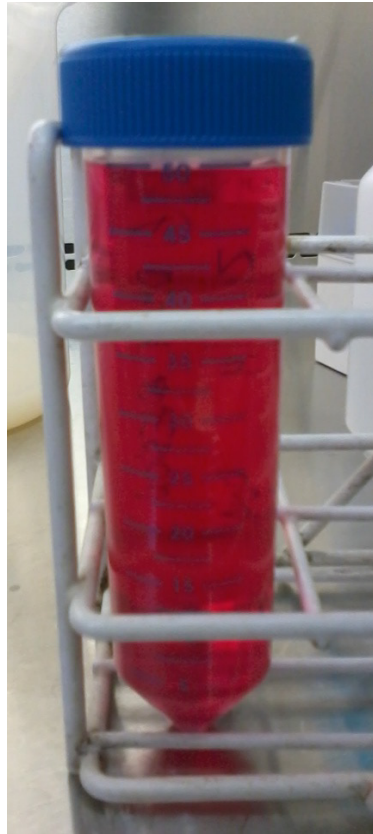


Figura 8: Medio DMEM ADHESIÓN.

- Para el ensayo de adhesión de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 y *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339, después del proceso de secado spray se partió de 0,5 gramos de polvo de cada condición por duplicado, es decir sin y con kefirán (C1, C2, K1 y K2). Se colocaron los 0,5 gramos de polvo en un tubo Falcon de 15 ml estéril en el cual se agregó también 10 ml de buffer fosfato para el primer lavado. Se centrifugó a 5000 rpm durante 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó nuevamente 10 ml de buffer fosfato para el segundo lavado. Se realizaron en total cuatro lavados para asegurar la eliminación de los restos de leche que contiene el polvo y solo queden los lactobacilos. Los pellet se resuspendieron de manera tal de que la concentración de microorganismos viables fue de $\sim 10^8$ ufc/ml. Luego se realizó un recuento inicial antes de la adhesión.

- Para el ensayo de adhesión se utilizaron microplacas conteniendo una monocapa de células Caco-2/TC-7 (Figura 9).



Figura 9: Microplaca de 24 fosas con la monocapa de células Caco-2/TC-7.

Por cada cepa se utilizaron 2 fosas (F1 Y F2) para realizar el control (suspensión de cultivo fresco) por duplicado y se utilizaron 8 fosas para evaluar la capacidad de adhesión de los microorganismos después del secado spray. En cada fosa se colocaron 0,5 ml de la suspensión de bacterias en DMEM ADHESIÓN (Figura 10) y se incubó 1 hora a 37 °C en atmósfera de CO₂ para permitir la adhesión de los lactobacilos a las células de la monocapa. Luego se descartó el sobrenadante que contiene el medio DMEM ADHESIÓN y los lactobacilos que no se adhirieron a la

monocapa. Se realizaron 3 lavados con 0,5 ml de buffer fosfato, se descartó el sobrenadante, se colocó 0,5 ml de agua miliQ y se incubó 1 hora a 37 °C en atmósfera de CO₂, para favorecer la lisis de las células y el desprendimiento de las bacterias para el recuento de lactobacilos adheridos.

Luego de la incubación se tomaron 0,5 ml de cada fosa y se colocaron en 4,5 ml de triptona 0,1% p/v, se realizaron diluciones seriadas 1/10 y se sembraron (100 µl) en placa de agar MRS por duplicado en las diluciones adecuadas para realizar el recuento de microorganismos viables (Figura 11).

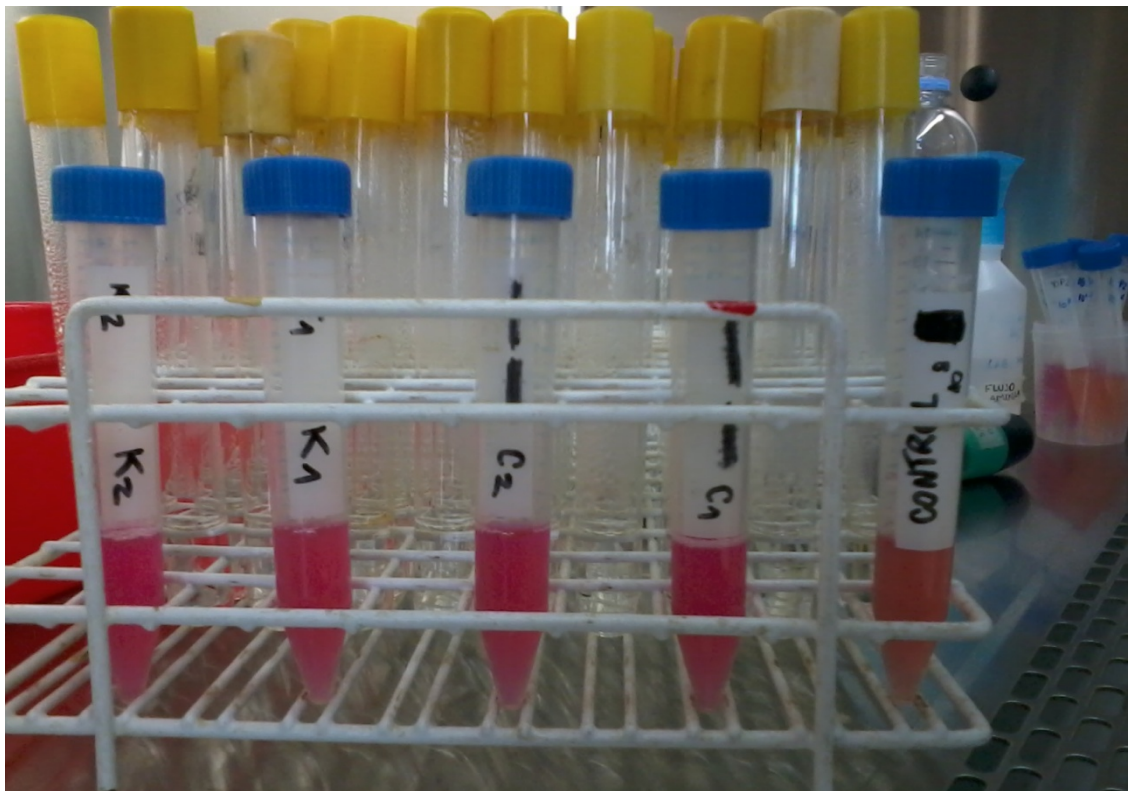


Figura 10: Por delante se observan tubos Falcon de 15 ml con las suspensiones bacterianas en DMEM ADHESIÓN.

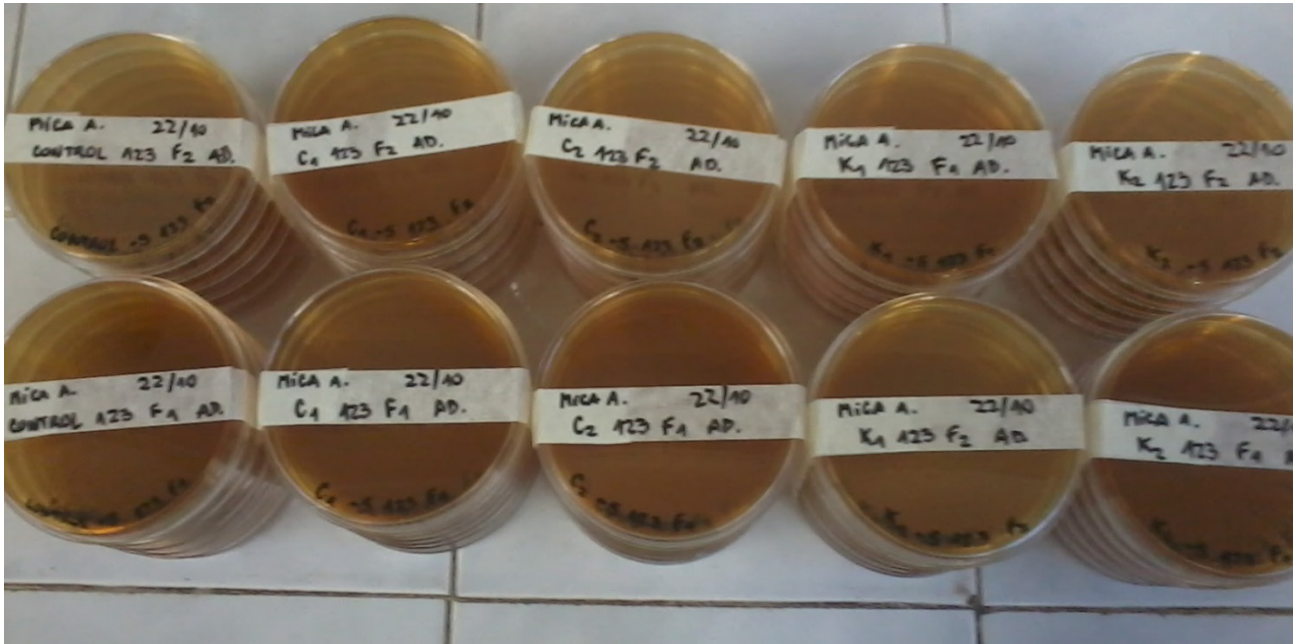


Figura 11: Placas de agar MRS correspondientes a los recuentos de microorganismos viables para evaluar la adhesión.

Se incubó a 30 °C durante 48 horas y se contaron las colonias, que corresponderían a los lactobacilos que se adhirieron.

✚ Congelación:

Para estudiar el efecto crioprotector del kefirán en la conservación por congelación a -20 °C se estudiaron 2 condiciones diferentes con kefirán para cada cepa y una condición control sin kefirán para cada cepa.

- Con kefirán:
 - 1ª condición: MRS + leche 5,5% p/v + kefirán 0,1% p/v (concentraciones finales en eppendorf para congelación). **K1**
 - 2ª condición: Buffer fosfato + kefirán 0,1% p/v (concentración final en eppendorf para congelación). **K2**
- Sin kefirán: MRS + leche 5,5% p/v (concentración final en eppendorf para congelación). **C**

Protocolo:

Para la preparación de las muestras a congelar se partió de un cultivo de la cepa en fase estacionaria (ya sea *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 o *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339). Este cultivo se fraccionó en eppendorf, colocando 1,5 ml en cada uno. Luego se centrifugó a 9000 rpm durante 4 minutos y se descartó el sobrenadante.

Al pellet se lo resuspendió en 750 μ l de MRS caldo y luego se agregó 750 μ l de leche 11% p/v y kefirán 0,2% p/v (al diluirse, la concentración en el eppendorf es leche 5,5% p/v y kefirán 0,1% p/v), (K1) o en 1,5 ml de Buffer fosfato + kefirán 0,1% p/v (K2).

En el caso de la condición control, al pellet se lo resuspendió con 750 μ l de MRS caldo y luego se agregó 750 μ l de leche 11% p/v quedando en el eppendorf leche al 5,5% p/v.

Se prepararon 15 eppendorf por cada condición.

Para cada cepa y para cada condición se realizó un recuento de microorganismos viables inicial antes de la congelación y después de someterlas a 1 ciclo o 5 ciclos de congelación/descongelación.

También se midió el Δ pH para evaluar la recuperación de la actividad acidificante, para esto se tomó 1 ml de muestra de cada condición y de cada cepa, y se lo colocó en 9 ml de leche 11% p/v estéril. Se separaron 2 ml para medir el pH con peachímetro de electrodo de vidrio y el resto se colocó en estufa a 37 °C durante 24 horas. Luego de este tiempo se volvió a medir el pH y se calculó el Δ pH a un tiempo fijo.

También se dejó incubando 16 horas a 30 °C para ver si hay algún cambio macroscópico y diferencias en el pH con respecto al que se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Análisis estadístico:

Los resultados se expresaron como la media \pm desvío standard de al menos tres experimentos independientes. El estudio estadístico se realizó con el programa *GRAPHPAD Prism* version 5.0 para Windows (San Diego, CA). Se efectuó un análisis de varianza simple (ANOVA) para determinar la diferencia entre medias. Las diferencias significativas entre los valores medios de cada experimento fueron determinadas por el test Tukey (intervalo de confianza del 95%).

Resultados y Discusión

Secado spray:

- Humedad de los polvos obtenidos por secado spray:

En las Tablas 1 y 2 se muestran los valores del contenido de sólidos totales y humedad de los polvos luego del secado spray de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 (Tabla 1) y *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 (Tabla 2) en las dos condiciones de secado spray).

Tabla 1: Peso seco y contenido de humedad de los productos obtenidos por secado spray conteniendo Lactobacillus paracasei CIDCA 83123.

	% p/p Peso Seco			% p/p Humedad		
		Promedio	Desvío estándar		Promedio	Desvío estándar
Control	95,01	94,36	0,7512	4,99	5,64	0,751
	94,82			5,18		
	93,33			6,67		
	94,28			5,72		
Kefiran	93,24	93,30	0,4700	6,76	6,70	0,470
	93,90			6,10		
	92,75			7,25		
	93,32			6,68		

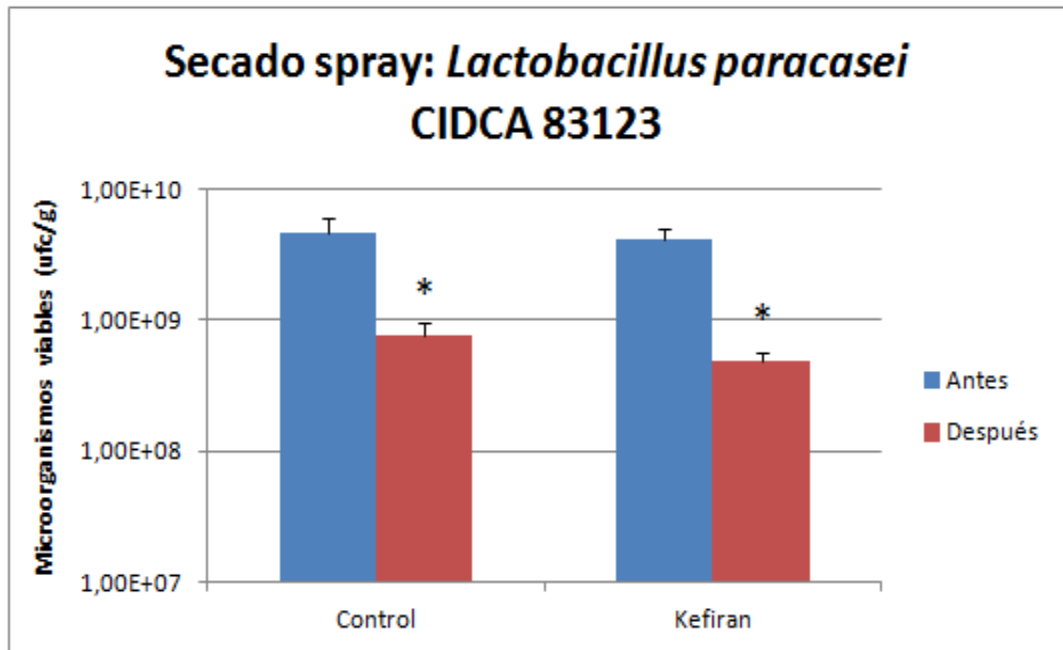
Tabla 2: Peso seco y contenido de humedad de los productos obtenidos por secado spray conteniendo *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339.

	% p/p Peso Seco	Promedio	Desvío estándar	% p/p Humedad	Promedio	Desvío estándar
Control	88,05	87,40	0,5415	11,95	12,60	0,5415
	87,61			12,39		
	86,83			13,17		
	87,11			12,89		
Kefiran	86,37	86,19	0,4202	13,63	13,81	0,4202
	86,27			13,73		
	86,53			13,47		
	85,58			14,42		

En ambos casos se puede ver que el proceso de secado spray fue muy eficiente ya que la humedad de los polvos obtenidos es menor del 15% p/p, logrando una buena deshidratación para su conservación a 4°C.

- Efecto del secado spray en la viabilidad:

Para evaluar el efecto del secado spray en la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 y 8339 se realizó un recuento inicial de microorganismos viables antes del secado spray y luego del mismo. En la Figura 12 se muestran los valores obtenidos para la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 para cada condición (control y con kefiran como protector) antes y después del secado spray.

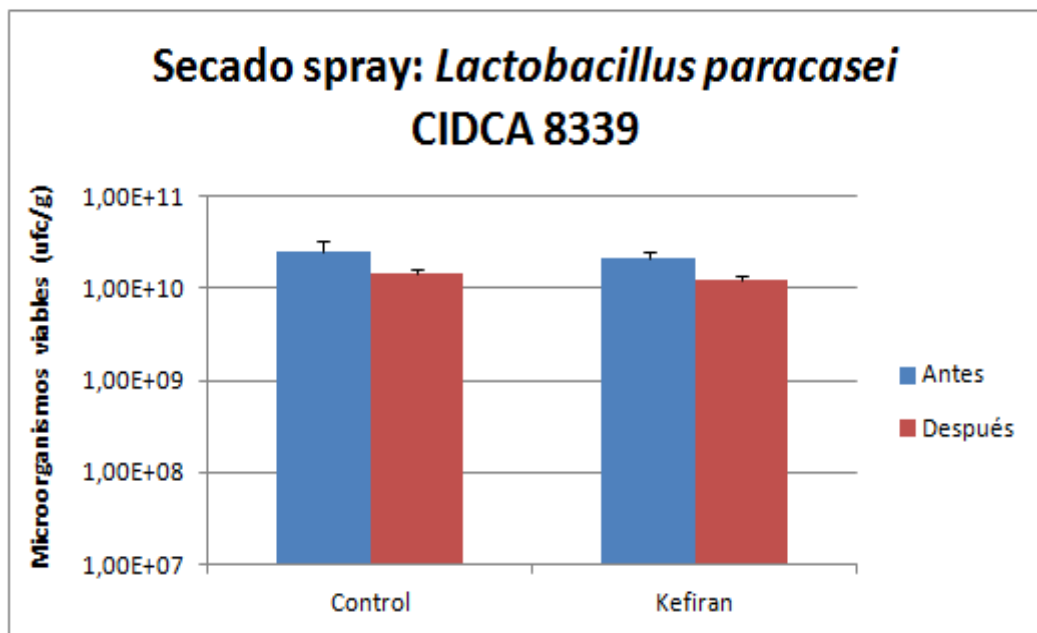


- Figura 12: Número de microorganismos viables (ufc/g) de la condición control y con kefiran, antes y después del secado spray de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123.

En la Figura 12 se puede ver que tanto para el control sin kefiran como para el que tiene kefiran como protector, el recuento de microorganismos viables luego del secado spray desciende en un ciclo logarítmico, presentando diferencias significativas en ambos casos con respecto al recuento antes del proceso ($p \leq 0,05$). Esto puede deberse a las altas temperaturas a las que se expone el microorganismo durante el proceso de secado spray y a la deshidratación que sufre durante el mismo, que termina dañando estructuras necesarias para la supervivencia de las bacterias. Pueden dañarse los ácidos nucleicos, oxidarse lípidos de la membrana bacteriana, desnaturalizarse proteínas, llevando a la muerte de las bacterias. El kefiran no ejerció ningún efecto adicional ya que no se encontraron diferencias significativas entre

los microorganismo viables deshidratados en cada condición ($p \leq 0,05$).

En la Figura 13 se presentan los resultados de los recuentos de microorganismos viables obtenidos para la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 antes y después del proceso de secado spray.



- Figura 13: Número de microorganismos viables (ufc/g) de la condición control y con kefiran, antes y después del secado spray de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339.

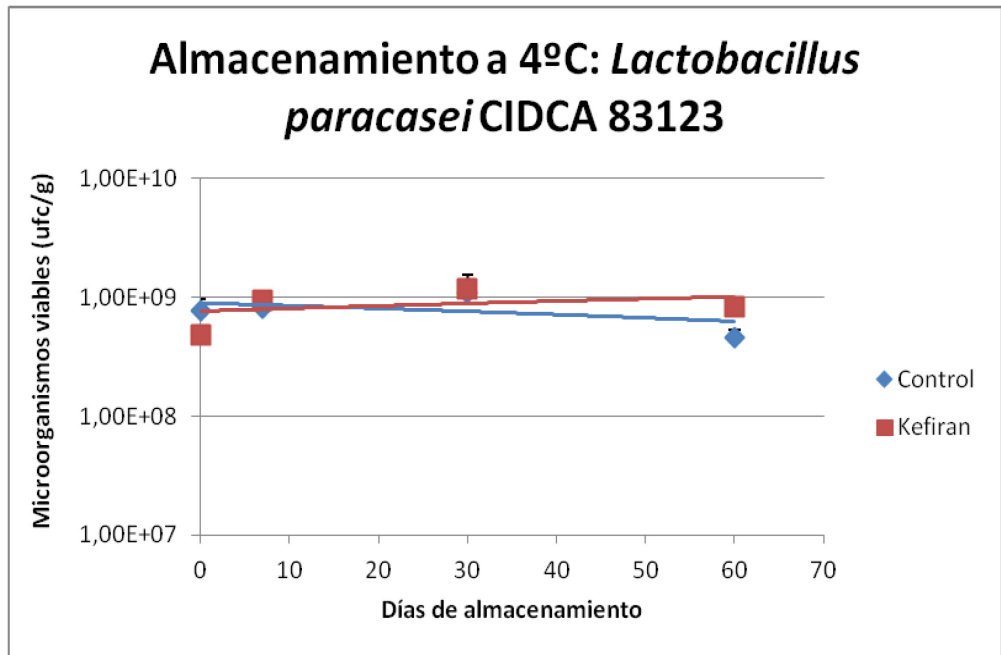
En la Figura 13 se puede ver que tanto para el control sin kefiran como para el que tiene kefiran como protector, el recuento luego del secado spray se mantiene en el mismo orden que el recuento inicial, no presentando diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Esto demuestra que la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 es muy resistente a las altas temperaturas y a la deshidratación. También se puede notar que el kefiran no ejerce efectos positivos ni

negativos como protector ya que la cepa en sí misma es muy resistente al proceso y se comporta de igual forma en el control o en el que tiene kefirán ($p \leq 0,05$).

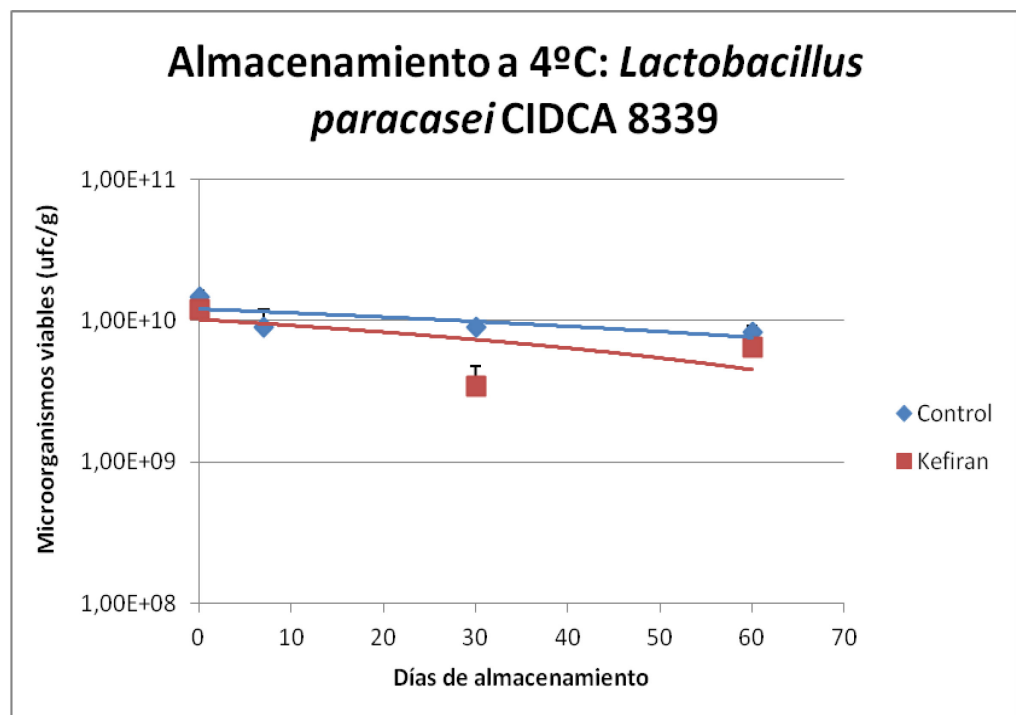
- Efecto durante el almacenamiento deshidratado:

Se evaluó el efecto del almacenamiento de los lactobacilos deshidratados por secado spray mediante el análisis de la supervivencia de cada cepa en cada condición para determinar si el kefirán ejerce un efecto crioprotector. Se tomaron muestras después de una semana, a los 30 días y a los 60 días de almacenamiento a 4 °C.

En las siguientes figuras se muestran los recuentos de microorganismos viables a los distintos tiempos en las distintas condiciones (control o con kefirán), incluyendo como recuento inicial al obtenido post secado spray sin almacenamiento.



- Figura 14: Número de microorganismos viables (ufc/g) inmediatamente después del secado spray de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 sin kefiran (control) y con kefiran (tiempo 0) y luego de 7, 30 y 60 días de almacenamiento a 4°C.



- Figura 15: Número de microorganismos viables (ufc/g) inmediatamente después del secado spray de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 sin kefiran (control) y con kefiran (tiempo 0) y luego de 7, 30 y 60 días de almacenamiento a 4°C.

En la figura 14 se puede ver que para *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 el número de microorganismos viables en el tiempo se mantiene en un mismo orden tanto para el control como para el que tiene kefiran como protector ($p \leq 0,05$).

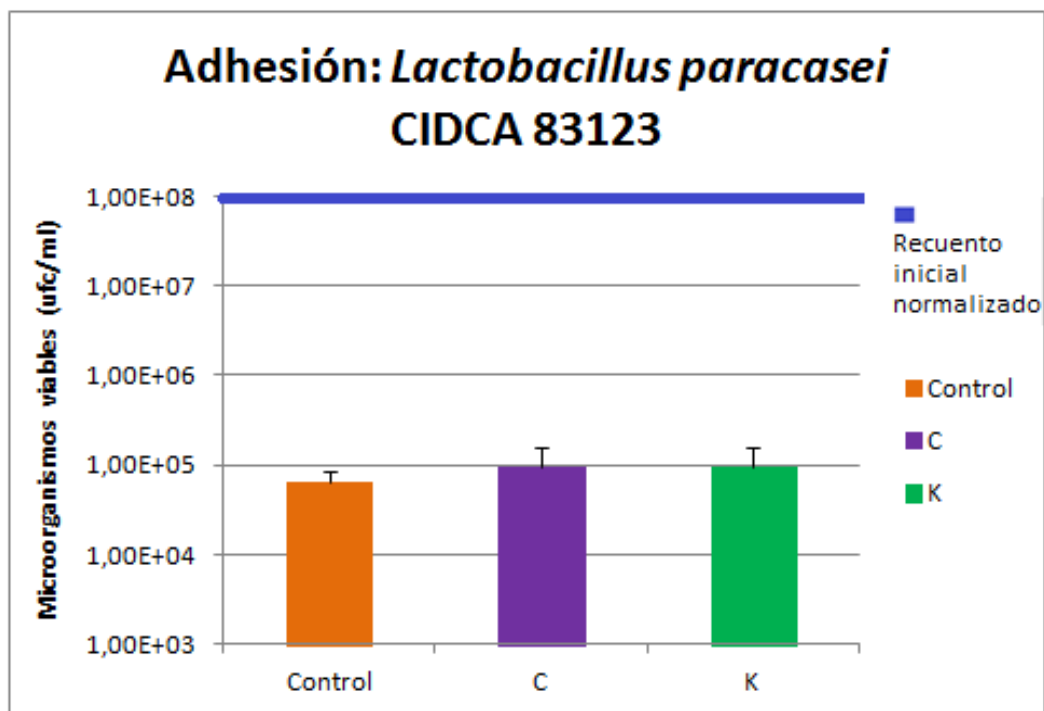
En la Figura 15 se puede ver que para *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339, el recuento de microorganismos viables se mantiene en el mismo valor al menos hasta los 60 días de almacenamiento ($p \leq 0,05$).

En ambas figuras (14 y 15) se observa igualmente que el recuento se mantiene en valores elevados para ambas cepas. El hecho de que estas cepas sean resistentes tanto al proceso de secado spray como al almacenamiento deshidratadas, las hace muy buenas candidatas para su transferencia ya que resisten el procesamiento y las condiciones de almacenamiento.

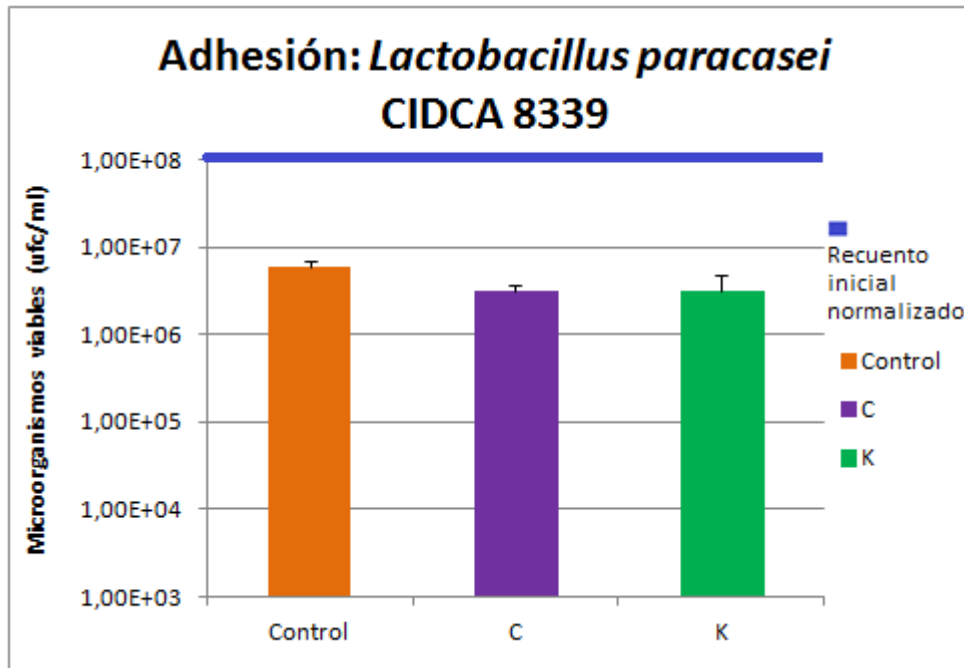
- Capacidad de adhesión al epitelio a los 30 días de almacenamiento:
Para evaluar si después del tratamiento térmico estas cepas eran capaces de mantener sus propiedades probióticas se evaluó la capacidad de adhesión al epitelio de los productos obtenidos por secado spray luego de 30 días de almacenamiento a 4°C. Se realizó el ensayo de adhesión explicado anteriormente. Como el polvo de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 contiene una concentración $\sim 10^8$ ufc/ml al pellet que queda después de los lavados se lo resuspendió en 5 ml de DMEM ADHESIÓN para no agregar una dilución extra y mantener esta concentración.
El polvo de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 en cambio, contiene una concentración $\sim 10^9$ ufc/ml, entonces al pellet que queda después de los lavados se lo resuspende en 5 ml de buffer

fosfato, se toman 0,5 ml y se los coloca en 4,5 ml de DMEM ADHESIÓN (dilución 1/10), quedando una concentración final $\sim 10^8$ ufc/ml.

Se realizó recuento de microorganismos viables de los productos antes y después del ensayo de adhesión. Se hizo lo mismo con cultivos frescos de ambas cepas utilizados como control. Los resultados se observan en las Figuras 16 y 17 donde se ve el número de microorganismos viables adheridos para las distintas condiciones. El recuento inicial (antes de la adhesión) de microorganismos viables fue normalizado a 10^8 ufc/ml para una mejor evaluación de los datos.



- Figura 16: Número de microorganismos viables (ufc/ml) luego del ensayo de adhesión, para el control (cultivo fresco) y las condiciones C y K de los productos obtenidos por secado spray conteniendo *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123. La línea azul indica el recuento inicial de microorganismos inoculados en cada fosa (10^8 ufc/ml).



- Figura 17: Número de microorganismos viables (ufc/ml) luego del ensayo de adhesión, para el control (cultivo fresco) y las condiciones C y K de los productos obtenidos por secado spray conteniendo *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339. La línea azul indica el recuento inicial de microorganismos inoculados en cada fosa (10^8 ufc/ml).

En ambos casos se puede ver que la adhesión no es 100% eficiente, ya que al partir de una concentración de microorganismos viables de 10^8 ufc/ml, después del ensayo de adhesión el recuento es inferior, lo que indica que no todas las bacterias que se ponen en contacto con las células se adhieren a ellas. En cada fosa hay 10^6 células epiteliales, esto quiere decir que para *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 en todas las condiciones ensayadas se adhiere al menos una bacteria por célula epitelial, ya que se ve en la Figura 17 que el recuento de microorganismos viables en todas las condiciones luego de la adhesión es aproximadamente 10^7 ufc/ml. En cambio, para *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 el recuento

de microorganismos viables luego de la adhesión para las distintas condiciones ensayadas es del orden de 10^5 ufc/ml (Figura 16), lo que indica que se adhiere menos de una bacteria por célula epitelial. Al hacer esta comparación, se puede determinar que la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 es más eficiente en la adhesión a células epiteliales y podría ejercer mejor sus efectos como cepa probiótica que *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123. Esto puede deberse a que la cepa de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 tenga distintos mecanismos de adhesión a las células epiteliales que la cepa de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123, debido a diferencias en las proteínas de superficie.

Se puede ver en las Figuras 16 y 17 que los polvos obtenidos por secado spray se comportan de igual forma que el cultivo fresco (control) ($p \leq 0,05$). Estos resultados son muy buenos ya que indica que después del proceso de secado spray y del almacenamiento durante 30 días a 4°C siguen manteniendo las mismas propiedades para adherirse a las células epiteliales que aquellas bacterias que no sufrieron el proceso de deshidratación ni la conservación.

No se observan en ninguna de las dos cepas efectos beneficiosos ni perjudiciales del kefirán usado como protector. Esto se ve al comparar la adhesión de microorganismos deshidratados solo en leche ya que no presentan diferencias significativas en su capacidad de adhesión con respecto a los que tienen kefirán ($p \leq 0,05$).

Congelación:

- Efectos de los ciclos de congelación en la viabilidad:

Se analizó el efecto de la congelación por recuento de microorganismos viables en placa sembrando las mismas diluciones que en el recuento inicial, luego de un ciclo de congelación/descongelación y luego de cinco ciclos de congelación/descongelación. Esto se realizó para ambas cepas en 3 condiciones de congelación.

K1) Con kefirán 0,1% p/v y leche 5,5 % p/v

K2) Con kefirán 0,1% p/v en buffer pH 7

C) leche 5,5% p/v

Los resultados se presentan en las siguientes Figuras.

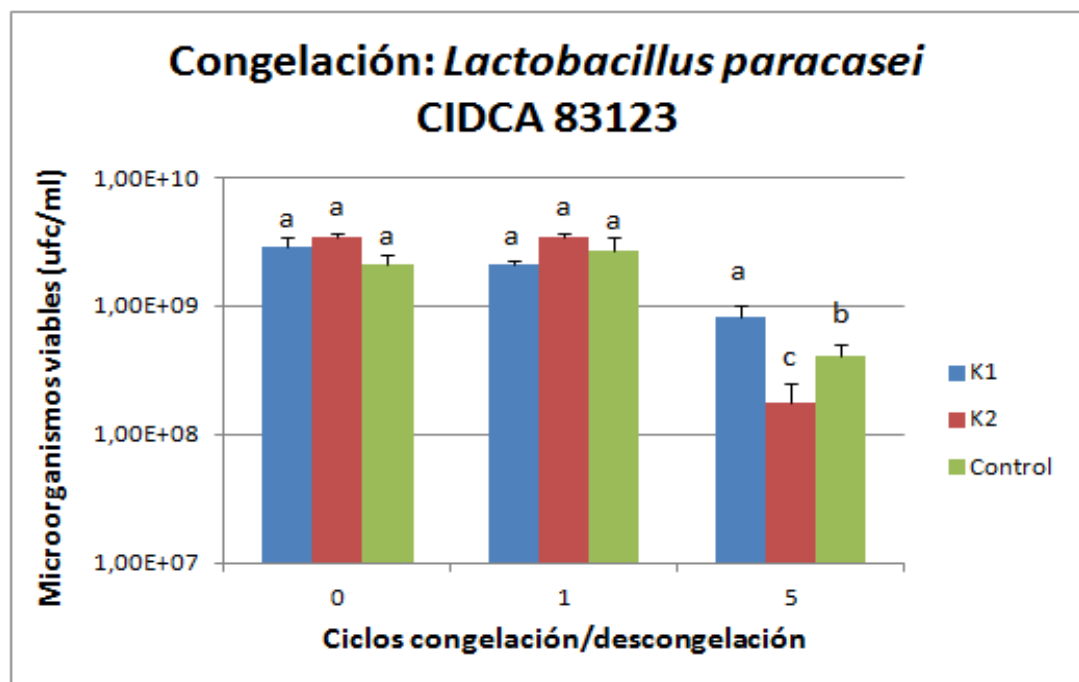


Figura 18: Número de microorganismos viables iniciales (ufc/ml) y luego de uno y cinco ciclos de congelación/descongelación de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 congelado en kefirán 0,1% p/v y leche 5,5 % p/v (K1), kefirán 0,1% p/v en buffer pH 7 (K2) y leche 5,5% p/v (Control).

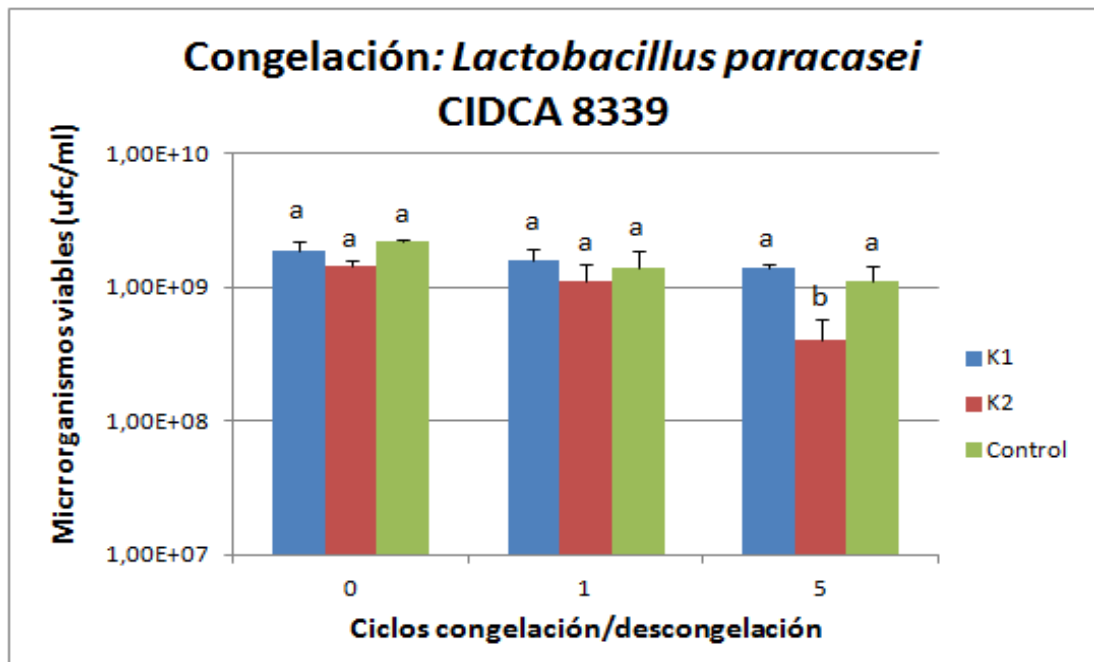


Figura 19: Número de microorganismos viables iniciales (ufc/ml) y luego de uno y cinco ciclos de congelación/descongelación de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 congelado en kefiran 0,1% p/v y leche 5,5 % p/v (K1), kefiran 0,1% p/v en buffer pH 7 (K2) y leche 5,5% p/v (Control).

Después de un ciclo de congelación/descongelación las dos cepas en las distintas condiciones de congelación no presentaron diferencias significativas con respecto a la viabilidad a pesar de ser sometidas a ciclos de congelación/descongelación ($p \leq 0,05$). Esto demuestra que ambas cepas son muy resistentes al almacenamiento a bajas temperaturas (-20°C) y que no sufren daño al congelarse y descongelarse.

También se puede ver que el kefiran como crioprotector no ejerce efectos beneficiosos pero tampoco perjudiciales para los microorganismos. Esto se ve al comparar el recuento de microorganismos viables del control con las dos condiciones de congelamiento con kefiran, en todas las condiciones los microorganismos se comportan de la misma manera. Esto demuestra

que los microorganismos son muy resistentes cualquiera sea el medio de almacenamiento.

Después de 5 ciclos de congelación/descongelación se comienzan a marcar tendencias. Los valores obtenidos son diferentes de acuerdo al test estadístico utilizado ($p \leq 0,05$), y muestran que la congelación con kefiran 0,1% p/v en buffer pH 7 protege menos del daño que cuando se utiliza kefiran 0,1% p/v y leche 5,5% p/v o sólo leche 5,5% p/v (control). Esto se puede ver tanto en la Figura 18 como en la 19. Cabe destacar que los sólidos de la leche son buenos agentes crioprotectores, esto se ve ya que en las muestras que contienen leche el recuento bacteriano se mantiene en niveles más elevados. Debería probarse también un control sólo en buffer pH 7, para que al comparar estos valores con respecto a los obtenidos durante la congelación con kefiran 0,1% p/v en buffer pH 7 se pueda determinar si realmente el kefiran ejerce algún efecto crioprotector.

En la Figura 18 se puede ver también que la condición de congelamiento en leche 5,5% p/v y kefiran 0,1% p/v presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al control (leche 5,5% p/v). Esto demuestra que el kefiran está ejerciendo un efecto protector durante el congelamiento ya que se obtiene un recuento mayor de microorganismos viables.

- Efectos de los ciclos de congelación en el pH de los coágulos de leche:
Se realiza el Δ pH luego de un ciclo de congelación/descongelación para determinar si la congelación afectó la capacidad metabólica de las cepas evidenciado por cambios en la velocidad de acidificación comparado con los Δ pH iniciales antes de la congelación.

En la siguiente tabla se muestran los Δ pH obtenidos en las distintas condiciones.

Tabla 3: Δ pH después de 24 h de incubación a 37°C de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 y *Lactobacillus paracasei* 83123 luego de un ciclo de congelación/descongelación en las distintas condiciones (C, K1 y K2) y en el control antes de congelar.

		Δ pH	
		0 ciclos 37°C 24 Hs	1 ciclo 37°C 24 Hs
<i>Lactobacillus paracasei</i> CIDCA 8339	K1	2,72	2,42
	K2	2,35	2,35
	C	2,75	2,62
<i>Lactobacillus paracasei</i> CIDCA 83123	K1	2,34	1,80
	K2	1,94	1,66
	C	2,27	1,94

En la Tabla 3 se puede ver que no hay diferencias entre los Δ pH después de 24 h de incubación a 37°C de la leche inoculada con las dos cepas de lactobacilos antes del proceso de congelación/descongelación.

Este parámetro no se vio afectado después de someter a *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 a un ciclo de congelación/descongelación pero se vio levemente disminuído al analizar el Δ pH obtenido con *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 indicando que esta cepa sufrió un daño durante el proceso.

Las principales diferencias no fueron en el Δ pH sino en el coágulo de leche de forma macroscópica. Se observó que todos los coágulos de leche de ambas cepas en las distintas condiciones (K1, K2 y C) eran sólidos cuando no fueron sometidas a ciclos de

congelación/descongelación y se incubaron a 37°C durante 24 horas (Figura 20).

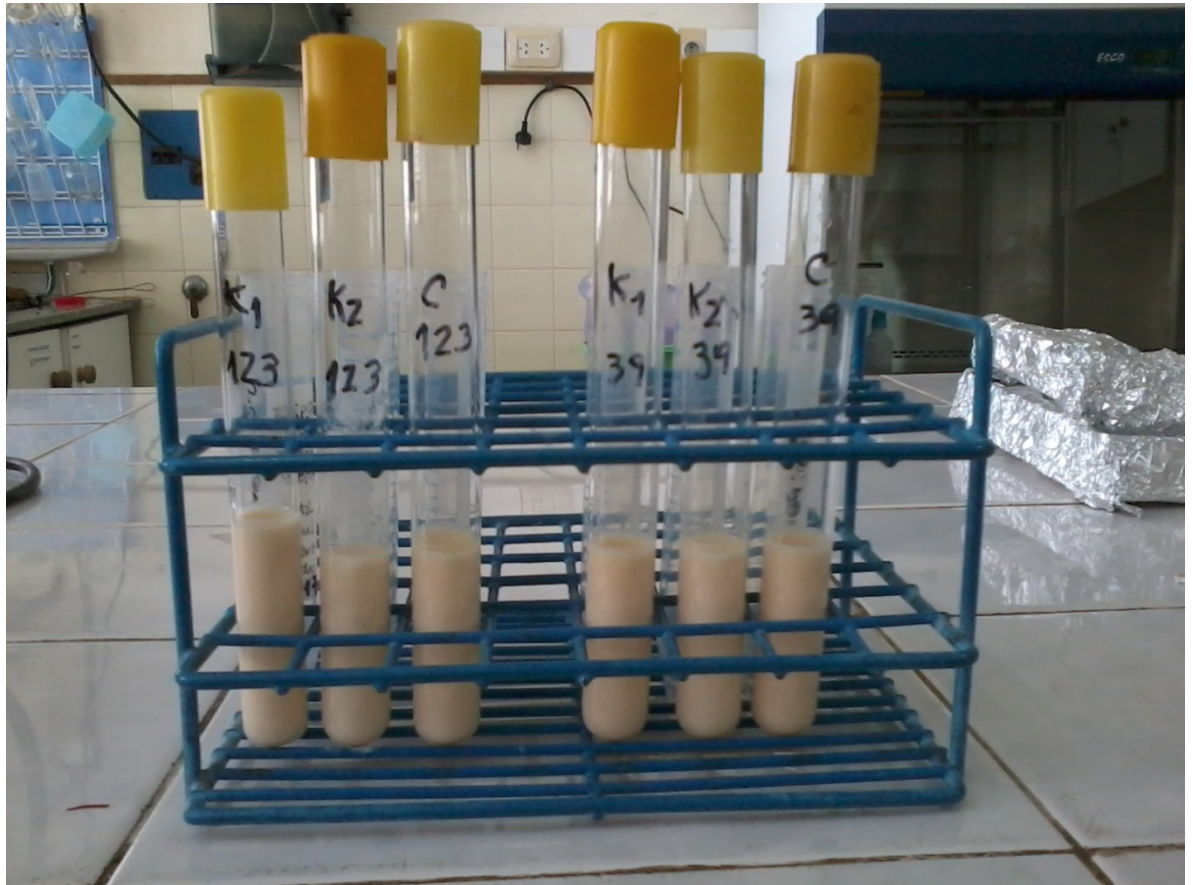


Figura 20: Coágulos obtenidos por fermentación de la leche con *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 Y 8339 (K1, K2 y C) al incubarse a 37°C durante 24 horas sin tener ciclo de congelación/descongelación.

En cambio al ser sometidos a un ciclo de congelación/descongelación y luego incubadas a 37°C durante 24 horas para la formación del coágulo de leche, la cepa de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 en la condición K2 (buffer fosfato + kefiran 0,1% p/v) permaneció de forma líquida sin poder formar el coágulo. También se ve que esta cepa en esta condición es la que produjo el menor ΔpH , lo que indicaría una menor actividad metabólica y por lo tanto menor capacidad de formar coágulos de leche en estas condiciones.



Figura 21: *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 condición K2, un ciclo de congelación/descongelación y luego incubación a 37°C durante 24 horas, permaneció líquido.

Para analizar el efecto de la congelación en la actividad acidificante se realizó además la medida de ΔpH después de 16 hs de incubación a 30°C (Tabla 4).

Tabla 4: ΔpH después de 16 h de incubación a 30°C de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 Y *Lactobacillus paracasei* 83123 luego de un ciclo de congelación/descongelación en las distintas condiciones (C, K1 y K2)

		ΔpH
		1 ciclo 30°C 16 Hs
<i>Lactobacillus</i>	K1	2,27
<i>paracasei</i>	K2	1,74
CIDCA 8339	C	2,31
<i>Lactobacillus</i>	K1	1,27
<i>paracasei</i>	K2	0,64
CIDCA 83123	C	1,35

El ΔpH que más varía con respecto a los observados en la Tabla 3 es el obtenido luego de un ciclo de congelación/descongelación y posterior formación del coágulo a 30°C durante 16 horas en la condición de congelación con kefirán 0,1% p/v en buffer pH 7.

Se observó que los coágulos de la cepa de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 en las distintas condiciones no se formaron, es decir que permanecieron líquidos.

Lactobacillus paracasei CIDCA 8339 en la condición K2 (kefirán 0,1% p/v en buffer pH 7) también permaneció líquida, a diferencia de K1 Y C que formaron coágulos bien sólidos. Todo coincide con que las que permanecieron líquidas son aquellas que tuvieron el menor ΔpH y por lo tanto la menor actividad metabólica y menor capacidad de formar coágulos de leche. Esto pone de manifiesto que ambas cepas sufrieron daño durante el proceso de congelación/descongelación, pero se ve que la cepa *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 es más susceptible al daño durante este proceso, ya que en las tres condiciones de congelación (K1, K2 y C) no fue capaz de recuperar completamente su

actividad metabólica, ni siquiera en las condiciones K1 y C que además de kefirán tienen leche como protector. En el caso de *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 se observó que el daño se da principalmente al congelarlo en la condición K2 (kefirán 0,1% p/v en buffer pH 7), esto puede deberse a que en esta condición solo hay kefirán protegiendo a los lactobacilos, a diferencia de las condiciones K1 y C donde también hay leche como crioprotector.

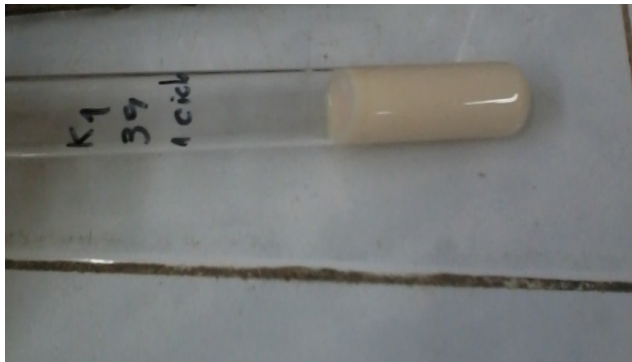


Figura 22: *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 condición K1, un ciclo congelación/descongelación, incubación 30°C durante 16 horas. Coágulo sólido.

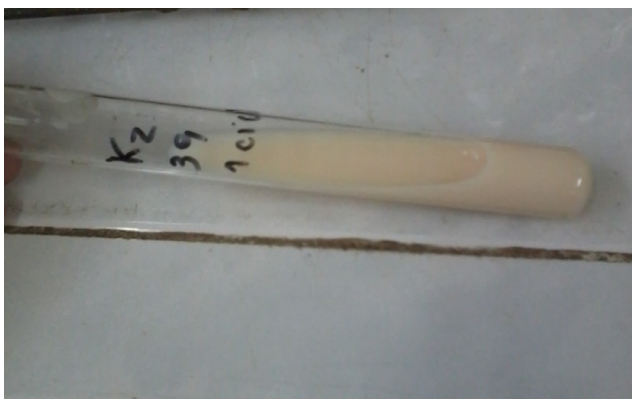


Figura 23: *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 condición K2, un ciclo congelación/descongelación, incubación 30°C durante 16 horas, permaneció líquido.



Figura 24: Lactobacillus paracasei CIDCA 8339
condición C, un ciclo
congelación/descongelación,
incubación 30°C durante 16
horas. Coágulo sólido.

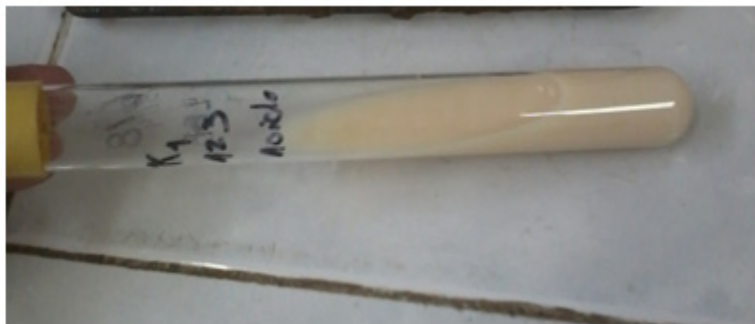


Figura 25: Lactobacillus paracasei CIDCA 83123
condición K1, un ciclo
congelación/descongelación,
incubación 30°C durante 16
horas, permaneció líquido.



Figura 26: Lactobacillus paracasei CIDCA 83123
condición K2, un ciclo
congelación/descongelación,
incubación 30°C durante 16
horas, permaneció líquido.



Figura 27: Lactobacillus paracasei CIDCA 83123
condición C, un ciclo
congelación/descongelación,
incubación 30°C durante 16
horas, permaneció líquido.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que las cepas *Lactobacillus paracasei* CIDCA 83123 y *Lactobacillus paracasei* CIDCA 8339 poseen cualidades muy buenas para su utilización en el desarrollo de alimentos probióticos y los beneficios que estos traen a la salud.

Ambas cepas demostraron resistir condiciones muy adversas, como son la conservación en estado deshidratado a 4 °C o la congelación a -20 °C, incluyendo también su resistencia a las altas temperaturas para lograr deshidratarlas y poder conservarlas de esta forma.

Tanto el proceso de conservación por congelación a -20 °C (sufriendo un ciclo de congelación/descongelación) y el almacenamiento en estado deshidratado a 4 °C, no logran provocar daños como para disminuir el número de microorganismos viables ni alterar sus cualidades como bacterias probióticas.

Otra cualidad a tener en cuenta es que no solo conservan la viabilidad, sino que también mantienen la capacidad de adhesión a células epiteliales. Si esta capacidad se perdiera, también se perderían los beneficios como bacterias probióticas, por lo cual es muy importante que además de permanecer viables conserven sus funciones normales.

También es importante que puedan recuperar su actividad metabólica normal luego de los procesos de conservación, esto se puso de manifiesto al medir la producción de ácidos por medio del ΔpH , y se comprobó que son capaces de recuperar su actividad metabólica.

Otro aspecto que hace que estas cepas tengan potencial para el desarrollo de alimentos probióticos es que pueden ser conservadas en distintos medios y de igual forma mantienen la viabilidad y sus

propiedades. El agregado de kefiran como crio/termoprotector no tuvo efectos beneficiosos ni perjudiciales y esto se debe a que las cepas en sí mismas son muy resistentes a todas las condiciones de conservación probadas y por lo tanto no necesitan de protectores adicionales para mantener todas sus características.

Bibliografía

- ✓ Abraham A. G. & de Antoni G. 1999. Characteristics of kefir grain grown in milk and in soy milk. *Journal of Dairy Research*. 66, 327-333
- ✓ Ananta, E., Volkert, M. & Knorr, D., 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal* 15, 399-409.
- ✓ Bassete R. & Acosta J. S. 1988. Composition of milk products. In *Fundamentals of Dairy Chemistry, 3rd ed. Ed.: Wong. N. P.* 39-79. New York: Van Nostrand Reinhold.
- ✓ Chávez B. E. & Ledebor A. M. 2007. Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. *Drying Technology* 25(7-8): 1193-1201.
- ✓ Código Alimentario Argentino. Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011. BOLETIN OFICIAL N° 32.279. pp 22-23.
- ✓ 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 -1039.
- ✓ FAO/WHO. 2001. CODEX Standard for Fermented Milks #243. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp
- ✓ Fujisawa T., Adachi S., Toba T., Arihara K., & Mitsuoka T. 1988. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38, 12-14.
- ✓ Garrote G. L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. 2010. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. 18, 327-340. Ed. Mozzi F., Raya R. & Vignolo G. M.
- ✓ Gibson G. & Roberfroid M. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125, 1401-1412.
- ✓ Johnson J. A. C. & Etzel M. R. 1995 Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray drying, freeze drying, or freezing. *Journal of Dairy Science*, 78, 761 - 768.
- ✓ Kooiman P. 1968. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of kefir grain. *Carbohydrate Research*. 7, 200-211.
- ✓ La Riviere J. W. M., Kooiman P. & Schmidt K. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the Kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archiv für Mikrobiologie*. 59, 269-278.
- ✓ Londero A., Hamet M. F., De Antoni G. L., Garrote G. L., & Abraham A.G. 2012. Kefir grains as starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterization. *Journal of Dairy Research*. 79: 262-271

- ✓ Manning T. S., Rastall R. & Gibson G. 2004. Prebiotics and Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*. Eds.: Salminen S, von Wright A., Ouwehand A.
- ✓ Meng X. C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Daly C. & Rosset R. P. 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106(4), 1406-1416.
- ✓ Micheli L., Uccelletti D., Palleschi C., Crescenzi V. 1999. Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53, 69-74.
- ✓ Mukai T., Toba T., Itoh T. & Adachi S. 1988. Structural Microheterogeneity of Kefiran from Kefir Graiss. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 59, 167-176.
- ✓ Paul E., Fages J., Blanc P., Goma G. and Pareilleux A. 1993. Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 34-39.
- ✓ Riveros B., Ferrer J. & Borquez R. 2009 Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology* 27, 123-132.
- ✓ Rimada P. S. & Abraham A. G. 2001. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*. 68, 653-661.
- ✓ Rosi J. & Rossi, J. 1978. I microorganismi del kefir: I fermenti lattici. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*. 29, 291-305.
- ✓ Schrezenmeir J. & de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical nutrition*. 73, 361S-364S.
- ✓ Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y. & Nakase T. 1994. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 435-439.
- ✓ Vancanneyt M., Mengaud J., Cleenwerck I., Vanhonacker K., Hoste B., Dawyndt P., Degivry M. C., Ringuet D., Janssens D. & Swings, J. 2004. Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* Takizawa et al. 1994 as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* Fujisawa et al. 1988. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 551-556.
- ✓ Vedamuthu E. R. 1982. Fermented milks. In *Economic Microbiology*, pp. 199-226. Ed.: Rose A. H. Academic Press: Washington

- ✓ Witthuhn R. C., Schoeman T. & Britz T. J. 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*. 15, 383-389.
- ✓ Zamora L. M., Carretero C. & Pares D. 2006. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology International* 12, 77-84.