

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA



*“Desarrollo de complementos dietarios funcionales usando probióticos
lácticos deshidratados como estrategia de innovación”*

Lic. María Alejandra Correa Deza

Año 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA

Ayacucho 471- T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos

Dr. Manuel Javier Aybar

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano

Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra

Dra. María Antonieta Gordillo

Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga

Sr. Mario Rodríguez

Sr. Joaquín Hernán Vargas

Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez

Srta. Karen Nahir Ríos

DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Inés Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA

Ayacucho 471- T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



|

DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

Suplentes

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

Dra. Claudia Alejandra Crespo

Dra. María Angélica Véliz

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA

Ayacucho 471- T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE
DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: Resolución 750- CONEAU -13

Director:

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

Vice-directora:

Dra. Lucia Claps

Comité académico:

Dr. Alfredo Grau
Dr. Raúl Pedraza
Dra. Silvina Fadda



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA

Ayacucho 471- T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

*Desarrollo de complementos dietarios funcionales usando probióticos lácticos
deshidratados como estrategia de innovación*

TESISTA:

Lic. María Alejandra Correa Deza

DIRECTORA:

Dra. Graciela Font

CO-DIRECTORA:

Dra. Carla Luciana Gerez

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN:

Dra. María Pía Taranto

Dra. Julia Inés Fariña

Esta Tesis Doctoral se desarrolló en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), dependiente de CONICET, de la Fundación Miguel Lillo y de la Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC).



Los estudios realizados se financiaron a través de becas y subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

En este contexto, quisiera hacer un agradecimiento especial a CONICET por haberme otorgado la Beca que posibilitó la realización de este trabajo y resaltar la importancia que tiene la inversión del Estado Argentino en Ciencia y Tecnología, gracias a la cual es posible la formación altamente calificada de doctores e investigadores en nuestro País.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral dieron lugar a la siguiente publicación y comunicaciones científicas:

Publicaciones en revistas científicas con referato:

Correa Deza MA, Grillo-Puertas M, Salva S, Rapisarda V, Gerez CL, Font G (2017). "Inorganic salts and intracellular polyphosphate inclusions play a role in the thermotolerance of the immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505". PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179242>.

Comunicaciones Científicas

2017. Correa Deza MA, Grillo-Puertas M, Salva S, Martos G, Rapisarda V, Gerez CL, Font G. "Intracellular polyphosphate inclusions play a role in the thermotolerance of the immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505". XII Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. Tucumán, 2 a 4 de Agosto de 2017.

2016. Correa Deza MA., Salva S., Martos GI., Gerez CL., Font G. "The effect of pH and growth phase on the heat tolerance of the immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505". V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Tucumán, Octubre de 2016.

2015. Correa Deza MA, Gerez CL, Font G. "Effect of stirring on growth and tolerance to heat stress of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505". XI Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. Córdoba, 5 a 7 de Agosto de 2015.

2014. Correa Deza MA, Gerez CL, Font G. "Intrinsic tolerance of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 to stress conditions". V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba, 17 a 19 de Noviembre de 2014.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi directora, Dra. Graciela Font, por abrirme las puertas de CERELA y por haberme confiado la realización de este trabajo. Por sembrar en mí durante estos años su vocación por la investigación científica, proponiéndome constantemente nuevos desafíos, dudas e inquietudes que me movilizaron y fueron el pilar de mi formación en este campo. Es, fue y será siempre un orgullo inmenso para mí haberme formado profesionalmente en este camino bajo su dirección. A título personal, rescato el respeto con el que siempre se ha dirigido hacia mí, como becaria y a la vez profesional, confiando en mis capacidades y otorgándome la libertad de tomar decisiones respecto a mi trabajo de Tesis. Finalmente, me llevo también mis mejores recuerdos de generosidad, calidez, empatía, comprensión, paciencia y humanidad; cualidades que considero indispensables y complementarias a la formación de un profesional.

A mi codirectora, Dra. Luciana Gerez, por su dedicación y acompañamiento durante todo este trabajo de Tesis Doctoral, el cual no hubiese resultado igual sin sus acertados aportes, ideas, experiencia y sabiduría. Por haberse puesto el delantal y trabajar al lado mío cuando fue necesario. Por su compromiso y empuje diario. Finalmente por su empatía como madre, muy valiosa para mí durante todos estos años.

A la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán, instituciones que posibilitaron mi formación de grado y posgrado. Y por supuesto, a los ciudadanos argentinos que, a través del Estado, sostenemos y luchamos por una educación pública y gratuita de altísimo nivel.

A las Dras. Julia Fariña y María Pía Taranto, miembros de mi Comisión de Supervisión de Tesis, por sus valiosos aportes y compromiso durante el desarrollo de esta tesis.

A las Dras. Viviana Rapisarda, Mariana Grillo Puertas y Josefina Villegas, y a todo el personal de INSIBIO, en donde realicé trabajos en colaboración para llevar a cabo experimentos que fueron los pilares de esta Tesis. Vivi, Mariana y Jose, gracias por haberme recibido tan cálidamente y por el compromiso en nuestros experimentos.

A la Dra. Mariana Montenegro y el Mic. Ladislao Vergara con quienes realicé una estadía en la Universidad Nacional de Villa María, Córdoba, Argentina. Gracias por haberme recibido tan bien y haber hecho de mis pocos días allí una experiencia hermosa, en la cual conocí a un valioso grupo humano y de trabajo.

A la Dra. Susana Salva, una profesional admirable, comprometida, honesta, responsable. Gracias por tu dedicación a mi Tesis las veces que fue necesario. Y también te agradezco inmensamente tu cariño y tus palabras de aliento siempre.

A Marisa Garro, con quien inicié mi paso por CERELA antes de recibirme. Gracias por el cariño de siempre.

A Vicky Martos, una gran amiga y referente todos estos años. Desde mi Tesis de Licenciatura estuvo cerca cuidándome, apoyándome y aconsejándome, con un inmenso cariño, lo cual hizo que hoy, y para siempre, signifique alguien muy especial en mi vida que llevaré siempre en mi corazón.

A Raúl Raya, por su amistad y generosidad. Por sus palabras de aliento y su cariñoso humor, tan necesario muchas veces en que me sentí agotada o desorientada. Gracias por hacer más lindos mis días en CERELA.

A Pia Taranto agradezco sus consejos, sus palabras de aliento, su disposición para escucharme y ayudarme en lo que estuvo a su alcance.

A Lulú Saavedra, una gran persona y profesional, por su cariño y su actitud positiva siempre. Por inculcarnos el compromiso y la responsabilidad en el trabajo diario, sobre todo para una mejor convivencia entre los diferentes grupos de laboratorio.

A Fernanda Mozzi, Gabi Zárate, Silvina Fadda y Billy Hebert por sus consejos, ayuda y apoyo cuando fue necesario. Por su buena onda siempre.

A todo el personal de CERELA, quienes me acompañaron durante estos años y con quienes compartí muchos momentos agradables que recordaré por siempre: Julito, Luisito, Richard, Martita M, Mabeluchi, Mario, José Luis, Pablito, Mirta, Majo F, Vero M, Lulú CP, Marta N, Jorge P, Yoli.

A mis compañeros y amigos de CERELA, los que se fueron y a los que llegaron después. Gracias por los consejos, el aguante durante tantas horas y años compartidos, las risas, los mates. Principalmente por haber sido una pieza fundamental en mi formación profesional y personal: Mica Pescuma, Male J, Jony L, Kitilina O, Lore C, Lu B, Rubia B, Juli Bo, Anto R, Lucre T, Lu R, Sil del C, Guille M, Nadiu S, Poly L, Mily G, Vicky T, Mati R, Gastón P, Gabriel S, Pablito C, Fernando M (socio! Jaja), Anita F, Ema L, Barby N, Flor M, Hernán S, Natividad, Mariano E, Franquito S, Cony M, Steffi D, Lu C, Mily T, Lu P.

A mis compañeros más cercanos este último año, Andrés y Pato. Por las risas y todos los momentos compartidos en el "sucucho".

A Caro T. por su compañía, apoyo y empuje, tan necesarios este último año. Agradezco haber tenido la oportunidad de conocernos mejor y de descubrir a una gran persona y profesional, con quien me sentí identificada y comprendida muchas veces.

A Yani, Lucre, Romi, Lu Ruíz y Rubita. Amigas muy queridas que me fue dejando CERELA en el transcurso de todos estos años. Gracias por los mates, las risas, las siestas, las tardes y las noches, llenos de cariño y energías súper positivas.

A mi querida amiga Ale Orihuel. Gracias porque siempre tuviste las palabras justas en los momentos más difíciles. Gracias también por compartir tu maternidad conmigo, lo mejor que nos ha pasado. Y por tantos otros miles de momentos, risas, mates, gimnasio, salidas. Sin duda una de las cosas más hermosas que me dejó esta tesis es nuestra amistad.

Especialmente a mi amiga y compañera desde los inicios (estudios de grado y de posgrado), Dra. Antonieta Rodríguez de Olmos. Gracias por estar siempre, apoyarme y bancarme en todo. Por nuestras risas, llantos, peleas, enojos, experimentos de laboratorio, salidas, consejos. Por tus aportes a la realización de mi Tesis desde tu experiencia, desde el desinteresado lugar del que no espera nada a cambio más que la satisfacción de dar una mano para que todos salgamos adelante. Amiga querida, fundamentalmente por transitar este larguísimo camino conmigo desde el principio y hasta el final y por vivir tu vida junto a la mía y la de mi hijo, para hacer de ambas algo increíblemente mejor. Te amamos tía Anto!

A mis grandes amigos Rami, Diego y Lu, siempre presentes en mi vida y la de mi flia.

A Guille Almada, Anto Caponetto, Mily Griet, Pau Germano y Ceci Ullua. Grandes amigas que me dio la facultad y la vida y que me acompañaron también todos estos años.

A mis amadas sarmientinas: Wili, Grachu, Fer, Sofi F, Sofi Ji, Negrita, Lauri O, Eva. Amigas desde muy chiquitas y acompañándome muy cerquita desde entonces.

A mi neuróloga favorita, Dani Grací, quien valoró como pocos el significado y el esfuerzo que implicó la realización de mi Tesis. Gracias amiga por entenderme y apoyarme siempre, sos un pilar muy importante en mi vida.

A mi "grupo de antiayuda". Mis amigos más selectos y raros. Mis cable a tierra tan necesarios: Umpa, Ro, Sofi, Anto, Fede y Martin.

A mis suegros, Piru y Mario, que también me acompañaron y apoyaron durante estos años.

A mi papi y Pato, siempre pendientes de mi Tesis, enorgulleciéndose y alentándome a seguir.

A mi Abu Gladys, mi abubi. La mujer más fuerte que conocí y a la cual admiro muchísimo. Gracias por tus palabras de aliento y tu amor infinito.

A mi otra mamá, mi Tía Gachi. Gracias por estar en cada acontecimiento importante en mi vida y en la de mi hijo; gracias por entenderme y contenerme como nadie lo hizo nunca, en esos abrazos eternos que todo lo consuelan. Gracias por tus energías positivas siempre!

A mi Tío Seba, que con su característico humor, cariño y empuje siempre me hizo seguir adelante.

A toda mi amada familia, Tio Leo, Jo, Gus, Mario A, Lu, Rami, Facu, Guada, Tomy, Lucas, Rocío, Ale, Mati; quienes siempre me alentaron y acompañaron desde el amor todos estos años.

A mis primeras amigas en la vida y cómplices en todo, mis hermanas Flor y Juli. Mujeres increíbles que admiro profundamente y fueron sin duda referentes para mí. Gracias por el aliento y la ayuda necesaria durante estos años. Y a mi hermano por elección, mi cuñado Fede, quien también estuvo a mi lado en cada momento importante de mi vida.

A mi mamá, por darme siempre palabras de aliento y fuerzas para seguir adelante. Por “heredarme” el lado justiciero que me caracteriza, que inevitablemente va acompañado de mucha honestidad y lealtad, por lo cual me siento muy orgullosa de tanta herencia. Por admirarme y enorgullecerse de cada uno de mis logros, así fuesen muy chiquitos. Por cuidar de mi hijo como si fuese yo miles de veces para que yo pudiera terminar y cumplir con todos mis proyectos profesionales, como fue esta Tesis. Por infinitas cosas más, pero principalmente, por el simple hecho de estar, acompañar, y creer en mí, gracias mami!

A mi amor y compañero de vida, Mario, que estuvo incondicional a mi lado en cada momento. Que me apoyó en cada decisión, que me alentó cuando sentí no dar más, que me esperó, me aguantó, me abrazó y me hizo reír a carcajadas para seguir siempre adelante. Y por supuesto a mi hijo, el amor más grande que jamás imaginé, el chinito alegre que ilumina mis días y mi vida entera, el bebé que me esperó tantas veces para tomar teta, para sonreírme, para decirme sus primeras palabras, para dar conmigo sus primeros pasos, para abrazarme, besarme, jugar conmigo. Y ahora, el niño que me sigue esperando ansioso con la misma sonrisa y me “resetea” tantísimas veces. Simplemente gracias por existir, nada de esto hubiera sido igual sin mis dos motores, quienes le dan un sentido especial a todo lo que hago.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
Bacterias lácticas probióticas.....	8
Inmunobiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CRL1505.....	10
Mercado de probióticos.....	11
Complementos dietarios.....	12
Proceso de secado por pulverización.....	14
Estrategias de protección de la viabilidad celular.....	17
Acumulación de <i>polyP</i> en bacterias.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	21
CAPÍTULO 1: Comportamiento de <i>L. rhamnosus</i> CRL1505 en medios de cultivo de base no láctea.....	24
INTRODUCCIÓN.....	24
RESULTADOS.....	25
Morfología de <i>L. rhamnosus</i> CRL1505.....	26
Acumulación de <i>polyP</i>	28
Tolerancia intrínseca a condiciones de estrés.....	34
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES PARCIALES.....	46
CAPÍTULO 2: Estrategias de optimización de la tolerancia a estrés térmico de <i>L. rhamnosus</i> CRL1505.....	49
INTRODUCCIÓN.....	49
RESULTADOS.....	49
Efecto de tratamientos subletales.....	49
Efecto de las condiciones de fermentación.....	50
DISCUSIÓN.....	59

CONCLUSIONES PARCIALES	64
CAPÍTULO 3: Secado de <i>L. rhamnosus</i> CRL1505 por pulverización	67
INTRODUCCIÓN.....	67
RESULTADOS	67
Evaluación del medio de secado	67
Secado por pulverización. Estudios preliminares.....	71
Efecto de las condiciones de rehidratación de los productos secos	73
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES PARCIALES	81
CAPÍTULO 4: Funcionalidad de <i>polyP</i> en un modelo experimental <i>in vivo</i>	84
INTRODUCCIÓN.....	84
RESULTADOS	86
Cuantificación de <i>polyP</i> en extractos intracelulares de <i>L. rhamnosus</i> CRL1505.....	86
Modelo experimental animal	88
Evaluación de la respuesta inmune local y sistémica	89
DISCUSIÓN	95
CONCLUSIONES PARCIALES	99
CONCLUSIÓN GENERAL DE TESIS.....	100
MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
Microorganismo de estudio.....	102
Medios de cultivo	102
Técnicas generales	103
Estudio de la tolerancia intrínseca a estrés	105
Estudio de polifosfato inorgánico intracelular	107
Estudio del efecto de la agitación	111
Producción de biomasa en biorreactores.....	111
Secado por pulverización.....	112
Modelo experimental de inflamación respiratoria aguda	115
Análisis estadístico	117
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

RESUMEN

El desarrollo de probióticos lácticos deshidratados implica un desafío científico-tecnológico y reviste gran interés como herramienta de innovación para ampliar el mercado de alimentos y/o suplementos dietarios con propiedades funcionales. El proceso de secado por pulverización genera estrés térmico, osmótico y oxidativo para las células, con pérdida de viabilidad y/o de su actividad metabólica. El inmunobiótico *Lactobacillus (L.) rhamnosus* CRL1505 es objeto de continuo estudio por sus propiedades beneficiosas en salud. El objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue conocer su comportamiento frente a situaciones de estrés derivadas del proceso de deshidratación y sentar las bases tecnológicas para el desarrollo de complementos dietarios probióticos. Se formuló un medio de cultivo económico (MCM) de base no láctea para la producción de biomasa, que contiene una elevada concentración de sales de fosfato (9,2 g/L). En este medio se evidenció la presencia de gránulos de polifosfato (*polyP*) en el citoplasma del inmunobiótico CRL1505, mediante la estandarización de diferentes técnicas (microscopía óptica y electrónica de transmisión, fluorescencia, RT-PCR, PAGE, espectrofotometría). Se relacionó la acumulación intracelular de *polyP* y la concentración de fosfato del medio de cultivo, estableciéndose dos condiciones para obtener células con alto y bajo contenido de *polyP*. MCM y MCM(-), respectivamente, según la concentración de fosfato del medio de cultivo. Posteriormente, se evaluó la tolerancia intrínseca de los cultivos a estrés térmico, oxidativo y osmótico, confirmándose que dicha tolerancia requiere 9,2g/L de sales de fosfato inorgánico para obtener la tolerancia a estrés observada. Se evaluó el efecto de pH y la fase de crecimiento sobre la acumulación de *polyP* y tolerancia a *shock* térmico usando bioreactores (1,5 L). Se estableció la condición óptima de cultivo para obtener células tolerantes a estrés: crecimiento a pH libre y cosecha en fase estacionaria. La respuesta a estrés del inmunobiótico CRL1505 se evaluó en diferentes medios de *shock* térmico, obteniéndose los mejores resultados con un pool de sales inorgánicas (MCM3) conteniendo Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 y MnSO_4 . Establecidas las condiciones óptimas de producción de biomasa con máxima tolerancia a estrés, se procedió al secado por pulverización (escala laboratorio) en dos matrices: maltodextrina (polvo A) y maltodextrina-MCM3 (polvo B). La sobrevivencia celular

fue mayor en el polvo B (72,5 %) respecto al A (42,8 %), poniéndose en evidencia el efecto termoprotector de MCM3.

Finalmente, se evaluó el efecto biológico de extractos intracelulares de *L. rhamnosus* CRL1505 conteniendo *polyP* y de un *polyP* sintético (control) mediante ensayos *in vivo* utilizando un modelo murino de inflamación pulmonar aguda. Se demostró que los *polyP* evitan el desarrollo de una respuesta inflamatoria local en las vías respiratorias.

En esta Tesis Doctoral se establecieron diferentes estrategias para mejorar la sobrevivencia del probiótico CRL1505 a estrés relacionado con el proceso de secado: medio de cultivo de bajo costo con alto contenido de fosfato inorgánico; aumento de *polyP* intracelular; agregado de MCM3 (pool de sales inorgánicas) a la matriz de secado. El uso de *polyP* de *L. rhamnosus* CRL1505 como un nuevo biocompuesto con propiedades funcionales es una de las proyecciones de este trabajo.

ABSTRACT

The dehydration of lactic acid probiotics implies a scientific-technological challenge, and it is of great interest to expand the market of food and dietary supplements with functional properties. The spray drying process generates thermal, osmotic and oxidative stress for the cells with loss of viability and/or metabolic activity. The immunobiotic *Lactobacillus (L.) rhamnosus* CRL1505, used in this study, is under continuous study because of its beneficial health properties. The objective of this PhD study was to know the behavior of the strain under oxidative and thermic stress which take place during dehydration process, as the first step for probiotic dietary supplements development. An economic non-dairy based growth medium (MCM) was formulated for biomass production, which contains high concentrations of phosphate salts (9.2 g/L/64 Mm). In this medium, the immunobiotic CRL1505 accumulates polyphosphate granules (polyP) in the cytoplasm, which was evinced by setting up different techniques, e.g., optical and transmission electronic microscopy; fluorescence; RT-PCR; PAGE; spectrophotometry. The relationship existing between the intracellular accumulation of polyP and the phosphate concentration in the culture medium was established. From these results, two growth conditions MCM and MCM(-) for obtaining cells with high and low polyP content, respectively, were set up. Afterwards, the intrinsic tolerance of the cultures to thermal, oxidative and osmotic stress was evaluated, thus confirming that 9.2 g/L of phosphate salts in the culture medium are required for the stress tolerance observed. The effect of pH and growth phase on both the accumulation of polyP and the tolerance of the cells to heat shock was evaluated in bioreactors (1.5 L). The optimal culture conditions were free pH and stationary phase for obtaining stress tolerant cells. The stress response of the immunobiotic CRL1505 in different heat shock media was evaluated, best results being obtained with MCM3 (pool of inorganic salts) containing Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 and MnSO_4 . Once the optimum conditions for biomass production were established, cultures were spray dried at lab scale using two dry matrix: maltodextrin (powder A) and maltodextrin-MCM3 (powder B). Cell survival was higher in powder B (72.5 %) than in powder A (42.8 %), thus confirming the thermoprotective effect of MCM3. Finally, the biological effect of intracellular extracts of *L. rhamnosus* CRL1505 containing polyP and a synthetic

polyP (control) was evaluated in vivo using a murine model of acute lung inflammation. It was shown that polyPs avoid development of a local inflammatory response in the respiratory tract.

In this Doctoral Thesis, different strategies to improve the survival rate of *L. rhamnosus* CRL1505 to stress conditions involved in the drying process were established: a low-cost culture medium with high inorganic phosphate content; the increase in intracellular polyP; the addition of MCM3 (pool of inorganic salts) in the drying matrix.

The potential usage of *L. rhamnosus* CRL1505 polyP as a novel bioproduct with functional properties is one of the projections of this work.

INTRODUCCIÓN

GENERAL

Bacterias lácticas probióticas

Las bacterias lácticas (BL) constituyen un grupo de microorganismos Gram positivos, filogenéticamente relacionadas entre sí por sus características morfológicas, metabólicas y fisiológicas (1). Su nombre deriva de la capacidad de producir ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares aunque es una denominación restrictiva por cuanto presentan una gran diversidad metabólica (1). En general presentan morfología cocoide o bacilar, no esporulados, catalasa negativa, aerotolerantes y con bajo contenido G+C (33-55 %). Tienen capacidad biosintética limitada por lo que presentan requerimientos nutricionales complejos que incluyen: aminoácidos, vitaminas, bases nitrogenadas y ésteres de ácidos grasos, entre otros (1). La *Administración Federal de Medicamentos y Alimentos* de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) considera a las BL como microorganismos de grado alimentario o GRAS (generalmente reconocidas como seguras) (2). Estas bacterias presentan un imponderable potencial biotecnológico dado que son capaces de crecer bajo diferentes condiciones ambientales; juegan un rol importante en la fermentación de alimentos destinados al consumo humano y animal; mejoran las características organolépticas de estos productos (3) y contribuyen al correcto estado higiénico-sanitario de los mismos por acción de sus productos de fermentación (ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, etanol, etc.) (4, 5).

Los avances de los últimos años en relación al microbioma humano, han demostrado la importancia de las BL en salud. Diversas patologías, como el síndrome del intestino inflamatorio (6), la otitis media aguda (7), el síndrome del intestino irritable (8) y las enfermedades pulmonares crónicas (9) parecen estar asociadas con un desequilibrio del microbioma. Esta situación podría restaurarse mediante la adición de un número suficiente de bacterias beneficiosas, conocidas como probióticos. Los microorganismos probióticos están representados por diferentes especies, incluidas bacterias, levaduras y hongos; sin embargo, las BL son los principales organismos explorados en la industria alimentaria, particularmente cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* utilizadas en la elaboración de alimentos funcionales, principalmente derivados lácteos (10-12). Otros géneros como *Pediococcus*, *Propionibacterium*,

Enterococcus y *Lactococcus* también son explorados por sus potenciales características beneficiosas (12).

En 2001, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (13) definieron los probióticos como “microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedador”. Los mecanismos responsables de los efectos beneficiosos de los probióticos son difíciles de determinar debido a su naturaleza multifactorial, que incluye: modificación de la microbiota intestinal, adherencia competitiva a la mucosa y el epitelio, fortalecimiento de la barrera epitelial intestinal y modulación del sistema inmune (14). Esto ocurre, en general, mediante la producción de proteínas y ácidos grasos de cadena corta, la disminución del pH intestinal, la competencia de nutrientes que estimula la función de barrera de la mucosa, la inmunomodulación (15), entre otros. La **Figura 1** resume los diferentes mecanismos de acción de los probióticos. El rol de los probióticos en la regulación del sistema inmune en mucosas, principalmente intestinal (16-18) ha sido ampliamente estudiado utilizando modelos clínicos y animales. Considerando que el efecto benéfico de los probióticos puede extenderse desde intestino a piel, boca, vagina (19) y tracto respiratorio (20-22), surgió en el año 2003 una nueva denominación para bacterias probióticas. Clancy (23) propuso el término inmunobióticos para definir cepas probióticas capaces de regular benéficamente el sistema inmune de las mucosas, con el fin de diferenciarlas de aquéllas con efecto estrictamente local. En la última década, se informa en la literatura que células muertas o partes celulares de BL probióticas, tienen un efecto positivo en el sistema inmune humano, lo que abre nuevas posibilidades de aplicación de estas bacterias (24, 25). Así, surgió el término *parabióticos* para definir a células microbianas no viables (intactas o lisadas) o extractos intracelulares los cuales, cuando son administrados (oral o tópicamente) en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud humana o animal (26). En consecuencia, moléculas activas y/o metabolitos derivados de probióticos o parabióticos podrían ser también categorizados y, en este sentido, el término *inmunogénicos* (27), que incluye componentes bacterianos extra e intracelulares

(fosfopolisacáridos extracelulares, péptidoglicano, ácido lipoteicoico, etc) con habilidades inmunoregulatoras, surgió para definirlos.

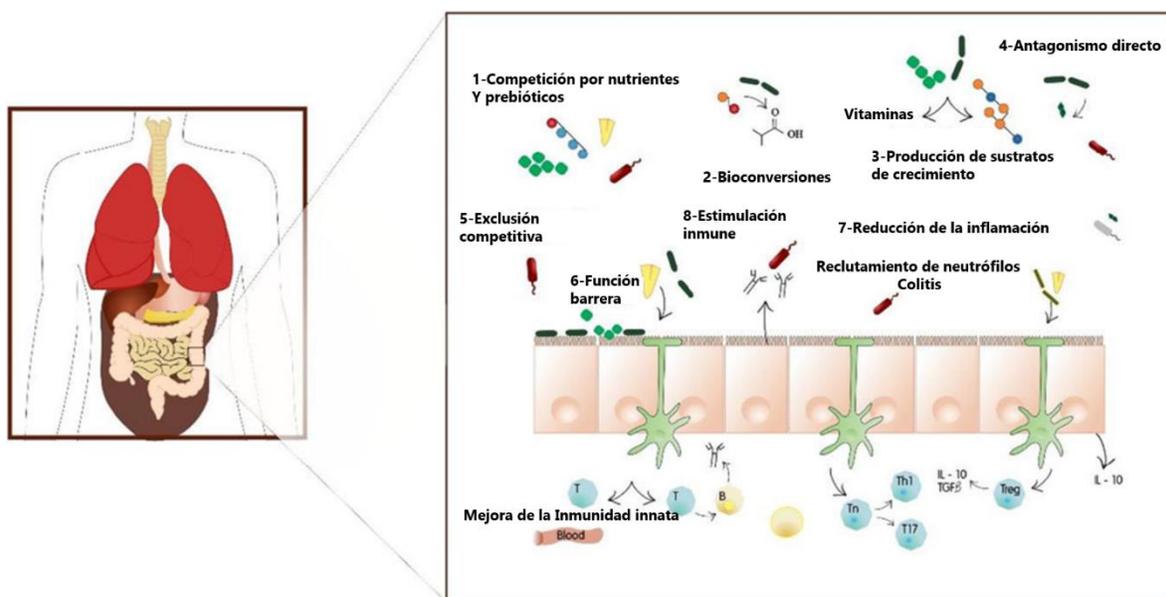


Figura 1. Mecanismos de acción probiótica. Extraído de Colombo y col. (2018) (12).

Immunobiótico Lactobacillus rhamnosus CRL1505

Lactobacillus (L.) rhamnosus CRL1505 (CRL1505) es una cepa probiótica con notables estudios científicos-tecnológicos que han permitido su transferencia tecnológica con gran repercusión en Argentina. En rigor a nuevos conceptos en el ámbito de los probióticos, CRL1505 se considera "immunobiótico" debido a su efecto inmunomodulador a distancia, es decir en mucosas distantes a la intestinal. Esta cepa probiótica-immunobiótica fue estudiada y caracterizada funcional y tecnológicamente en CERELA (Laboratorios de Immunobióticos, de Tecnología y Desarrollo y Planta de I+D) (28-31). Particularmente, los mecanismos inmunológicos relacionados al efecto protector de CRL1505 contra patógenos respiratorios han sido ampliamente estudiados y demostrados (32). CRL1505 es capaz de incrementar el número de células inmunoglobulina A positivas (IgA) en intestino y bronquios y de mejorar la producción de IgA antineumocócica en las vías respiratorias en ratones (28). La IgA es uno de los principales anticuerpos del organismo que forma parte del sistema inmunitario necesario para combatir los ataques de bacterias, virus y toxinas. Asimismo, en estudios

clínicos, CRL1505 demostró mejorar los niveles de IgA en niños que recibieron el probiótico (33), lo que condujo a una mayor resistencia a infecciones respiratorias virales y bacterianas. Por otro lado, se sabe que los síntomas asociados al resfriado común son el resultado de una respuesta inflamatoria del hospedador a la infección; un efecto antiviral podría consistir en compuestos con capacidad de controlar la inflamación exacerbada. En este aspecto, CRL1505 demostró inducir un incremento significativo de interleuquina (IL)-10 en pulmón y suero, previo a una infección con neumococo (28) o con poli(I:C) (análogo estructural a virus de ARN doble cadena)(34). La mejora de los niveles de IL-10 podría representar una herramienta de gran valor para atenuar el daño causado por la inflamación y las alteraciones fisiopatológicas en niños infectados. Esta respuesta inflamatoria controlada inducida por CRL1505, podría explicar los efectos benéficos de esta cepa en la incidencia y severidad del resfriado común observada en los estudios realizados (33).

CRL1505 forma parte del proyecto social YOGURITO[®], donde el probiótico CRL1505 se administra como componente de un yogur a niños escolares de diferentes provincias en Argentina. Actualmente el proyecto incluye otros alimentos probióticos conteniendo la cepa CRL1505 que se distribuyen en el mercado social: CHOCOLET[®], BIOQUESO y un suplemento nutricional de base láctea en polvo conteniendo el cultivo CRL1505 deshidratado, denominado BIOSEC[®]. YOGURITO[®], CHOCOLET[®] y BIOSEC[®] son marcas registradas a favor de CONICET.

Mercado de probióticos

Debido al valioso aporte de los probióticos y sus bioproductos en salud, la industria alimentaria introdujo innovación en su cartera de productos, dando lugar a los alimentos funcionales (35, 36). El concepto de alimento funcional fue promovido por primera vez en 1984 por científicos japoneses que estudiaron las relaciones entre la nutrición, la satisfacción sensorial, la fortificación y la modulación de los sistemas fisiológicos. En 1991, el Ministerio de Salud introdujo las normas para la aprobación de una categoría específica de alimentos relacionados con la salud denominada FOSHU (*Food For Specified Health Use*), que incluía

el establecimiento de declaraciones de propiedades saludables específicas para este tipo de alimentos (37-40)).

Los alimentos denominados funcionales constituyen un mercado en alza, siendo uno de los segmentos con mayor crecimiento en los últimos años (41), lo cual a su vez trajo aparejado una explosión en la demanda de probióticos. América del Norte proyectó una tasa de crecimiento anual compuesto (TCAC) del 11,4 % en productos probióticos para el período 2015-2020 (42). Asia-Pacífico mostró el mayor mercado en 2015 con USD 15 mil millones. Sin embargo, este crecimiento abrupto en la demanda de probióticos exige una pronta diversificación del mercado en base a la disponibilidad de nuevas cepas con propiedades diferenciadas o nuevos formatos de cultivos probióticos. Los productos lácteos fermentados constituyen el principal vehículo para el suministro de bacterias probióticas, aunque la industria farmacéutica también ha demostrado interés por este tipo de bioproductos(43). En el año 2014, la información disponible en la plataforma *Euromonitor International* (empresa *on line* que provee, de forma paga, investigación de mercado estratégica independiente) indicaba que el valor del mercado de probióticos en el continente americano ascendía a más de 10.000 millones de dólares, siendo el 43,4 % representado por América Latina. Mientras en Estados Unidos el 29 % del mercado de probióticos está representado por suplementos alimentarios, en América Latina este mercado es incipiente y representa sólo un 4 %, correspondiendo el resto a alimentos tipo yogur (44) u otras leches fermentadas (45).

Complementos dietarios

Los probióticos presentes en formulaciones líquidas o semisólidas pueden sufrir una disminución de la viabilidad celular después de la administración oral, principalmente porque las bacterias no sobreviven a las condiciones del estómago, siendo la tolerancia a acidez una capacidad cepa dependiente (46). El desarrollo de formulaciones probióticas secas podría permitir una mayor supervivencia bacteriana (46) durante el tránsito gastrointestinal, aunque la producción de probióticos deshidratados también implica la exposición de las células a condiciones de estrés. En este sentido, los suplementos dietarios en polvo representan un nuevo desafío para el suministro de bacterias probióticas.

Los complementos dietarios, también llamados "suplementos nutricionales", "complementos nutricionales", "suplementos alimenticios" o "suplementos dietarios", son productos especialmente formulados y destinados a suplementar la incorporación de nutrientes en la dieta de personas sanas, que presentan necesidades dietarias básicas no satisfechas o mayores a las habituales, debido a un estado fisiológico particular que requiera un aporte extra de algún nutriente (44). En Argentina, los suplementos dietarios se encuentran incorporados al Código Alimentario Argentino (CAA) desde el año 1998 y son definidos en el artículo 1381. Contienen algunos de los siguientes nutrientes: proteínas, lípidos, aminoácidos, glúcidos o carbohidratos, vitaminas, minerales, fibra dietaria y hierbas. Su administración es vía oral y deben presentarse en formas sólidas (comprimidos, cápsulas, granulado, polvos u otras) o líquidas (gotas, solución, u otras), u otras formas para absorción gastrointestinal, contenidas en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos".

Nestlé fue pionero con la primera fórmula para lactantes suplementada con probióticos aprobada por la FDA, GOOD DEFENSE®. Esta fórmula está destinada a la alimentación de lactantes prematuros o con bajo peso al nacer y aporta una cantidad óptima de energía y nutrientes. Además, contiene el probiótico *Bifidobacterium lactis* que favorece la activación del sistema inmune del recién nacido. (47). Existen numerosos trabajos relacionados al diseño de suplementos dietarios conteniendo BL probióticas (46, 48-50). Particularmente en Argentina, dentro de los grupos de los lactobacilos y las bifidobacterias, las especies más comunes de cepas probióticas incluidas en suplementos alimenticios son *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, etc (45). Sin embargo, en suplementos dietarios también podemos encontrar otros grupos como ciertas levaduras (*Saccharomyces boulardii*) y bacilos esporulados (*Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*).

Proceso de secado por pulverización

Las técnicas de secado, principalmente la liofilización, son aplicadas a la producción de cultivos probióticos para su inclusión en formulaciones secas. El secado por pulverización o *spray drying* es un método de secado rápido y rentable que puede producir partículas de polvo esféricas secas con propiedades deseadas, como buena fluidez, contenido de humedad residual específico y distribución uniforme de formas y tamaños (51, 52). Esta técnica de secado proporciona grandes ventajas respecto a la liofilización (51, 53). En la **Tabla 1** se muestran datos comparativos de ambos procesos.

Tabla 1. Cuadro comparativo con las principales características de las técnicas de secado por pulverización (*spray drying*) y por liofilización.

	<i>Spray Drying</i>	Liofilización
Tipo de proceso	Continuo	En lotes
Costo* Fijo	12%	100%
Costo* Fabricación	20%	100%
Control de característica de partícula	Si	No
Conocimiento/Experiencia	Creciente	Bien conocido y descripto
Etapas de procesamiento extra para obtener partículas de polvo separadas	No	Etapas de micronización es necesaria para romper la torta seca en partículas separadas
Tiempo de proceso	Segundos/Minutos	Horas/Días
Temperatura de proceso	Alta (hasta 200°C)	Baja (< 0°C)
Presión** de proceso	Limitada	Alto vacío (≤ 10 mbar)

* En relación con el costo de la liofilización (Santivarangkna y col., 2007a, 2007b).

** Vacío puro = 0 mbar.

Extraído de Broecks y col. (2016) (43).

El proceso de *spray drying* puede dividirse en cuatro etapas (**Figura 2 A**). En primer lugar, la alimentación líquida se atomiza en pequeñas gotitas (**Figura 2 A a**). A continuación, la pulverización atomizada entra en contacto con un gas caliente en la cámara de secado (**Figura 2 A b**). Aquí se pueden aplicar tres patrones de flujo de pulverización dependiendo de la dirección en la que el aire y el líquido ingresan a la cámara de secado: co-corriente, contracorriente y flujo mixto. Debido a que los probióticos son organismos sensibles al calor, es importante aplicar el patrón de co-corriente, ya que de esta forma las gotas más húmedas entran en contacto con la temperatura más alta y las partículas más secas con la temperatura más baja, lo que minimiza el riesgo de daño por calor en las células probióticas.

La tercera fase del proceso implica el secado de las gotitas y la formación de partículas (**Figura 2 A c**), las cuales finalmente se separan de la corriente de aire de secado. En general, las partículas gruesas y pesadas se separan en la base de la cámara de secado por fuerza gravitacional.

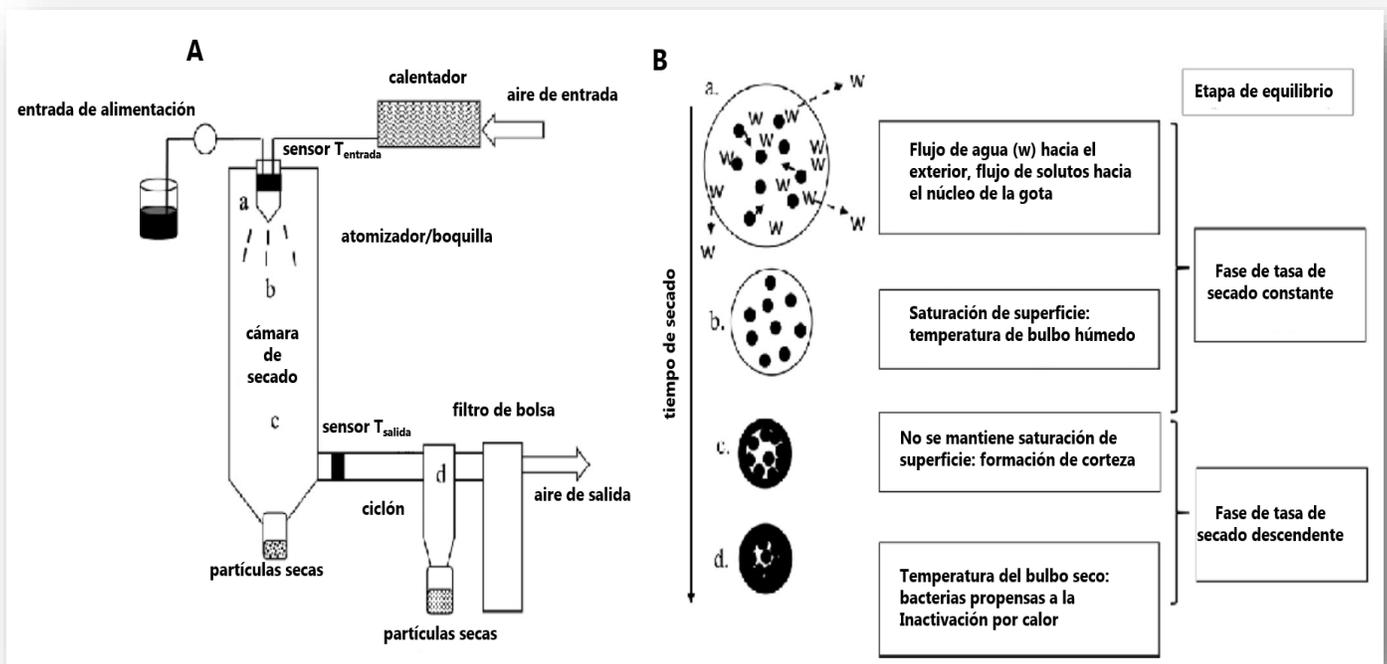


Figura 2. Proceso de secado por pulverización. **(A)** Resumen esquemático de un secador por pulverización. **(B)** Resumen esquemático de las diferentes etapas durante el proceso de secado. Puntos negros: células bacterianas, w: moléculas de agua. Extraído y modificado de Broeckx y col. (2016) (43).

Las partículas finas se separan utilizando ciclones y filtros de bolsa (**Figura 2 A d**). El polvo recogido en el recipiente colector es un polvo listo para vender o utilizar. En relación a las etapas del proceso, las partículas secas se forman en varias fases (**Figura 2 B**). En primer lugar, se alcanza un estado de equilibrio entre las gotas y el aire de secado. Inmediatamente después del contacto con el aire caliente, el agua comienza a evaporarse (**Figura 2 B a**). Mientras la saturación de la superficie de la gota se pueda mantener, esta evaporación se caracteriza por un período de tasa de secado constante, donde la temperatura de las partículas se define por la temperatura del bulbo húmedo (**Figura 2 B b**). Cuando ya no se pueden mantener las condiciones de saturación en la superficie de la gota, comienza el periodo de tasa de secado descendente. A medida que la gota se contrae, se forma una costra o corteza por cristalización de los materiales disueltos o suspendidos en la solución de alimentación (**Figura 2 B c**). La velocidad de evaporación después de la formación de la corteza depende de la difusión de humedad a través de la corteza seca. Con el aumento de la evaporación, la corteza se vuelve más gruesa y la velocidad de evaporación disminuye. De esta forma, la temperatura del producto aumenta y se asemeja a la temperatura del aire de secado (**Figura 2 B d**). En esta última etapa, las células probióticas son propensas a la inactivación por calor (53, 54).

Enzimas deshidratadas, detergentes, extractos de café y proteínas son ejemplos de productos producidos mediante secado por pulverización (53). No obstante, la aplicación de esta técnica en probióticos se ve reducida debido a que, durante el secado, las células se encuentran con diferentes condiciones de estrés que pueden afectar su viabilidad. Estas condiciones incluyen estrés térmico, osmótico y oxidativo; deshidratación y estrés por cizallamiento, proceso durante el cual las partículas se deforman por acción de una fuerza externa cortante durante la atomización (55-57). El estrés por calor y la deshidratación son los dos mecanismos principales que conducen a la inactivación y pérdida de la viabilidad de los probióticos (58, 59). Sin embargo, los resultados varían entre diferentes géneros y especies bacterianas e incluso entre cepas de la misma especie (43), por lo cual deben ser estudiados y controlados para cada caso particular.

Estrategias de protección de la viabilidad celular

Es importante mantener las propiedades tecnológicas (actividad de acidificación, propiedades organolépticas y conservantes) y/o probióticas de BL durante un bioproceso, como es el secado por pulverización. Este enfoque es de considerable interés en investigación a nivel industrial ya que las BL se utilizan ampliamente en la elaboración de alimentos fermentados y productos farmacéuticos (53). La tolerancia de bacterias al estrés derivado del proceso de secado por pulverización depende de diferentes factores, como ser la tolerancia intrínseca de los microorganismos, las condiciones de producción de biomasa (fermentación) (53, 60), adición de agentes protectores, adaptación de las células a los parámetros del proceso y pre-tratamientos de estrés subletal antes del secado (43). Estas estrategias no solo impactan en la viabilidad de los probióticos inmediatamente después del secado, sino también durante el almacenamiento. La **Figura 3** esquematiza ejemplos de estrategias para aumentar la tolerancia celular a estrés y generar protección que contribuyen a disminuir los efectos negativos del secado por pulverización.

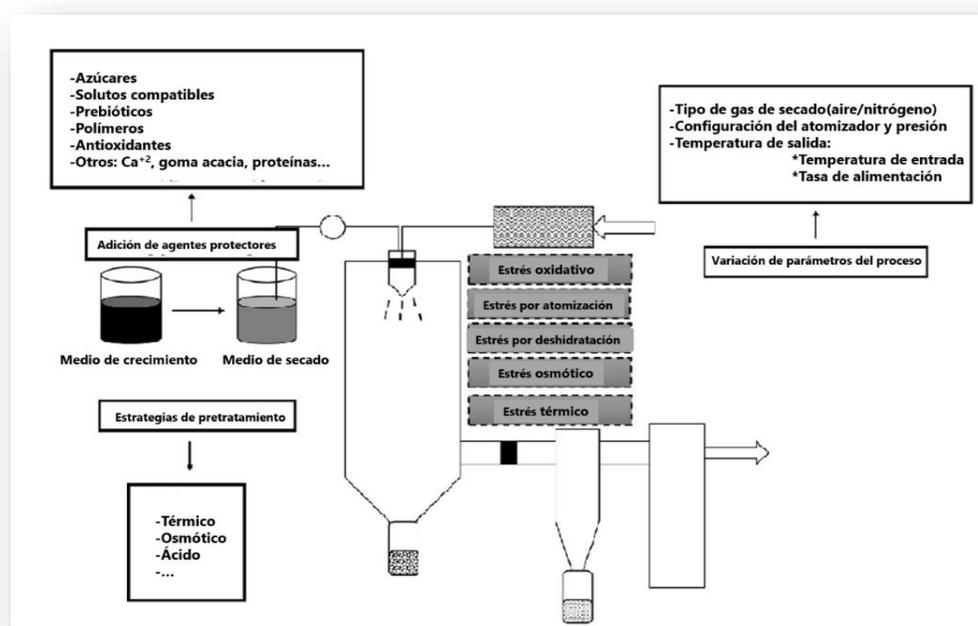


Figura 3. Estrategias de protección de la viabilidad de probióticos frente al estrés generado durante el secado por pulverización. Extraído de Broeckx y col. (2016) (43).

El estado fisiológico del cultivo previo al proceso es clave en la tolerancia intrínseca de las células a condiciones de estrés (61-63). Las células bacterianas pueden prepararse para hacer frente a diferentes entornos adversos a partir de modificaciones en las condiciones de fermentación. Esto incluye: composición del medio de cultivo, temperatura, pH, edad del cultivo y atmósfera (inyección de gases). Según la composición del medio de cultivo, durante el crecimiento algunos microorganismos acumulan solutos compatibles para mantener el equilibrio osmótico con el ambiente extracelular. Las BL no sintetizan solutos compatibles y, por lo tanto, dependen del ambiente para tomarlos (53). Los solutos compatibles pueden ayudar a los cultivos microbianos a estabilizar las proteínas y la membrana celular durante las condiciones de estrés osmótico provocadas por la baja actividad del agua durante el proceso de secado (64). En este sentido, Huang y col (63) proponen que la acumulación citoplasmática de polifosfato inorgánico (*polyP*) en *Propionibacterium freudenreichii* es inducida osmóticamente y utilizada como moléculas de almacenamiento de energía y solutos compatibles. La acumulación de *polyP* en este microorganismo condujo a una mayor resistencia multiestrés y, particularmente, a una mayor supervivencia después del secado por pulverización. La síntesis de *polyP* en microorganismos ha sido ampliamente estudiada debido a sus funciones relevantes en la fisiología bacteriana y como una herramienta biotecnológica en algunos procesos microbianos (65).

Acumulación de polyP en bacterias

PolyP es un polímero lineal compuesto por decenas o cientos de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídridos de alta energía (**Figura 4**). Probablemente un precursor prominente en la evolución prebiótica, *polyP* es una molécula ubicua presente en todos los seres vivos: bacterias, hongos, protozoos, plantas y mamíferos (66). Los *polyP* fueron visualizados por primera vez en microorganismos como gránulos metacromáticos teñidos de rosa por colorantes azules básicos (67) y fueron denominados "gránulos de volutina". Durante algún tiempo, debido a su carácter polianiónico, los gránulos de *polyP* fueron confundidos con ácidos nucleicos. Con el advenimiento de la microscopía electrónica, se observó que estas partículas eran altamente refractivas y fueron identificados como

Los mecanismos por los cuales el *polyP* impacta en todos estos procesos aún no están claros y, en la mayoría de los casos, podrían implicar una variedad de aspectos, como la regulación de la expresión génica (74), la estabilidad del ARNm (75), el recambio de proteínas (76) o la homeostasis de ATP (77).

La primera cita en relación a *polyP* en *Lactobacillus* data de principios de la década de 1960 y describe la presencia de este polianión en *L. casei*, entre otros microorganismos (78). Mientras estudiaban la ultraestructura de la membrana de *L. plantarum*, Kakefuda y col. (79) informaron la presencia de gránulos de *polyP* en su citoplasma. Más tarde, *polyP* fue descrito en *L. plantarum* como una molécula que forma un complejo con el Mn (II) como contraión. En esta especie, que carece de superóxido dismutasa, Mn (II) participa en un mecanismo particular de defensa no enzimática contra la toxicidad del oxígeno por captura de O_2^- (80, 81). El segundo ejemplo reportado de inclusiones de *polyP* en lactobacilos provino de la observación de que el 60 % de las cepas de aisladas de suero de queso mozzarella, particularmente *L. casei* y cepas de *L. fermentum*, formaban cuerpos de inclusión, los cuales fueron teñidos por el método de Neisser y mostraron un color amarillo fluorescente característico al ser teñidos con DAPI (4,6-diamidino-2-henilindol) (82). Estudios más recientes en BL, establecen una relación directa entre la acumulación de *polyP* y la tolerancia a diferentes factores de estrés (70, 83).

Un nuevo rol funcional para *polyP* fue descrito recientemente. Esta molécula ha sido identificada como un factor extracelular sintetizado por *L. brevis* que ayuda a mantener la homeostasis en modelos de inflamación intestinal, *in vitro* e *in vivo*, mediante la inducción de proteínas de *shock* térmico citoprotectoras (84). Asimismo, la utilización de un *polyP* sintético (sintetizado enzimáticamente) demostró un efecto benéfico en modelos animales, al suprimir significativamente la permeabilidad intestinal inducida por agentes oxidantes (84, 85). Estas observaciones podrían justificarse en el hecho de que los efectos beneficiosos asociados a probióticos, en muchos casos, se encuentran mediados por factores solubles secretados por los mismos (39, 86-89); por lo tanto, no resulta sorprendente la identificación de *polyP* como un biocomponente responsable de efectos probióticos.

En este contexto, esta Tesis Doctoral plantea los objetivos generales y específicos e hipótesis de trabajo que se detallan a continuación:

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un complemento dietario probiótico conteniendo la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 deshidratada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar parámetros de cultivo para la producción de biomasa de la cepa *L. rhamnosus* CRL1505 usando medios económicos de base no láctea.
2. Evaluar *in vitro* la tolerancia intrínseca a condiciones de estrés térmico, osmótico y oxidativo con el fin de definir las condiciones óptimas para la sobrevivencia del probiótico al proceso de secado por pulverización.
3. Evaluar la incidencia de polímeros de fosfato inorgánico (*polyP*) sobre la tolerancia de CRL1505 a estrés.
4. Producir a escala de laboratorio un suplemento prototipo funcional a base de *L. rhamnosus* CRL1505 deshidratado por pulverización y determinar su estabilidad durante el almacenamiento.
5. Evaluar *in vivo* el efecto antiinflamatorio y/o inmunomodulador de extractos libres de células de *L. rhamnosus* CRL1505 conteniendo *polyP*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1- *L. rhamnosus* CRL1505 puede crecer en medios de cultivo de base no láctea con buena tasa de recuento de viables.
- 2- El aumento de la tolerancia intrínseca *L. rhamnosus* CRL1505 a condiciones de estrés mejora la sobrevivencia de las células al proceso de secado por pulverización y su estabilidad durante el almacenamiento.

3- El polifosfato inorgánico producido intracelularmente por *L. rhamnosus* CRL1505 posee un efecto benéfico evidenciado en un modelo experimental murino de inflamación pulmonar aguda.

CAPÍTULO 1

Comportamiento de *L. rhamnosus* CRL1505 en medios de cultivo de base no láctea

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BL) son microorganismos exigentes desde el punto de vista nutricional. Los nutrientes esenciales para su desarrollo están disponibles en medios complejos que contienen carbohidratos fermentables (fuente de carbono y energía), fuentes de nitrógeno (peptonas, triptonas, extracto de carne y levadura) y estimulantes del crecimiento como Tween 80 y sales (Mg^{+2} , Mn^{+2}). Medios complejos como MRS (90) y LAPTg (91) son de uso habitual en el laboratorio para sustentar el crecimiento de BL. Sin embargo, su empleo no es factible a escala industrial por el costo elevado de algunos componentes, como extracto de levadura y peptona de carne (92). Por otro lado, a nivel de producción de biomasa bacteriana para su empleo en industria, se percibe una tendencia cada vez mayor a utilizar medios de cultivo con bajo o nulo contenido en derivados de origen animal como la leche, en vista del número creciente de personas con intolerancia a lactosa y alergias a proteínas lácteas. Esta tendencia responde también a nichos emergentes de mercado representado por consumidores vegetarianos y veganos que podrían acceder a productos funcionales con probióticos pero exentos de ingredientes de origen animal.

El medio de cultivo puede afectar el estado fisiológico de la biomasa microbiana obtenida en un biorreactor, el cual representa un factor clave en la tolerancia de las células a estrés derivado de los procesos tecnológicos previos a la comercialización del producto. Por ejemplo, congelamiento, compresión, secado por pulverización o liofilización, inclusión en matrices alimentarias, etc. En este sentido, la relativamente baja tolerancia de los probióticos a condiciones adversas (pH, temperatura, a_w , osmolaridad, oxidación, falta de nutrientes) es uno de los principales factores que limitan su comercialización bajo la forma de productos comerciales no lácteos. Los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento pueden estimular en las células la tolerancia a diversos factores de estrés mediante la expresión de proteínas de estrés o la acumulación intracelular de solutos compatibles, entre otras estrategias de supervivencia. Recientemente, algunos autores (70, 80-82) reportaron que la

acumulación citoplasmática de polifosfato inorgánico (*polyP*) en BL permite a las células tolerar condiciones de estrés. Los *polyP* son moléculas ubicuas en organismos vivos que consisten en cadenas lineales de unas pocas a cientos de moléculas de fosfato unidas por enlaces fosfoanhídridos (69, 93, 94).

En este capítulo se estudiaron algunos aspectos tecnológicos relacionados con la producción de biomasa del probiótico CRL1505 en un medio de cultivo de base no láctea, con miras a un escalamiento competitivo a nivel industrial. Durante los estudios se observó, por primera vez, la presencia de gránulos de *polyP* en el citoplasma de la cepa CRL1505. Estos polianiones fueron visualizados y semi-cuantificados utilizando diferentes procedimientos metodológicos. Asimismo, se determinó la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de *polyP* y se estudió la tolerancia intrínseca a condiciones de estrés de la cepa cultivada en este medio.

RESULTADOS

Para la producción del probiótico *L. rhamnosus* CRL1505 en la planta de I+D del CERELA se utiliza un medio de base láctea (denominado en esta tesis como MI+D) suplementado con una fuente adicional de azúcar, proteína, nitrógeno y sales, entre las que se incluye 9,2 g/L de fosfato inorgánico. En este trabajo, se tomaron los componentes de este medio de cultivo como base de una nueva formulación, en la que se reemplazó la leche por peptona de carne, evaluándose dos concentraciones: 0,5 % y 1,0 %. Se establecieron las condiciones de cultivo: pH libre, 37°C y 24 hs de incubación para la cosecha y determinación de la biomasa producida.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la producción de biomasa ($9,04 \pm 0,04$ log UFC/mL) en las dos concentraciones ensayadas, por lo que se seleccionó la menor concentración (0,5 %) a fin de reducir costos de producción. Este medio de cultivo se denominó MCM y se utilizó en ensayos posteriores.

En la **Figura 5** se muestra la cinética de crecimiento de *L. rhamnosus* CRL1505 en MCM. Se observa una fase de latencia de aproximadamente 3 hs y una fase exponencial de

crecimiento hasta las 14 hs, con una velocidad de crecimiento (μ_{\max}) de $0,30 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$. La biomasa obtenida fue $8,94 \pm 0,07 \text{ log UFC/mL}$ a las 20 hs, con un pH final de $3,80 \pm 0,04$.

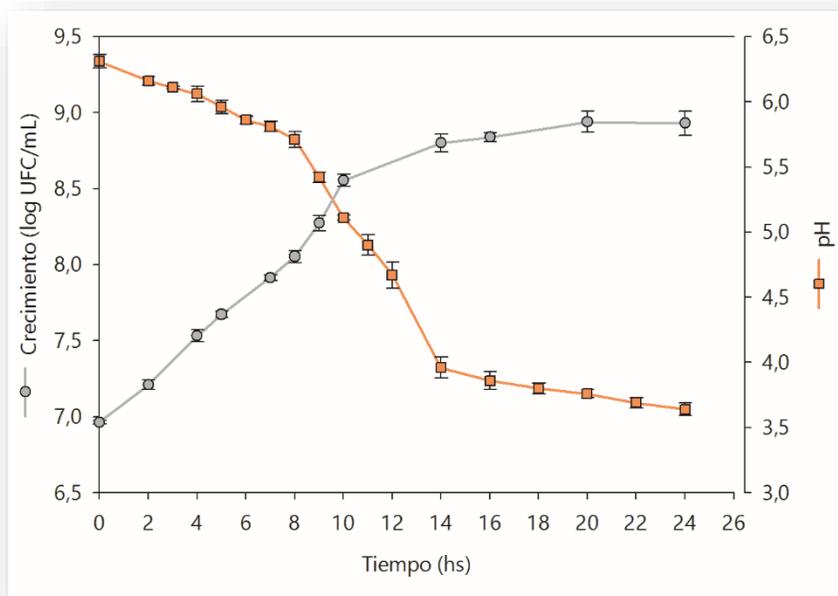


Figura 5. Crecimiento de *L. rhamnosus* CRL1505 en MCM a pH libre, 37°C y durante 24 hs.

Morfología de *L. rhamnosus* CRL1505

El medio de cultivo MCM contiene una concentración de fosfato inorgánico (Pi) significativamente superior (9,2 g/L) a la utilizada en los medios de cultivo convencionales para BL, como por ejemplo el medio MRS que tiene 2 g/L de Pi. En bacterias, la concentración de Pi presente en el medio puede estimular la acumulación de *polyP* en el citoplasma celular. En este sentido, se estudió la morfología del probiótico CRL1505 cultivado en medio MCM mediante técnicas de microscopías óptica (tinción de Neisser) y electrónica de transmisión (TEM).

La morfología característica de este microorganismo consiste en bacilos delgados, largos y "enrollados" (**Figura 6 a**). La tinción de Neisser, técnica de tinción específica para *polyP*, se basa en el uso del colorante básico azul de metileno que tiñe estos gránulos en bacterias (63, 70). La **Figura 6 b** muestra las células de *L. rhamnosus* CRL1505 teñidas con el reactivo de Neisser y observadas mediante microscopía óptica de inmersión. Los puntos azules de

mayor intensidad en el citoplasma celular corresponden a gránulos de *polyP* y ponen en evidencia la presencia de estas inclusiones en la cepa CRL1505.

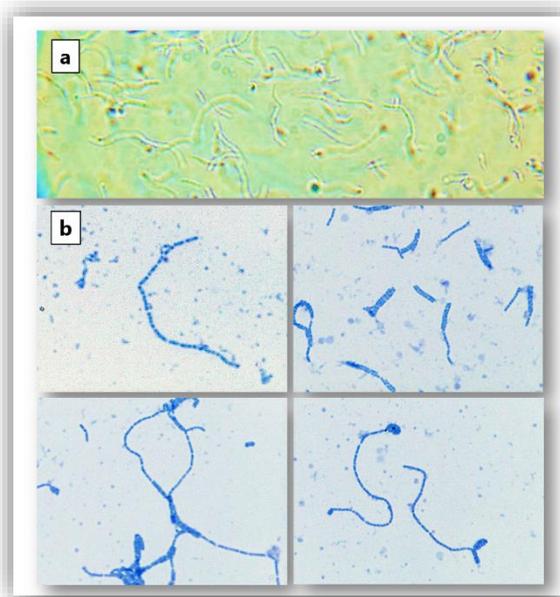


Figura 6. Micrografías ópticas de inmersión (100x) de *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM (pH libre, fase estacionaria, 37°C) sin (a) y con (b) tinción de Neisser

La presencia de los gránulos de *polyP* en el citoplasma de *L. rhamnosus* CRL1505 fue confirmada mediante TEM. En la mayoría de las células se observaron huecos circulares y ovales en el citoplasma, de diámetro aprox. 50-200 nm (**Figura 7**), característicos en bacterias que acumulan *polyP* (63, 70).

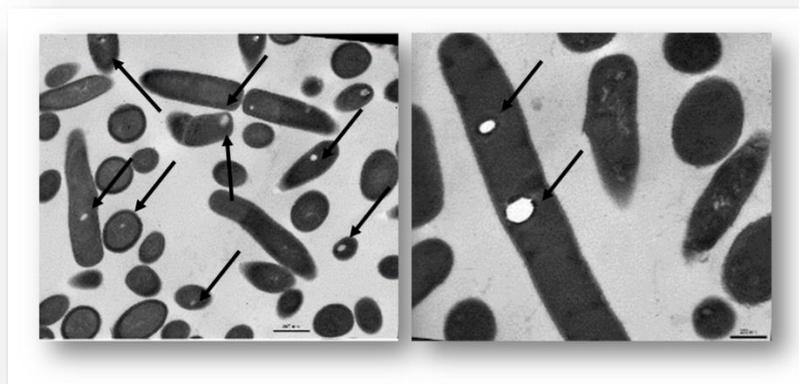


Figura 7. Micrografías electrónicas de transmisión de *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM a pH libre, 37°C y cosechado en fase estacionaria de crecimiento.

Acumulación de *polyP*

La acumulación de *polyP* por algunos géneros bacterianos, tanto Gram negativos como Gram positivos, es dependiente de la concentración de Pi del medio de cultivo (63, 70, 95). Para determinar si *L. rhamnosus* CRL1505 tenía un comportamiento similar a lo mencionado, se preparó el medio MCM sin adición de Pi [MCM(-)]. CRL1505 fue cultivada en ambas condiciones [MCM y MCM(-)] a fin de comparar parámetros de crecimiento, niveles de *polyP* y funcionalidad de los genes que codifican para las enzimas que participan en el metabolismo de este polianión.

El crecimiento (A_{600}) de CRL1505 en los medios MCM y MCM(-) fue similar ($p > 0,05$) luego de 20 hs de fermentación. Sin embargo, se observó un valor de μ_{\max} 1,3 veces mayor ($p < 0,05$) en los cultivos MCM comparado con los valores de μ_{\max} en MCM(-). Respecto al pH, no se observaron diferencias significativas luego de 20 hs de fermentación en los medios MCM y MCM(-), obteniéndose valores de $3,80 \pm 0,05$ y $3,84 \pm 0,22$, respectivamente. El recuento celular fue *ca.* 0,5 unidades logarítmicas (ULog) mayor ($p < 0,05$) en los cultivos MCM ($9,03 \pm 0,13$ log UFC/mL) respecto a MCM(-) ($8,68 \pm 0,18$ log UFC/mL).

Para la determinación del nivel de *polyP* acumulado se utilizó un método semi-cuantitativo basado en el uso de una sonda fluorescente (4',6-diamidino-2-fenilindol, DAPI) que se une al polianión formando un complejo con señal de emisión característica a 550 nm. Esta técnica

es utilizada en la bibliografía para la semi-cuantificación de *polyP* en bacterias Gram negativas (95, 96), por lo que fue necesario adaptarla para la cepa CRL1505 por tratarse de una bacteria Gram positiva. Así, las células cultivadas en MCM y cosechadas en fase estacionaria de crecimiento fueron permeabilizadas con dodecil sulfato sódico (SDS) y cloroformo para permitir el ingreso de la sonda fluorescente. Posteriormente, las células con la sonda se incubaron bajo agitación durante 20 min determinándose el espectro de emisión de fluorescencia a intervalos de 5 min. La **Figura 8** muestra los resultados obtenidos. Las células permeabilizadas emitieron un espectro de fluorescencia típico del complejo DAPI-*polyP* que manifiesta la presencia de este polianión en el citoplasma, mientras que las células no permeabilizadas y tratadas con DAPI mostraron una débil señal de fluorescencia. El tiempo de incubación se fijó en 15 min, ya que no se observó aumento de fluorescencia después de este periodo.

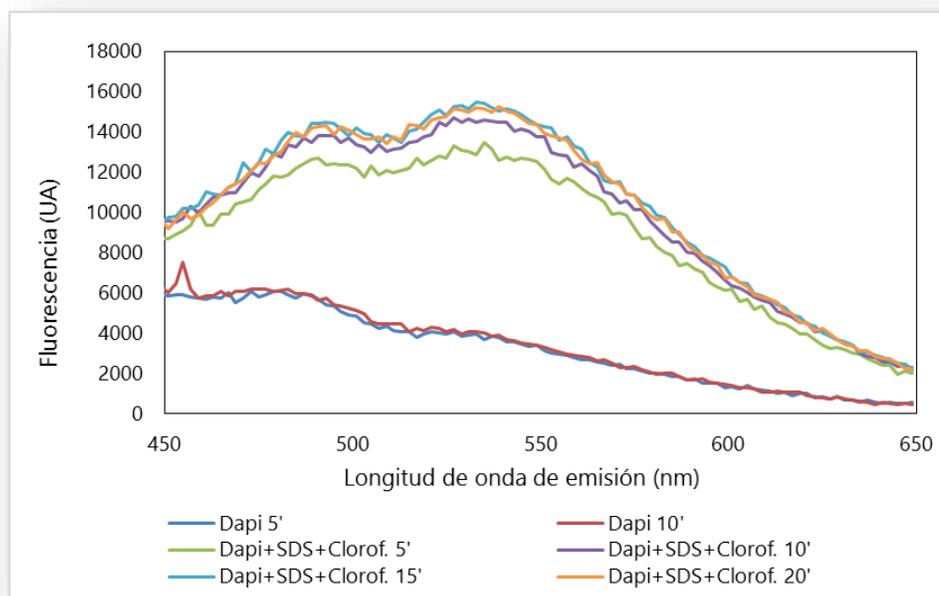


Figura 8. Espectros de emisión de fluorescencia del complejo DAPI-*polyP* en células de *L. rhamnosus* CRL1505 con distintos tratamientos de permeabilización. UA, unidades arbitrarias.

Una vez estandarizada la técnica con DAPI, se procedió a la semi-cuantificación de *polyP* en la cepa CRL1505 cultivada en MCM y MCM(-). Los resultados obtenidos se muestran en la

Figura 9. La emisión de fluorescencia de DAPI-*polyP* fue 2:1 UA (unidades arbitrarias) en los cultivos MCM respecto a los cultivos MCM(-). Como control negativo de fluorescencia se usó una cepa mutante *ppk* de *Escherichia (E.) coli* que no sintetiza *polyP*.

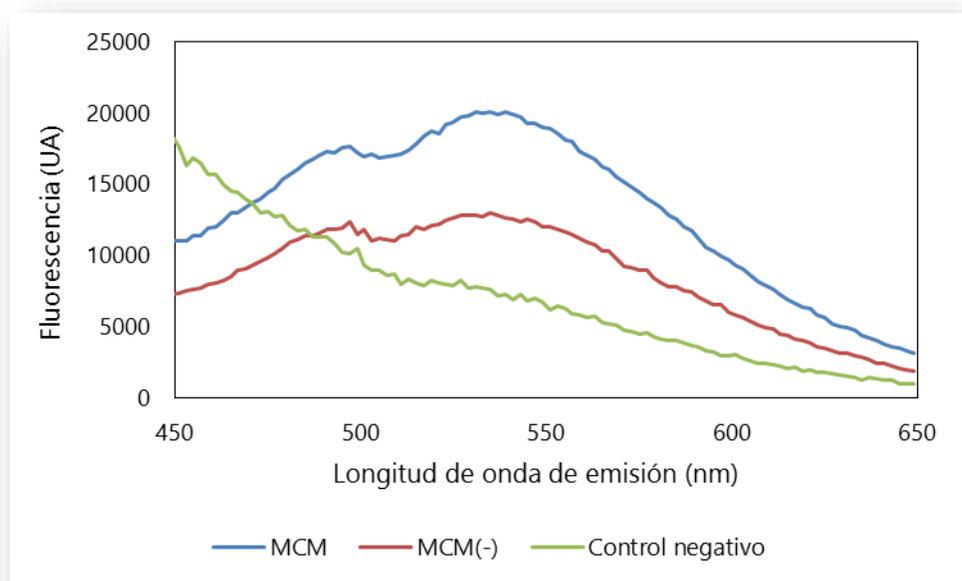


Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia del complejo DAPI-*polyP* en *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM y MCM(-). UA, unidades arbitrarias.

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se empleó para separar y visualizar el *polyP* presente en extractos intracelulares (EICs) de *L. rhamnosus* CRL1505 provenientes de ambos cultivos, MCM (EIC) y MCM(-) [EIC(-)]. Esta técnica utiliza azul de toluidina como colorante básico de tinción para polifosfato (70, 97-100). Se incluyó el análisis de los medios de cultivo estériles a fin de descartar interferencias con otros polianiones que pudieran ser detectados con azul de toluidina. Asimismo, se utilizaron los sobrenadantes [SBN y SBN(-)] de los cultivos respectivos para evaluar la presencia de *polyP* en el medio extracelular, de acuerdo a lo informado para *L. paracasei* JCM 1163(101).

En un primer ensayo se sembró únicamente el EIC proveniente del cultivo en MCM. Se emplearon geles de poliacrilamida al 8 % utilizando ADN plasmídico proveniente de una bacteria láctica como referencia de tamaño molecular. Luego del revelado del gel con azul

de toluidina se visualizó una banda definida en la zona inferior de la calle 1 correspondiente al EIC (**Figura 10**) lo que indicaría la presencia de un *polyP* de bajo peso molecular. También se observó una gran cantidad de muestra remanente en los pocillos de siembra que no ingresó al gel, al igual que lo ocurrido con el ADN plasmídico (calle 4).



Figura 10. Análisis por PAGE (8 %) de *polyP* proveniente de *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM (pH libre, fase estacionaria de crecimiento, 37°C). Calles: (1) EIC, (2) MCM, (3) SBN, (4) ADN.

En base a estos resultados, se utilizó una concentración menor (4 %) de poliacrilamida con el fin de aumentar el tamaño del poro y posibilitar el ingreso de la totalidad de la muestra al gel. En este caso se utilizó un estándar de *polyP* sintético de 45 residuos de fosfato (*polyP*-45; PM 4748 Da) como control y marcador de tamaño molecular. En general, los *polyP* no se resuelven en PAGE como una banda coloreada definida, como es el caso de las proteínas, sino en forma de una banda "arrastrada" a lo largo de la corrida. La **Figura 11** muestra la corrida electroforética del gel preparado al 4 %, donde se visualizan estas bandas en las calles 3 y 6, las cuales son características de *polyP* (70, 97-101). La banda obtenida en la calle correspondiente al EIC (calle 6) resultó mucho más intensa que la del EIC(-) (calle 3). No se observaron bandas en las calles correspondientes a los medios MCM y MCM(-), lo que permitió descartar interferencias de los medios de cultivo. La ausencia de bandas en los sobrenadantes de cultivo (calles 2 y 5) indica que el *polyP* permanece en el interior de las

células, lo que se observó en ambos geles (**Figuras 10 y 11**). El estándar de *polyP*-45 utilizado como marcador de peso molecular (calle 7) se ubicó en una zona inferior a la de las muestras de EICs, lo que sugiere que la longitud de cadena del *polyP* de CRL1505 sería mayor a 45 residuos de fosfato; es decir, este *polyP* tiene un PM superior a 4748 Da.

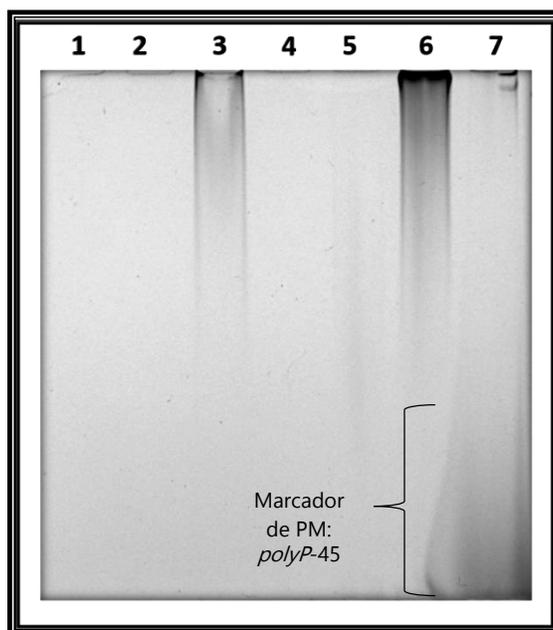


Figura 11. Análisis por PAGE (4 %) de *polyP* de *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM y MCM(-) (pH libre, 37°C, fase estacionaria de crecimiento). Calles: (1) MCM(-),(2) SBN(-), (3) EIC(-),(4) MCM, (5) SBN, (6) EIC, (7) *polyP*-45.

Los resultados obtenidos mostraron que *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM sin agregado de Pi (MCM-) acumuló *polyP*, lo que podría deberse a la presencia de trazas de Pi en extracto de levadura y peptona de carne, componentes del medio MCM y MCM(-). A fin de corroborar esta hipótesis, se determinó la concentración de Pi en ambos medios y en soluciones de extracto de levadura y peptona de carne con las concentraciones presentes en los medio de cultivo (1,0 % y 0,5 %, respectivamente). Se utilizó una técnica espectrofotométrica para la determinación de Pi. Los resultados se muestran en la **Figura 12**.

El medio MCM tiene una concentración de Pi de $8,12 \pm 2,21$ g/L y el medio MCM(-), $0,70 \pm 0,13$ g/L de Pi. Este valor es cercano a la suma de Pi correspondiente a las soluciones de

extracto de levadura y peptona ($0,64 \pm 0,17$ g/L), por lo que se asume que el Pi presente en MCM(-) proviene de estos componentes.

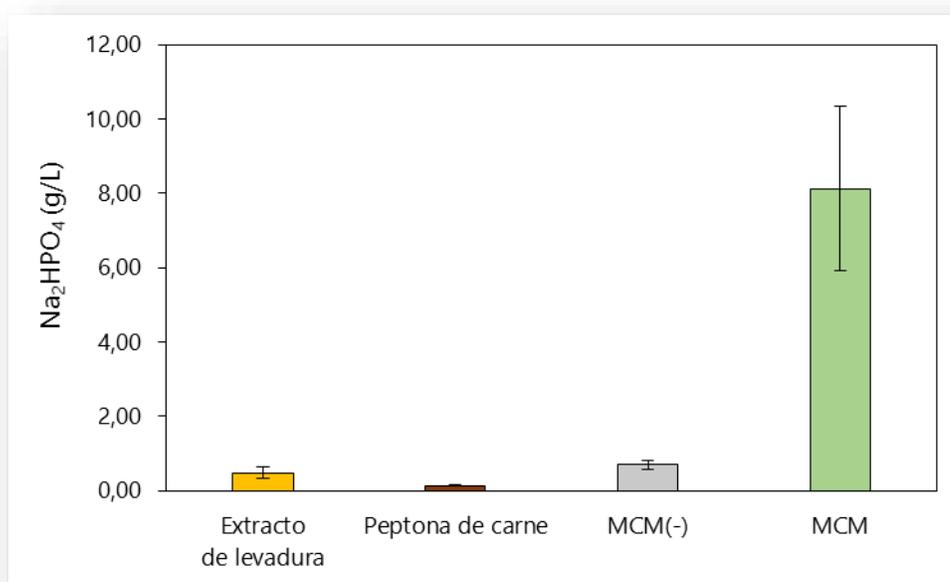


Figura 12. Concentración de fosfato soluble (Na_2HPO_4) en los medios de cultivo MCM, MCM(-) y en soluciones de peptona (0,5 %, p/v) y extracto de levadura (1,0 %, p/v).

Finalmente, se estudió la transcripción de los genes que codifican para las enzimas que participan en el metabolismo de *polyP* en BL: *ppk*, *ppx1* y *ppx2* (70), que codifican para una polifosfato quinasa (PPK) y dos exopolifosfatasa (PPX1 y PPX2, respectivamente). La enzima PPK es encargada de la reacción reversible de síntesis de *polyP* a partir de ATP mientras que la enzima PPX hidroliza *polyP* a partir de sus fosfatos terminales. El genoma de *L. rhamnosus* CRL1505 se encuentra actualmente secuenciado (102) por lo que fue posible corroborar que los genes (*ppk* de 898 pb, *ppx1* de 909 pb y *ppx2* de 881 pb) están presentes en esta cepa. En base a esta información se diseñaron tres pares de *primers* para evaluar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR), la funcionalidad de los genes mencionados en el probiótico CRL1505, cultivado en los medios MCM y MCM(-). Se utilizó como gen reportero de la transcripción, el ARNm (retrotranscripto) proveniente del gen 16s ARNr.

Los resultados mostraron que los tres genes fueron transcritos en ambas condiciones de cultivo, con una mayor intensidad de bandas (1,4 veces *ppx1*; ,5 veces *ppx2* 1 y 2 veces *ppk*) en el medio MCM (**Figura 13**). Estos resultados estuvieron en concordancia con los obtenidos por fluorescencia y PAGE, en los que se observaron mayores niveles de *polyP* en la condición MCM (**Figuras 9 y 11**).

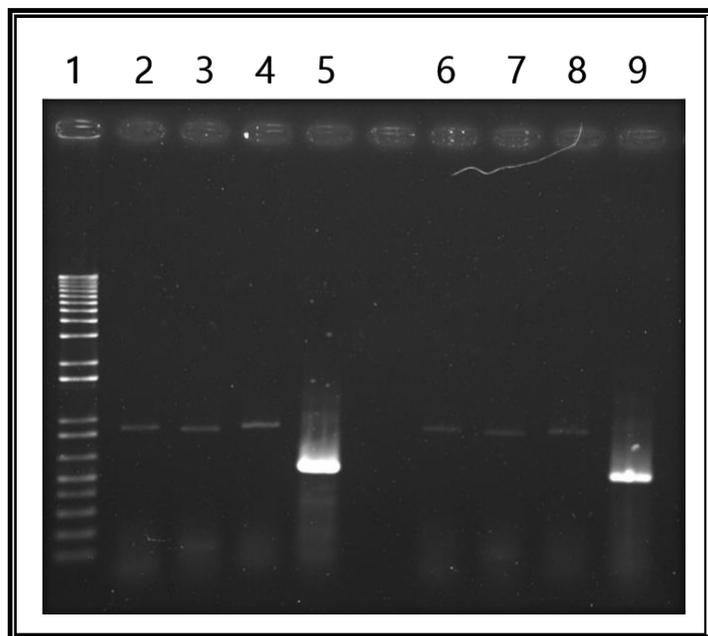


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación (~900 pb) de los genes *ppk*, *ppx1* y *ppx2* por RT-PCR en *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM (calles 2-5) y MCM(-) (calles 6-9). Calles: (1) Marcador de peso molecular, (2 y 6) *ppx1*, (3 y 7) *ppx2*, (4 y 8) *ppk*, (5 y 9) 16 S ARNr.

Tolerancia intrínseca a condiciones de estrés

Con el fin de evaluar el comportamiento de *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM frente a condiciones de estrés, se realizaron curvas de muerte de la cepa frente a diferentes estresores: temperatura, H₂O₂ y a_w (ajustada con glicerol). Las células cultivadas en MCM (pH libre, 37°C, fase estacionaria de crecimiento) fueron cosechadas, suspendidas en buffer fosfato de potasio (pH 7) y sometidas a las diferentes condiciones de estrés, determinándose la viabilidad celular post-desafío. La sobrevivencia celular se expresó como log N/Ni, donde N representa el recuento celular al tiempo final de desafío y Ni el recuento celular inicial, sin

exposición a estrés (**Figura 14**). Un control positivo de células mantenidas en buffer a 37°C sin adición de estresores se utilizó como control de la viabilidad inicial (Ni).

Frente a estrés térmico (50°C y 55°C) la viabilidad celular de CRL1505 se mantuvo constante durante el tiempo de desafío (20 min). A 60°C y 65 °C se observó una disminución de $2,24 \pm 0,56$ y $5,98 \pm 1,20$ log N/Ni, respectivamente a los 5 min de incubación, no detectándose células viables a 65°C luego de 20 min. Durante el primer minuto de exposición a 70°C las células murieron en su totalidad (**Figura 14 a**).

La cepa CRL1505 presentó una osmotolerancia intrínseca elevada en todas las condiciones de a_w evaluadas durante los 20 min de desafío (**Figura 14 b**). Similares resultados se observaron frente a estrés oxidativo, no observándose disminución de la viabilidad hasta una concentración de 0,10 % de H₂O₂ (**Figura 14 c**).

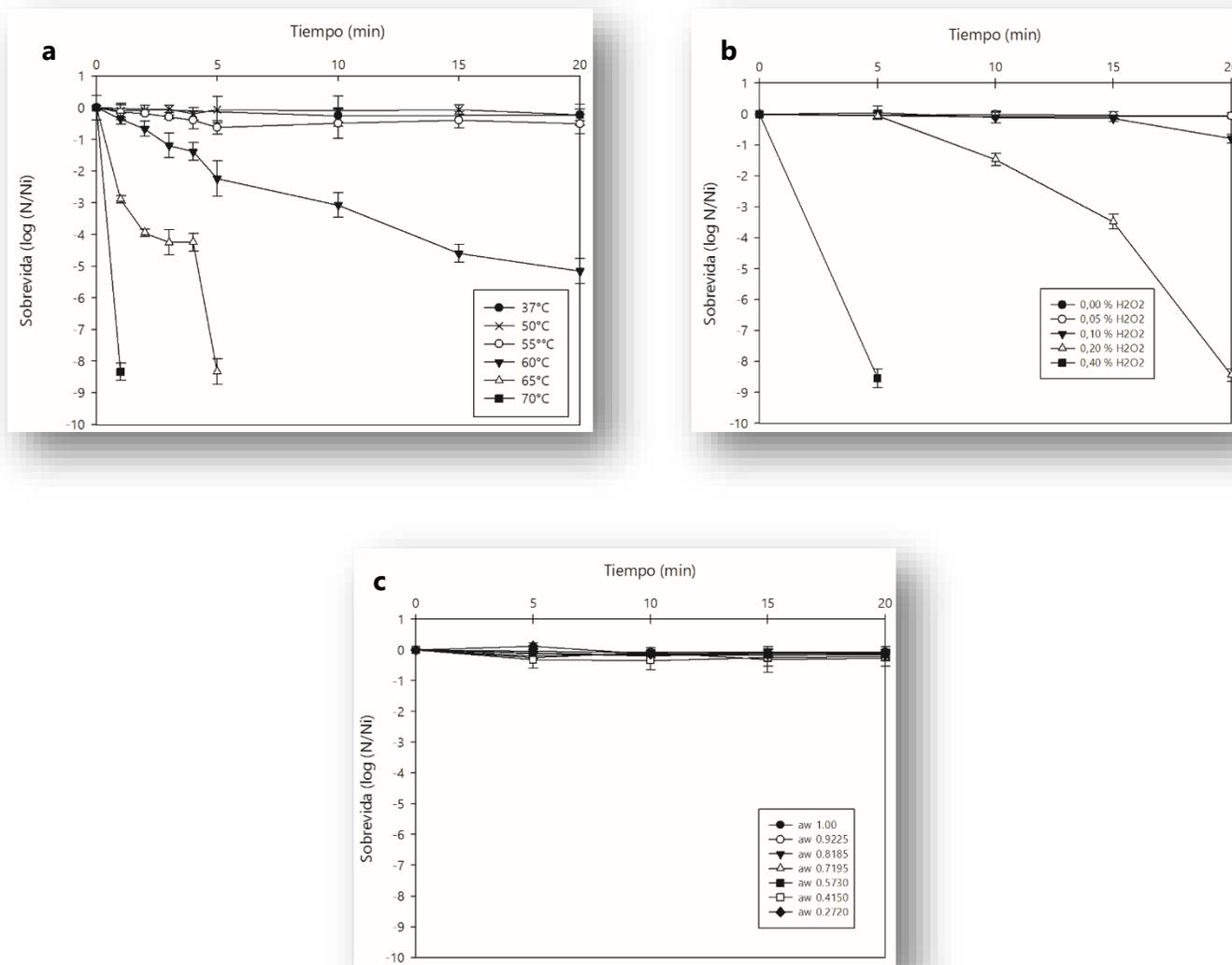


Figura 14. (a) Sobrevida (log N/Ni) de *L. rhamnosus* CRL1505 durante 20 min de tratamiento en buffer fosfato de potasio (pH 7) a diferentes temperaturas (37°C- 70°C); (b) Adicionado de H₂O₂ (0,05 %-0,40 %) o (c) Ajustado a diferentes valores de a_w (0,272-0,972).

En base a los resultados obtenidos, se establecieron las siguientes condiciones de estrés letal: *shock* térmico, 60°C/5 min; *shock* oxidativo, 0,20 % H₂O₂/10 min; *shock* osmótico, a_w 0,200/60 min, con una pérdida de viabilidad de al menos 1 ULog. Estas condiciones de *shock* se aplicaron para conocer el comportamiento de cultivos CRL1505 en el medio MCM(-) sin adición de Pi. Las células cultivadas en este medio (pH libre, 37°C, fase estacionaria) fueron cosechadas, suspendidas en buffer fosfato de potasio (pH 7) y sometidas a condiciones de *shock* térmico, osmótico y oxidativo previamente establecidas. La **Tabla 2** muestra los resultados comparativos de los cultivos MCM y MCM(-), observándose una mayor sobrevida a estrés en los cultivos MCM.

Tabla 2. Efecto del medio de cultivo en la tolerancia a estrés de *L rhamnosus* CRL1505. *Shock* térmico: 60°C, 5 min; *shock* osmótico: a_w 0,200; 60 min y *shock* oxidativo: 0,20 % H₂O₂, 10 min.

Cultivo	Sobrevida celular (log N/Ni)*		
	<i>Shock térmico</i>	<i>Shock osmótico</i>	<i>Shock oxidativo</i>
MCM	-2,24 ± 0,56 ^a	-0,70 ± 0,05 ^a	-1,00 ± 0,13 ^a
MCM(-)	-3,28 ± 0,30 ^b	-1,30 ± 0,23 ^b	-2,30 ± 0,34 ^b

*N=recuento celular a los 5 min de *shock*; Ni=recuento celular inicial. ^{a, b} Para cada estresor, datos con la misma letra en superíndice no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Para complementar el análisis de la sobrevida de CRL1505 frente a condiciones de estrés se utilizó la técnica de citometría de flujo en combinación con el kit *BD™ Cell Viability*. Esta técnica combina una doble tinción de las células para proporcionar información de parámetros funcionales; en este caso, la integridad de la membrana a través de la retención de naranja de tiazol (medida de la viabilidad celular) y la acumulación intracelular de yoduro de propidio (utilizado para medir el daño de membranas plasmáticas) (103). En este sentido, se utilizó esta metodología para comparar la integridad celular de cultivos MCM y MCM(-) después de su exposición a *shock*. Esta técnica no pudo utilizarse en los cultivos sometidos

a *shock* osmótico y oxidativo por inconvenientes técnicos derivados de la presencia de glicerol y H₂O₂.

Los resultados obtenidos para los cultivos sometidos a *shock* térmico se muestran en la **Figura 15**. En los *density plots* obtenidos del análisis de citometría de flujo, la población de bacterias se distribuyen en 3 regiones de acuerdo a su integridad de membrana: % células muertas, % células dañadas y % células vivas. Como control se utilizaron indistintamente células provenientes de cultivos en fase estacionaria, MCM o MCM(-), las cuales fueron mantenidas a 37°C durante 5 min (**Figura 15 a**). En este control se observa una población celular con un alto porcentaje de células vivas (49,1 %) y dañadas (21,5 %) conjuntamente con un bajo porcentaje de células muertas (2,7 %). Este perfil poblacional es característico de cultivos en fase estacionaria.

Una disminución en las células vivas y un aumento en las células muertas se observó cuando los cultivos CRL1505 en ambas condiciones [MCM y MCM(-)] fueron sometidos a *shock* térmico. La magnitud de los cambios en los porcentajes poblacionales dependió del medio de cultivo empleado. CRL1505 cultivada en MCM (alto contenido de *polyP*) y expuesta a *shock* térmico mostró un 50,4 % de células muertas (**Figura 15 b**), valor que ascendió a 85,9% para los cultivos en MCM(-) (bajo contenido de *polyP*) (**Figura 15 c**).

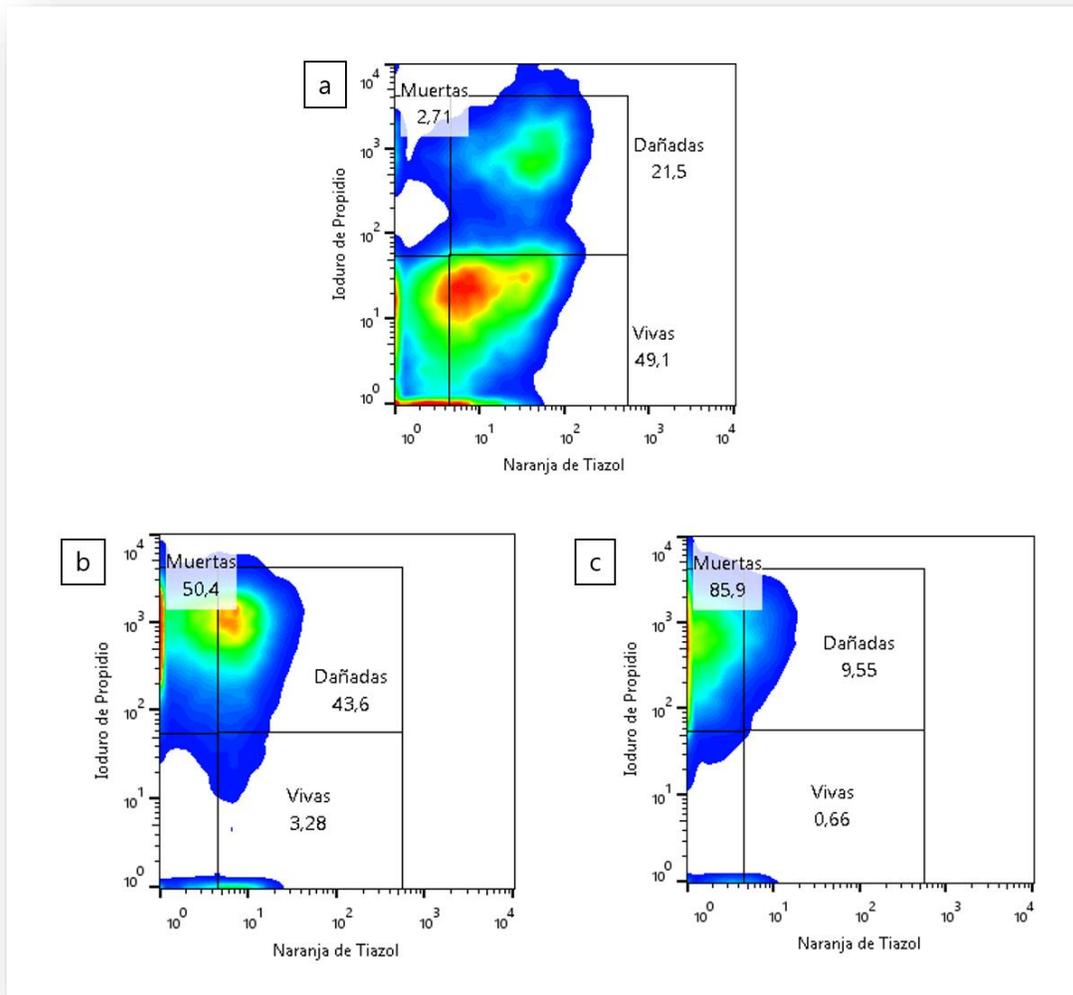


Figura 15. *Density plots* de *L. rhamnosus* CRL1505 cultivada en MCM y MCM(-) (pH libre, 37°C y fase estacionaria de crecimiento) y sometida a *shock* térmico. (a) Células mantenidas a 37°C durante 5 min; (b) Cultivos MCM después de 5 min de *shock* térmico (c) Cultivos MCM(-) después de 5 min de *shock* térmico.

Asimismo, a partir del análisis de citometría de flujo, pudieron observarse diferencias en el tamaño y complejidad de la población celular después del estrés térmico, por los cambios generados en la dispersión de la luz por poblaciones morfológicamente diferentes (**Figura 16**). Estos parámetros disminuyeron después del *shock* térmico, observándose una

población más compacta, con un *Forward Scatter* (FSC) menor respecto a células no estresadas.

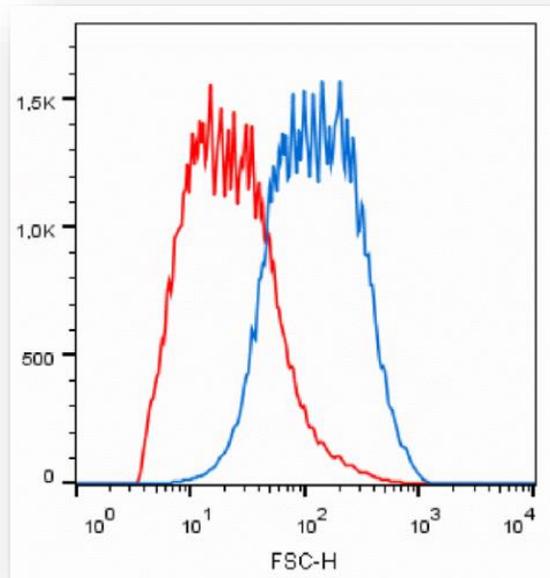


Figura 16. FSC-Histograma de dispersión (*Forward Scatter*) de células de *L. rhmanosus* CRL1505 suspendidas durante 5 min en buffer fosfato a 37°C (línea azul) y a 60°C (*shock* térmico, línea roja).

Estos resultados se corresponden con las observaciones de TEM. En la **Figura 17** puede observarse la estructura característica de células inalteradas, mantenidas a 37°C durante 5 min (**a**), en comparación con células sometidas a *shock* térmico (**b**) donde se destacan ciertas modificaciones a nivel estructural. En el citoplasma de las células control, sin tratamiento térmico, se observan vesículas membranosas (V) y ribosomas (R), los cuales desaparecieron después del *shock* térmico, al mismo tiempo que aparecieron fracturas (F) a nivel de la membrana plasmática (MP) y un citoplasma de apariencia granular (G) característico, probablemente debido a la precipitación de proteínas y otros componentes celulares durante el *shock* térmico. Por el contrario, la estructura de la pared celular (PC) se observa inalterada.

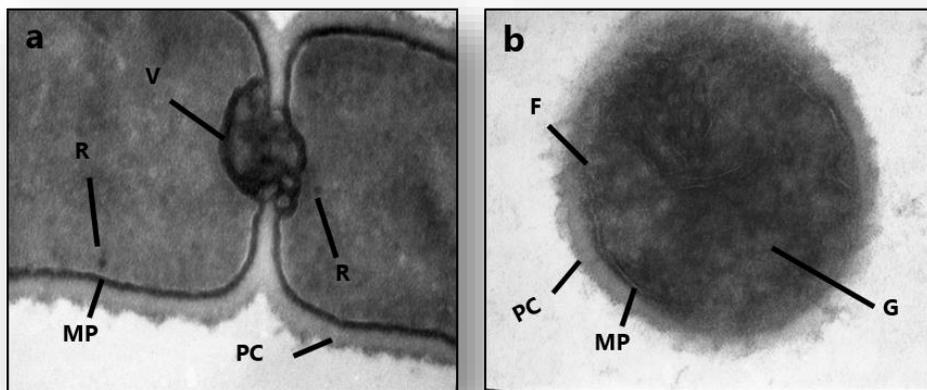


Figura 17. Micrografías electrónicas de transmisión de células de *L. rhamnosus* CRL1505. La cepa se mantuvo a 37°C durante 5 minutos (a) o fue expuesta a *shock* térmico (b). Magnificación de x 80,000.

DISCUSIÓN

Las actividades de I+D son necesarias para optimizar los resultados de laboratorio y ajustar las variables tecnológicas de un bioproceso, como etapa preliminar para un cambio de escala y eventual transferencia tecnológica. En este capítulo se evaluó el comportamiento del probiótico *L. rhamnosus* CRL1505 en un medio de base no láctea, reemplazando la leche por peptona de carne en su formulación. A la concentración de peptona usada (0,5 %) se obtuvieron resultados similares al medio original (MI+D): una producción de biomasa de *ca.* 9 log UFC/mL, con la ventaja de una metodología de preparación del medio de producción más simple al eliminar la leche de su formulación. Es conocido el efecto positivo de hidrolizados de proteínas, ampliamente usados a escala laboratorio, en el crecimiento de lactobacilos (104, 105). Sin embargo, estos compuestos representan un 70 % del costo total del medio de cultivo, lo que limita su empleo a mayor escala. La sustitución de leche (medio MI+D) por peptona de carne (medio MCM) significa un incremento de 1 USD por litro. Comparando con el medio MRS (uno de los más usados para el cultivo de lactobacilos) el precio de MCM es 5 veces menor (MRS, 13,9 USD/L).

El medio MCM, cuya concentración de Pi es significativamente mayor (3,6 veces) que la de los medios de cultivo convencionales para BL, induce la acumulación de gránulos de *polyP*

en la cepa CRL1505. La tinción específica de Neisser permitió visualizarlos al microscopio óptico por la metacromasia característica del polianión *polyP*, en concordancia con lo observado para otros lactobacilos (63, 70). En las micrografías obtenidas con TEM se observaron agujeros o *holes* en el citoplasma celular *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM, similar a lo informado por Huang (63) y Alcántara (70) en cepas de los géneros *Propionibacterium* y *Lactobacillus*, quienes los identificaron como inclusiones de *polyP*. Estas inclusiones se observan como gránulos electrodensos que se desvanecen bajo un haz de electrones. Debido a la preparación de las muestras para TEM como láminas muy delgadas, los gránulos de *polyP* citoplasmáticos son "arrancados" durante el corte dejando agujeros característicos (106, 107) como se observa en las imágenes de CRL1505 (**Figura 7**). El tamaño de los *holes* en este caso no superó los 200 nm, tamaño inferior al reportado para otros lactobacilos (> 500 nm) (70).

Para determinar los niveles de acumulación de *polyP* en *L. rhamnosus* CRL1505 se estandarizó y utilizó por primera vez en BL, una técnica semi-cuantitativa para bacterias Gram negativas (95), lo que constituye un aporte al estudio de estos biopolímeros en bacterias Gram positivas.

De acuerdo a los perfiles de corrida por PAGE, el principal *polyP* acumulado por *L. rhamnosus* CRL1505 tendría una longitud de cadena mayor a 45 residuos de fosfato y un PM que supera los 4748 Da, comparando con un *polyP* sintético usado como marcador de PM (4748 Da; 45 residuos de fosfato). Resultados similares fueron reportados por Saiki y col. (101) quienes determinaron que el tamaño del *polyP* acumulado por *L. paracasei* JCM 1163 fue aprox. de 700 residuos de fosfato. Por otro lado, en este microorganismo se ha comprobado la presencia de *polyP* en sobrenadantes de cultivo, aunque en cantidades hasta 1000 veces menor al contenido intracelular (101) Los autores sugieren a partir de estas evidencias, que el *polyP* no se excreta activamente sino que se filtraría al exterior de las células. En nuestros estudios, no se detectaron bandas de *polyP* en el sobrenadante de CRL1505.

En lactobacilos, la acumulación de *polyP* varía según la especie, la cepa y las condiciones de cultivo (70) siendo la presencia de fosfato inorgánico en el medio una condición necesaria para la acumulación del polianión. Schurig-Briccio y col. (95) informaron que *E. coli* cultivada

en un medio con una concentración de Pi mayor a 11,5 g/L acumulaba altos niveles de *polyP* durante la fase estacionaria. Resultados similares fueron reportados por Huang y col. (63) en *Propionibacterium (P.) freudenreichii* cultivada en suero de queso hiperconcentrado (11 g/L) comparado con suero de queso normal que contiene aprox. 1,8 g/L de Pi. Estos autores proponen que la acumulación de polifosfato es inducida osmóticamente y utilizada por *P. freudenreichii* como moléculas de almacenamiento de energía y soluto compatibles.

En *L. rhamnosus* CRL1505, la acumulación de *polyP* tiene una relación directa con la concentración de Pi del medio de cultivo. Así, en el medio MCM(-) el nivel de *polyP* disminuyó 38 % (UA) respecto a los niveles determinados en MCM (aprox. 14000 UA). Es interesante señalar que *L. rhamnosus* CRL1505 continúa acumulando *polyP* en el medio MCM (-) por no ser un medio libre de Pi ya que contiene pequeñas cantidades (0,70 g/L de Pi) provenientes de algunos componentes del medio, como peptona de carne y extracto de levadura. Esta concentración es *ca.* 12 veces menor que el medio MCM, cuya concentración de fosfato (9,2 g/L) es, a la vez, superior a la del medio MRS (2 g/L), de uso convencional para el crecimiento de BL. Alcántara y col. (70) también observaron mayor presencia de *polyP* en lactobacilos cultivados con 9 g/L de Pi (concentración similar a la de nuestro medio MCM) comparado con cultivos en MRS.

La acumulación de inclusiones de *polyP* en *L. rhamnosus* CRL1505 se correlacionó con la presencia del gen *ppk* en su genoma, lo que concuerda con otros autores que consideran la enzima polifosfato quinasa (PPK) como la principal involucrada en la síntesis de *polyP* (71). Los estudios preliminares sobre la regulación de la síntesis de *polyP* por fosfato fueron realizados mediante RT-PCR. La expresión del gen *ppk* fue 2 veces mayor ($p < 0.05$) en el medio MCM respecto a MCM(-), lo que explica los menores niveles de *polyP* detectados en este último. Gavigan y col. (108) también realizaron estudios acerca de la regulación por fosfato de la transcripción del gen *ppk* en *Acinetobacter baumannii*, sin embargo, en este microorganismo los transcriptos del gen *ppk* se detectaron en células en fase estacionaria cultivadas en condiciones limitantes de fosfato y no en condiciones con exceso de fosfato, a diferencia de los resultados obtenidos para CRL1505. En este caso, las enzimas responsables de la síntesis y degradación de *polyP* están codificadas por genes que forman

parte de un mismo operón, por lo que se piensa que la transcripción de estos genes se encuentra co-regulada, de acuerdo a los resultados obtenidos en la **Figura 13**. En CRL1505 podría existir una extra regulación de la enzima PPX que permite que la acumulación de *polyP* predomine sobre la degradación, como ocurre en *E. coli*, donde los genes *ppk* y *ppx* forman un mismo operón, por lo que no se espera una transcripción diferencial de los mismos (109). La síntesis y degradación de *polyP* en *E. coli* están reguladas por guanósina tetrafosfato (ppGpp) que interactúa con PPX inhibiendo su actividad. En este sentido, condiciones fisiológicas tales como el ayunado en aminoácidos, que aumenta el nivel de ppGpp, resultan en la acumulación de *polyP* mientras que niveles bajos de ppGpp, como ocurre durante el crecimiento exponencial, favorecen su hidrólisis, disminuyendo así la concentración intracelular (109).

La producción de probióticos como suplemento alimentario requiere de un nivel apropiado de células viables (110). Aunque se han detectado proteínas que regulan los mecanismos de tolerancia a ciertos factores de estrés, esta resistencia depende también de factores genéticos y ambientales, así como del estado fisiológico de la célula (55, 111). *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en medio MCM mostró una elevada osmo y oxi tolerancia, siendo la temperatura el factor de estrés con mayor impacto en la viabilidad celular. La tolerancia térmica de probióticos, generalmente cepa dependiente (55), es un factor importante para el secado por pulverización ya que determinará su supervivencia al proceso tecnológico (112). Por ello, la resistencia térmica de las BL destinadas a ser utilizadas como probióticos deshidratados es generalmente estudiada (113). Parente y col. (114) evaluaron la tolerancia de cepas de lactobacilos a diferentes condiciones de estrés y observaron que un tratamiento térmico de 55°C/15 min, produjo una reducción de 4 a 7 ULog en la población viable de la mayoría de las cepas. En contraste, Gardiner y col. (115) mostraron que temperaturas hasta 55°C no indujeron diferencias significativas en la resistencia térmica en cepas de lactobacilos, resultados similares al obtenido para *L. rhamnosus* CRL1505.

La membrana celular es el componente más susceptible a estrés térmico (43). Este daño puede examinarse con métodos directos como el análisis de citometría de flujo combinado con colorantes funcionales (116). Mediante esta metodología se visualizó un gran número

de células dañadas en CRL1505 luego de la exposición a *shock* térmico, las cuales podrían representar una población de células “viables no cultivables” (117-120). Esta población está constituida por células potencialmente funcionales que deben ser consideradas y no pueden visualizarse por recuento en placa. Además, recientes estudios sobre la cepa inmunobiótica CRL1505 revelaron que las células no viables (muertas por calor) o sus fracciones celulares (pared celular, peptidoglicano y exopolisacáridos) mantienen el efecto sobre el sistema inmune y podrían usarse como nuevos bioproductos inmunomoduladores (24, 121). Sin embargo, incluso cuando células dañadas puedan representar una fracción biológicamente activa y beneficiosa de la población microbiana, un alto número de células viables (aprox. 8 log UFC/mL) es importante para lograr el máximo efecto probiótico en el huésped (122).

Respecto a los resultados obtenidos frente a *shock* osmótico, la cepa CRL1505 mostró una osmotolerancia elevada a valores de a_w cercanos a 0,300 durante el tiempo establecido (20 min). Incluso utilizando 60 min de tratamiento osmótico, la cepa no mostró grandes pérdidas de viabilidad (datos no mostrados). Estos resultados podrían deberse a que el glicerol (usado en este trabajo para ajustar los valores de a_w) es un soluto compatible con CRL1505, a diferencia de NaCl, generalmente usado como estresor osmótico (114, 123). En general, los solutos compatibles son moléculas altamente solubles y no llevan una carga neta a pH fisiológico, por lo que pueden alcanzar altas concentraciones intracelulares sin alterar las funciones celulares vitales (124), como ocurre con las sales inorgánicas

La oxitolerancia es otro factor importante en bacterias lácticas a ser incluidas en alimentos, lo que puede estar ligado a enzimas como las peroxidasas y glutatión reductasas (114) o a un mecanismo de defensa basado en la producción de una pseudocatalasa conformada por *polyP* y Mn^{+2} , como lo descrito en *L. plantarum* (125). En el caso de CRL1505, la exposición a 0,10 % de peróxido de hidrógeno no afectó la viabilidad celular, a diferencia de lo informado para otras cepas de lactobacilos (pérdida de viabilidad de 4 a 8 ULog) en las mismas condiciones (114).

La función biológica principal de *polyP* en bacterias no está definida. Numerosos estudios informan diversas funciones del polianión en organismos eucariotas y bacterias Gram negativas, principalmente en *E. coli*, pero existen escasos estudios disponibles en bacterias

lácticas. Está comprobado que los *polyP* se relacionan con la sustitución de ATP en reacciones de quinasas y, para nuestro especial interés, con la adaptación fisiológica de las células para sobrevivir y crecer en entornos adversos (69). Alcántara y col. (70, 83) demostraron que una mutación del gen *ppk* en *L. casei* dio lugar a una disminución del crecimiento bajo una variedad de condiciones de estrés, con un efecto más pronunciado en estrés ácido y salino. Asimismo, en el trabajo recientemente publicado por este grupo (83) se informa también un aumento de la toxicidad por mercurio inorgánico [Hg (II)] y orgánico (CH₃Hg) en esta mutante *ppk* de *L. casei*. Los resultados de tolerancia a estrés térmico, oxidativo y osmótico obtenidos para *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en el medio MCM(-) sin agregado de Pi, permiten asumir que se requieren niveles de *polyP* mayores a 14000 UA (valor obtenido en este medio) para mejorar la tolerancia celular a estrés.

A partir de estos resultados se seleccionó el medio MCM para los posteriores estudios. Dado que la temperatura fue el estresor con mayor impacto en la viabilidad celular, en el **Capítulo 2** se presentan diversas estrategias para mejorar la tolerancia de CRL1505 a estrés térmico.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en este Capítulo permiten concluir que:

- ✚ *L. rhamnosus* CRL 1505 cultivado en el medio MCM conteniendo 0,5 % de peptona de carne en lugar de leche como fuente de proteína, alcanzó una biomasa aproximada de 9 log UFC/mL luego de 22 hs de fermentación, similar a la obtenida en el medio MI+D de base láctea.
- ✚ No se observaron diferencias significativas en el crecimiento (A_{600} y pH) de *L. rhamnosus* CRL1505 en los medios con (MCM) y sin [MCM(-)] adición de fosfato luego de 20 hs de incubación, aunque el recuento de células viables (log UFC/mL) fue 0,5 ULog mayor en el primero.
- ✚ *L. rhamnosus* CRL 1505 acumula en el citoplasma principalmente *polyP* de PM superior a 4748 Da.

- ✚ Existe una relación entre la concentración de fosfato del medio de cultivo, la acumulación de *polyP* y la tolerancia de *L. rhamnosus* CRL1505 a estrés térmico, osmótico y oxidativo.
- ✚ Los genes *ppx1*, *ppx2* y *ppk*, que codifican para las enzimas PPX1, PPX2 y PPK, respectivamente, involucradas en el metabolismo de *polyP*, se encuentran funcionales en *L. rhamnosus* CRL1505 en ambos medios de cultivo [MCM y MCM(-)], con una expresión mayor en MCM.

CAPÍTULO 2

Estrategias de optimización de la tolerancia a estrés térmico de *L. rhamnosus* CRL1505

INTRODUCCIÓN

La sobrevida de probióticos a condiciones adversas puede optimizarse considerando, entre otros factores, las condiciones de fermentación (61, 114, 126, 127) o el tratamiento de los cultivos a condiciones subletales de estrés químico y/o físico (112, 114, 127-129). A pesar de obtenerse en algunos casos resultados promisorios, la respuesta de las células probióticas a estas estrategias tecnológicas es cepa dependiente y debe ser evaluada.

A partir de los resultados obtenidos en el **Capítulo 1** se seleccionó el medio MCM para el cultivo de *L. rhamnosus* CRL1505. Estas condiciones de cultivo le otorgaron a la cepa CRL1505 osmo y oxi-tolerancia elevadas, siendo la temperatura el factor de estrés con mayor impacto en su viabilidad celular. En este **Capítulo 2** se evaluaron estrategias tecnológicas para mejorar la tolerancia del probiótico CRL1505 a *shock* térmico (60°C; 5 min), como los tratamientos subletales (térmico, oxidativo y osmótico) y la variación de las condiciones de fermentación (agitación, fase de crecimiento, pH).

RESULTADOS

Efecto de tratamientos subletales

En base a los resultados obtenidos (**Capítulo 1, Figura 14**) se establecieron las siguientes condiciones de estrés subletal:

- Estrés térmico subletal: 55°C/10 min.
- Estrés oxidativo subletal: 0,05 % H₂O₂/10 min.
- Estrés osmótico subletal: a_w 0,500/30 min.

El criterio de selección de estas condiciones subletales fue una pérdida de viabilidad celular de hasta 1 ULog después de cada tratamiento.

Así, *L. rhamnosus* CRL1505 fue expuesta a condiciones subletales de temperatura (factor de estrés homólogo) o de un factor de estrés heterólogo (protección cruzada, H₂O₂ y a_w) y posteriormente desafiada a *shock* térmico (60°C; 5 minutos). Como control se utilizó la

condición de *shock* térmico sin previo tratamiento subletal (tolerancia térmica aprox. -2 ULog)

Los tratamientos subletales evaluados no mejoraron la sobrevivida de la cepa a *shock* térmico, obteniéndose pérdidas de viabilidad similares al control sin tratamiento subletal (**Figura 18**).

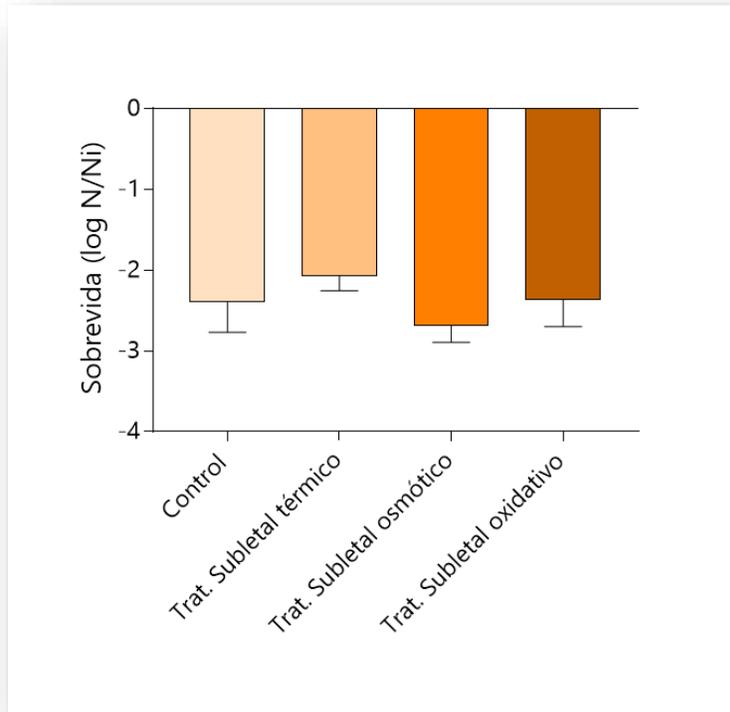


Figura 18. Sobrevida de cultivos de *L. rhamnosus* CRL1505 frente a *shock* térmico (60°C, 5 min). Los cultivos fueron expuestos directamente a *shock* (control) o primero a tratamientos subletales (térmico, osmótico y oxidativo). N: recuento de células a los 5 min de *shock* térmico; Ni: recuento de células inicial.

Efecto de las condiciones de fermentación

Agitación

Durante la fermentación microbiana, las células cultivadas bajo agitación crecen con una mejor disponibilidad de nutrientes lo que se traduce en un aumento en el rendimiento en biomasa (130, 131). Sin embargo, la agitación implica disolución de oxígeno en el medio de cultivo, lo que puede afectar positiva o negativamente la tolerancia de BL a estrés (132). En este sentido, se evaluó en primer lugar el efecto de la agitación (150 y 400 rpm) sobre la morfología, crecimiento y tolerancia térmica de la cepa CRL1505, para lo cual la cepa fue

cultivada en MCM a 37°C, pH libre, durante 24 hs, con y sin agitación. En la **Figura 19** pueden observarse las diferencias morfológicas de cultivos agitados: y estáticos: bacilos cortos y redondeados en el primer caso, y bacilos largos y enrutados característicos de CRL1505 durante el crecimiento estático.

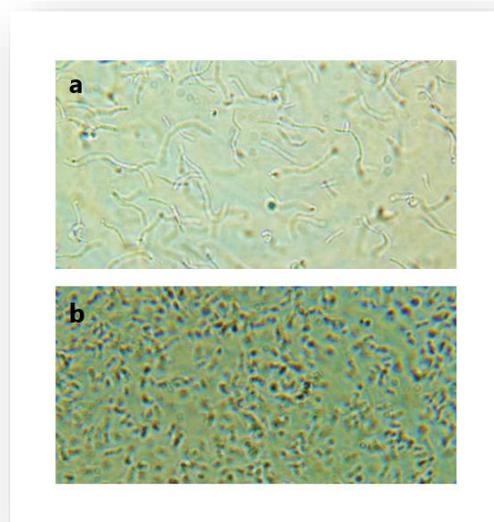


Figura 19. *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM a 37°C, pH libre, estático **(a)** y agitado (150, 400 rpm) **(b)**. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía óptica de inmersión (100x).

No se observaron diferencias ($p > 0,05$) en el crecimiento de CRL1505 en ambas condiciones luego de 24 hs de fermentación (**Tabla 3**) siendo ácido láctico el principal producto de fermentación. Bajo agitación la cepa produjo además ácido acético, fórmico y etanol, este último siendo detectado solamente a 400 rpm. La mayor producción (1,3 a 2 veces) se obtuvo a esta velocidad respecto a 150 rpm.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento y producción de metabolitos a las 24 hs de fermentación en *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM a pH libre, estático y bajo agitación (150 y 400 rpm).

Condición de cultivo	Parámetros de crecimiento			Metabolitos (g/L)			
	Crecimiento (log UFC/mL)*	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	pH*	Ác. láctico	Ác. acético	Ác. fórmico	Etanol
Estático	8,93 ± 0,15 ^a	0,30 ± 0,06 ^a	3,64 ± 0,07 ^a	10,28 ± 1,20 ^a	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>
150 rpm	8,86 ± 0,18 ^a	0,27 ± 0,07 ^a	3,69 ± 0,08 ^a	10,41 ± 0,80 ^b	0,26 ± 0,08 ^a	0,42 ± 0,07 ^a	<i>ND</i>
400 rpm	9,07 ± 0,10 ^a	0,37 ± 0,04 ^a	3,66 ± 0,05 ^a	10,66 ± 1,10 ^a	0,54 ± 0,10 ^b	0,56 ± 0,16 ^a	0,53 ± 0,19

ND = No detectado

a, b=Para cada columna, datos con diferente letra en superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A fin de determinar la formación de diacetilo/acetoína por la cepa CRL1505, se usó el método cualitativo de King (133) mediante el cual se visualiza un anillo de color fucsia (+) en el cultivo en presencia de estos compuestos de aroma. El resultado fue negativo para cultivos estáticos y positivo bajo agitación, a las dos r.p.m. ensayadas (**Figura 20**).

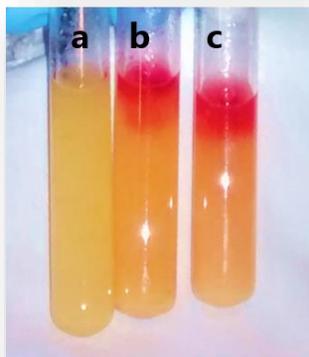


Figura 20. Producción diacetilo/acetoína en *L. rhamnosus* CRL1505 cultivado en MCM, 37°C, pH libre, estático (**a**), agitado a 150 rpm (**b**) o agitado a 400 rpm (**c**).

Finalmente, los cultivos estáticos y agitados (150 y 400 rpm) fueron cosechados en fase estacionaria de crecimiento y sometidos a *shock* térmico. La sobrevivencia frente a *shock* térmico de células crecidas bajo las condiciones de agitación fue mayor (-0,69 y -0,41 ULog, respectivamente) respecto a cultivos estáticos (-2,03 ULog; $p < 0,05$) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Efecto de la agitación sobre la sobrevivencia a *shock* térmico (60°C, 5 minutos) de *L. rhamnosus* CRL1505.

Condiciones de cultivo	Sobrevivencia a <i>shock</i> térmico (log N/Ni)*
Cultivo estático	-2,03 ± 0,15 ^a
150 rpm	-0,69 ± 0,25 ^b
400 rpm	-0,41 ± 0,08 ^b

*N=recuento celular a los 5 min de *shock*; Ni=recuento celular inicial

a, b=Datos con diferente letra en superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fase de crecimiento y pH de cultivo

A partir de los resultados obtenidos, se continuó trabajando bajo condiciones de agitación (150 rpm) y se evaluó el efecto del pH (libre o controlado) y la fase de crecimiento (exponencial o estacionaria) sobre la resistencia a *shock* térmico de *L. rhamnosus* CRL1505. La cepa fue cultivada en bioreactores (2 L; 150 rpm) en el medio MCM a pH libre o controlado (5,5 y 6,0) y se determinaron parámetros de crecimiento (A_{600} , pH, viabilidad por recuento en placa y citometría de flujo). Para evaluar la tolerancia térmica, las células fueron cosechadas en fase exponencial media o estacionaria de crecimiento (24 hs). Se consideró fase exponencial media como el punto medio (hs) entre el inicio y el final de dicha fase, el cual fue diferente según la condición de pH de crecimiento. Estos cultivos fueron sometidos a *shock* térmico utilizando buffer fosfato como medio de *shock*. En la **Figura 21** se muestran los resultados obtenidos. A pH libre, la fase de latencia fue de unas 4 hs, punto de inicio de la fase exponencial, la cual se desarrolló con una μ_{\max} de $0,17 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$. La fase estacionaria comenzó a las 16 hs de fermentación obteniéndose el máximo recuento celular ($9,0 \pm 0,2 \text{ log UFC/mL}$) (**Figura 21 a**). A pH controlado se observó una cinética de crecimiento diferente: a pH 5,5, la fase de latencia fue muy extensa (10 hs) y la fase exponencial transcurrió hasta las 24 hs, con una μ_{\max} de $0,30 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$. En este punto la cepa comenzó la fase estacionaria de crecimiento y el recuento celular máximo alcanzado fue de $9,4 \pm 0,2 \text{ log UFC/mL}$ (**Figura 21 b**). El comportamiento de CRL1505 a pH 6,0 fue similar a pH 5,5 (**Figura 21 c**).

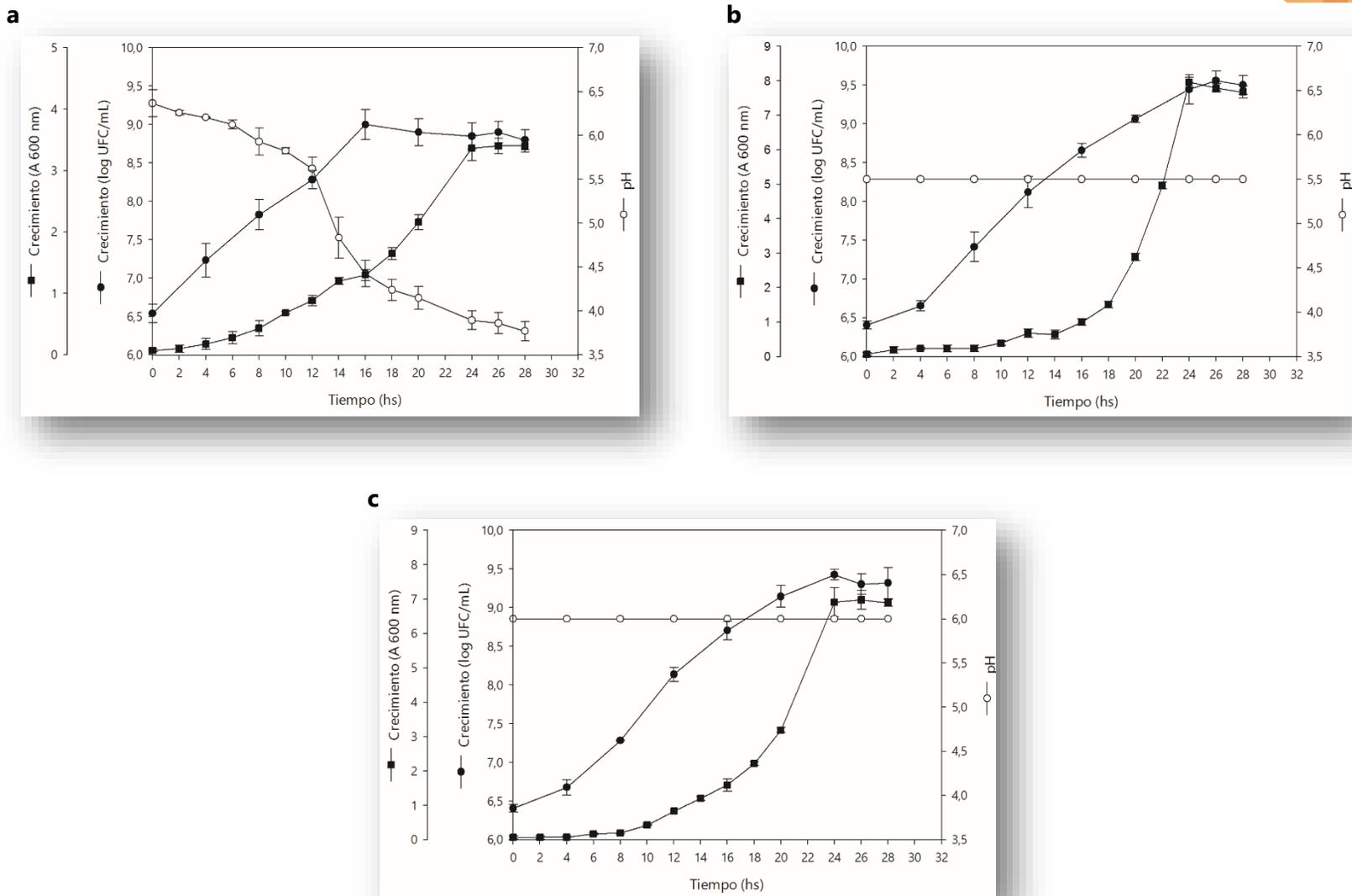


Figura 21. (a) Crecimiento de *L. rhamnosus* CRL1505 en MCM a 37°C a pH libre, (b) pH 5,5 y (c) pH 6,0.

A partir de estos resultados, se cosechó la biomasa en fase exponencial media y estacionaria de crecimiento para cuantificar los niveles de *polyP* en todas las condiciones de pH y evaluar la tolerancia a *shock* térmico de la cepa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 22**. Los niveles de *polyP* acumulados en fase exponencial de crecimiento a pH libre y pH 5,5 (17.830 y 14.453 UA, respectivamente) fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) respecto a fase estacionaria (10.98 y 9.702 UA, respectivamente); mientras que a pH 6,0 se obtuvieron los más bajos niveles de *polyP* (aprox. 8.600 UA) independientemente de la fase de crecimiento.

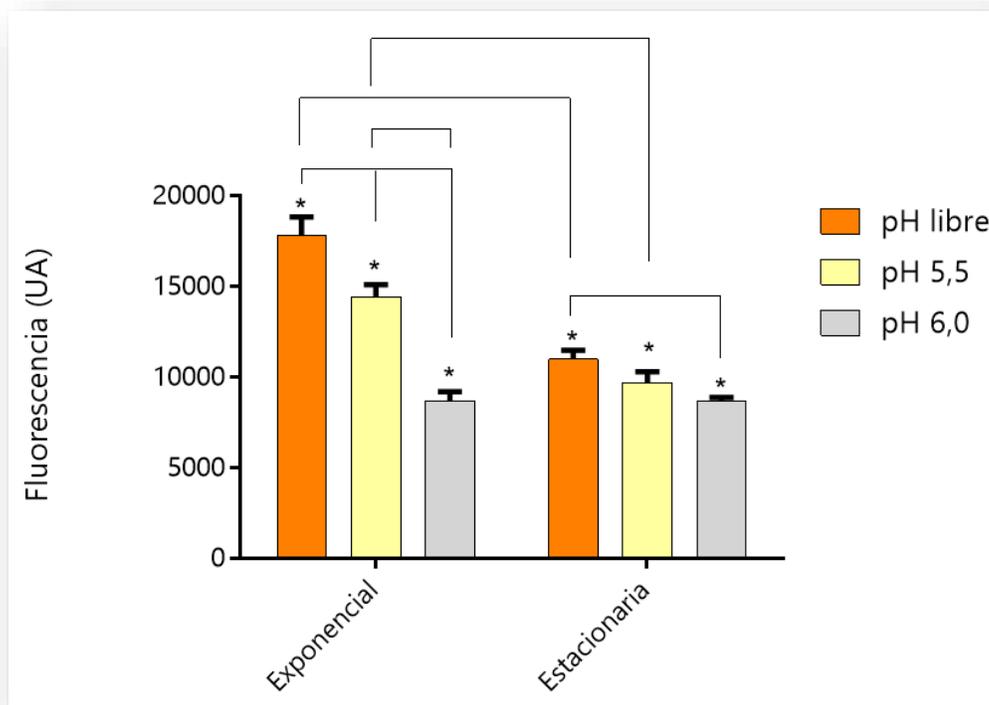


Figura 22. Niveles de *polyP* acumulados por *L. rhamnosus* CRL 1505 en fase exponencial y estacionaria de crecimiento cultivado a pH libre y controlado (5,5 y 6,0). UA, unidades arbitrarias.

En la **Figura 23** se muestra el efecto del pH de cultivo y la fase de crecimiento en la tolerancia de la cepa CRL1505 frente a *shock* térmico. La termotolerancia fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en fase exponencial que en fase estacionaria a pH libre y pH 5,5, en concordancia

con los mayores niveles de *polyP* acumulados. A pH 6,0, se produjo una mayor pérdida de viabilidad.

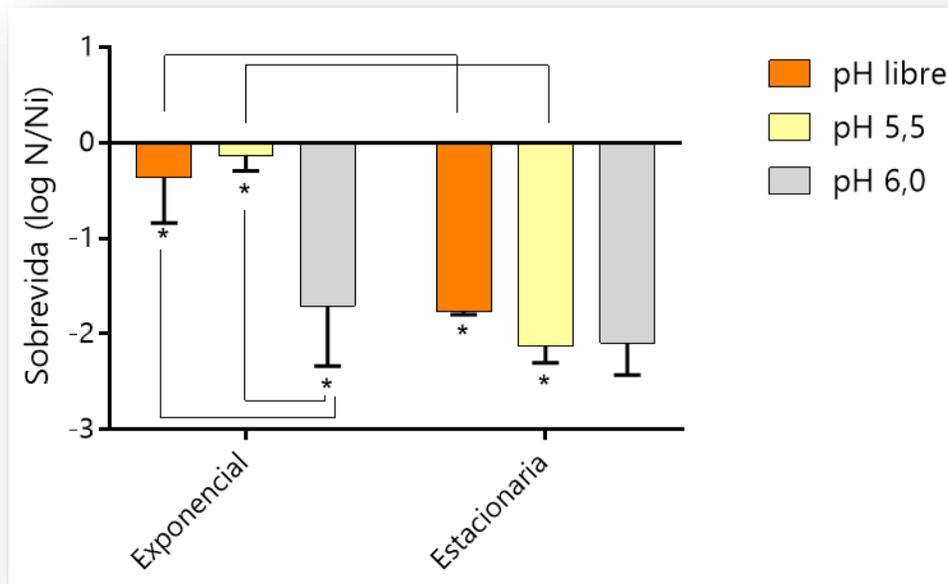


Figura 23. Sobrevida (log N/Ni) a *shock* térmico de *L. rhamnosus* CRL 1505 en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, cultivado bajo a pH libre y controlado (5,5 y 6,0).

Los eventuales cambios en la integridad celular de la cepa CRL1505 sometida a *shock* térmico se evaluaron mediante citometría de flujo. En la **Figura 24** se muestra los *density plots* obtenidos. En todos los casos el *shock* térmico produjo una disminución en la población de células vivas y un aumento de células dañadas y muertas. La magnitud de estos cambios dependió del estado fisiológico de la bacteria (fase de crecimiento) y el pH de cultivo.

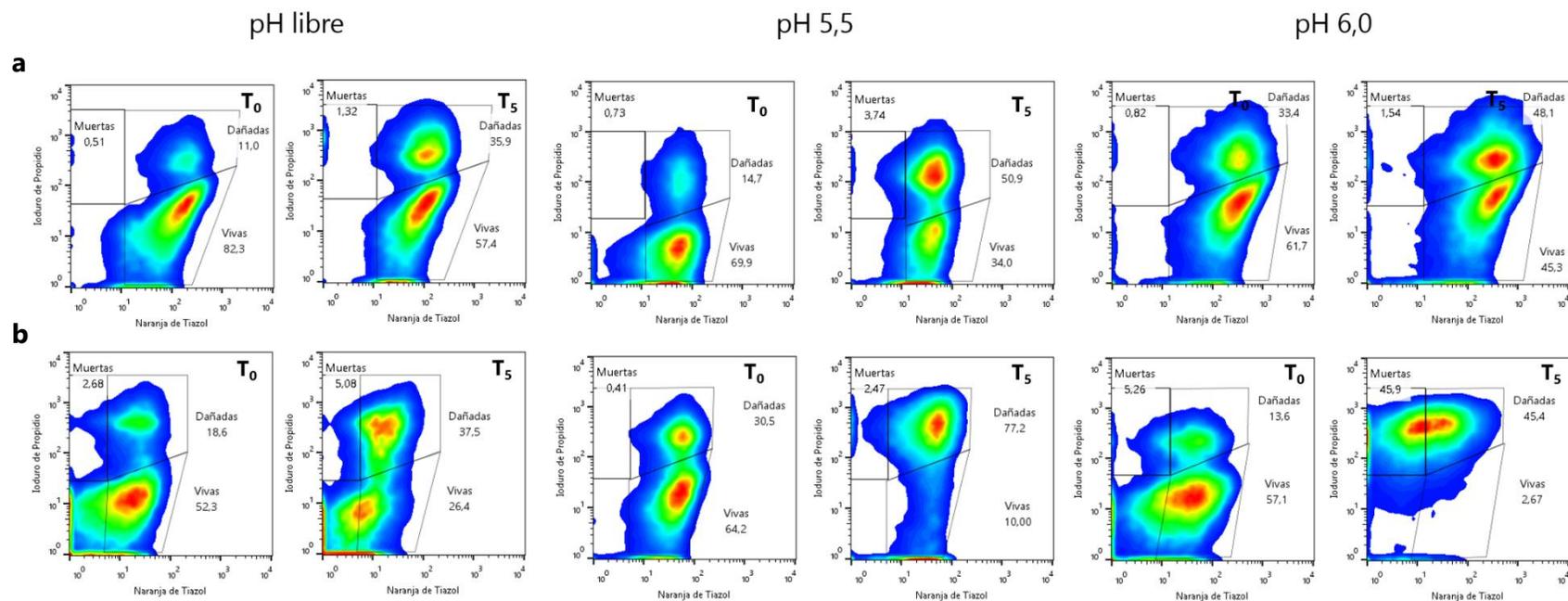


Figura 24. *Density plots* (% de células vivas, muertas y dañadas) de *L. rhamnosus* CRL1505 antes (T_0) y después (T_5) de *shock* térmico. La cepa fue cultivada en MCM a 37°C, bajo diferentes condiciones de pH (libre; 5,5 o 6,0) y cosechada en fase exponencial (a) o estacionaria.

En fase exponencial se observó un mayor porcentaje de células vivas respecto a fase estacionaria, excepto a pH 5,5 donde no se manifestó esta disminución. Frente a *shock* térmico, la biomasa en fase exponencial mostró mayor tolerancia térmica, manifestada por una menor reducción en la población de células vivas a los 5 min de *shock* (T_5), independientemente del pH de cultivo. Por ejemplo, considerando la diferencia en el porcentaje de células vivas antes y después de *shock* (entre T_0 y T_5 en relación a la **Figura 24**), a pH 5,5 en fase exponencial esta población se redujo un 35,9 %, mientras que en fase estacionaria la disminución fue del 54,2 %.

Respecto al pH de cultivo y su efecto sobre la tolerancia térmica de las células, los cultivos a pH 6,0 cosechados en fase estacionaria fueron los más sensibles al calor, ya que *ca.* el 50% de la población de células estaba muerta después del *shock* (**Figura 24**). Por el contrario, cultivos a pH libre y 5,50 en fase estacionaria mostraron una mayor tolerancia, obteniéndose los mejores resultados a pH libre (células vivas a T_5 26.4 %) respecto a pH 5.5 (células vivas a T_5 10 %) (**Figura 24**). En este caso, la disminución de células vivas entre T_0 y T_5 fue de 25,9 % y 54 %, respectivamente.

DISCUSIÓN

En el Capítulo anterior se estudió la tolerancia intrínseca del probiótico *L. rhamnosus* CRL1505 a condiciones de estrés oxidativo, térmico y osmótico, siendo el factor temperatura el que ocasionó mayores pérdidas de viabilidad. En probióticos, la resistencia intrínseca al calor es un factor importante para el secado por pulverización ya que determina la supervivencia a este proceso tecnológico. Estudios previos informan que cepas de BL de la misma especie o de especies relacionadas presentan diferente resistencia a altas temperaturas (134) y, por lo tanto, diferente sobrevivencia al proceso de secado por pulverización (135). En este sentido, es importante conocer el comportamiento de la cepa de nuestro interés frente a la temperatura y evaluar las posibles estrategias tecnológicas que contribuyan a optimizar su tolerancia a estrés térmico.

Las BL responden a cambios en su entorno inmediato mediante una reprogramación metabólica que conduce a un estado celular de mayor tolerancia a los mismos (55, 136). Estos sistemas de defensa se pueden dividir en dos clases; la primera comprende un sistema específico inducido por una dosis subletal de un estrés químico o físico, que permite la supervivencia frente a una dosis mayor del mismo agente (137, 138). La segunda clase de resistencia comprende sistemas más generales que preparan a las células para sobrevivir frente diferentes factores de estrés ambiental sin necesidad de exposición previa a un factor de estrés específico (114, 126, 136, 139). Con el objeto de evaluar estas posibilidades, *L. rhamnosus* CRL1505 se sometió a dosis subletales de temperatura (55°C, 10 min), H₂O₂ (0,05 %, 10 min) y a_w (0,500, 30 min) previo a la exposición a *shock* térmico (60°C, 5 min). Estos tratamientos subletales (homólogo o heterólogo) no indujeron en CRL1505 mayor tolerancia frente a *shock* térmico, a diferencia de lo informado para *L. casei* Nad y *L. plantarum* 8329 (112) y *L. paracasei* NFBC 338 (140). Este último lactobacilo adaptado a estrés por calor (52°C, 15 min) sobrevivió 300 veces mejor que el control no adaptado cuando se expuso a *shock* térmico (60°C, 10 min) en MRS.

Contrario al efecto de tratamientos subletales en CRL1505, la agitación mejoró la respuesta a *shock* térmico, obteniéndose una mayor sobrevivencia de la biomasa en cultivos agitados respecto a cultivos estáticos.

Los cultivos lácticos son producidos a gran escala utilizando bioreactores en los cuales la agitación es indispensable para mantener el cultivo en suspensión. En este estudio se evaluó en primer lugar el efecto de la agitación sobre la morfología celular, crecimiento y tolerancia térmica de CRL1505. Se observaron cambios en la morfología de las células, de bacilos largos y delgados a bacilos cortos y redondeados en respuesta a la agitación del medio de cultivo. Este pleomorfismo se describió para diferentes lactobacilos y también estuvo relacionado con las condiciones de cultivo y el medio de crecimiento (141-144). Asimismo, se ha informado que bacilos cortos son más estables en procesos industrialmente relevantes, como fue demostrado para *L. acidophilus* NCFM (145).

La agitación genera una mejor distribución de nutrientes a través del tanque de fermentación logrando un microambiente más homogéneo para los microorganismos (146),

pero también favorece la disolución de oxígeno en el medio de cultivo habiéndose observado un efecto negativo sobre el crecimiento de estas bacterias (56) que no lo requieren. La toxicidad del oxígeno se atribuye a especies reactivas como O^{-2} (ión superóxido) y OH_r (radical hidroxilo) que atacan a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que constituye una de las principales causas del envejecimiento y muerte celular (56). En este trabajo de tesis, la agitación del cultivo (150 rpm o 400 rpm) no afectó los parámetros de crecimiento de *L. rhamnosus* CRL1505 en comparación con el cultivo estático. Este comportamiento oxitolerante se vio también reflejado en los resultados del **Capítulo 1** donde se puso de manifiesto la tolerancia elevada de la cepa CRL1505 frente a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Similares resultados fueron hallados por Iannello y col. (147) quienes demostraron que la $u_{máx}$ de *L. rhamnosus* N132 era similar en condiciones de crecimiento estático y aeróbicas.

L. rhamnosus CRL1505 tiene un metabolismo heterofermentativo facultativo. En presencia de glucosa y ausencia de oxígeno produce principalmente ácido láctico a partir de piruvato y por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH); sin embargo, puede emplear vías alternativas según condiciones de cultivo o en presencia de otra fuente de carbono (1, 148). Existen en la literatura diversos estudios acerca del efecto del oxígeno en la producción de ácidos orgánicos por BL (56, 131, 132) y su incidencia en el destino del piruvato. Este efecto puede ser directo, mediado por la enzima piruvato oxidasa, o indirecto través de reacciones con las enzimas NADH oxidasas donde actúa como aceptor externo de electrones regenerando NAD^+ necesario para la glicólisis (1). En el caso de BL homofermentativas cultivadas en presencia de oxígeno, estas enzimas compiten eficientemente con la enzima LDH lo que lleva, además la producción de ácido láctico, a un excedente de piruvato disponible para el metabolismo mediante la vía diacetilo/acetoína (1). La presencia de estos compuestos de aroma fue detectada en los cultivos de CRL1505 bajo agitación. En BL heterofermentativas obligadas las NADH oxidasas no compiten con la LDH sino con la acetaldehído deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa, enzimas de la "rama" de etanol en la vía del 6-Fosfo-Gluconato (6-PG)/PK (1). La cepa CRL1505 mostró cambios en sus vías metabólicas según las condiciones de cultivo, produciendo como producto principal

únicamente ácido láctico (cultivo estático) y también acético, fórmico y etanol bajo agitación, poniendo en evidencia la activación de diferentes vías metabólicas como se muestra en la **Figura 25**.

Por su metabolismo, las BL producen ácido láctico (de allí la denominación del grupo) que provoca un descenso del pH del medio de cultivo y un posible efecto negativo en la viabilidad celular, a pesar de su capacidad de crecer en un amplio rango de pH, 3,5 a 6,5 (149, 150). Así, las fermentaciones a pH controlado resultan una alternativa útil para evitar esta limitación y mejorar el rendimiento en biomasa (151). En el caso de CRL1505 se observó un aumento significativo de biomasa (0,4 ULog, $p < 0,05$) y de la A_{600nm} en condiciones controladas de pH, similar a lo informado por Polak-Berecka y col. (152) para *L. rhamnosus* E/N y en otras BL como *Enterococcus faecium* CRL1943 y *Leuconostoc citreum* CRL1945 (153). Resultados diferentes se obtuvieron sin embargo, para *L. bulgaricus* Q7 donde la tasa de crecimiento promedio y la biomasa final fueron mayores en cultivos de pH libre (154).

Para la producción industrial de probióticos, las células son recolectadas comúnmente durante fase estacionaria de crecimiento con el fin de obtener un mayor rendimiento (155). Algunos trabajos (56, 114, 127, 156) indican que las BL muestran una mayor tolerancia a estrés en esta fase debido a la síntesis de proteínas de estrés cuya expresión es inducida por el agotamiento de nutrientes y/o los productos que acumulados en el medio de cultivo. En contraste, *L. rhamnosus* CRL1505 mostró mayor resistencia térmica en fase exponencial. Resultados similares fueron reportados por Zotta y col. (156) para algunas cepas de BL del Género *Streptococcus* frente a estrés térmico, oxidativo y osmótico.

En nuestro caso, la mayor tolerancia de CRL1505 a *shock térmico* fue observada en fase exponencial, cultivos a pH libre y controlado 5,5, lo que se vio reflejado en la integridad celular y en la menor pérdida de viabilidad post-*shock*. Estos resultados estarían relacionados con el mayor nivel *polyP* intracelular acumulado en esta etapa de crecimiento, similar a lo reportado para bacterias Gram negativas como *E. coli*, (95). Según revisión bibliográfica concerniente a la acumulación de *polyP* en BL, este es el primer estudio realizado en fase exponencial.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron las siguientes condiciones de cultivo para estudiar **(Capítulo 3)** el comportamiento de *L. rhamnosus* CRL1505 frente al proceso de secado por pulverización: medio MCM, agitación (150 rpm), pH libre y fase estacionaria (20 hs). Se descartó la cosecha en fase exponencial, a pesar de las ventajas en cuanto a integridad celular, acumulación de *polyP* y respuesta a *shock* térmico, debido a que el recuento celular fue insuficiente para el proceso de secado. La elección de pH libre se basó en la reducción de costos, considerando que el comportamiento de la cepa a pH libre y pH 5,5 fue similar.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en este Capítulo permiten concluir que:

✚ Los tratamientos subletales (térmico, osmótico y oxidativo) no mejoraron la sobrevivencia de *L. rhamnosus* CRL 1505 a *shock* térmico. Por el contrario, sí lo hizo la agitación del cultivo.

- ✚ *L. rhamnosus* CRL1505 respondió a la agitación modificando su perfil metabólico, sin alterar sus parámetros de crecimiento.
- ✚ *L. rhamnosus* CRL1505 acumula mayores niveles de *polyP* en fase exponencial de crecimiento a pH libre y pH controlado 5,5 y presenta mayor tolerancia a *shock* térmico que cultivos en fase estacionaria o a pH 6,0.

CAPÍTULO 3

Secado de *L. rhamnosus* CRL1505 por pulverización

INTRODUCCIÓN

El secado por pulverización (*spray drying*) de cultivos lácticos ha sido ampliamente estudiado como un proceso industrial alternativo a la liofilización debido principalmente al costo de este último proceso (53). Sin embargo, la técnica de *spray drying* aplicada a probióticos plantea un desafío tecnológico: la preservación de la viabilidad y funcionalidad celular durante y después del proceso (157). Actualmente se han identificado una serie de variables que determinan la sobrevivencia de los probióticos durante el secado y almacenamiento, entre ellas: temperatura de deshidratación; termosensibilidad de las bacterias; presencia de termoprotectores (principalmente azúcares y fibras solubles) y el medio de secado o *carrier*, compuesto típicamente por proteínas, carbohidratos o combinaciones de estos (112, 157-160).

En los capítulos anteriores se evaluaron aspectos relacionados con la tolerancia intrínseca del probiótico CRL 1505 frente a condiciones adversas y los factores que influyen en la sobrevivencia frente a *shock* térmico, como las condiciones de fermentación, edad fisiológica del cultivo, la composición del medio de crecimiento y la aplicación de tratamientos subletales. En este capítulo se estudió el comportamiento de *L. rhamnosus* CRL1505 durante el secado por pulverización, considerando variables como el medio de secado, las condiciones del proceso, la rehidratación y almacenamiento del producto.

RESULTADOS

Evaluación del medio de secado

La tolerancia térmica de la cepa CRL 1505 se estudió en buffer fosfato a 60°C/5 min para simular las condiciones del proceso de secado por pulverización. En esta sección se evaluó en una primera etapa diferentes medios de secado o de soporte para determinar su efecto sobre la tolerancia de la cepa láctica a *shock* térmico. La solución buffer se usó como control negativo (disminución de la viabilidad de aprox.-2 ULog). Los medios de soporte usados fueron: leche descremada reconstituida (LDR) como control positivo ya que es el medio de

elección por su alto contenido en proteínas y carbohidratos; maltodextrina (MA) y combinaciones de goma arábica (GA), alginato de sodio (ALG) y concentrado proteico de suero (WPC). La concentración de estos medios de suspensión se estableció en 20 % considerando el contenido mínimo de sólidos requerido en el proceso de secado por pulverización. La GA, ALG y WPC no pudieron ensayarse a esta concentración por su difícil disolución y elevada viscosidad estableciéndose experimentalmente las concentraciones máximas de disolución: 5 % para GA; 0,5 % para ALG y 15 % para WPC. De esta forma, las combinaciones empleadas fueron: 5 % GA-15 % LDR; 5 % GA-15 % MA; 5 % GA-15 % WPC; 0,5 % ALG-19,5 % LDR; 0,5 % ALG-19,5 % MA y 15 % WPC-5 % MA. Se incluyó también en este estudio el medio de cultivo MCM a fin de evaluar la posibilidad de usar el cultivo completo (biomasa+ medio de cultivo fermentado) en el proceso de secado.

En la **Figura 26** se muestran los resultados obtenidos. Se observó una mayor sobrevida ($p < 0,05$) en todos los medios so porte respecto al control en buffer.

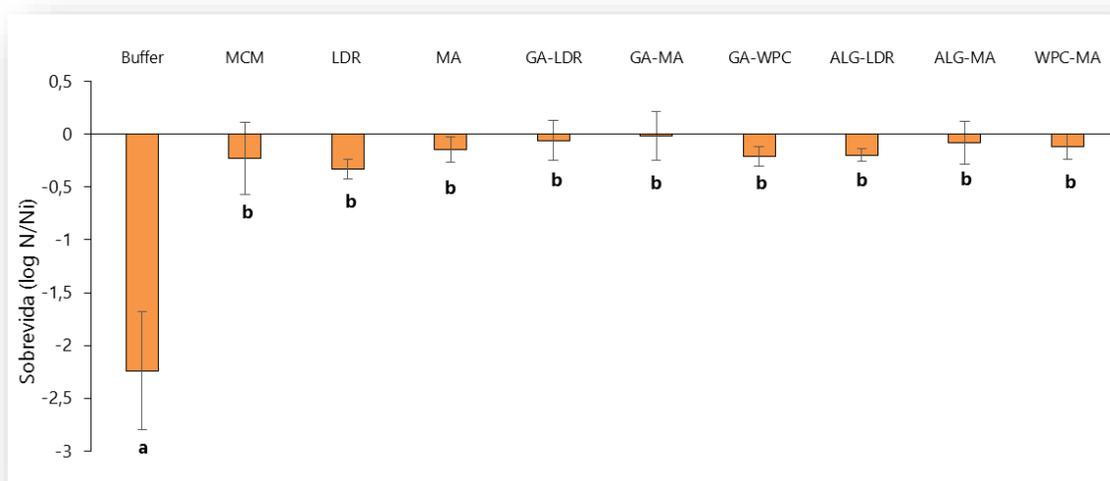


Figura 26 Sobrevida (log N/Ni) de *L. rhamnosus* CRL1505 a *shock* térmico (60 °C, 5 minutos) en diferentes medios soporte. N: recuento de células a los 5 min de tratamiento; Ni: recuento de células inicial.

El probiótico CRL1505 suspendido en el medio MCM, de bajo porcentaje de sólidos (4,4 %), mostró una sobrevida frente a *shock* térmico, similar a la obtenida en LDR cuya concentración de sólidos totales fue del 20 %. Este resultado es relevante considerando que

la leche es el medio de soporte por excelencia en procesos de secado por su efecto termoprotector (112, 129, 157, 159). En base a este resultado, se decidió evaluar el efecto de los componentes del medio MCM sobre la termotolerancia de la cepa CRL1505 utilizando la técnica de omisión simple. A partir de la extracción de cada uno de estos componentes, se formularon 7 medios de soporte en los que la cepa CRL1505 fue suspendida y expuesta a *shock* térmico. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la sobrevida de *L. rhamnosus* CRL1505, obteniéndose pérdidas de viabilidad de -0,03 a -0,60 log UFC/mL (datos no mostrados). Posteriormente se agruparon los componentes según su naturaleza química (azúcares, proteínas y sales inorgánicas) generándose así 5 nuevos medios de soporte designados como MCM1 (lactosa); MCM2 (extracto de levadura y peptona de carne); MCM3 (pool de sales de fosfato y sulfato); MCM4 (fosfatos de sodio y potasio; se omiten sales de sulfato de MCM3) y MCM5 (sulfatos de magnesio y manganeso; se omiten sales de fosfato de MCM3). La sobrevida de CRL1505 a *shock* térmico en estos medios se muestra en la **Tabla 5**. Se obtuvieron resultados similares ($p > 0,05$) en los medios MCM2 y MCM3 comparado con el medio completo MCM. Por el contrario, en ausencia de sulfatos (MCM4) o fosfatos (MCM5) se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la viabilidad celular después del *shock*.

Tabla 5. Efecto de los componentes del medio MCM en la sobrevida de *L. rhamnosus* CRL1505 a *shock* térmico (60°C, 5 min).

Medio soporte	Componentes	Sobrevida (log N/Ni)*
MCM	Medio completo	-0,23 ± 0,34 ^a
MCM1	Lactosa	-1.02 ± 0.52 ^a
MCM2	Extracto de levadura + Peptona	-0.20 ± 0.01 ^a
MCM3	Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄ + MgSO ₄ + MnSO ₄	-0.42 ± 0.09 ^a
MCM4	Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄	-1.74 ± 0.66 ^b
MCM5	MgSO ₄ + MnSO ₄	-2.85 ± 0.20 ^c

*Ni y N= recuento de células inicial y después de *shock* térmico

a, b, c Datos con diferente letra en superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Se usó la técnica de citometría de flujo para visualizar las diferencias en la población celular luego del tratamiento térmico, resultados que se muestran en la **Figura 27**. Después del *shock* térmico, el porcentaje de células vivas en buffer fosfato, MCM4 y MCM5 fue bajo (3,28 %; 3,36 % y 0,025 %, respectivamente) (**Figuras 27 b, e y f**) respecto a los valores obtenidos en el medio completo MCM (18,3 %) y en el pool de sales, MCM3 (25,0 %) (**Figuras 27 c y d**). El elevado porcentaje de células muertas detectados en los medios MCM4 y MCM5 (56,6 % y 96,1 %, respectivamente) se correlacionó con la pérdida de viabilidad obtenida en estos medios por recuento en placa (**Tabla 5**). Los resultados obtenidos por ambas técnicas permitieron seleccionar el medio de soporte MCM3 (pool de sales inorgánicas) que resultó óptimo para mejorar la tolerancia de la cepa CRL1505 a shock térmico. Si bien en el medio soporte MCM2 la sobrevivencia de la cepa CRL1505 fue similar a MCM3, la elección de este último se basó en la simplicidad en su composición.

En base a los resultados obtenidos, se procedió al secado por pulverización del probiótico CRL1505.

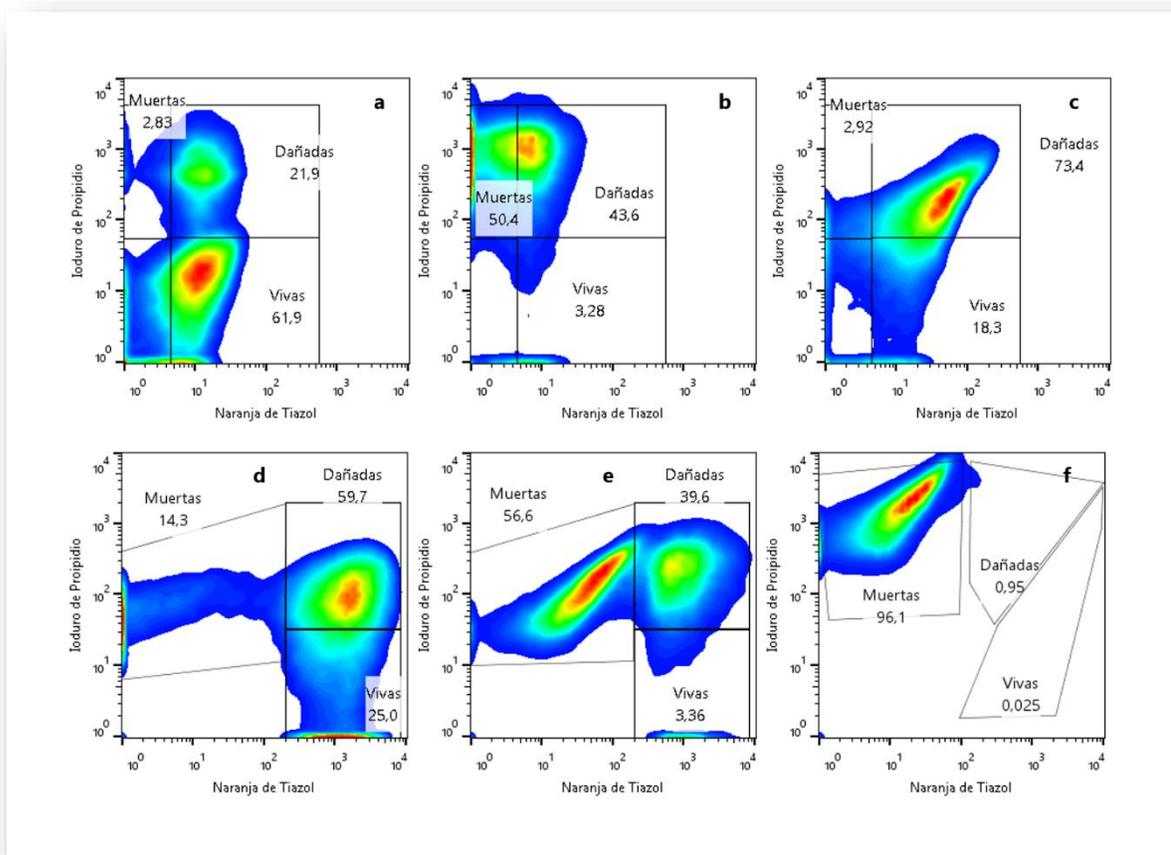


Figura 27. *Density plots* de *L. rhamnosus* CRL1505 post-*shock* térmico en diferentes medios. Células no tratadas mantenidas en buffer a 37°C durante 5 min, (a) y después de *shock* térmico (60°C, 5 minutos) en los diferentes medios: buffer (b), MCM (c), MCM3 (d), MCM4 (e) y MCM5 (f).

Secado por pulverización. Estudios preliminares

L. rhamnosus CRL1505 fue cultivada de acuerdo a las condiciones establecidas en el **capítulo 2** (medio MCM, 37°C, pH libre, cosecha en fase estacionaria de crecimiento) usando sistema por lote en bioreactores de 2 L. Como matriz de secado se seleccionó maltodextrina (MA,) que tuvo un efecto similar a LDR en la supervivencia de CRL1505 frente a *shock* térmico (**Figura 26**). Este polisacárido es ampliamente utilizado en la industria de alimentos y farmacéutica debido a sus propiedades funcionales (44, 161, 162) que lo convierten en un excelente aditivo para suplementos alimenticios en polvo. Asimismo, se incluyó en este estudio el pool

de sales inorgánicas MCM3, (0,93 % p/v) formulado en el apartado anterior, el cual mostró ser un aditivo termoprotector óptimo para la cepa CRL 1505. Se formuló así la matriz de secado MA-MCM3, combinando MA (19,07 %) y MCM3 (0,93 %) como aditivo termoprotector. De esta forma, los medios de secado evaluados fueron (A) MA, y (B), MA-MCM3, ambos medios a la concentración de 20% de sólidos totales. Las células de CRL1505 fueron cosechadas, suspendidas en los medios A y B y secadas por pulverización, obteniéndose como productos los polvos respectivos, A y B. En la **Tabla 6** se detallan las condiciones operativas del proceso, su impacto sobre la viabilidad de *L. rhamnosus* CRL1505, y las características físicas de los polvos obtenidos. Las muestras de los medios A y B antes (peso húmedo) y después del secado (polvos A y B) se llevaron a peso seco a fin de uniformar los recuentos de viables, que fueron similares (10,5 y 10,3 log UFC/g de peso seco, respectivamente) previo al secado. Las características físicas de los polvos fueron análogas, con bajo contenido de humedad (4 % y 6 % en polvos A y B, respectivamente) y rendimientos en sólidos mayores al 50 % en ambos procesos. La adición de sales inorgánicas (MA-MCM3) mejoró 1,8 veces la sobrevivencia del probiótico CRL1505 al secado por pulverización respecto a MA (4,5 log UFC/g de peso seco) lográndose así 72,8 % de sobrevivencia en estas condiciones (polvo B).

Tabla 6. Condiciones de secado por pulverización de *L. rhamnosus* CRL1505 y resultados del proceso.

VARIABLES	CONDICIONES OPERATIVAS	
	<i>Secado A*</i>	<i>Secado B*</i>
Temperatura de entrada (°C)	153-155	153-155
Bomba de alimentación (%)	10-13	12-14
Temperatura de salida (°C)	76-79	76-78
Flujo de aire (mm)	50	50
Aspersor (%)	100	100
Limpieza de la aguja (Nozzle)	5	5
RESULTADOS		
Recuento de BL (log UFC/g peso seco)	4,5 ± 0,02	7,5 ± 0,01
Sobrevida (%)	42,8 ± 2,1	72,5 ± 1,6
Humedad (%)	4,2 ± 0,2	6,0 ± 0,4
Rendimiento de sólidos (%)	73,7 ± 1,2	57,0 ± 0,9

**Secado A* se realizó en maltodextrina (20 %). *Secado B* se realizó en maltodextrina-MCM3 (20 %).

Efecto de las condiciones de rehidratación de los productos secos

El medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de reconstitución de probióticos deshidratados influye en la recuperación de la viabilidad de las células post-secado, (43, 163-165). En este sentido, se evaluaron cuatro medios en la rehidratación de los polvos A y B conservados 30 días a -20°C: soluciones de agua peptona (0,1 %) y sacarosa, (20 %), medio diluyente (3 %) y MCM3 (pool de sales inorgánicas). El medio MCM3 fue incluido debido a su efecto protector frente a *shock* térmico y en el proceso de secado. Como control se usó buffer fosfato salino (PBS). Las temperaturas de rehidratación, 37 y 45°C, fueron seleccionadas en base a resultados previos de laboratorio y el tiempo de rehidratación se fijó en 30 min, inferior al tiempo de duplicación de la cepa CRL1505 (aprox. 2 hs).

En la **Figura 28** se muestran los resultados obtenidos. La viabilidad de los polvos A y B rehidratados a 37°C fue mayor que a 45°C. A 37°C en los medios MCM3 y medio diluyente se obtuvieron los mayores recuentos celulares de la cepa CRL1505 para ambos polvos (polvo A: 4,62 y 4,58 log UFC/g; polvo B: 5,30 y 5,36 log UFC/g, en MCM3 y medio diluyente, respectivamente). Asimismo, a 45°C, se destaca el efecto positivo de estos medios sobre la viabilidad celular de los polvos A y B. En todos los medios evaluados, el polvo A tuvo menores recuentos de células viables ($p < 0,05$).

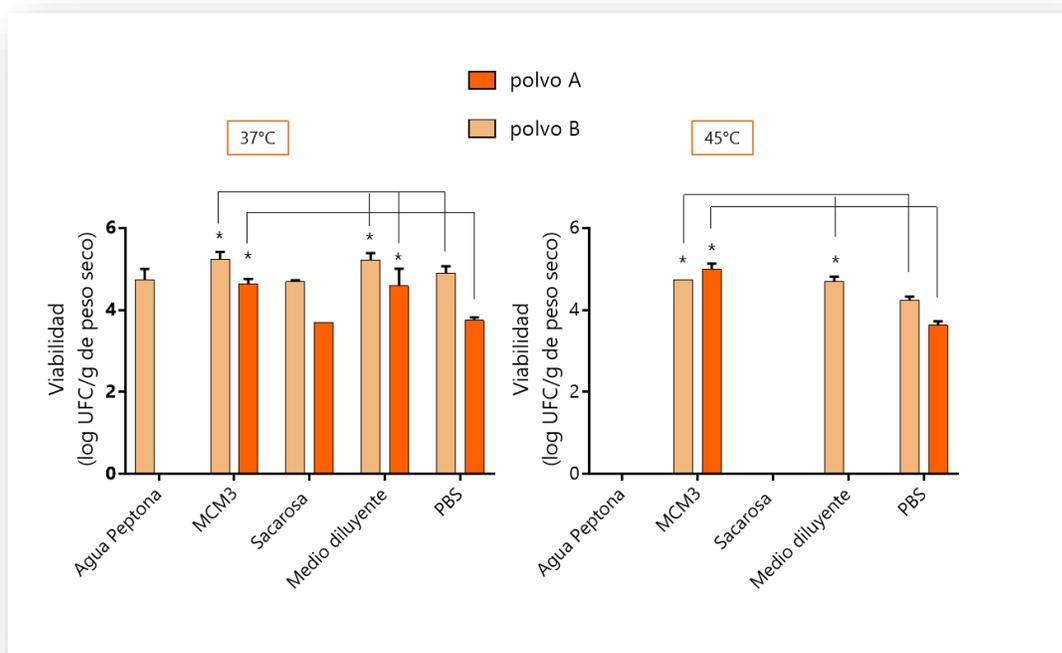


Figura 28. Viabilidad (log UFC/g peso seco) de *L. rhamnosus* CRL1505 en los polvos A y B, rehidratados en diferentes medios a 37°C y 45°C durante 30 min.

La conservación de los polvos probióticos A y B se realizó a -20°C durante 90 días. La reconstitución de los productos secos se realizó de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en los experimentos de rehidratación: medio MCM3 y 30 min de incubación a 37°C. Se usó PBS en las mismas condiciones, como control.

Se tomaron muestras cada 30 días para medir viabilidad celular mediante recuento en placa y citometría de flujo. En la **Figura 29** pueden observarse los recuentos obtenidos durante el almacenamiento, considerando el tiempo cero (T_0) como el recuento celular inmediatamente después del secado. El polvo A mantuvo constante la viabilidad celular ($p < 0,05$) durante los 90 días de almacenamiento respecto a T_0 , observándose diferencias según fuera rehidratado en MCM3 o PBS, donde no se observaron células viables al cabo del período estudiado (**Figura 29 a**). Respecto al polvo B, se observó una caída abrupta de la viabilidad (3 ULog) durante el primer mes de almacenamiento, permaneciendo luego constante durante todo el período de conservación, rehidratado tanto en PBS como en MCM3, pero con mayor recuento celular (aprox 1 ULog, $p < 0,05$) en este último (**Figura 29 b**).

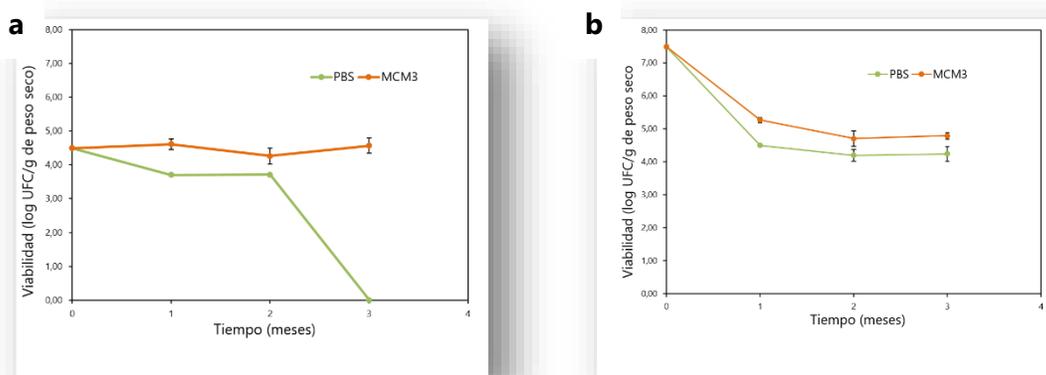


Figura 29. Viabilidad (log UFC/g de peso seco) de *L. rhamnosus* CRL1505 en los polvos A (a) y B (b) rehidratados en PBS y MCM3, durante 90 días de preservación a -20°C .

Las diferencias en la población celular de CRL1505 en los polvos A y B durante el almacenamiento a -20°C respecto a T_0 (inmediatamente después del secado) y rehidratados en MCM3 y PBS (control) se visualizaron mediante citometría de flujo. En la **Figura 30** se presentan los resultados obtenidos.

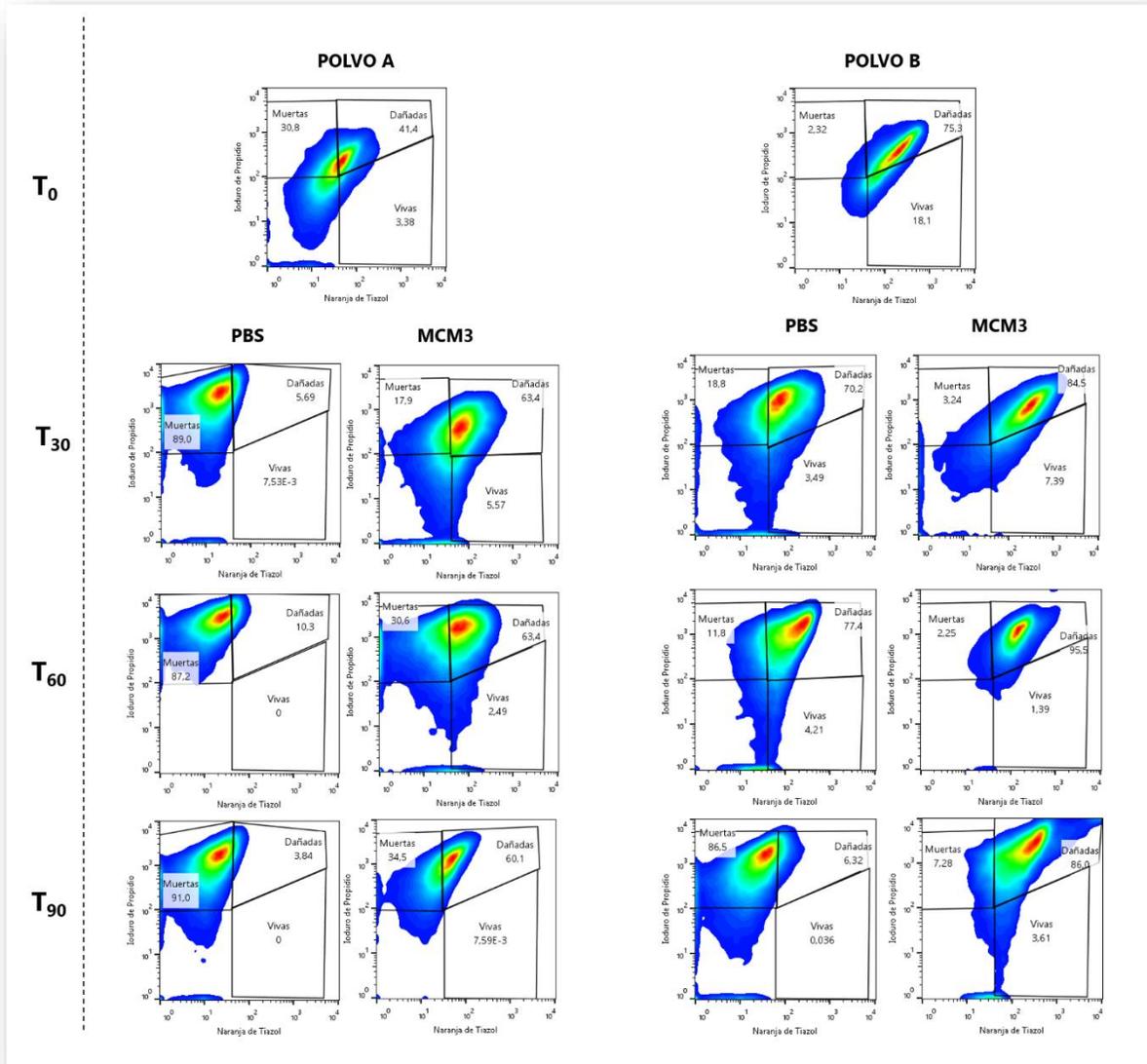


Figura 30. Density plots de poblaciones celulares de *L. rhamnosus* CRL1505 luego del secado por pulverización (T_0) y durante 90 días de almacenamiento (T_{30} , T_{60} y T_{90}) a -20°C .

Después del secado (T_0) se observa un mayor porcentaje de células vivas y dañadas (18,1 y 75,3 %, respectivamente) en el polvo B respecto al polvo A (3,4 y 30,8 %, respectivamente). Durante el almacenamiento, en ambos casos se observa un incremento en la población de células muertas y dañadas a expensas de una reducción de células vivas,

independientemente del medio de rehidratación. A los 90 días, el porcentaje de células muertas en el polvo A rehidratado en PBS fue 91,0 %, no detectándose células viables mediante recuento en placa, como se observó en la **Figura 29 a**. En el polvo B rehidratado en PBS a los 90 días de preservación, el porcentaje de células muertas fue similar (86,5 %); sin embargo, en este caso se detectaron células viables (aprox. 4 log UFC/mL, **Figura 29 b**). Por el contrario, la rehidratación con MCM3 reveló en ambos casos un elevado porcentaje de células dañadas que podrían recuperarse en condiciones adecuadas, a diferencia de la rehidratación en PBS donde casi la totalidad de la población se encontró en el sector de células muertas.

DISCUSIÓN

La obtención de probióticos deshidratados por pulverización (*spray drying*) reviste gran interés como herramienta de innovación para ampliar el mercado de alimentos y suplementos dietarios con propiedades funcionales. Sin embargo, el proceso de secado implica un desafío científico-tecnológico para minimizar el estrés térmico que afecta la viabilidad y funcionalidad de las células sometidas al mismo. En este capítulo se evaluaron diferentes matrices de secado, como el medio MCM, leche en polvo reconstituida (LDR), maltodextrina (MA) y combinaciones de éstos con concentrado proteico de suero (WPC), goma arábiga (GA) y alginato (ALG) con el fin de optimizar la respuesta de *L. rhamnosus* CRL1505 a condiciones que se asemejan, en parte, a las del proceso de secado por aspersión (*shock* térmico; 60°C/5 min). La sobrevida de CRL1505 post-*shock* fue similar en todos los medios evaluados comparado con LDR (utilizada como control positivo) y mayores a los obtenidos en buffer fosfato de potasio. En la bibliografía hay numerosos informes acerca del efecto termoprotector de LDR en probióticos lácticos, los cuales presentan una excelente resistencia térmica cuando se encuentran inmersos en esa matriz (112, 129, 159). Se describen buenos resultados también para GA, ALG, (157, 166-169), polisacáridos con capacidad de encapsulación y protección de material biológico, incluidos probióticos lácticos. WPC es considerado un agente microencapsulante exitoso para mejorar la

sobrevida de *L. rhamnosus* CRL1505 frente a estrés ácido (158) y de *L. rhamnosus* 64 frente al estrés proveniente del proceso de secado por pulverización (170).

En este trabajo de tesis se evaluaron combinaciones de GA, ALG y WPC obteniéndose resultados positivos (baja pérdida de viabilidad) al exponer el probiótico CRL1505 a *shock* térmico. Sin embargo, estas formulaciones no pudieron emplearse como soporte en el proceso de secado por dificultades técnicas de manejo debido a su elevada viscosidad. Por este motivo, se usaron las matrices MA y MA-MCM3 obteniendo como producto seco los polvos A y B, respectivamente. Cabe aclarar que las condiciones de secado reportadas en la bibliografía son muy variables y la tolerancia de las células al proceso es cepa-dependiente (53). En nuestro caso, establecimos condiciones drásticas de secado, con una temperatura de salida de aire en el rango de 76°C-80°C, a fin de evaluar la efectividad de las matrices seleccionadas. Los resultados obtenidos mostraron una elevada pérdida de viabilidad en ambos casos, polvos A y B, indicando que la temperatura de salida del aire es el principal estresor que afecta la viabilidad celular. Este parámetro depende de la temperatura de entrada del aire, velocidad de flujo, tasa de alimentación, composición del medio de secado y tamaño de gota atomizada (57, 60, 160, 171). La tasa de alimentación es otro factor importante ya que determina el tiempo de residencia de las células en el equipo (53, 160); esto es, a menor tasa de alimentación, mayor tiempo de residencia de las células expuestas a alta temperatura y, por consiguiente, mayores pérdidas de viabilidad celular post-secado. Sin embargo, el uso de tasas altas de alimentación conlleva la evaporación de mayor cantidad de líquido y el riesgo de obtener un producto húmedo, perjudicial para el almacenamiento a largo plazo. En este trabajo se ajustó la tasa de alimentación a valores relativamente bajos (10-13 %) obteniéndose polvos con bajo contenido de humedad (4-6 %), requisito indispensable para la estabilidad del producto durante el almacenamiento (53); sin embargo, estas condiciones afectaron negativamente la sobrevivencia de CRL1505.

La matriz de secado y el agregado de termoprotectores es otro aspecto a considerar para mejorar la sobrevivencia de los probióticos al secado por pulverización. Oldenhof y col. (172) encontraron una mayor sobrevivencia en lactobacilos secados por pulverización usando una mezcla de MA y sacarosa, donde el azúcar interactuó con lípidos y proteínas, y la

maltodextrina funcionó como un compuesto de carga osmóticamente inactivo contribuyendo a la formación de una matriz vítrea (172). La matriz vítrea restringe el movimiento molecular y, por lo tanto, enlentece los efectos perjudiciales como los procesos de cristalización y difusión, los efectos externos deteriorantes y el metabolismo bacteriano (43, 173). Chávez y Ledebøer (157) también obtuvieron una mejor tasa de supervivencia de *Bifidobacterium lactis* BB12 secada por pulverización usando una combinación de proteína de soja y MA.

En este trabajo, se evaluó maltodextrina (MA) sola y combinada con MCM3 (MA-MCM3) como aditivo termoprotector. Respecto a MA, existen resultados discordantes en la literatura. Algunos autores (174-176) informan un efecto positivo sobre la viabilidad bacteriana mientras que otros estudios reportan el efecto opuesto. En este sentido, Broeckx y col. (162) obtuvieron mayor pérdida de viabilidad en *L. rhamnosus* GG secado por aspersión en presencia de MA que cuando se usaron disacáridos como lactosa y trehalosa. Los disacáridos tienen la capacidad de reemplazar las moléculas de agua y formar enlaces hidrógeno con las proteínas y componentes de la membrana celular, preservando así la integridad de estas estructuras (157, 160, 162). En el caso de maltodextrina, se trata de un polímero de PM relativamente alto en comparación con los disacáridos, lo que puede generar impedimentos estéricos que impidan su acción protectora (162, 177, 178).

La efectividad de MA en la viabilidad de CRL1505 durante el secado por pulverización (polvo A) fue menor al 50 %, coincidente con lo reportado para *L. rhamnosus* GG (162). Sin embargo, el agregado de MCM3 (pool de sales inorgánicas) a esta matriz permitió obtener una sobrevivencia celular mayor al 70%, resultado de relevancia considerando la baja concentración de sólidos (0,93 %) de este medio. La mayor tolerancia del probiótico CRL1505 al proceso de secado obtenida por la adición de MCM3, es relevante desde un punto de vista tecnológico debido al precio de las sales de fosfato y sulfato que lo constituyen (alrededor de US\$ 0,40/L) comparado con el de la sacarosa (alrededor de US\$ 1,45/L) comúnmente utilizada como termoprotector.

Un análisis del efecto termoprotector de las sales presentes en MCM3 (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 y MnSO_4) nos lleva a considerar, en primer lugar, la presencia de *polyP* en CRL1505,

corroborada en los capítulos anteriores. Se sabe que la acumulación de *polyP* en bacterias es un mecanismo de protección principalmente contra estrés oxidativo (69, 80, 81, 179). En BL, este polianión junto al Mn^{+2} forma parte de un mecanismo no enzimático de preservación contra este tipo de estrés, descrito por primera vez para *L. plantarum* (80). Asimismo, otras interacciones *polyP*-iones metálicos y actividad chaperona inorgánica han sido documentadas, comprobándose que previenen la agregación de proteínas dañadas durante situaciones de estrés (180-182). Estas múltiples vías podrían también proteger (directa e indirectamente) a las bacterias lácticas del estrés por calor donde el manganeso y el magnesio actuarían como cofactores en reacciones enzimáticas asociadas a la respuesta a estrés (180, 181).

La rehidratación es otra etapa crítica en la recuperación de polvos conteniendo material biológico secados por pulverización. El medio (osmolaridad, composición, pH) y las condiciones de rehidratación (temperatura y tiempo, entre otras) afectan la viabilidad celular (43). Para el probiótico CRL1505 (polvos A y B) la rehidratación a 37°C dio mejores resultados que a 45°C en todos los casos. Dentro de los medios ensayados, MCM3 y medio diluyente también permitieron una buena recuperación celular a 45°C, pero este último solo fue efectivo para el polvo B. En *Bifodobacterium longum* B65 y *S. thermophilus* CCRC 1408 secadas por pulverización, temperaturas de rehidratación entre 35°C y 50°C mostraron una mayor recuperación celular comparado con bajas (5-20°C) (183). Mille y col. (184) reportaron resultados similares para *L. bulgaricus* mientras que para *L. plantarum* la temperatura de rehidratación (30°C o 37°C) no tuvo un efecto significativo en la recuperación.

Las condiciones de almacenamiento constituyen otro parámetro de consideración que afecta la estabilidad de bio-productos secos, siendo la temperatura y la humedad factores claves para evitar el deterioro causado por la actividad microbiana. (43, 53). El contenido final de humedad está relacionado con la transición de la fase vítrea/gomosa que puede ocurrir durante el almacenamiento. Un alto contenido de humedad resulta en una disminución de la temperatura de transición vítrea; cuando ésta cae por debajo de la temperatura de almacenamiento, el producto cambia de estado vítreo a estado gomoso, donde la movilidad de las moléculas y la velocidad de las reacciones químicas están menos

restringidas (43). Una mayor movilidad molecular desestabiliza el material biológico y cambia las características del polvo (por ejemplo, fluidez, cristalinidad), lo que conduce a la pérdida de la viabilidad de los probióticos y una disminución de la vida útil del polvo almacenado. En el caso de probióticos, este es uno de los aspectos básicos para mantener una tasa adecuada de células viables, donde la actividad metabólica debe ser cercana a cero durante la conservación (159). En cuanto a la temperatura de almacenamiento, como es de esperar, la estabilidad de productos secados por pulverización disminuye durante el almacenamiento, y bajas temperaturas de almacenamiento conducen a mayores tasas de supervivencia microbiana (53). El contenido de humedad obtenido en los polvos A y B (4 y 6 %) conservados a -20°C estuvo en concordancia con el valor óptimo requerido para largos periodos de preservación de probióticos (5 %) (43, 53), ya que a este valor las reacciones de deterioro, como la oxidación de lípidos, se encuentran en su minimizadas.

En este trabajo los polvos (A y B) con bajo contenido de humedad (4 y 6 %, respectivamente) se conservaron a -20°C durante 90 días. Los mejores resultados se obtuvieron con el polvo B, secado en presencia de MCM3 y rehidratado en este medio. La presencia de sales, específicamente de fosfatos, en el medio de cultivo, tuvo un efecto positivo sobre la sobrevivencia de *L. rhamnosus* CRL1505 expuesta a estrés térmico, lo cual se relacionó con la acumulación de *polyP* (**Capítulo 1**). Cuando estas sales de fosfatos se combinan con las de sulfato conformándose el medio MCM3, las mismas tienen un efecto termoprotector comprobado tanto *in vitro* (*shock* térmico) como en el escenario real del proceso de secado, almacenamiento y rehidratación de los polvos (**Capítulo 3**). Así, el empleo de este agente termoprotector, de naturaleza salina y de bajo costo, representa una alternativa tecnológica prometedora en procesos industriales donde el probiótico CRL1505 deba ser sometido a altas temperaturas. Estos resultados permiten ampliar el uso a otras presentaciones comerciales, como suplementos en polvo.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en este Capítulo permiten concluir que:

- ✚ La sobrevivencia de *L. rhamnosus* CRL1505 al *shock* térmico dependió del medio de soporte. El medio MCM3 de simple composición (sales de fosfato y sulfato) tuvo un efecto protector similar a medios complejos como MCM, LDR, MA, y combinaciones de GA, ALG y WPC.
- ✚ El agregado de MCM3 como aditivo protector a la matriz de secado maltodextrina permitió obtener una mayor sobrevivencia post-secado y durante el almacenamiento (polvo B).
- ✚ El recuento celular del probiótico CRL1505 en polvo dependió del medio y la temperatura de rehidratación. Medio diluyente y MCM3 permitieron la mayor recuperación de células viables a 37°C.

CAPÍTULO 4

Funcionalidad de *polyP* en un modelo experimental *in vivo*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias agudas (ERAs) son enfermedades infecciosas de aparición rápida que pueden afectar los pulmones, las vías respiratorias o ambos, siendo las causas más frecuentes de consulta médica. La mayoría de los episodios de ERAs son leves, pero en algunos grupos poblacionales de riesgo pueden provocar un cuadro grave con riesgo de muerte. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que las ERAs son una de las principales causas de morbilidad/mortalidad en el mundo (185). Como ejemplos de ERAs cabe citar resfriado común, gripe y síndrome respiratorio agudo severo (SRAS) siendo los síntomas comunes tos, dolor de garganta, secreción nasal, estornudos, dificultad para respirar y fiebre.

El cuadro clínico de una ERA es un proceso complejo y variable asociado con disfunción pulmonar. La primera etapa (fase exudativa) se caracteriza por una respuesta inflamatoria aguda acompañada de una afluencia marcada de neutrófilos y secreción de citoquinas pro-inflamatorias, las cuales amplifican la respuesta inflamatoria. Estas moléculas se producen en pulmón por macrófagos alveolares, células epiteliales y fibroblastos. En casos más severos, se observa apoptosis de las células epiteliales pulmonares y aumento en la permeabilidad de la barrera alvéolo-capilar, lo que conduce a la destrucción del epitelio pulmonar y al deterioro de su función de barrera (186) (**Figura 31**).

En el caso de cuadros leves de ERAs se emplean antibióticos o antivirales (según el agente causal) y antiinflamatorios, incluidos glucocorticoides. Estos últimos pueden ser administrados por vía intranasal ó por inhalación ya que, tanto en mucosa pulmonar como nasal, se produce una rápida absorción y distribución sistémica del fármaco, razón por lo cual su efecto en cuadros agudos es óptimo. Los corticoides que se usan con mayor frecuencia son el propionato de fluticasona, budesonida y dipropionato de beclometasona aunque su empleo está asociado con algunos efectos adversos como aumento del riesgo de disfonía, candidiasis oral y tos.

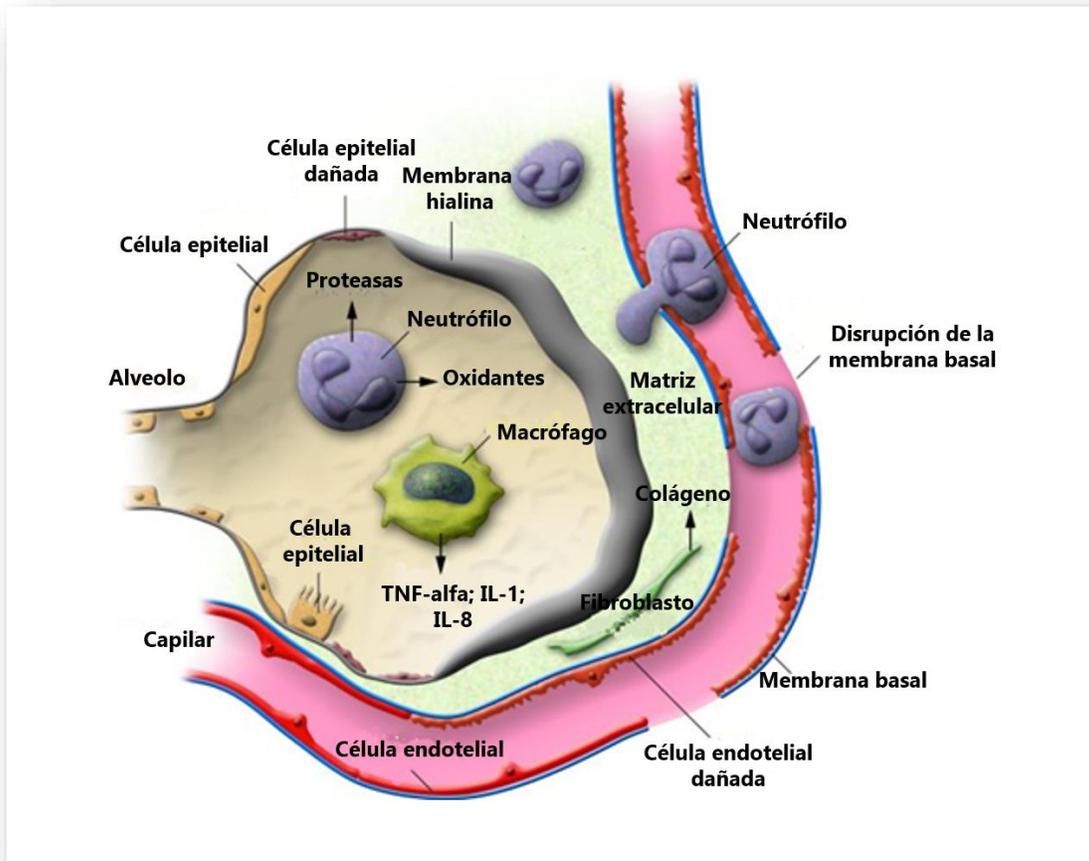


Figura 31. Mecanismo celular de inflamación pulmonar aguda. Modificado de Minamino y Komuro (2006) (186).

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la síntesis de *polyP* en bacterias está relacionada con la supervivencia de las células a condiciones de estrés. Asimismo, en ciertas cepas probióticas de lactobacilos, la síntesis de estos polianiones se evidencia como un mecanismo probiótico relacionado a la restauración de la homeostasis en intestino (84). Otros estudios sobre el rol de los *polyP* derivados de bacterias probióticas muestran que suprime la inflamación en un modelo murino de colitis (85) y mejora la funcionalidad de la barrera intestinal (187).

En este Capítulo se evaluó, por primera vez en mucosa pulmonar, la funcionalidad de extractos intracelulares de *L. rhamnosus* CRL1505 conteniendo *polyP* utilizando un modelo murino de inflamación pulmonar aguda inducido por lipopolisacárido (LPS) (188).

RESULTADOS

Cuantificación de polyP en extractos intracelulares de L. rhamnosus CRL1505

En el **Capítulo 1** se puso a punto una técnica semi-cuantitativa de fluorescencia (DAPI) para determinar los niveles de *polyP* (**Figura 8**) y su visualización por PAGE (**Figuras 10 y 11**). Sin embargo, la evaluación del polianión como agente terapéutico en ensayos preclínicos requiere conocer la cantidad exacta del *polyP* presente en el citoplasma de CRL1505 para poder definir la dosis a administrar al modelo murino experimental establecido. Así, en este capítulo se evaluaron dos técnicas espectrofotométricas para la cuantificación de *polyP*, una basada en la interacción *polyP*-colorante azul de toluidina (99) y la otra, en la cuantificación de fosfato soluble. Esta última, usada para determinar la concentración de fosfato del medio de cultivo (**Capítulo 1**) se aplicó ahora para cuantificar el fosfato soluble proveniente de la hidrólisis de *polyP* (84, 97, 99).

L. rhamnosus CRL1505 fue cultivado en medio MCM (pH libre, 37°C) y cosechado en fase estacionaria de crecimiento. A partir de la biomasa obtenida se preparó un extracto intracelular (EIC) mediante ruptura con perlas que se usó en los ensayos de cuantificación. La técnica espectrofotométrica con colorante básico azul de toluidina se basa en cambios en el espectro de absorción. El *polyP* es un polianión cargado negativamente y, a medida que la carga polianiónica aumenta, el espectro de absorción del colorante unido a *polyP* se desplaza de 620 a 530 nm. La relación correspondiente a este cambio espectral (A_{620}/A_{530}) es directamente proporcional a la concentración de *polyP* presente en la muestra (99). Técnicamente, una solución colorante de azul de toluidina se añadió a EICs de CRL1505 y el cambio metacromático resultante se estableció midiendo la absorbancia a 520 y 630 nm. La concentración de *polyP* se determinó empleando un gráfico de calibración entre A_{620}/A_{530} frente a concentraciones conocidas del estándar *polyP*-45. La concentración de *polyP* así calculada fue $0,021 \pm 0,003$ mg *polyP*-45/mL de EIC-1505. Una limitación de esta técnica es

que depende no sólo de la concentración del polianión sino también de la longitud de su cadena. Teniendo en cuenta que la longitud de cadena del *polyP* presente en el EIC de *L. rhamnosus* CRL1505 es mayor a la del estándar *polyP*-45 (**Capítulo 1, Figura 11**), usado como patrón en la curva de calibración de esta técnica, presumimos que la concentración real de *polyP* presente en EICs de CRL1505 está subvalorada. Por esta razón se evaluó una segunda técnica espectrofotométrica.

La técnica de cuantificación de fosfato soluble fue adaptada ya que se requiere una hidrólisis previa (HCl 1M, 100°C, 30 min) del polianión para escindir los ortofosfatos que lo conforman. Los ortofosfatos liberados se cuantificaron en términos de la concentración del estándar utilizado (Na_2HPO_4). La concentración de *polyP* en EIC de CRL1505 calculada de esta forma fue $3,24 \pm 0,06$ mg Na_2HPO_4 /mL de extracto. Diluciones del estándar *polyP*-45 hidrolizado en las mismas condiciones fueron cuantificadas mediante esta técnica para la confección una curva de correlación de concentraciones de Na_2HPO_4 en función de concentraciones conocidas del estándar hidrolizado. La linealidad de esta curva fue óptima, con un $R^2 = 0,9979$ (**Figura 32**). La concentración de *polyP* calculada mediante la fórmula extraída del análisis de correlación fue $0,57 \pm 0,01$ mg de *polyP*-45/mL de extracto y fue tomada como válida.

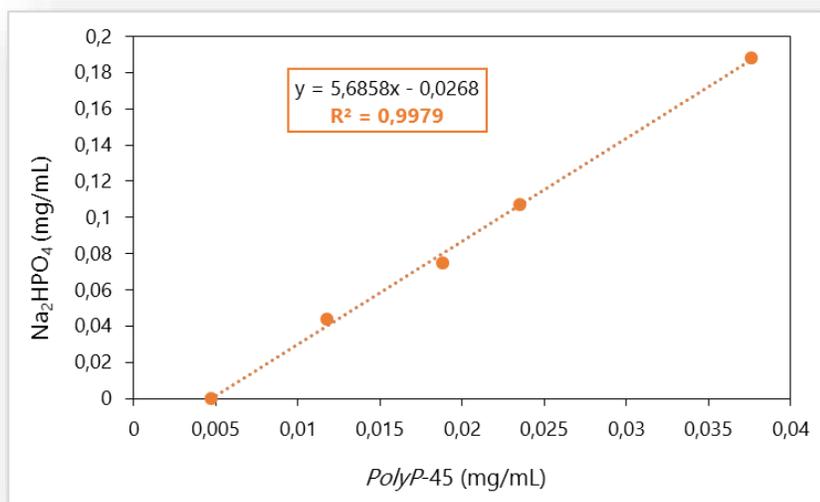


Figura 32. Correlación entre concentraciones conocidas de Na_2HPO_4 y del estándar *polyP*-45 hidrolizado.

Modelo experimental animal

Los modelos animales experimentales han contribuido significativamente al entendimiento de la patogenia y la fisiopatología de las ERAs (189) siendo el lipopolisacárido (LPS) microbiano un importante inductor de inflamación pulmonar (190). La administración de LPS vía sistémica o intranasal induce una respuesta inflamatoria exacerbada mediante la activación de numerosas células, principalmente neutrófilos y macrófagos (191). En este capítulo se evaluó la funcionalidad del EIC de *L. rhamnosus* CRL1505 conteniendo *polyP* y de un *polyP* sintético de PM conocido (*polyP*-45) utilizando un modelo murino de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS (188). El esquema del modelo experimental de inflamación aguda utilizado se muestra en la **Figura 33**.

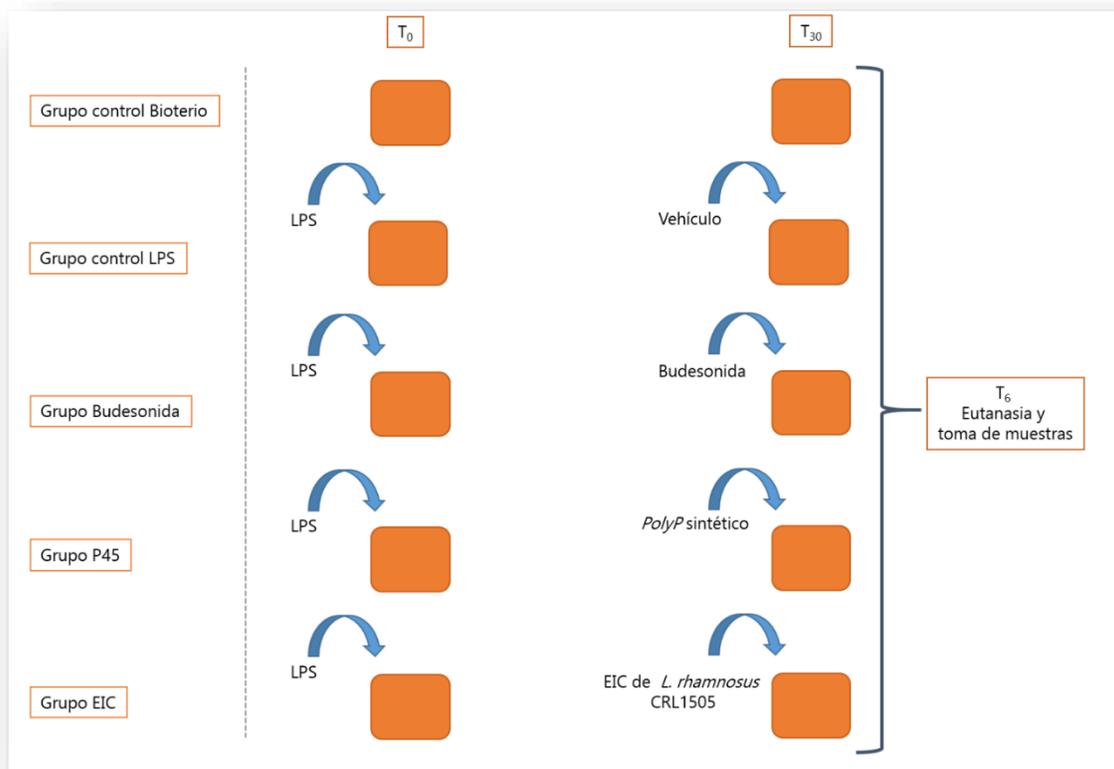


Figura 33. Esquema del modelo *in vivo* de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS en ratones BALB/c. Los tratamientos fueron con budesonida, *polyP* sintético y EIC de *L. rhamnosus* CRL1505. T₀: tiempo inicial del experimento; T₃₀: 30 min post-desafío con LPS y T₆: 6 hs post-desafío con LPS.

Se administró a todos los ratones LPS de *E. coli* O55:B5 por vía intranasal (T_0), excepto al grupo control de bioterio. A continuación, los animales fueron distribuidos al azar en cinco grupos para recibir los diferentes tratamientos en 25 μ L de muestra, 30 min después del desafío con LPS (T_{30}): grupo control LPS (ratones que recibieron LPS y posteriormente agua destilada estéril), grupo Budesonida (ratones control positivo de efecto antiinflamatorio; se les administró LPS y posteriormente budesonida); grupo P45 (ratones que recibieron LPS y posteriormente *polyP* sintético) y grupo EIC (se administró LPS y posteriormente EIC de CRL1505). El control de bioterio fue realizado para comparar parámetros normales en ratones sanos con ratones enfermos, con y sin tratamiento. La concentración del *polyP* sintético se ajustó en base a la concentración de fosfato del *polyP* presente en el EIC de CRL1505 (3,24 mg/mL de Na_2HPO_4). La concentración de budesonida se ajustó según indicaciones del fabricante (5,6 μ g por ratón). En todos los casos se tuvo en cuenta el peso de los animales (aprox. 35 g por ratón). A las 6 hs post-administración de LPS (T_6) se sacrificaron los ratones de los diferentes grupos experimentales y los ratones control bioterio (ratones sanos) para la tomas de muestras y determinaciones de parámetros de la respuesta inflamatoria local y sistémica.

Evaluación de la respuesta inmune local y sistémica

Recuento total y diferencial de leucocitos en lavado bronco-alveolar (LBA)

Como es de esperar en este modelo de inflamación pulmonar inducido por LPS, a nivel local la administración del liposacárido indujo un incremento significativo del recuento total de células (leucocitos) en el grupo LPS (sin tratamiento) (**Figura 34**), observándose una disminución de los recuentos leucocitarios en los grupos EIC, *polyP-45* y budesonida, similares al control bioterio.

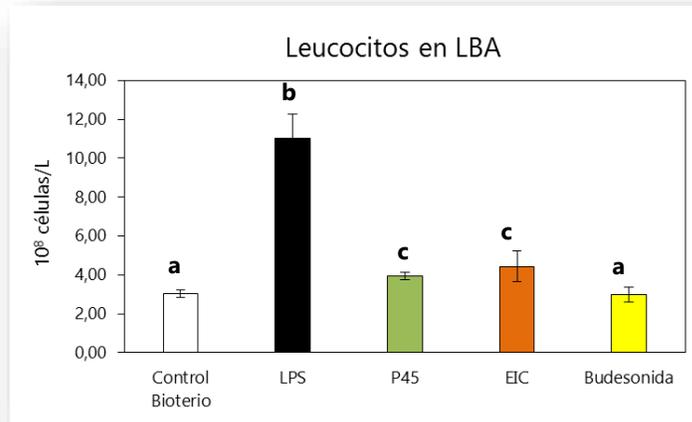
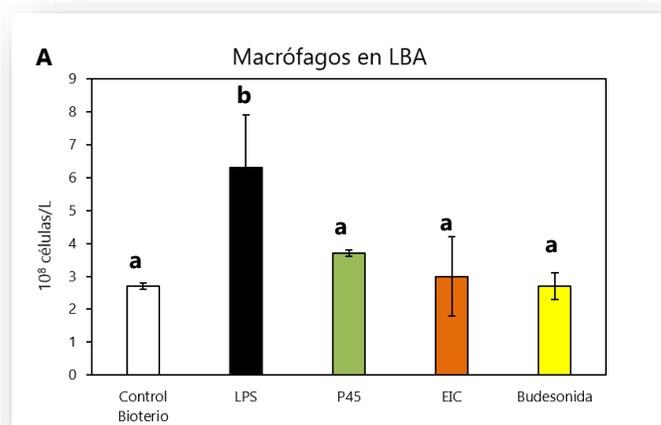


Figura 34. Recuento total de células (leucocitos) en lavado bronco-alveolar (LBA) después de 6 hs de desafío con LPS. ^{a, b, c} Grupos con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De la misma forma, este resultado pudo también ser visualizado mediante el recuento diferencial de macrófagos alveolares y neutrófilos, fagocitos profesionales que conforman una de las primeras líneas de defensa frente a infecciones. El número de macrófagos y neutrófilos aumentó significativamente en LBA en el grupo LPS (**Figura 35 A**). Sin embargo, los tratamientos con EIC, *polyP*-P45 o budesonida indujeron una disminución significativa en los recuentos de los mismos (41,3 - 57,2 % en macrófagos y 90,5 - 93 % en neutrófilos; $p < 0,05$), obteniéndose valores similares a los de ratones sanos (control bioterio).



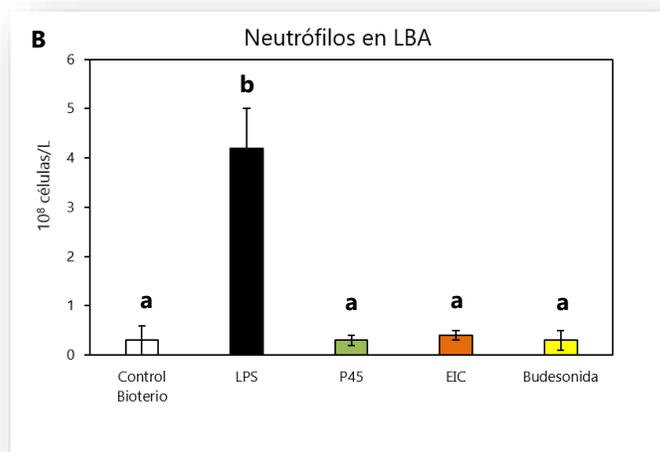


Figura 35. Recuento diferencial (A: macrófagos; B: neutrófilos) en lavado bronco-alveolar (LBA) después de 6 hs de desafío nasal con LPS.^{a, b} Grupos con diferente letra son significativamente.

Recuento total y diferencial de leucocitos en sangre

En los exámenes de sangre se observó que el LPS indujo una disminución en el recuento leucocitario (grupo LPS, **Figura 36**) respecto a ratones sanos (control bioterio). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos grupos experimentales a las 6 hs post-desafío.

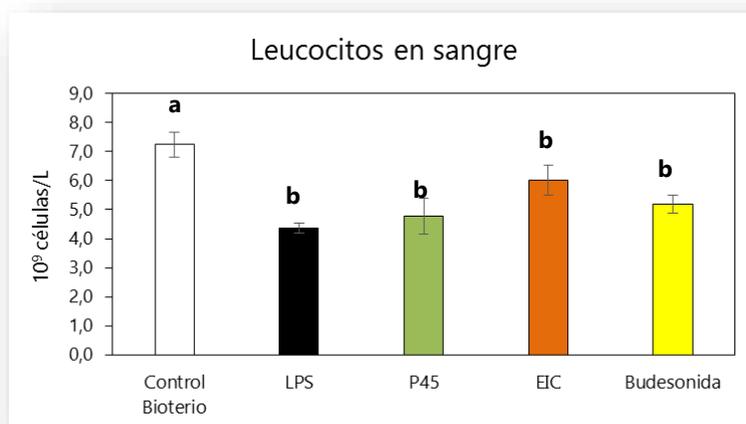


Figura 36. Recuento total de células (leucocitos) en sangre después de 6 hs de desafío con LPS.^{a, b} Grupos con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En la **Figura 37** puede verse el recuento de neutrófilos en sangre en los diferentes grupos experimentales. El número de neutrófilos en el grupo LPS se vio significativamente disminuido ($p < 0,05$) respecto al control bioterio, lo que indica la migración de los mismos hacia pulmón en respuesta a la inflamación inducida por LPS. En los ratones tratados con el estándar *polyP-45*, el número de neutrófilos no tuvo diferencias significativas respecto al control bioterio ($p > 0,05$), sin embargo en los grupos budesonida y EIC este número disminuyó, aunque sus valores fueron significativamente mayores a los del grupo LPS ($p < 0,05$).

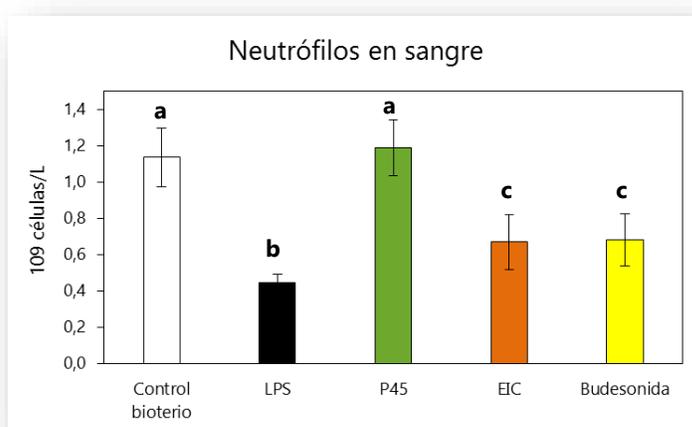


Figura 37. Recuento de neutrófilos en sangre después de 6 hs de desafío con LPS. **a, b, c** Grupos con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Por otro lado, se realizó el análisis de mieloperoxidasa de neutrófilos en sangre, comúnmente utilizado como indicador de activación y funcionalidad de los mismos. Las células se calificaron como peroxidasa débilmente, moderadamente o fuertemente positivas, en base al cálculo de un *score*. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y controles (bioterio y LPS) (**Figura 38**).

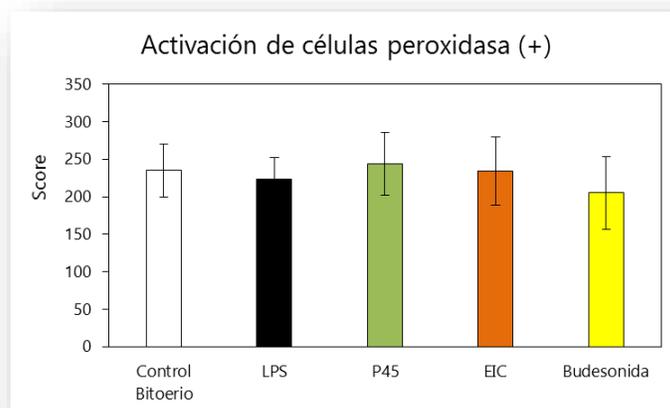


Figura 38. Activación de neutrófilos peroxidasa positivos (+).

Concentración de citoquinas en LBA y en suero

Mediante citometría de flujo se evaluó si la administración de LPS en ratones estimulaba la liberación de citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria (IL-10; IL-17A; TNF alfa; IFN gama; IL-6; IL-4 e IL-2). En lavado LBA se observó un aumento de todas las citoquinas en el grupo LPS respecto a ratones sanos (control bioterio) (**Figura 39 A**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$) y el grupo LPS a las 6 hs post desafío. Por el contrario, a nivel sistémico, en todos los tratamientos se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de todas las citoquinas evaluadas respecto al grupo LPS, alcanzando valores similares a los de ratones sanos (**Figura 39 B**).

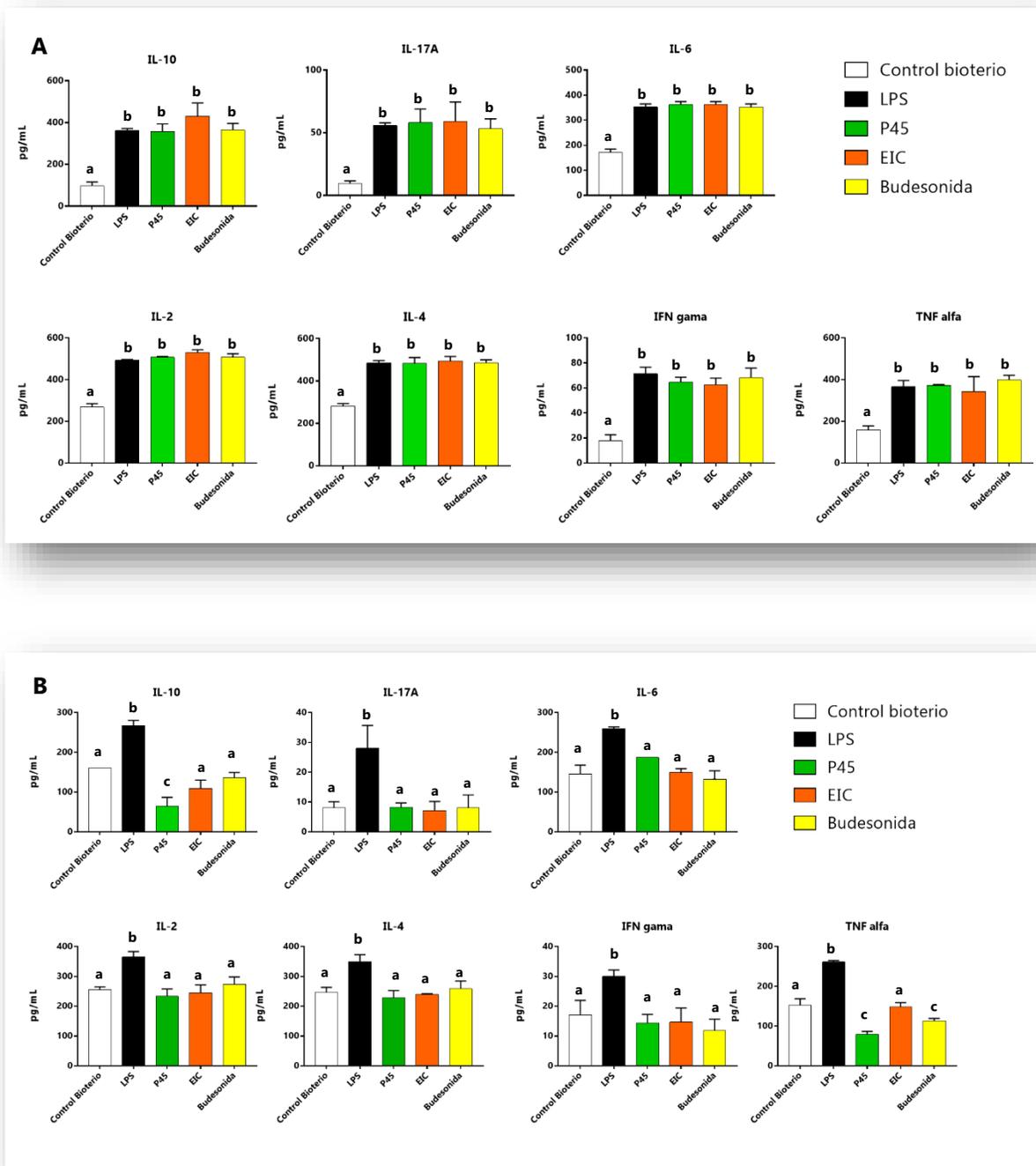


Figura 39. Niveles de citoquinas inflamatorias en LBA (A) y en sangre (B), medidos por citometría de flujo en ratones BALB/c después de 6 hs del desafío con LPS. ^{a, b, c} Grupos con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El *polyP* es una biomolécula ubicua y fisiológicamente importante para toda célula viva (192) con potencialidad de ser usada como agente terapéutico, por lo que su cuantificación intracelular es crucial para una correcta caracterización funcional. En la determinación de *polyP* se han utilizado diferentes métodos (192) y la falta de un procedimiento estandarizado posiblemente sea responsable de la gran dispersión de resultados que se encuentran en la literatura. La extracción de *polyP* y la determinación del fosfato libre liberado por la degradación enzimática del polímero (sistema PPK/ATP/luciferasa) es un método bastante común para la cuantificación de *polyP* (101, 192) pero su implementación requiere inversiones considerables de dinero y tiempo. En este trabajo de tesis se evaluaron técnicas semicuantitativas (complejo DAPI-*polyP*, **Capítulo 1**) y cuantitativas. La técnica espectrofotométrica basada en la interacción de azul de toluidina y *polyP*, aplicada a la cuantificación directa del polianión en el EIC de CRL1505, fue descartada debido a una subestimación de la concentración real de *polyP* ya que la aplicación de esta técnica depende de la concentración y longitud de la cadena del polianión. Por el contrario, otros autores utilizaron sin inconvenientes esta metodología pero emplearon estándares de *polyP* de peso molecular similar al polianión en estudio (99). En este trabajo de tesis, utilizamos la técnica espectrofotométrica que permite medir la concentración de fosfato soluble del *polyP* previamente hidrolizado por tratarse de una técnica simple, de bajo costo y consistente en las mediciones, tanto en EIC como en medios de cultivo (**Capítulo 1**). Esta metodología cuantifica *polyP* en términos de la concentración de monómeros de fosfato y fue utilizada previamente con esta finalidad (84, 97, 99). Con esta metodología se estableció una curva de correlación ($R^2 = 0,99$) entre concentraciones de fosfato libre y concentraciones conocidas del *polyP* sintético (*polyP*-45) hidrolizado, que permitió ajustar la dosis del estándar de *polyP*-45 a la concentración de fosfato libre presente en el EIC de la cepa CRL1505 para su utilización en los experimentos *in vivo*.

Estudios recientes (84, 85, 187) informan acerca de la funcionalidad de los *polyP* de diferentes cepas de *Lactobacillus*, que presentaron efecto anti-inflamatorio a nivel intestinal. El *polyP* de *L. paracasei* JCM 1163 suprime significativamente la permeabilidad intestinal

inducida por oxidantes en el intestino delgado en ratones (modelo murino) (101) mientras que otros investigadores observaron que el *polyP* de *L. brevis* SBC8803 mejora la barrera intestinal (84, 187), suprime la inflamación y la fibrosis intestinal al (85) inducir la apoptosis e inhibe la progresión de células de cáncer de colon a través de la activación de la señalización ERK (193). Este grupo propone que la administración del *polyP* de *L. brevis* SBC8803 es una opción novedosa para el tratamiento de procesos inflamatorios intestinales crónicos.

Por el contrario, no hay antecedentes en la literatura acerca de la administración de *polyP* por una vía diferente a la oral, como es la vía intranasal, y que demuestren su efecto en otra mucosa, como es la mucosa respiratoria. En este sentido, el principal objetivo de nuestros estudios *in vivo* fue investigar si EIC de CRL1505 conteniendo *polyP*, administrado por vía intranasal durante un proceso inflamatorio respiratorio en curso, sería capaz de disminuir o evitar la inflamación. Al respecto, se conoce una gran variedad de modelos experimentales de inflamación pulmonar empleados para comprender los mecanismos de daño pulmonar y probar nuevas estrategias terapéuticas (194-196). En este trabajo de tesis se empleó un modelo de inflamación respiratoria aguda inducida por la administración intranasal de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (188), el cual es un reconocido factor inductor de inflamación (190).

Los macrófagos pulmonares cumplen un papel central en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y la defensa del hospedador y se encuentran distribuidos a lo largo de todo el tracto respiratorio. En condiciones normales, la población mayoritaria en pulmón está compuesta por macrófagos alveolares (> 95 %) una de las pocas poblaciones celulares que residen en espacios aéreos saludables. En estado estacionario, la función principal de los macrófagos alveolares es la fagocitosis y el secuestro de antígenos para evitar que se produzca una respuesta inflamatoria y proteger a los tejidos locales (197). En este estado, los macrófagos alveolares producen pequeñas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, manteniendo la capacidad de ser activados en respuesta a estímulos extrínsecos e intrínsecos, incluyendo citoquinas, microorganismos y material particulado. Al superar los mecanismos homeostáticos, la activación de los macrófagos alveolares resulta

en un cambio de su capacidad funcional para convertirse en una eficiente célula efectora: adquieren mayor capacidad fagocítica y microbicida, aumentan la producción de citoquinas pro-inflamatorias y coordinan la respuesta inmune innata (198, 199). Esta activación de los macrófagos es uno de los factores de riesgo inductores de la inflamación respiratoria aguda (190). El LPS, uno de los componentes principales de la membrana externa de bacterias Gram negativas, es capaz de penetrar en el torrente sanguíneo e inducir respuestas inflamatorias mediante la activación de macrófagos (200). Se ha demostrado que la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias después del desafío con LPS es capaz de reducir las lesiones pulmonares y mejorar la tasa de supervivencia (201, 202).

En esta tesis demostramos que la administración de LPS por vía intranasal en los animales de experimentación indujo una respuesta inflamatoria evidenciada, en primer lugar, por la migración de numerosas células, principalmente macrófagos, al espacio pulmonar. Las citoquinas pro-inflamatorias producidas por estos macrófagos reclutan y activan los neutrófilos, que se adhieren al endotelio de los capilares afectados y migran a los espacios aéreos, lo que lleva a una lesión pulmonar más grave (203). Estos cambios fueron observados en nuestro modelo experimental de inflamación respiratoria ya que la administración de LPS aumentó significativamente el número de neutrófilos en lavado bronco-alveolar (LBA), redujo el número de los mismos en sangre periférica e incrementó los niveles de IL-10, IL-17, IL-6, IL-2, IL-4, INF gama y TNF-alfa a nivel local y en sangre, con un pico a las 6 hs post-desafío. Estos hallazgos son coincidentes con estudios previamente reportados en modelos animales (188, 191, 204) así como en diversos estudios clínicos (205) donde la acumulación de neutrófilos en los espacios alveolares contribuyó a la inflamación y a los efectos citotóxicos sobre las células pulmonares. Estos son indicios de que la inflamación pulmonar aguda es provocada por un exceso de citoquinas pro-inflamatorias producidas por los neutrófilos activados que se acumulan en el pulmón e inducen la liberación de otros mediadores inflamatorios (186).

En nuestro modelo *in vivo* de inflamación respiratoria aguda se empleó budesonida como control positivo del efecto anti-inflamatorio buscado. Este es un fármaco con capacidad anti-inflamatoria, frecuentemente usado en el tratamiento enfermedades respiratorias. Por otro

lado, al no disponer de cepas *knockout* para el gen *ppk* (gen que codifica para la enzima PPK, encargada de la síntesis de *polyP*), cepas comúnmente utilizadas en bibliografía como control del efecto de *polyP* en experimentos *in vivo* (83, 101), en este trabajo se incluyó un *polyP* sintético como control (P45). De esta forma, se adjudicó el efecto al *polyP* del EIC de CRL1505 por haberse obtenido valores similares a P45. También es importante destacar que el efecto de *polyP* en este modelo fue independiente de su PM y longitud de cadena, teniendo en cuenta las diferencias existentes entre *polyP* del EIC de CRL1505 y *polyP*-45 (P45).

El tratamiento intranasal con EIC o *polyP* sintético fue capaz de evitar la migración leucocitaria (macrófagos y neutrófilos) al espacio bronco-alveolar y el incremento de la actividad mieloperoxidasa en sangre, además de normalizar el número de neutrófilos en sangre periférica. Este efecto estuvo relacionado con los niveles de las citoquinas estudiadas. Si bien en LBA no se observaron diferencias significativas en los niveles de las citoquinas estudiadas entre los grupos tratados y no tratado (grupo LPS), el tratamiento con EIC logró normalizar los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-17, IL-6, IL-2, IL-4, INF gama, al igual que los tratamientos con *polyP*-45 y budesonida, sin diferencias significativas entre ellos. Por el contrario, únicamente el tratamiento con EIC logró normalizar los niveles de TNF-alfa en suero, a diferencia de *polyP*-45 y budesonida que dieron valores inferiores al control de bioterio. La administración intrarrectal del *polyP* proveniente de *L. brevis* SBC8803 en un modelo murino de colitis aguda mejoró significativamente la tasa de supervivencia y la lesión intestinal mediante la supresión de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 beta e IL-6 (84). Utilizando este mismo modelo animal, Kashima y col. (85) demostraron que ratones tratados con un *polyP* sintético presentaron una disminución significativa en los niveles de expresión de ARNm de IL-1 beta, TNF alfa e INF gama.

Se sabe que la IL-10 tiene un papel protector importante en el control de la inmunopatología durante infecciones respiratorias (34, 206) y daño pulmonar agudo (207, 208) contribuyendo a la restitución del equilibrio entre factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. El

tratamiento terapéutico con EIC o budesonida normalizó los niveles séricos de IL-10, a diferencia del *polyP* sintético que dió valores menores que el control de bioterio.

A pesar de que se conocen diversas bacterias lácticas probióticas con propiedades anti-inflamatorias, se han identificado pocas biomoléculas derivadas de las mismas (188). En este trabajo de tesis se demuestra, por primera vez, que el tratamiento intranasal con EIC de *L. rhamnosus* CRL1505 en un modelo murino de inflamación aguda pulmonar luego de un desafío inflamatorio, evita el desarrollo de una respuesta inflamatoria local en las vías respiratorias. Las propiedades descritas para este nuevo agente bioactivo, *polyP* del inmunobiótico *L. rhamnosus* CRL1505, apoyan la búsqueda de alternativas biológicas para mitigar trastornos inflamatorios de las vías respiratorias, que constituyen un problema de salud pública.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en este Capítulo permiten concluir que:

- ✚ La administración de LPS a ratones (modelo experimental murino) produjo un aumento significativo de leucocitos, macrófagos y neutrófilos en líquido bronco alveolar (LBA) y una disminución significativa de leucocitos y neutrófilos en sangre periférica, comparado con el grupo control de bioterio a las 6 hs post-desafío
- ✚ El tratamiento con el EIC de CRL1505 disminuyó la inflamación producida por LPS al evitar el reclutamiento de leucocitos, macrófagos y neutrófilos al espacio alveolar. Al mismo tiempo, mantuvo el número de neutrófilos en sangre periférica cercano a la normalidad, sin modificar su actividad mieloperoxidasa. Similares resultados se obtuvieron con *polyP*-45 y budesonida.
- ✚ El desafío con LPS indujo el incremento significativo de todas las citoquinas estudiadas (IL-10, IL-17, IL-6, IL-2, IL-4, INF gama, TNF alfa) tanto a nivel local como sistémico, lo que indica que el modelo de inflamación respiratoria funciona.
- ✚ El tratamiento con EIC-CRL1505 logró normalizar los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias IL-17, IL-6, IL-2, IL-4 e INF gama en sangre periférica, al igual que los tratamientos con *polyP*-45 y budesonida sin diferencias significativas entre éstos.

- ✚ Sólo el tratamiento con EIC logró normalizar los niveles de TNF alfa en suero, dando valores similares al control de bioterio.
- ✚ El tratamiento con EIC normalizó los niveles séricos de IL10, citoquina reguladora, al igual que el tratamiento con el corticoide budesonida, no así *polyP-45* que indujo valores inferiores al control de bioterio.

CONCLUSIÓN GENERAL DE TESIS

En esta Tesis Doctoral se estudió la tolerancia al estrés térmico, osmótico y oxidativo derivados del proceso de secado por pulverización de la cepa inmunobiótica (*L. rhamnosus* CRL1505, cuyas propiedades benéficas están ampliamente documentadas. Se evidenció por primera vez la acumulación de *polyP* en el citoplasma de *L. rhamnosus* CRL1505 y su relación con la tolerancia a estrés, estableciéndose las condiciones biotecnológicas de producción de biomasa para mejorar la supervivencia de las células a la deshidratación. Se demostró que la inclusión de sales inorgánicas, tanto en la matriz de secado como en el medio de rehidratación del probiótico en polvo, mejora la viabilidad celular durante el secado y posterior almacenamiento. Los probióticos deshidratados obtenidos sobre base no láctea representan una alternativa a los productos disponibles actualmente en el mercado y un punto de partida para la formulación de un complemento dietario, que constituye un área de vacancia en el mercado. Finalmente, se puso en evidencia la capacidad del *polyP* intracelular de *L. rhamnosus* CRL1505 para evitar el desarrollo de una respuesta inflamatoria local en las vías respiratorias, empleando un modelo murino de inflamación pulmonar aguda.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMO DE ESTUDIO***Origen***

En este trabajo se utilizó la cepa *L. rhamnosus* CRL1505 perteneciente a la Colección de Cultivo del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), San Miguel de Tucumán, Argentina. La cepa fue aislada de leche de cabra en la provincia de Tucumán.

Preservación y propagación

Con el fin de conservar a largo plazo la cepa en estudio, se prepararon cultivos *stock* de la siguiente manera: la cepa fue cultivada (2 %) en caldo MRS a 37°C durante 16 hs (fase estacionaria de crecimiento). Las células se cosecharon por centrifugación (10000 g, 15 min) y se suspendieron en medio protector LEL-Glicerol estéril (10 x). Este cultivo se fraccionó en viales estériles (500 uL) que fueron conservados a -20 °C hasta su uso. Se obtuvo un cultivo activo de la cepa en estudio mediante transferencia de estos viales al medio de cultivo (inóculo al 2 %; v/v) e incubación a 37 °C hasta la fase de crecimiento deseada.

MEDIOS DE CULTIVO***Medio Protector LEL-Glicerol***

Medio LEL: leche descremada en polvo 10,0 g; extracto de levadura 0,5 g; glucosa 1,0 g; agua destilada c.s.p. 100 mL. Se esterilizó a 115 °C (0,6-0,7 atm de presión) durante 20 min. Se agregó glicerol puro (esterilizado por separado a 121 °C, 20 min) al medio LEL en una concentración final del 20 % (v/v).

Caldo MRS (90)

Peptona de carne 10,0 g; extracto de carne 10,0 g; extracto de levadura 10,0 g; glucosa 20,0 g; Tween 80 1,0 g; K₂HPO₄ 2,0 g; acetato de sodio 5,0 g; citrato triamónico 2,0 g; MgSO₄.7H₂O 0,2 g; MnSO₄.4H₂O 0,05 g; agua destilada csp. 1000 mL. Se esterilizó a 121°C durante 20 min. El pH final del medio fue 6,4 ± 0,03.

Este medio fue utilizado de forma sólida mediante el agregado de 1,5 % de agar al medio líquido.

Caldo MCM

Peptona de carne 5,0 g; extracto de levadura 10,0 g; lactosa 20,0 g; MnSO₄ 0,038 g; MgSO₄ 0,05 g; KH₂PO₄ 5,6 g; Na₂HPO₄ 3,6 g; agua destilada csp. 1000 mL. Se esterilizó a 121°C durante 20 min. El pH final del medio fue 6,4 ± 0,02.

LAPTg agar (91)

Peptona de carne 15 g; tripteína 10 g; extracto de levadura 10 g; Tween 80 1 g; glucosa 10 g; agar 15 g; agua destilada csp. 1000 mL. Se esterilizó a 121°C durante 20 min.

TÉCNICAS GENERALES

Medidas de crecimiento

Como medidas de crecimiento celular se utilizaron la absorbancia del cultivo a 600 nm (A₆₀₀) y/o el recuento de células viables (unidades formadoras de colonias por mL: UFC/mL) mediante la técnica de recuento en gota (209), sembrando diluciones seriadas de un cultivo en LAPTg agar o MRS agar (diluciones seriadas en solución fisiológica NaCl 0,85 %; p/v). La velocidad específica de crecimiento máxima [μ_{\max} (h⁻¹)] se calculó durante la fase de crecimiento exponencial mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\mu_{\max} = [\ln (N/N_i)] / \Delta T$$

Donde N y Ni representan las UFC/mL al final y al comienzo de la fase exponencial, respectivamente y ΔT el tiempo en el que transcurrió la fase exponencial (hs).

Determinación de la viabilidad y daño celular por citometría de flujo

Células de CRL1505 cultivadas en diferentes condiciones fueron teñidas con un kit de viabilidad celular (BD™ Biosciences, EE. UU.) compuesto por dos colorantes que indican integridad de la membrana celular: naranja de tiazol (parámetro de viabilidad celular) y

ioduro de propidio, cuya acumulación intracelular indica daño de membrana plasmática (103). Las células de CRL1505 fueron suspendidas en solución buffer fosfato salino (PBS) a una concentración aprox. de 1×10^6 células/mL y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min con 420 μ M de naranja de tiazol y 48 μ M de ioduro de propidio. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACS Calibur (BD™ Biosciences, EE.UU.), utilizando dos longitudes de onda diferentes, 488 nm y 635 nm. Se contaron 10000 eventos por muestra. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado y el análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo, versión 7.6.1. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células vivas, dañadas y muertas.

Determinación de pH

Las medidas de pH se efectuaron empleando un pHmetro portátil (Sartorius PT-10).

Determinación de etanol y ácidos orgánicos por HPLC

Etanol y los ácidos láctico, fórmico y acético se determinaron por HPLC como describió previamente Gerez y col. (210) utilizando una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H (modelo ISCO 2350, 300×7,8 mm², Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Las concentraciones de metabolitos se expresaron en g/L.

Determinación de la producción de diacetilo/acetoína(133)

Esta técnica permite determinar en forma semicuantitativa la formación de diacetilo/acetoína; el diacetilo reacciona con alfa naftol en medio alcalino formando un compuesto color fucsia. Brevemente, se agregó 1 mL de KOH 30 % (p/v) a 2 mL de cultivo de CRL1505 (estático o agitado). Posteriormente, se agregó 1 mL de alfa naftol (4 %, p/v) disuelto en alcoholisoamílico:etanol (10:90, v/v). La mezcla obtenida se incubó a 30 °C durante 30 min. Las muestras positivas mostraron la formación de un halo fucsia.

Quantificación espectrofotométrica de fosfato soluble

La técnica fue adaptada de Smith y col. (65) y de De Angelis y col. (211). Brevemente, 100 μL de muestras diluidas se mezclaron con 100 μL de un reactivo de color compuesto por 80 % de solución A [1, 5 % (p/v) de molibdato de amonio y 5,5 % (v/v) de ácido sulfúrico] y 20 % de solución B [2, 7 % (p/v) de sulfato ferroso]. Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia de las mismas a 700 nm en un lector de microplacas. Las concentraciones de fosfato se determinaron por referencia a una curva estándar utilizando 2 mg/mL de Na_2HPO_4 como patrón y se informaron en términos de la concentración de monómeros de fosfato (fórmula de monómero: NaPO_3).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Células de *L. rhamnosus* CRL1505 fueron cultivadas en MCM a 37°C durante 20 hs y observadas por microscopía electrónica. Para la obtención de delgadas láminas celulares, las células se fijaron durante una semana en solución Karnovsky: 2,66 % de formaldehído; 1,66 % de glutaraldehído y buffer fosfato de sodio (0,1 M; pH 7,4) (212). Posteriormente, las células se lavaron tres veces con este buffer y se fijaron en tetróxido de osmio al 2 % en el mismo tampón, a 4°C durante toda la noche. Finalmente las muestras fueron deshidratadas en series de etanol y se colocaron en resina de Spurr. El seccionamiento se llevó a cabo con ultramicrotomo Potter Blum MT1. Los slices fueron teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo (213) y examinados con un microscopio electrónico Zeiss EM109 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania). Se tomaron microfotografías electrónicas con diferente aumento.

❖ **Estudio de la tolerancia intrínseca a estrés**

Células de un cultivo activo de CRL1505 en MCM (37°C, 20 h) fueron cosechadas por centrifugación (9790 g; 15 min; 4°C) y suspendidas en buffer fosfato de potasio estéril (10 mM; pH 7,0). Esta suspensión se utilizó para inocular 50 mL del mismo buffer (recuento inicial de aprox. 10^8 UFC/mL) equilibrado a: **(1)** Temperaturas: 37°C; 50°C; 55°C; 60°C y 65°C y 70°C **(2)** Actividad de agua (a_w , ajustada con glicerol puro): 1,000; 0,9225; 0,8185; 0,7195; 0,5730;

0,4150 y 0,2720 **(3)**H₂O₂: 0,00 %; 0,05 %, 0,10 %; 0,20% y 0,40 %. Como control positivo y recuento de células inicial (Ni) se utilizó buffer a 37°C; a_w 1,000 y 0,00 % de H₂O₂. Se tomaron muestras (1 mL) después de 1-5 min, y después de 10, 15 y 20 min de incubación bajo las diferentes condiciones de estrés. En el caso de la temperatura, las muestras tomadas fueron enfriadas inmediatamente en baño de hielo. En el caso de presencia de agua oxigenada y glicerol, las muestras tomadas fueron inmediatamente diluidas. Los recuentos celulares se realizaron en placas de LAPTg agar y las placas (ensayos duplicados) se incubaron a 37 ° C durante 48 hs. Los resultados se expresaron como sobrevida celular según la siguiente ecuación:

$$\text{Sobrevida} = \log (N/N_i)$$

Donde N es el número de células en un determinado tiempo y Ni representa el recuento inicial, el cual fue obtenido a partir del control a 37°C, 0,00 % de H₂O₂ y a_w = 1,000.

Protocolo de shock térmico

La sobrevida a *shock* térmico de la cepa CRL1505 cultivada en MCM o MCM(-) se evaluó de la misma forma que en el apartado anterior, seleccionando 60°C como temperatura de *shock* y 5 min de tratamiento. Se evaluaron diferentes medios de *shock* térmico, los cuales fueron esterilizados y llevado a pH 7 previo a su utilización:

- Buffer fosfato de potasio (10 mM; pH 7,0)
- Leche descremada reconstituida (LDR; pH 6.70; Milkaut, Argentina)
- MCM
- MCM1: lactosa 2 %)
- MCM2: extracto de levadura 1 % + peptona de carne 0,5 %
- MCM3: Na₂HPO₄ +KH₂PO₄ + MgSO₄ + MnSO₄
- MCM4: Na₂HPO₄ +KH₂PO₄
- MCM5: MgSO₄ + MnSO₄
- Goma Arábica (La repostera, Tucumán, Argentina)
- Alginato de sodio (KIMIKA; PROVIND NOA, Tucumán, Argentina)

- Concentrado proteico de suero (WPC; 35 %; Milkaut, Argentina)
- Maltodextrina (15/Globe 19159; PROVIND NOA, Tucumán, Argentina)

❖ Estudio de polifosfato inorgánico intracelular

Visualización de polyP por tinción de Neisser

Se utilizaron cultivos (50 x) de *L. rhamnosus* CRL1505 en MCM a 37°C cosechados a las 20 hs de fermentación. Los frotis bacterianos se secaron al aire en portaobjetos limpios y desengrasados y los gránulos de polifosfato inorgánico se tiñeron específicamente con solución de Neisser (Sigma-Aldrich Co) (70, 214) durante 3 min. Se lavaron los frotis con abundante agua destilada y se dejaron secar completamente. Se observaron al microscopio óptico (CX, Olympus, Tokyo, Japan) usando aceite de inmersión (100 x).

Electroforesis de polyP en geles de poliacrilamida (PAGE)

En primer lugar se prepararon extractos intracelulares (EICs) de *L. rhamnosus* CRL1505, para lo cual la cepa fue cultivada en el medio MCM o MCM(-) a 37°C durante 20 hs. Las células bacterianas se recuperaron por centrifugación (10000 g, 15 min) y fueron concentradas (50 x) en agua destilada estéril. El *pellet* concentrado se mezcló con perlas de vidrio (150-212 µm diámetro, Sigma-Aldrich Co; St. Louis, MO, Estados Unidos) en una relación 1:1 (células: perlas). Luego, las células se rompieron usando un disruptor celular Mini-BeadBeater-8 (Biospec Products Inc.; Bartlesville, OK, Estados Unidos) a velocidad máxima, con 7 ciclos de 1,5 min cada uno e intervalos en hielo de 1 min entre ciclo y ciclo. Para eliminar los restos celulares y las perlas de vidrio, las muestras se centrifugaron (14500 g, 5 min, 4 °C) y los EICs obtenidos se utilizaron inmediatamente o se conservaron en *freezer* (-20°C) hasta su utilización.

El tamaño del polifosfato presente en EICs de CRL1505 se estimó según Leitao y col. (100), con modificaciones. Brevemente, 20 µL de muestra se mezclaron con el colorante de siembra [buffer Tris-Borato-EDTA (5 x; TBE): 90 mM Tris; 90 mM Borato; 2,7 mM EDTA; pH 8.3; 5 % de glicerol; 0,01 % de azul de bromo fenol y 0,02 % de xileno cianol]) y se cargaron en geles

de poliacrilamida al 4 % y 8 % (relación acrilamida: bisacrilamida = 20:1). Los geles se corrieron en buffer TBE (1 x) y se tiñeron con una solución de azul de toluidina (0,05 %) en 25 % de metanol. El tamaño de polifosfato se comparó con un estándar de polifosfato cuya longitud de cadena polianiónica consistió en 45 residuos de fosfato (PM: 4748 Da).

Semi-cuantificación de polyP mediante fluorescencia con DAPI

Se determinó el contenido de polifosfato inorgánico intracelular en suspensiones celulares de CRL1505 provenientes de los medios de cultivo MCM o MCM(-), bajo diferentes condiciones. Se utilizó un enfoque de fluorescencia basado en la utilización de la sonda fluorescente DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol) (215). El método fue tomado y adaptado de la técnica reportada por Schurig-Briccio y col.(95) y Grillo-Puertas y col. (96) para bacterias Gram negativas. Brevemente, se añadieron 17 mM DAPI (Sigma) a las células de CRL1505 lavadas y suspendidas en buffer T (Tris-HCl 100 mM; pH 8) junto con dodecilsulfato sódico (SDS) y cloroformo para la permeabilización celular ($A_{600}=0,02$). Después de 15 min de agitación a 37°C, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de DAPI (excitación 415 nm, emisión 450 a 650 nm) usando un espectrofluorómetro ISS PCI (Champaign, IL). La fluorescencia (unidades arbitrarias; UA) del complejo DAPI-polifosfato a 550 nm se utilizó como una medida del contenido de polifosfato intracelular, ya que las emisiones de fluorescencia de DAPI libre y DAPI-DNA son mínimas a esta longitud de onda (215). Se usó una cepa mutante de *Escherichia coli*, no productora de polifosfato, como control negativo de fluorescencia.

Cuantificación espectrofotométrica de polyP mediante azul de toluidina

El método se basa en una disminución de la absorbancia del colorante azul de toluidina de 620-530 nm por reacción metacromática con polifosfato (216). La técnica fue empleada para la medida directa de polifosfato en EIC de CRL1505 y fue adaptada a partir de Ohtomo y col. (216). Brevemente, 100 μ L de azul de toluidina (0,15 mg/mL) en ácido acético (50 mM) fueron mezclados con 100 μ L de muestra conteniendo polifosfato. Se dejó 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia de las muestras a 530 y 620 nm en un

espectrofotómetro de microplacas. La concentración de polifosfato se calculó a partir de una curva estándar confeccionada con la relación de absorbancias a 620 y 530 nm (A_{620}/A_{530}) en función de concentraciones conocidas (0; 2; 2,5; 4; 5; 8; 10; 12, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de un estándar de polifosfato inorgánico constituido por 45 residuos de fosfato (Sigma; PM 4748 Da).

Cuantificación de polyP como fosfato soluble

Esta técnica se empleó previamente para cuantificar fosfatos en medios de cultivo (pág. 104). Para cuantificar *polyP* intracelular se partió de EICs de CRL1505 y se adicionó una etapa de hirólisis (HCl 1 M, 100°C, 30 min) previa a la cuantificación espectrofotométrica de los grupos fosfatos liberados, como se describió previamente.

Análisis transcripcional de los genes codificantes para las enzimas PPX1, PPX2 y PPK

El aislamiento de ARN total se realizó a partir de un cultivo de 20 hs de *L. rhamnosus* CRL1505 según Raya y col. (217) a partir de dos réplicas biológicas y dos repeticiones técnicas. Brevemente, las células de 25 mL de un cultivo de 20 hs en MCM y MCM(-) a 37°C, se recogieron por centrifugación, se lavaron con tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8) y se suspendieron en 500 μL de tampón TE frío. La suspensión celular se añadió a un tubo de microcentrífuga con tapón de rosca de 2 mL que contenía 0,6 g de perlas de vidrio (100 μm de diámetro, Sigma-Aldrich Co; St. Louis, MO, Estados Unidos), 170 μL de una suspensión de Macaloide al 2 % (p/v), 500 μL de tampón Tris-HCl fenol-cloroformo (1:1) pH 7, y 100 μL de 20 % (p/v) de SDS. Las células se rompieron por agitación en un disruptor celular Mini-BeadBeater-8 durante 10 ciclos de 1 min con intervalos en hielo de 1 min. Luego se centrifugó a 13000 rpm, 4°C durante 15 min, el sobrenadante acuoso que contenía el ARN fue extraído dos veces con 1 volumen de Tris-HCl fenol-cloroformo (1:1 v/v) y se precipitó con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y etanol absoluto (3 volúmenes). Finalmente, el ARN fue suspendido en agua libre de ARNasa. El ARN aislado se trató con el

kit TURBO-ADN libre™ (Ambion®, Invitrogen, Buenos Aires kArgentina) según las instrucciones del fabricante, antes de la síntesis de ADNc.

RT-PCR: la síntesis de ADNc se realizó a partir de 5 µg de ARN total confirmado libre de ADN, utilizando el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Buenos Aires-Argentina). Los cebadores utilizados en la RT-PCR se enumeran en la **Tabla 7**. Estos fueron diseñados de acuerdo con las secuencias de *ppx1*, *ppx2* y *ppk* en el genoma de *L. rhamnosus* GG (NCBI Reference Sequence: NC_013198.1) y CRL 1505 (GenBank N°:ATBI00000000.1), con el programa Primer Quest (Integrated DNA Technologies, Inc.). Las reacciones de PCR a partir del ADNc obtenido, se realizaron por duplicado y estuvieron compuestas por 60 ng de ADNc, 1 µM de cada cebador, 1x de mezcla de reacción para PCR (Green GoTaq® Reaction Buffer Promega, Buenos Aires-Argentina) y 0,1 µL de la enzima GoTaq® DNA Polimerasa (Promega, Buenos Aires-Argentina) en un volumen final de 12,5 µL por reacción.

Las condiciones de PCR fueron: inicialmente 4 min/95°C, 30 ciclos que constan de 30 s/95°C, 30 s/50°C, 60 s/72°C seguido por una extensión final a 72°C por 5 min. Para cada reacción se incluyó: un control no templado (sin ADNc), un control positivo de la expresión representado por el gen constitutivo 16S ARNr, y un control positivo de la reacción con cada cebador utilizando el ADN genómico de la cepa CRL 1505 como molde. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1,5 % (p/v) a 90 V en tampón TAE 1x (40 mM Tris pH 7,6, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y posteriormente se tiñeron con una solución de Gel Red 0,001 % (v/v) (Biotium, Genbiotech, Buenos Aires-Argentina). Los gels fueron fotografiados usando un sistema de fotodocumentación digital (ChemiDoc XRS+, Biorad, Buenos Aires, Argentina) y analizados con el programa Image Lab Software. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado y mantenidas en hielo durante todo el procesamiento.

Tabla 7. *Primers* empleados en las reacciones de PCR para la amplificación de los genes *ppk*, *ppx1*, y *ppx2*.

Gen	Primer	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	Longitud (bases)
<i>ppk</i> : polifosfato quinasa	<i>ppk-f</i>	ATGCGGCTGTGTTCCAGTAA	51,78	20
	<i>ppk-r</i>	TCACGGCCCGATTGATTTGA	51,78	20
<i>ppx1</i> : expolifosfatasa 1	<i>ppx1-f</i>	ATTCACGGCTCGGGTGTTTC	53,25	19
	<i>ppx1-r</i>	AGGTAGCAACTCTGCACGAA	51,78	20
<i>ppx2</i> : exopolifosfatasa 2	<i>ppx2-f</i>	GAATCTTTTGCTGCCGCGAT	51,78	20
	<i>ppx2-r</i>	ACCGTTGCGGGTGTATGAAA	51,78	20

❖ Estudio del efecto de la agitación

CRL1505 fue cultivada a pH libre en medio MCM a 37°C, durante 24 hs, en un baño termostatzado con (400 rpm y 150 rpm) y sin agitación. A las 24 hs se tomaron muestras para estudios morfológicos mediante microscopía óptica, medidas de pH, recuento celular y producción metabolitos.

❖ Producción de biomasa en biorreactores

Se realizaron fermentaciones en batch utilizando un biorreactor de 2 L (INFORS HT, Suiza, **Figura 40**). El medio de cultivo (1,5 L) fue inoculado al 1 % (v/v) con *L. rhamnosus* CRL1505. Durante la fermentación la temperatura se mantuvo a 37°C, la velocidad de agitación en 150 rpm y el pH se mantuvo libre o se ajustó a 5,5 y 6,0 con una solución de NH₄OH al 20 % (v/v). Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 24-28 hs y, a intervalos de tiempo regulares se tomaron muestras asépticamente para medidas de A₆₀₀, pH y recuento celular en placas de LAPTg agar, que se incubaron a 37°C durante 48 h. Los resultados se expresaron como log de unidades formadoras de colonias (UFC/mL).



Figura 40. Fermentador *Minifors* (INFORS HT, Suiza).

❖ **Secado por pulverización**

Preparación del medio de secado

20 g de maltodextrina 15 DE (PROVIND NOA, Tucumán, Argentina) se equilibraron a 100 g con agua destilada ó 19,07 g de maltodextrina se mezclaron con 0,93 g de MCM3 (0,36 g de Na_2HPO_4 ; 0,56 g de KH_2PO_4 ; 0,005 g de MgSO_4 ; 0,0038 g de MnSO_4) y se equilibraron a 100 g con agua destilada. Las soluciones se dejaron hidratar y homogeneizar por completo durante 1 hs a 37°C bajo agitación magnética y posteriormente se esterilizaron en autoclave (120°C, 20 minutos) para destruir los patógenos. Una vez enfriadas las soluciones, se suspendieron los pellets de *L. rhamnosus* CRL1505 y se concentraron (2x); nuevamente se homogeneizó la solución a 37°C bajo agitación magnética. Se tomaron muestras para medir humedad y expresar el recuento celular antes del proceso de secado en UFC/g de peso seco.

Condiciones de secado

Los medios de secado conteniendo a *L. rhamnosus* CRL1505 se mantuvieron bajo agitación a baja velocidad durante todo el proceso de secado usando el agitador magnético propio

del equipo. Se deshidrataron usando un secador por aspersión BÜCHI B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza; **Figura 41**), equipado con un inyector de doble fluido con diámetro de orificio de 0,5 mm. Las condiciones de trabajo se establecieron en: 150°C temperatura de entrada, 13-15 % bomba de alimentación, 76°C-80°C temperatura de salida, 55 mm flujo de aire, 100% tasa de aspiración y 5 limpieza de la aguja de inyección. Los polvos obtenidos después del secado por pulverización se recogieron en frascos recolectores estériles y se almacenaron a -20°C en freezer.



Figura 41. Mini spray dryer B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza).

Medidas de peso seco

5 mL de solución presecado o 5 g de muestra en polvo fueron colocados en placas de vidrio e introducidos en estufa a 105 °C. Se realizaron pesadas diarias hasta peso constante y se calculó el porcentaje en agua mediante la pérdida en peso húmedo debida a su eliminación por calentamiento. Antes de cada pesada, las plaquitas fueron colocadas dentro de un frasco conteniendo sílica gel herméticamente cerrado hasta ser enfriadas.

Sobrevida celular

La rehidratación de los polvos se realizó disolviendo 0,5 g de polvo en 4,5 mL de PBS, a 37°C bajo agitación magnética hasta disolución completa. Se realizaron diluciones seriadas a partir de esta solución que fueron sembradas en LAPTg agar. Para los cálculos de sobrevida (%) al proceso se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Sobrevida} = \frac{\log \text{ UFC/g peso seco después del secado}}{\log \text{ UFC/g peso seco antes del secado}} \times 100$$

Rendimiento en sólidos

El rendimiento en sólidos se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento en sólidos} = \frac{\text{g peso seco en polvo}}{\text{g peso seco en solución presecado}} \times 100$$

Efecto de los medios y la temperatura de rehidratación

Los medios de reconstitución utilizados para investigar la recuperación del probiótico CRL1505 a partir de los polvos deshidratados fueron:

- Agua peptona (0,1%; p/v)
- MCM3
- LDR (10 %; p/v)
- Medio diluyente (1,5 % peptona de carne, 1,0 % tripteína y 0,5 % extracto de levadura; p/v)
- Sacarosa (20 %; p/v)
- PBS (control).

Diluciones 1/10 del probiótico deshidratado (0,5 g en 4,5 mL de medio de rehidratación) fueron homogeneizadas hasta disolución total e incubadas durante 30 min a 37°C y 45°C. Se evaluó la viabilidad celular mediante recuento en placa (LAPTg agar) y citometría de flujo.

❖ **Modelo experimental de inflamación respiratoria aguda**

Se emplearon ratones albino Suizos, machos o hembras de 3 semanas de edad. Los mismos fueron provistos por el bioterio de CERELA, donde fueron criados en colonias cerradas y bajo condiciones ambientales controladas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas durante los ensayos. Se administró a todos los ratones 25 μ L lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma Aldrich-Nº de Producto L2880), en una dosis de 200 mg/kg de peso corporal, por vía intranasal. A continuación, los animales fueron distribuidos al azar en los grupos experimentales. Los diferentes tratamientos se administraron a los animales en una única dosis por vía nasal, cada uno en un volumen final de 25 μ L, 30 minutos después de la administración del LPS. Budesonida (MEDISOL; 5,6 μ g por ratón) se utilizó como control positivo de efecto antiinflamatorio.

A las 6 hs post-administración de LPS, se sacrificaron los ratones de todos los grupos, ya que antes de este punto no se observan diferencias en la respuesta inflamatoria en los animales. Este estudio fue realizado en estricto acuerdo con las recomendaciones de la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio de los "Lineamientos para experimentación animal" de CERELA, y se hicieron todos los esfuerzos dirigidos a minimizar su sufrimiento

Evaluación de la respuesta inmune innata local y sistémica

Recuento total y diferencial de leucocitos en lavado bronco-alveolar (LBA)

Las muestras de LBA se obtuvieron de la siguiente manera: los ratones fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical y se expuso quirúrgicamente la tráquea. Se realizó una pequeña incisión en la tráquea y se instiló en los pulmones 1 mL de PBS estéril con heparina 1%. El fluido recuperado se centrifugó a 2500 rpm durante 4,5 min. Se guardó el sobrenadante, y el *pellet* se utilizó para realizar el recuento de leucocitos en cámara de Neubauer usando líquido de Turk para lisar los eritrocitos. El recuento diferencial fue realizado en microscopio (1000x), contando 200 células en improntas teñidas con May-Grünwald Giemsa. El sobrenadante se conservó a -20 °C para ser utilizado posteriormente en la determinación de citoquinas.

Recuento total y diferencial de leucocitos en sangre

Las muestras de sangre entera se obtuvieron por punción cardíaca empleando EDTA como anticoagulante. El recuento de leucocitos fue realizado empleando métodos hemocitométricos convencionales puestos a punto para ratón (28). Para el recuento diferencial se utilizaron extendidos de sangre teñidos con May-Grünwald Giemsa. Los recuentos se expresaron en valores absolutos (10^9 células/L). El suero se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser utilizado posteriormente en la determinación de citoquinas (28, 218).

Actividad peroxidasa de neutrófilos de sangre

La actividad peroxidasa de los neutrófilos de sangre se midió utilizando la prueba de Washburn, un método citoquímico que utiliza la bencidina como cromógeno. Cuando la peroxidasa actúa sobre el H_2O_2 se produce la liberación de O_2 , el cual oxida a la bencidina dando lugar a un precipitado intra-citoplasmático de color pardo oscuro. La intensidad de la reacción es directamente proporcional a la actividad enzimática. En base a esto, las células se clasificaron como negativas (grado 0), ligeramente positivas (grado 1), moderadas (grado 2) o fuertemente positivas (grado 3). La puntuación se calculó contando 200 neutrófilos en un frotis de sangre. Los resultados se expresaron como score de peroxidasa, mediante la suma de los productos del grado por su respectivo porcentaje (219).

Concentración de citoquinas en LBA y en suero

A las 6 hs post-administración de LPS, se determinaron las concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), interferín gama (IFN gama), interleuquina (IL)-6, IL-10, IL-17A, IL-4 e IL-2 en suero y LBA. Las muestras de suero y de LBA fueron obtenidas como se describió anteriormente. Para la determinación de los niveles de estas citoquinas se utilizó un kit comercial de CBA Th1/Th2/Th17 (Cytometric Bead Array) siguiendo las recomendaciones del fabricante (BD™ catálogo N° 560485). Los resultados se expresaron en picogramos (pg)/mL utilizando la curva estándar realizada con diferentes concentraciones de la citoquina correspondiente.

❖ **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en esta Tesis correspondieron al menos a tres ensayos independientes y se informaron como valores medios con desviación estándar. Los análisis ANOVA, Tukey y DGC (220), se realizaron utilizando el software InfoStat (2008) o GraphPad Prism 7. Las diferencias se consideraron significativas con $p < 0,05$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Axelsson L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology In: Dekker M, editor. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3rd. New York 2004. p. 1-67.
2. USFDA U. A Food Labeling Guide: Reference Values for Nutrition Labeling. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) Retrieved 27th Feb. 2017.
3. Del Nobile MA, Lucera A, Costa C, Conte A. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:287.
4. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016;100(7):2939-51.
5. Fernández LMS, del Castillo MS. *Lactobacillus spp.* importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora: Editorial Universitaria; 2000.
6. Sartor RB, Mazmanian SK. Intestinal microbes in inflammatory bowel diseases. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*. 2012;1(1):15.
7. Hilty M, Qi W, Brugger SD, Frei L, Agyeman P, Frey PM, et al. Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. *Journal of infectious diseases*. 2012;205(7):1048-55.
8. Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(39):14105.
9. Dickson RP, Huffnagle GB. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS pathogens*. 2015;11(7):e1004923.
10. Hossain MI, Sadekuzzaman M, Ha S-D. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: a review. *Food Research International*. 2017;100:63-73.
11. Reid G. The growth potential for dairy probiotics. *International Dairy Journal*. 2015;49:16-22.
12. Colombo M, Todorov SD, Eller M, Nero LA. The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. *Journal of Dairy Research*. 2018:1-10.
13. Food FWCohIoAi, Programme WHOFS, Organization WH, Staff WHO, FAO., WHO, et al. Health Implications of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation,

WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002: World Health Organization; 2002.

14. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British journal of nutrition*. 2013;109(S2):S35-S50.

15. Ahire JJ, Mokashe NU, Patil HJ, Chaudhari BL. Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *Journal of food science and technology*. 2013;50(1):26-34.

16. Marcial G, Villena J, Faller G, Hensel A, de Valdéz GF. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* CRL1190 reduces the inflammatory response caused by *Helicobacter pylori*. *Beneficial microbes*. 2017;8(3):451-61.

17. El-Adawi H, El-Sheekh M, Khalil M, El-Deeb N, Hussein M. Lactic acid bacterial extracts as anti-*Helicobacter pylori*: a molecular approach. *Irish journal of medical science*. 2013;182(3):439-52.

18. Garcia-Castillo V, Zelaya H, Ilabaca A, Espinoza-Monje M, Komatsu R, Albarracín L, et al. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Beneficial Microbes*. 2018:1-14.

19. Foligne B, Daniel C, Pot B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current opinion in microbiology*. 2013;16(3):284-92.

20. Villena J, Salva S, Barbieri N, Alvarez S. Immunobiotics for the prevention of bacterial and viral respiratory infections. *Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics: Science Publishers, CRC Press, Taylor & Francis Group company*. 2013:128-68.

21. Guo C, Lei M, Wang Y, Hua L, Xue S, Yu D, et al. Oral Administration of Probiotic *Lactobacillus Casei* Shirota Decreases Pneumonia and Increases Pulmonary Functions after Single Rib Fracture: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Journal of food science*. 2018;83(8):2222-6.

22. Bae J-Y, Kim JI, Park S, Yoo K, Kim I-h, Joo W, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* Probiotics on Human Seasonal and Avian Influenza Viruses. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2018;28(6):893-901.

23. Clancy R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2003;38(1):9-12.
24. Kolling Y, Salva S, Villena J, Marranzino G, Alvarez S. Non-viable immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and its peptidoglycan improve systemic and respiratory innate immune response during recovery of immunocompromised-malnourished mice. *International immunopharmacology*. 2015;25(2):474-84.
25. Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin H-S, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*. 2018.
26. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & nutrition*. 2011;6(3):261.
27. Saito T, Kitazawa H. Recent tendency of immunogenics research on lactic acid bacteria. *Bulletin of Japan Dairy Technical Association*. 2005;55:34-44.
28. Salva S, Villena J, Alvarez S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections. *International journal of food microbiology*. 2010;141(1-2):82-9.
29. Kitazawa H, Villena J. Modulation of respiratory TLR3-anti-viral response by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Frontiers in immunology*. 2014;5:201.
30. Villena J, Vizoso-Pinto MG, Kitazawa H. Intestinal innate antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects against rotavirus infection. *Frontiers in immunology*. 2016;7:563.
31. Zelaya H, Alvarez S, Kitazawa H, Villena J. Respiratory antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects on inflammation-coagulation interaction during influenza virus infection. *Frontiers in immunology*. 2016;7:633.
32. Villena J, Salva S, Núñez M, Corzo J, Tolaba R, Faedda J, et al. Beneficial *lactobacilli* for improving respiratory defenses: the case of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Lactobacillus*. classification, uses and health implications. 2012.

33. Villena J, Salva S, Núñez M, Corzo J, Tolaba R, Faedda J, et al. Probiotics for everyone! The novel immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and the beginning of Social Probiotic Programs in Argentina. International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. 2012;1(3):189-98.
34. Villena J, Chiba E, Tomosada Y, Salva S, Marranzino G, Kitazawa H, et al. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly (I: C). BMC immunology. 2012;13(1):53.
35. Tamang JP, Shin D-H, Jung S-J, Chae S-W. Functional properties of microorganisms in fermented foods. Frontiers in microbiology. 2016;7:578.
36. Florou-Paneri P, Christaki E, Bonos E. Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes: InTech; 2013.
37. Roberfroid MB. A European consensus of scientific concepts of functional foods. Nutrition. 2000;16(7):689-91.
38. Kwak N-S, Jukes DJ. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. Food Control. 2001;12(2):99-107.
39. Menard S, Candalh C, Bambou J, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. Gut. 2004;53(6):821-8.
40. Burdock GA, Carabin IG, Griffiths JC. The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. Toxicology. 2006;221(1):17-27.
41. Falguera V, Aliguer N, Falguera M. An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? Food Control. 2012;26(2):274-81.
42. Probiotic Products-A Global Market Overview. Market research reports to define the right strategy and execute through to the succes. 2015:221.

43. Broeckx G, Vandenneuvel D, Claes IJ, Lebeer S, Kiekens F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International journal of pharmaceutics*. 2016;505(1-2):303-18.
44. Available from: www.euromonitor.com.
45. Vinderola RWJADPG. Probióticos: su impacto en la nutrición y la salud: una visión desde el cono sur. Buenos Aires: Asociación Civil Danone para la Nutrición, la Salud y la Calidad de Vida; 2018. 256 p.
46. Klayraung S, Viernstein H, Okonogi S. Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;370(1-2):54-60.
47. Czinn SJ, Blanchard SS. Probiotics in foods and supplements. *Probiotics in Pediatric Medicine*: Springer; 2009. p. 299-306.
48. Stadler M, Viernstein H. Optimization of a formulation containing viable lactic acid bacteria. *International journal of pharmaceutics*. 2003;256(1-2):117-22.
49. Poulin J-F, Caillard R, Subirade M. β -Lactoglobulin tablets as a suitable vehicle for protection and intestinal delivery of probiotic bacteria. *International journal of pharmaceutics*. 2011;405(1-2):47-54.
50. Sreeja V, Prajapati JB. Probiotic formulations: Application and status as pharmaceuticals—A review. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2013;5(2):81-91.
51. Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in colloid and interface science*. 2015;223:40-54.
52. Vandenneuvel D, Singh A, Vandersteegen K, Klumpp J, Lavigne R, Van den Mooter G. Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;84(3):578-82.
53. Peighambardoust S, Tafti AG, Hesari J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2011;22(5):215-24.

54. Golman B, Julklang W. Analysis of drying kinetics of a slurry droplet in the falling rate period of spray drying. *Int J Chem Sci Eng.* 2013;7:801-5.
55. De Angelis M, Gobbetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*. a review. *Proteomics.* 2004;4(1):106-22.
56. van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Springer;* 2002. p. 187-216.
57. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology.* 2008;105(1):1-13.
58. Janning B, In't Veld P. Susceptibility of bacterial strains to desiccation: a simple method to test their stability in microbiological reference materials. *Analytica chimica acta.* 1994;286(3):469-76.
59. Perdana J, Bereschenko L, Fox MB, Kuperus JH, Kleerebezem M, Boom RM, et al. Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. *Food Research International.* 2013;54(2):1351-9.
60. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology progress.* 2007;23(2):302-15.
61. Velly H, Fonseca F, Passot S, Delacroix-Buchet A, Bouix M. Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis subsp. lactis* TOMSC 161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *Journal of applied microbiology.* 2014;117(3):729-40.
62. Fonseca F, Béal C, Corrieu G. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology.* 2001;43(3):189-98.
63. Huang S, Rabah H, Jardin J, Briard-Bion V, Parayre S, Maillard M-B, et al. Hyperconcentrated sweet whey: a new culture medium that enhances *Propionibacterium freudenreichii* stress tolerance. *Applied and environmental microbiology.* 2016:AEM. 00748-16.
64. Morgan CA, Herman N, White P, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of microbiological methods.* 2006;66(2):183-93.

65. Alcántara C, Coll-Marqués JM, Jadán-Piedra C, Vélez D, Devesa V, Zúñiga M, Monedero V. Polyphosphate in *Lactobacillus* and its link to stress tolerance and probiotic properties. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9.
66. Kornberg A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of bacteriology*. 1995;177(3):491-6.
67. Meyer A. Orientierende untersuchungen über verbreitung, morphologie und chemie des volutins: A. Felix; 1904.
68. Wiame J, editor Yeast metaphosphate. Federation proceedings; 1947.
69. Kornberg A, Rao NN, Ault-Riche D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual review of biochemistry*. 1999;68(1):89-125.
70. Alcántara C, Blasco A, Zúñiga M, Monedero V. Accumulation of polyphosphate in *Lactobacillus spp.* and its involvement in stress resistance. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(5):1650-9.
71. Rao N, Kornberg A. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Inorganic Polyphosphates*: Springer; 1999. p. 183-95.
72. Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, et al. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(17):9636-41.
73. Candon HL, Allan BJ, Fraley CD, Gaynor EC. Polyphosphate kinase 1 is a pathogenesis determinant in *Campylobacter jejuni*. *Journal of bacteriology*. 2007;189(22):8099-108.
74. Tsutsumi K, Munekata M, Shiba T. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 2000;1493(1-2):73-81.
75. Blum E, Py B, Carpousis AJ, Higgins CF. Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Molecular microbiology*. 1997;26(2):387-98.

76. Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, et al. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science*. 2001;293(5530):705-8.
77. McMeechan A, Lovell MA, Cogan TA, Marston KL, Humphrey TJ, Barrow PA. Inactivation of *ppk* differentially affects virulence and disrupts ATP homeostasis in *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* and *Gallinarum*. *Research in microbiology*. 2007;158(1):79-85.
78. Hughes D, Muhammed A, editors. The metabolism of polyphosphate in bacteria. *Colloq Int Centre Natl Recherche Sci(Paris)*; 1962.
79. Kakefuda T, Holden JT, Utech NM. Ultrastructure of the membrane system in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of bacteriology*. 1967;93(1):472-82.
80. Archibald FS, Duong M-N. Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of bacteriology*. 1984;158(1):1-8.
81. Archibald FS, Fridovich I. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1982;215(2):589-96.
82. Aprea G, Mullan W, Mullan A, Murru N, Tozzi M, Cortesi M. Isolation of polyphosphate-accumulating lactic acid bacteria from natural whey starters. *Milchwissenschaft*. 2005;60(3):256-8.
83. Alcántara C, Coll-Marqués JM, Jadán-Piedra C, Vélez D, Devesa V, Zúñiga M, et al. Polyphosphate in *Lactobacillus* and its link to stress tolerance and probiotic properties. *Frontiers in microbiology*. 2018;9.
84. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin–p38 MAPK pathway. *PLoS One*. 2011;6(8):e23278.
85. Kashima S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, et al. Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic *Lactobacillus brevis*, improves the fibrosis in murine colitis. *Translational Research*. 2015;166(2):163-75.

86. Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. 2007;132(2):562-75.
87. Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008;295(5):G1025-G34.
88. Petrof EO, Claud EC, Sun J, Abramova T, Guo Y, Waypa TS, et al. Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NF-kappaB pathways and inhibits proteasome function. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(10):1537-47.
89. Heuvelin E, Lebreton C, Grangette C, Pot B, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Mechanisms involved in alleviation of intestinal inflammation by *Bifidobacterium breve* soluble factors. *PLoS One*. 2009;4(4):e5184.
90. De Man J, Rogosa d, Sharpe ME. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *Journal of applied Bacteriology*. 1960;23(1):130-5.
91. Raibaud P, Galpin J, Ducluzeau R, Mocquot F, Oliver G, editors. The "Lactobacillus" genus in the digestive tract of the rat. II. Characteristics of heterofermentative strains isolated from "holo-" and "gnotoxenic" rats (author's transl). *Annales de microbiologie*; 1973.
92. Coghetto CC, Brinques GB, Ayub MAZ. Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions. *International journal of food sciences and nutrition*. 2016;67(8):929-43.
93. Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:605-47.
94. Brown MR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(46):16085-7.
95. Schurig-Briccio LA, Farías RN, Rintoul MR, Rapisarda VA. Phosphate-enhanced stationary-phase fitness of *Escherichia coli* is related to inorganic polyphosphate level. *Journal of bacteriology*. 2009;191(13):4478-81.

96. Grillo-Puertas M, Villegas JM, Rintoul MR, Rapisarda VA. Polyphosphate degradation in stationary phase triggers biofilm formation via LuxS quorum sensing system in *Escherichia coli*. PloS one. 2012;7(11):e50368.
97. Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Rienstra CM, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. Blood. 2010:blood-2010-01-266791.
98. Clark JE, Wood HG. Preparation of standards and determination of sizes of long-chain polyphosphates by gel electrophoresis. Analytical biochemistry. 1987;161(2):280-90.
99. Mullan A, Quinn JP, McGrath JW. A nonradioactive method for the assay of polyphosphate kinase activity and its application in the study of polyphosphate metabolism in *Burkholderia cepacia*. Analytical biochemistry. 2002;308(2):294-9.
100. Leitão JM, Lorenz B, Bachinski N, Wilhelm C, Müller WE, Schröder HC. Osmotic-stress-induced synthesis and degradation of inorganic polyphosphates in the alga *Phaeodactylum tricorutum*. Marine Ecology Progress Series. 1995;121:279-88.
101. Saiki A, Ishida Y, Segawa S, Hirota R, Nakamura T, Kuroda A. A *Lactobacillus* mutant capable of accumulating long-chain polyphosphates that enhance intestinal barrier function. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2016;80(5):955-61.
102. Taranto MP, Villena J, Salva S, Alvarez S, de Giori GS, de Valdez GF, et al. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505, an Immunobiotic Strain Used in Social Food Programs in Argentina. Genome announcements. 2013;1(4):e00627-13.
103. Haugland RP. Fluorescent dyes for assessing vital cell functions. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 1992:172-80.
104. Ha M-Y, Kim S-W, Lee Y-W, Kim M-J, Kim S-J. Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2003;96(2):134-40.
105. Juarez Tomas M, Bru E, Wiese B, de Ruiz Holgado A, Nader-Macías M. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. Journal of Applied Microbiology. 2002;93(4):714-24.

106. Auling G, Pilz F, Busse H, Karrasch S, Streichan M, Schön G. Analysis of the polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. *Applied and environmental microbiology*. 1991;57(12):3585-92.
107. Bode G, Mauch F, Ditschuneit H, Malfertheiner P. Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*. 1993;139(12):3029-33.
108. Gavigan J-A, Marshall LM, Dobson AD. Regulation of polyphosphate kinase gene expression in *Acinetobacter baumannii* 252. *Microbiology*. 1999;145(10):2931-7.
109. Kuroda A, Murphy H, Cashel M, Kornberg A. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(34):21240-3.
110. Kosin B, Rakshit SK. Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44(3):371-9.
111. Di Cagno R, De Angelis M, Limitone A, Fox PF, Gobbetti M. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(7):4503-14.
112. Paéz R, Lavari L, Vinderola G, Audero G, Cuatrin A, Zaritzky N, et al. Effect of heat treatment and spray drying on *lactobacilli* viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*. 2012;48(2):748-54.
113. Golod N, Loiko N, Mulyukin A, Neiyamatov A, Vorobjeva L, Suzina N, et al. Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions. *Microbiology*. 2009;78(3):280-9.
114. Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, Zotta T, Felis GE, Torriani S. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *International journal of food microbiology*. 2010;144(2):270-9.
115. Gardiner G, O'sullivan E, Kelly J, Auty M, Fitzgerald G, Collins J, et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(6):2605-12.

116. Ananta E, Heinz V, Knorr D. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiology*. 2004;21(5):567-77.
117. Byrd JJ, Xu H-S, Colwell RR. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Applied and environmental microbiology*. 1991;57(3):875-8.
118. Fakruddin M, Mannan KSB, Andrews S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN microbiology*. 2013;2013.
119. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*. 2005;43(1):93-100.
120. Oliver JD, Nilsson L, Kjelleberg S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57(9):2640-4.
121. Laiño J, Villena J, Kanmani P, Kitazawa H. Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria exopolysaccharides: new insights into molecular interactions with host cells. *Microorganisms*. 2016;4(3):27.
122. Villena J, Barbieri N, Salva S, Herrera M, Alvarez S. Enhanced immune response to pneumococcal infection in malnourished mice nasally treated with heat-killed *Lactobacillus casei*. *Microbiology and immunology*. 2009;53(11):636-46.
123. Prasad J, McJarrow P, Gopal P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(2):917-25.
124. Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of microbiology*. 1998;170(5):319-30.
125. Barynin VV, Whittaker MM, Antonyuk SV, Lamzin VS, Harrison PM, Artymiuk PJ, et al. Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Structure*. 2001;9(8):725-38.
126. Lorca GL, de Valdez GF. The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology*. 1999;39(2):144-9.

127. Kim WS, Perl L, Park JH, Tandianus JE, Dunn NW. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*. 2001;43(5):346-50.
128. Saarela M, Rantala M, Hallamaa K, Nohynek L, Virkajärvi I, Mättö J. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic *lactobacilli* and *bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96(6):1205-14.
129. Broadbent JR, Lin C. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology*. 1999;39(1):88-102.
130. Gaudu P, Vido K, Cesselin B, Kulakauskas S, Tremblay J, Rezaïki L, et al. Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*: Springer; 2002. p. 263-9.
131. Guidone A, Ianniello R, Ricciardi A, Zotta T, Parente E. Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013;29(9):1713-22.
132. Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters*. 1987;46(3):269-80.
133. King C. Physical and chemical properties governing volatilization of flavor and aroma components. 1983.
134. Christiansen P, Nielsen EW, Vogensen FK, Brogren C-H, Ardö Y. Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *International dairy journal*. 2006;16(10):1196-204.
135. Golowczyc MA, Silva J, Teixeira P, De Antoni GL, Abraham AG. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus spp.* isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International journal of food microbiology*. 2011;144(3):556-60.
136. Pichereau V, Hartke A, Auffray Y. Starvation and osmotic stress induced multiresistances: influence of extracellular compounds. *International journal of food microbiology*. 2000;55(1-3):19-25.
137. Mackey B, Derrick CM. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. *Journal of Applied Bacteriology*. 1986;61(5):389-93.

138. Teixeira P, Castro H, Kirby R. Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. Letters in Applied Microbiology. 1994;18(4):218-21.
139. Flahaut S, Hartke A, Giard Jc, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. FEMS microbiology letters. 1996;138(1):49-54.
140. Desmond C, Stanton C, Fitzgerald G, Collins K, Ross R. Environmental adaptation of probiotic *lactobacilli* toward improvement of performance during spray. International Dairy Journal. 2001;12:801-8.
141. Rechinger KB, Siegumfeldt H, Svendsen I, Jakobsen M. Early protein synthesis of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* in milk revealed by [35S] methionine labeling and two-dimensional gel electrophoresis. ELECTROPHORESIS: An International Journal. 2000;21(13):2660-9.
142. Ives DH, Ikeda S. Life on the Salvage Path: The Deoxynucleoside Kinases of *Lactobacillus acidophilus* R-26. Progress in nucleic acid research and molecular biology. 59: Elsevier; 1997. p. 205-55.
143. Beck WS, Levin M. Purification, kinetics, and repression control of bacterial trans-N-deoxyribosylase. J Biol Chem. 1963;238:702-9.
144. Kusaka I, Kitahara K. Effect of several vitamins on the cell division and the growth of *Lactobacillus delbrueckii*. The journal of vitaminology. 1962;8(2):115-20.
145. Senz M, van Lengerich B, Bader J, Stahl U. Control of cell morphology of probiotic *Lactobacillus acidophilus* for enhanced cell stability during industrial processing. International journal of food microbiology. 2015;192:34-42.
146. Aguirre-Ezkauriatza E, Galarza-González M, Uribe-Bujanda A, Ríos-Licea M, López-Pacheco F, Hernández-Brenes C, et al. Effect of mixing during fermentation in yogurt manufacturing. Journal of dairy science. 2008;91(12):4454-65.
147. Ianniello R, Zheng J, Zotta T, Ricciardi A, Gänzle M. Biochemical analysis of respiratory metabolism in the heterofermentative *Lactobacillus spicheri* and *Lactobacillus reuteri*. Journal of applied microbiology. 2015;119(3):763-75.

148. Gaenzle MG. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*. 2015;2:106-17.
149. Russell JB. Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Applied and environmental microbiology*. 1991;57(1):255-9.
150. McDonald L, Fleming H, Hassan H. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(7):2120-4.
151. Savoie S, Champagne C, Chiasson S, Audet P. Media and process parameters affecting the growth, strain ratios and specific acidifying activities of a mixed lactic starter containing aroma-producing and probiotic strains. *Journal of applied microbiology*. 2007;103(1):163-74.
152. Polak-Berecka M, Waśko A, Kordowska-Wiater M, Targoński Z, Kubik-Komar A. Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42(4):1485-94.
153. Correa Deza MA, Martos GI, Nuñez M, Fiori M, Gerez CL, Font G. Artisanal tanneries: Potential application of inoculants formulated with lactic acid bacteria. *Journal of basic microbiology*. 2018;58(4):296-301.
154. Ai Z, Lv X, Huang S, Liu G, Sun X, Chen H, et al. The effect of controlled and uncontrolled pH cultures on the growth of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. *LWT-Food Science and Technology*. 2017;77:269-75.
155. Laakso K, Koskenniemi K, Koponen J, Kankainen M, Surakka A, Salusjärvi T, et al. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. *Microbial biotechnology*. 2011;4(6):746-66.
156. Zotta T, Ricciardi A, Ciocia F, Rossano R, Parente E. Diversity of stress responses in dairy thermophilic *streptococci*. *International journal of food microbiology*. 2008;124(1):34-42.
157. Chávez B, Ledebøer A. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying technology*. 2007;25(7-8):1193-201.

158. Gerez CL, Font de Valdez G, Gigante ML, Grosso C. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. Letters in applied microbiology. 2012;54(6):552-6.
159. Corcoran B, Ross R, Fitzgerald G, Stanton C. Comparative survival of probiotic *lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. Journal of Applied Microbiology. 2004;96(5):1024-39.
160. Santivarangkna C, Higl B, Foerst P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. Food Microbiology. 2008;25(3):429-41.
161. Slavutsky AM, Chávez MC, Favaro-trindade CS, Bertuzzi MA. Encapsulation of *Lactobacillus Acidophilus* in a Pilot-Plant Spray-Dryer. Effect of Process Parameters on Cell Viability. Journal of food process engineering. 2017;40(2):e12394.
162. Broeckx G, Vandenheuvel D, Henkens T, Kiekens S, van den Broek MF, Lebeer S, et al. Enhancing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying and during storage. International journal of pharmaceutics. 2017;534(1-2):35-41.
163. Champagne CP, Raymond Y, Tompkins TA. The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. Food microbiology. 2010;27(8):1104-11.
164. Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. International journal of food microbiology. 2011;149(3):185-93.
165. Muller J, Stanton C, Sybesma W, Fitzgerald G, Ross R. Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. Journal of applied microbiology. 2010;108(4):1369-79.
166. Krishnan S, Bhosale R, Singhal RS. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. Carbohydrate polymers. 2005;61(1):95-102.

167. Desmond C, Ross R, O'callaghan E, Fitzgerald G, Stanton C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of applied microbiology*. 2002;93(6):1003-11.
168. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of a synbiotic into PLGA/alginate multiparticulate gels. *International journal of pharmaceutics*. 2014;466(1-2):400-8.
169. Chávarri M, Marañón I, Villarán MC. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. *Probiotics: InTech*; 2012.
170. Lavari L, Páez R, Cuatrin A, Reinheimer J, Vinderola G. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic *lactobacilli*. *Journal of dairy research*. 2014;81(3):267-74.
171. Boza Y, Barbin D, Scamparini A. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. *Process Biochemistry*. 2004;39(10):1275-84.
172. Oldenhof H, Wolkers WF, Fonseca F, Passot S, Marin M. 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*. 2005;21(3):885-92.
173. Roos YH. Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. *Le Lait*. 2002;82(4):475-84.
174. Golowczyc MA, Silva J, Abraham AG, De Antoni G, Teixeira P. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*. 2010;50(1):7-12.
175. Favaro-Trindade C, Grosso C. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of microencapsulation*. 2002;19(4):485-94.
176. Simpson P, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;99(3):493-501.
177. Górska A, Szulc K, Ostrowska-Ligęza E, Wirkowska M, Bryś J. The influence of trehalose–maltodextrin and lactose–maltodextrin matrices on thermal and sorption

- properties of spray-dried β -lactoglobulin–vitamin D₃ complexes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2013;112(1):429-36.
178. Vandenheuvel D, Meeus J, Lavigne R, Van den Mooter G. Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix. *International journal of pharmaceutics*. 2014;472(1-2):202-5.
179. Gray MJ, Jakob U. Oxidative stress protection by polyphosphate—new roles for an old player. *Current opinion in microbiology*. 2015;24:1-6.
180. Gray MJ, Wholey W-Y, Wagner NO, Cremers CM, Mueller-Schickert A, Hock NT, et al. Polyphosphate is a primordial chaperone. *Molecular cell*. 2014;53(5):689-99.
181. Boyaval P. Lactic acid bacteria and metal ions. *Le lait*. 1989;69(2):87-113.
182. Grillo-Puertas M, Schurig-Briccio LA, Rodríguez-Montelongo L, Rintoul MR, Rapisarda VA. Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *BMC microbiology*. 2014;14(1):72.
183. Wang Y-C, Yu R-C, Chou C-C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;93(2):209-17.
184. Mille Y, Obert JP, Beney L, Gervais P. New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;88(1):71-6.
185. Organization WH. Infection prevention and control of epidemic-and pandemic-prone acute respiratory infections in health care: World Health Organization; 2014.
186. Minamino T, Komuro I. Regeneration of the endothelium as a novel therapeutic strategy for acute lung injury. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(9):2316-9.
187. Tanaka K, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kashima S, Sasajima J, et al. Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;467(3):541-8.

188. Griet M, Zelaya H, Mateos MV, Salva S, Juarez GE, de Valdez GF, et al. Soluble factors from *Lactobacillus reuteri* CRL1098 have anti-inflammatory effects in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. PLoS One. 2014;9(10):e110027.
189. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. New England Journal of Medicine. 2000;342(18):1334-49.
190. Atabai K, Matthay M. The pulmonary physician in critical care• 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. Thorax. 2002;57(5):452-8.
191. Matthay MA, Howard JP. Progress in modelling acute lung injury in a pre-clinical mouse model. Eur Respiratory Soc; 2012.
192. Bru S, Jiménez J, Canadell D, Ariño J, Clotet J. Improvement of biochemical methods of polyP quantification. Microbial Cell. 2017;4(1):6.
193. Sakatani A, Fujiya M, Ueno N, Kashima S, Sasajima J, Moriichi K, et al. Polyphosphate derived from *Lactobacillus brevis* inhibits colon cancer progression through induction of cell apoptosis. Anticancer research. 2016;36(2):591-8.
194. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2008;295(3):L379-L99.
195. Aeffner F, Bolon B, Davis IC. Mouse models of acute respiratory distress syndrome: a review of analytical approaches, pathologic features, and common measurements. Toxicologic pathology. 2015;43(8):1074-92.
196. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma. Respirology. 2016;21(5):842-9.
197. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. Nature reviews immunology. 2014;14(2):81.
198. Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. Nature Reviews Immunology. 2008;8:142.
199. Wissinger E, Goulding J, Hussell T, editors. Immune homeostasis in the respiratory tract and its impact on heterologous infection. Seminars in immunology; 2009: Elsevier.

200. Knapp S, Florquin S, Golenbock DT, van der Poll T. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo. *The Journal of Immunology*. 2006;176(5):3189-95.
201. Matsuda A, Yang W-L, Jacob A, Aziz M, Matsuo S, Matsutani T, et al. FK866, a Visfatin Inhibitor, Protects Against Acute Lung Injury After Intestinal Ischemia–Reperfusion in Mice via NF- κ B Pathway. *Annals of surgery*. 2014;259(5):1007-17.
202. Gill SE, Gharib SA, Bench EM, Sussman SW, Wang RT, Rims C, et al. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases–3 Moderates the Proinflammatory Status of Macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;49(5):768-77.
203. Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respiratory research*. 2005;6(1):61.
204. de Oliveira AL, Lazzarini R, Cavriani G, Quinteiro-Filho W, de Lima WT, Palermo-Neto J. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. *International immunopharmacology*. 2008;8(9):1164-71.
205. Soromou LW, Chu X, Jiang L, Wei M, Huo M, Chen N, et al. *In vitro* and *in vivo* protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *International immunopharmacology*. 2012;14(1):66-74.
206. Chiba E, Tomosada Y, Vizoso-Pinto MG, Salva S, Takahashi T, Tsukida K, et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *International immunopharmacology*. 2013;17(2):373-82.
207. Hiroshima Y, Hsu K, Tedla N, Chung YM, Chow S, Herbert C, et al. S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury. *The Journal of Immunology*. 2014:1302556.
208. Wu Q, Li R, Soromou LW, Chen N, Yuan X, Sun G, et al. p-Syneprine suppresses lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibition of the NF- κ B signaling pathway. *Inflammation Research*. 2014;63(6):429-39.
209. Miles AA, Misra S, Irwin J. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*. 1938;38(6):732-49.

210. Gerez C, Carbajo M, Rollán G, Torres Leal G, Font de Valdez G. Inhibition of citrus fungal pathogens by using lactic acid bacteria. *Journal of food science*. 2010;75(6):M354-M9.
211. De Angelis M, Gallo G, Corbo MR, McSweeney PL, Faccia M, Giovine M, et al. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;87(3):259-70.
212. Morris JK. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J cell Biol*. 1965;27:137-9.
213. Venable JH, Coggeshall R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 1965;25(2):407.
214. Gurr E. The rational use of dyes in biology and general staining methods. *The rational use of dyes in biology and general staining methods*. 1965.
215. Aschar-Sobbi R, Abramov AY, Diao C, Kargacin ME, Kargacin GJ, French RJ, et al. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *Journal of fluorescence*. 2008;18(5):859-66.
216. Ohtomo R, Sekiguchi Y, Kojima T, Saito M. Different chain length specificity among three polyphosphate quantification methods. *Analytical biochemistry*. 2008;383(2):210-6.
217. Raya R, Bardowski J, Andersen PS, Ehrlich SD, Chopin A. Multiple transcriptional control of the *Lactococcus lactis* trp operon. *Journal of bacteriology*. 1998;180(12):3174-80.
218. Salva S, Marranzino G, Villena J, Agüero G, Alvarez S. Probiotic *Lactobacillus* strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *International immunopharmacology*. 2014;22(1):209-21.
219. Herrera M, Salva S, Villena J, Barbieri N, Marranzino G, Alvarez S. Dietary supplementation with *Lactobacilli* improves emergency granulopoiesis in protein-malnourished mice and enhances respiratory innate immune response. *PloS one*. 2014;9(4):e90227.
220. Di Rienzo JA, Guzmán AW, Casanoves F. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of agricultural, biological, and environmental statistics*. 2002;7(2):129-42.