

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

## GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



## Aplicación de Técnicas de Secado a Baja Temperatura para la Estabilización de Biocatalizadores

CURSO 2013-2014

### TRABAJO FIN DE GRADO

**Autor:**

Miguel Báez Martín

**Director:**

José Vicente García Pérez

Valencia, Junio 2014



**Alumno:** Miguel Báez Martín

**Profesor:** José Vicente García Pérez

Valencia, Junio 2014

**Título:** Aplicación de técnicas de secado a baja temperatura para la estabilización de biocatalizadores.

**Resumen:**

Las técnicas actuales de estabilización de biocatalizadores por deshidratación presentan como principal inconveniente la disminución de la viabilidad de las estructuras biológicas procesadas. Y entre estas técnicas destaca la liofilización a vacío, cuyo elevado coste de operación impide su aplicación a gran escala. Una alternativa interesante a la liofilización es el secado convectivo a baja temperatura. Sin embargo, se trata de un proceso extremadamente lento. La implementación de ultrasonidos de potencia puede considerarse una alternativa no-térmica para su intensificación.

Así, el objetivo de este trabajo fue estudiar la viabilidad del secado convectivo a baja temperatura asistido por ultrasonidos de potencia en la deshidratación de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*). El estudio incluye el análisis cinético de la aplicación de ultrasonidos y de su repercusión en la viabilidad celular.

Para lograr este objetivo, la levadura se secó a baja temperatura (2 m/s, -10°C) con (US, 75W) y sin (SUS) aplicación de ultrasonidos de potencia, y se liofilizó a vacío (LF). El efecto de los ultrasonidos sobre las cinéticas de secado se analizó mediante un modelo difusivo y convectivo. La viabilidad de la levadura deshidratada se determinó a través del cultivo en placa (24 h, medio YPD, 33°C) y del recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Por último, se llevó a cabo el análisis microestructural del producto deshidratado mediante el uso de técnicas de tinción.

La aplicación de ultrasonidos de potencia aceleró el proceso de secado, alcanzándose reducciones de tiempo de hasta el 80%. El efecto de los ultrasonidos se centró principalmente en la mejora de los mecanismos de difusión. La viabilidad celular se vio afectada por todas las técnicas de deshidratación, aunque fue significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor en las muestras SUS y US que en LF. Finalmente, el análisis microestructural reveló que la transición al estado de latencia y la muerte celular fueron menores en la levadura SUS y US que en LF.

**Palabras clave:** preservación, biocatalizador, levadura, ultrasonidos, liofilización.

**Student:** Miguel Báez Martín

**Professor:** José Vicente García Pérez

Valencia, June 2014

**Title:** Application of low-temperature drying techniques on biocatalysts stabilization.

**Abstract:**

Current techniques for stabilizing biocatalysts by dehydration have as main drawback the viability decrease of the processed biological structures. Freeze-drying is one of the most common techniques for biocatalyst preservation but it is very costly, which prevents its use at large-scale. A novel alternative to freeze-drying is low-temperature convective drying. However, it is an extremely slow technique. The application of power ultrasound could be considered as a non-thermal way for the process intensification. Thus, the aim of this work was to determine the feasibility of low-temperature convective drying assisted by power ultrasound on baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) dehydration. The study addresses not only the kinetic analysis but also how ultrasound application affects cell viability.

For this purpose, yeasts were dried at low temperature (2 m/s, -10°C) with (US, 75W) and without (SUS) power ultrasound application and freeze-dried (LF). The effect of ultrasound on drying kinetics was analyzed by using a diffusion and convective model. The viability of dried yeast was determined by plate culture (24 h, YPD medium, 33°C) and count of Colony Forming Units (CFU). Finally, microstructural analysis of the dried product was carried out by using staining methods.

The application of power ultrasound accelerated the drying process, achieving drying time reductions of up to 80%. The effect of ultrasound focused on the internal diffusion. Cell viability was affected by all the dehydration techniques, but it was significantly ( $p < 0.05$ ) higher on SUS and US samples than LF ones. Finally, microstructural analysis revealed that transition to dormancy and cell death were less marked in the dried yeast by SUS and US than LF.

**Key words:** preservation, biocatalyst, yeast, ultrasound, freeze-drying.

---

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aplicaciones e importancia de la estabilización de biocatalizadores .....	1
1.2 Mecanismos de tolerancia a la desecación. El papel de la anhidrobiosis.....	2
1.3 Técnicas actuales de estabilización por deshidratación .....	4
1.4 Nuevas técnicas de estabilización por deshidratación. Aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo a baja temperatura y presión atmosférica .....	7
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 Materia prima y tratamiento pre-secado.....	12
3.2 Técnicas de estabilización. Condiciones experimentales.....	13
3.3 Secadero convectivo a baja temperatura .....	14
3.3.1 Adecuación de las muestras .....	14
3.3.2 Regulación de velocidad, temperatura, humedad relativa y sistema ultrasónico .	15
3.3.3 Sistema de gestión .....	16
3.4 Modelización de las cinéticas de secado. Ajuste del modelo. ....	18
3.5 Tratamiento post-secado .....	19
3.6 Análisis de viabilidad .....	20
3.7 Microscopía óptica y métodos de tinción .....	21
3.8 Diseño experimental .....	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
4.1 Influencia de los ultrasonidos de potencia en el secado a baja temperatura de <i>S. cerevisiae</i> .....	23
4.1.1 Velocidad de secado .....	23
4.1.2 Cinéticas de secado .....	24
4.1.3 Modelización de las cinéticas de secado .....	27

4.2 Influencia de los métodos de estabilización sobre la viabilidad .....	29
4.2.1 Recuento de UFC.....	29
4.2.2 Análisis microestructural.....	31
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>34</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>35</b>

## ÍNDICE FIGURAS

### 1. INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.1.</b> Algunos de los azúcares más utilizados como protectores frente a la desecación..	3
<b>Figura 1.2.</b> Esquema de un sistema de secado por spray (Singh, 2014).....	5
<b>Figura 1.3.</b> Esquema de un sistema de secado por lecho fluido (Singh, 2014) .....	6
Figura 1.4. Esquema de un sistema de liofilización (Singh, 2014) .....	7
<b>Figura 1.5.</b> Sistema de aplicación de ultrasonidos (García-Pérez, 2007) .....	7
<b>Figura 1.6.</b> (A) emisor de placa circular. (B) emisor de cilindro vibrante (García-Pérez, 2007).....	9

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Figura 3.1.</b> Bloques de levadura fresca o prensada .....	12
<b>Figura 3.2.</b> Esquema del secadero convectivo utilizado para realizar las experiencias SUS y US (García-Pérez <i>et al.</i> , 2012).....	13
<b>Figura 3.3.</b> Liofilizador de bandejas. ....	14
<b>Figura 3.4.</b> Portamuestras utilizado en la liofilización a presión atmosférica .....	14
<b>Figura 3.5.</b> Cámara de secado convectivo con amplificador cilíndrico.....	15
<b>Figura 3.6.</b> Principales elementos del sistema ultrasónico de potencia (Soriano, 2014).....	16
<b>Figura 3.7.</b> Sistema de gestión. (A) ventana de “EXPERIENCIA DE SECADO”. (B) ventana de “CUADRO DE MANDOS .....	17
<b>Figura 3.8.</b> Viales de plástico conteniendo el biocatalizador en forma de polvo. .	19
<b>Figura 3.9.</b> Métodos para el análisis de viabilidad. (A) cabina de flujo laminar. (B) contador de UFC manual electrónico.....	20
<b>Figura 3.10.</b> Equipo de microscopía óptica utilizado para visualizar las células mediante la tinción vital de levaduras .....	21

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Figura 4.1.</b> Variación de la velocidad de secado ( $dW/dt$ ) para las experiencias SUS y US..	23
---	----

**Figura 4.2.** Cinéticas de secado de levadura (2 m/s y -10°C) con (US) y sin (SUS) aplicación de ultrasonidos de potencia ..... 24

**Figura 4.3.** Cinéticas de secado de levadura (2 m/s y -10°C) con aplicación de ultrasonidos de potencia (US)..... 25

**Figura 4.4.** Pasta de levadura deshidratada en placa durante 24 horas mediante liofilización (LF, A), y secado a 2 m/s y -10°C sin (SUS, B) y con (US, C) aplicación de ultrasonidos de potencia ..... 26

**Figura 4.5.** (A) Modelización de cinéticas de secado de levaduras a 2 m/s y -10°C con (US) y sin (SUS) aplicación de ultrasonidos. (B) Comparación de la humedad experimental y calculada para la experiencia US..... 28

**Figura 4.6.** UFC/g ms para las muestras Control, LF, SUS y US (2 m/s y -10°C). ..... 30

**Figura 4.7.** Tinción de levaduras mediante el método de Lange *et al.* (1993), realizado para todas las técnicas estudiadas (incluido el Control), y a distintos tiempos de rehidratación en solución salina sin nutrientes (Directa, 3 horas y 24 horas) ..... 29

---

## ÍNDICE TABLAS

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla 3.1.</b> Resumen del número de experiencias, cultivos control, cultivos post-secado y tinciones realizados.....	22
--	----

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Tabla 4.1.</b> Modelización de las cinéticas de secado mediante un modelo difusivo y convectivo... ..	27
--	----

<b>Tabla 4.2.</b> Resultados obtenidos en el análisis de humedad y viabilidad del producto fresco y deshidratado mediante liofilización (LF), y secado a 2 m/s y -10°C con (US) y sin (SUS) aplicación de ultrasonidos de potencia.....	30
---	----



# 1. Introducción

## 1. Introducción

El término “biocatalizador” se refiere a la mínima parte biológica que posee capacidad para acelerar una o varias de las reacciones químicas que tienen lugar durante un proceso, que produce un determinado compuesto de interés, o que es aplicable en el área de la medicina y la salud. Enzimas, levaduras, bacterias, microalgas, células animales, plaquetas, cloroplastos y un largo etcétera quedan englobados bajo un mismo concepto, y la gran cantidad de aplicaciones que poseen justifica el interés actual por la posibilidad de mejorar sus condiciones de almacenamiento y viabilidad. Pero los biocatalizadores son estructuras inestables que, si no son procesadas y conservadas mediante técnicas y condiciones adecuadas, pueden perder su funcionalidad. Se hace necesaria por tanto la búsqueda de nuevas técnicas de estabilización, o preservación, que representen alternativas viables a las técnicas actuales. Entre los sistemas de estabilización de biocatalizadores, destacan aquellos que emplean la deshidratación para conseguir un producto que puede ser reducido a un polvo estable a temperatura ambiente (Morgan *et al.*, 2006).

### 1.1 Aplicaciones e importancia de la estabilización de biocatalizadores

Desde la industria de alimentos hasta la medicina humana y la veterinaria, pasando por la agricultura, la industria química, la gestión de residuos e incluso la minería, el éxito de la aplicación de los biocatalizadores es indudable (Donev, 2001). Pero es de tal éxito de donde nace la necesidad de facilitar su almacenamiento, manipulación y transporte (Bigetti *et al.*, 2012). Por otro lado, la modificación genética de microorganismos y otros biocatalizadores da la posibilidad de obtener cepas mejores o más aptas a la hora de realizar una determinada función. Por lo que conservar estos logros científicos se vuelve una necesidad de importancia primordial (Donev, 2001). La estabilización de biocatalizadores no solo permite preservar la viabilidad y el número de unidades requerido para que puedan llevar a cabo sus funciones. Si no que también consigue evitar la producción de mutaciones que pudieran causar cambios importantes en el genotipo y, con ello, en el fenotipo de interés.

Las técnicas de secado o deshidratación han sido ampliamente utilizadas para la estabilización de biocatalizadores durante décadas (Morgan *et al.*, 2006). Así, existen colecciones de cultivos microbianos que se almacenan deshidratados para preservar la gran diversidad de tipos celulares que albergan. Las industrias química y farmacéutica también han encontrado en las técnicas de deshidratación una manera muy adecuada de preservar distintos tipos de alimentos y fármacos. Por ejemplo, las levaduras que se utilizan en muchos procesos fermentativos (vino, cerveza, etc.) se distribuyen deshidratadas. En los controles de calidad que se llevan a cabo rutinariamente en las industrias de bebidas alcohólicas, alimentaria y clínica, se emplean como control positivo muestras de cepas microbianas de referencia que se distribuyen deshidratadas para que se puedan transportar fácilmente a temperatura ambiente y posteriormente sean fácilmente reconstituidas (Morgan *et al.*, 2006). La obtención de productos industriales estandarizados sería imposible sin la

disponibilidad de cultivos starter testados previamente y conservados deshidratados en tamaños y envases adecuados (Donev, 2001).

Los anteriores son algunos ejemplos de las posibilidades que brinda la aplicación de biocatalizadores estabilizados, pero otras áreas emergentes como los alimentos probióticos y biosensores requieren también la estabilización de los microorganismos. Según Ivanova *et al.* (2005) existe actualmente un gran interés por parte de las industrias alimentaria, química y farmacéutica en el uso de productos que contengan células vivas debido a sus propiedades beneficiosas sobre la salud humana. Pero estos productos son deshidratados para incrementar su estabilidad durante las etapas de procesado y comercialización (Anal y Singh, 2007). El problema es que las técnicas a las que son sometidos afectan a la viabilidad celular y así, a su contenido inicial de microorganismos viables. Por lo tanto, uno de los grandes retos de la industria es la producción de cultivos probióticos viables y estables en grandes cantidades para ser usados como inóculos o ser introducidos directamente en el producto.

Los biosensores emplean bacterias cuya habilidad para percibir cambios en sus alrededores permite medir la biodisponibilidad y la toxicidad de las posibles sustancias contaminantes que existan en el medio (Bjerketorp *et al.*, 2006). Sin embargo, su funcionamiento a largo plazo depende del mantenimiento de la viabilidad y la actividad de las bacterias “reporter” que se utilicen. Y aunque actualmente se aplican técnicas como la liofilización, el secado por vacío o la inmovilización sobre polímeros biocompatibles, la preservación de las características del biosensor a temperatura ambiente y durante largos periodos de tiempo supone aún un auténtico reto (Belkin, 2003; Nivens *et al.*, 2004).

Una última e interesante aplicación de la estabilización de biocatalizadores es la comentada por Wolkers *et al.* (2002), que ponen de manifiesto la posibilidad y el gran interés en mantener plaquetas y eritrocitos estabilizados mediante técnicas de deshidratación, como la liofilización. De esta manera se podría solucionar el problema existente en los bancos de sangre en cuanto al escaso tiempo de vida, especialmente de las plaquetas. Que según la regulación actual solo pueden permanecer cinco días almacenadas (22°C), tras los cuales se deben desechar. Wolkers *et al.* emplean el término anhidrobiosis para referirse al estado que puede alcanzar un organismo, tejido o célula deshidratado. En la siguiente sección, se describen brevemente los mecanismos de tolerancia a la desecación que pueden desembocar en este estado.

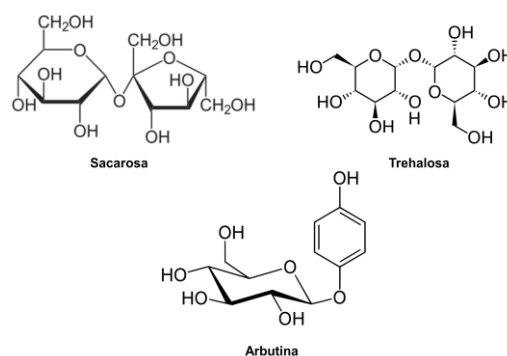
## **1.2 Mecanismos de tolerancia a la desecación. El papel de la anhidrobiosis**

Aunque describir en detalle los cambios que ocurren a nivel celular cuando un biocatalizador se somete a deshidratación no es el objetivo principal de este proyecto, sí que es de interés describir a grandes rasgos los mecanismos que intervienen a nivel biológico y bioquímico. Estos mecanismos son de vital importancia, pues de ellos depende que el biocatalizador sea viable o no tras la deshidratación. Esta sección se centrará especialmente en los cambios que ocurren en células, pues aunque existen muchos otros tipos de biocatalizadores, como ya se ha comentado, los estudios

previos se han centrado especialmente en la descripción de estos mecanismos a nivel celular.

Cuando se aplica una técnica de secado, la eliminación de la mayoría del agua que forma parte de un biocatalizador celular provoca una serie de cambios en las interacciones tanto inter como intra-moleculares de las proteínas, lípidos y el resto de moléculas que lo componen. Al reducir a un mínimo el número moléculas de agua, las proteínas citoplásmáticas y los lípidos de la membrana no pueden establecer puentes de hidrógeno con ellas. Por eso pasan a formarlos con otras moléculas con las que en condiciones normales no interaccionan (Wolkers *et al.*, 2002). Así, las proteínas establecen puentes de hidrógeno con otras proteínas, lo que puede llevar a la formación de agregados que produzcan cambios conformacionales en las mismas (Prestrelski *et al.*, 1993). En el caso de las enzimas la formación de estos agregados supone la pérdida de su actividad (Carpenter *et al.*, 1988). En cuanto a las membranas, la falta de agua alrededor de la cabeza hidrófila de los fosfolípidos puede llevar a la transición desde una fase fluida y biológicamente activa en la que se encuentran, a una fase gel como la que se formaría a baja temperatura (Tetteroo *et al.*, 1996). En estas condiciones de deshidratación, puede ocurrir incluso la fusión de orgánulos por la unión entre membranas lipídicas.

Pero las células no se mantienen pasivas ante una amenaza de este tipo, pues la selección natural ha moldeado su capacidad para tolerar el estrés hídrico. Existen muchas estrategias cuyo fin es impedir los graves daños celulares que supone la eliminación de agua. Una estrategia común es el uso moléculas estabilizadoras que pueden interaccionar de forma reversible con otras que corren un riesgo mayor de perder su conformación o la estructura que constituyen, como las proteínas o los lípidos de membrana (Wolkers *et al.*, 2002). De esta manera, si se rehidrata la célula tras un periodo de deshidratación, las moléculas seguirían poseyendo su estructura nativa. Algunos organismos llegan a un estado metabólico conocido como anhidrobiosis en el que se potencian los mecanismos de defensa frente a condiciones extremas de deshidratación, frío o calor (Klok, 2010). La acumulación de azúcares a altas concentraciones es uno de esos mecanismos de protección utilizados (Santivarangkna *et al.*, 2006). Pues estas moléculas pueden reemplazar a las de agua a la hora de formar puentes de hidrógeno con las moléculas del citoplasma (Figura 1.1). Además posibilitan la formación de una matriz vítrea en la que la movilidad molecular es baja, como en un sólido. La estabilización e inmovilización de los componentes del citoplasma protege al organismo de la desecación (Buitink *et al.*, 1998).



**Figura 1.1.** Algunos de los azúcares más utilizados como protectores frente a la desecación. Su estructura permite la formación de puentes de hidrógeno entre ellos y otras moléculas del citoplasma.

La introducción de proteínas en esta matriz vítrea da lugar a una estructura más compacta que si solo estuviera formada por azúcares, lo que incrementa la estabilidad de las macromoléculas del citoplasma. Esta estrategia es utilizada por las semillas y el polen con sus proteínas *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) (Wolkers *et al.*, 2001).

Uno de los biocatalizadores más utilizados en biotecnología y en la industria alimentaria es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo también emplea los mecanismos de protección descritos, y en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios que esclarecen cómo llega al estado de anhidrobiosis y qué factores influyen en ello (Trofimova *et al.*, 2010; Rozenfelde y Rapoport, 2014; Porrata *et al.*, 2012; Poirier *et al.*, 1999). Así, existe un gran interés por la posibilidad de aumentar artificialmente su tolerancia a la deshidratación. Los formatos en los que se comercializa *S. cerevisiae* han sido recientemente descritos por Lezcano (2012). Los formatos “Levadura seca” y “Levadura instantánea” se distribuyen en forma deshidratada y son lo que presentan una mayor vida útil. En la siguiente sección, se describen las técnicas que actualmente se utilizan para su estabilización y preservación.

### **1.3 Técnicas actuales de estabilización por deshidratación**

Para que una técnica de estabilización sea útil debe presentar facilidad de manejo, bajo coste, alta viabilidad de los biocatalizadores procesados y ser factible en cuanto a producción industrial. Actualmente, no existe ningún método de deshidratación que cumpla con todos estos requisitos, lo que hace que sea de interés la búsqueda de métodos alternativos que complementen a los actuales. A lo largo de esta sección, se irán describiendo las alternativas de estabilización existentes y, junto a ellas, las ventajas y desventajas que presentan. Un aspecto importante a resaltar es que la gran variedad de biocatalizadores y sus diferencias en cuanto a la resistencia frente a los distintos métodos de estabilización y reactivación existentes, hacen que no exista una “receta única y eficaz para la estabilización” (Donev, 2001). Por ello se puede afirmar que no existen métodos buenos o malos de estabilización. Si no que cada biocatalizador requiere un estudio individual y pormenorizado para determinar la técnica más adecuada.

Una primera técnica de estabilización, y relativamente novedosa, es la preservación por formación de espuma. Consiste en la formación de una matriz vítrea de azúcares a partir de una suspensión en la que se ha introducido el biocatalizador de interés. De esta manera, el biocatalizador queda inmerso en una estructura con aspecto de espuma seca y mecánicamente estable (Bronshstein, 1998). Se trata del mismo principio que se comentaba en la sección 1.2, pero en este caso la construcción de la matriz se induce de manera artificial. Lo que se hace en primer lugar es someter la suspensión biológica a condiciones de vacío y temperatura ambiente para que se produzca la vitrificación de los azúcares y comience la evaporación del agua. Después se aplican altas temperaturas (menores a 100 °C) para incrementar la estabilidad de la matriz o espuma y completar la evaporación del agua restante. En este proceso no es necesario un paso previo de congelación, por lo que se evitan los inconvenientes asociados.

Además, se trata de una técnica que se puede aplicar a grandes volúmenes de suspensión biológica, lo que facilita su escalado. Según Hajare *et al.* (2006), la preservación por formación de espuma se ha aplicado exitosamente en enzimas, virus y bacterias. Pero Morgan *et al.* (2006) señalan que la desventaja parece encontrarse en la pérdida de viabilidad de los biocatalizadores procesados, lo que podría achacarse a la elevada temperatura que se utiliza en la estabilización de la espuma.

El secado por spray emplea la atomización para generar finas gotas a partir de una solución líquida con el biocatalizador. Posteriormente, se provoca la evaporación prácticamente instantánea de la pequeña gota al hacer incidir una corriente de aire a alta temperatura (hasta 200°C). Cuando las gotas atraviesan la cámara se convierten en gránulos secos (Figura 1.2) (Singh, 2014). La principal ventaja del secado por spray es que permite generar grandes cantidades de producto a un coste relativamente bajo, siendo la tobera de atomización la parte más costosa del proceso. Aunque se trata de una técnica usada generalmente para productos como polímeros, sales inorgánicas y alimentos como la leche o el maíz, recientemente se ha propuesto su uso sobre organismos probióticos (Silva *et al.*, 2002; Corcoran *et al.*, 2004; Gardiner *et al.*, 2000). Desmond *et al.*, (2002) encontraron que la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* estabilizados mediante secado por spray caía en picado a las cuatro semanas de almacenamiento. También se comprobó que esta disminución de la viabilidad depende de la temperatura de secado y de la adición de sustancias protectoras. Silva *et al.* (2002) y Gardiner *et al.* (2000) pusieron de manifiesto que diferentes cepas bacterianas sometidas a las mismas condiciones de atomización presentaban grados de viabilidad muy diferentes durante su almacenamiento. Otra importante desventaja de esta técnica es que resulta complejo trabajar con soluciones muy viscosas, pues dificultan tanto el bombeo de la disolución a alta presión hasta la tobera, como la atomización en sí misma.

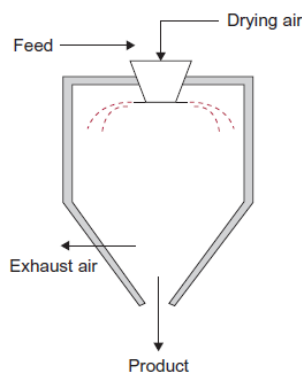


Figura 1.2. Esquema de un sistema de secado por spray (Singh, 2014).

El secado convectivo (aire forzado) por aire caliente es el método más utilizado de deshidratación en la industria química y de alimentos debido a su simplicidad, alta productividad y bajo coste. En la industria farmacéutica y biotecnológica su utilización está menos extendida debido al efecto negativo de las altas temperaturas sobre los materiales biológicos. Generalmente, en el caso de la estabilización de biocatalizadores, se utilizan secadores de lecho fluido donde las partículas de producto a secar se añaden a una cámara en la que se hace circular un flujo de aire a alta velocidad desde la parte inferior a la superior. Este flujo de aire permite que las

partículas queden en suspensión, lo que incrementa los coeficientes de transferencia de calor y materia, y contribuye a una deshidratación muy uniforme (Figura 1.3) (Singh, 2014). Así, se pueden utilizar temperaturas más bajas que en el caso de la atomización. Larena *et al.* (2003) mostraron que el secado en lecho fluido permite una mayor estabilidad a largo plazo de *Penicillium oxalicum* en comparación con el secado por spray y la liofilización. En estas dos últimas los biocatalizadores sufren daños durante el proceso. Por un lado, en el secado por spray la temperatura del flujo de aire que entra a la cámara es muy alta. En la liofilización, el daño que sufren las células se atribuye más bien a los largos periodos de tiempo que son sometidas a las condiciones de vacío y baja temperatura. A pesar del potencial que presenta esta técnica, hasta el momento no ha sido suficientemente estudiada.

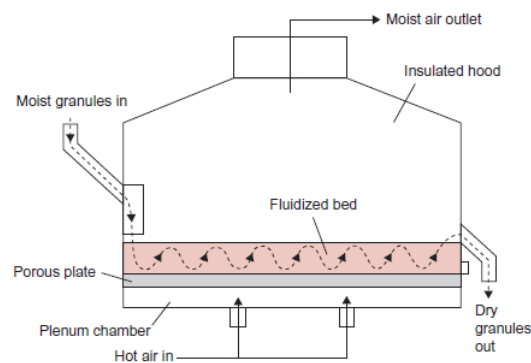


Figura 1.3. Esquema de un sistema de secado por lecho fluido (Singh, 2014).

La liofilización es el método más utilizado de deshidratación en la industria microbiológica. En este caso, la eliminación del agua no es por evaporación si no por sublimación (Singh, 2014). Por ello, el primer paso del proceso es la congelación del biocatalizador. Con el fin de evitar que éste sufra daños parece preferible que la congelación sea relativamente rápida y que impida la formación de grandes cristales de hielo que podrían provocar roturas en las frágiles membranas celulares y disminuir con ello la viabilidad (Uzunova-doneva y Donev, 2002). Así, una alternativa muy interesante es la congelación con nitrógeno líquido. Aunque generalmente, los liofilizadores disponen de sistemas de congelación convencionales “in-situ”, de esta manera se evitan los problemas asociados al transporte y la carga de la muestra. Posteriormente, se aplica vacío para reducir la presión por debajo del punto triple del agua, así empieza la eliminación de la misma por sublimación. La energía necesaria para la sublimación procede de las bandejas del liofilizador, que se mantienen a temperatura controlada (entre  $-10$  y  $20^{\circ}\text{C}$ ). Las condiciones de vacío no solo mantienen el producto en estado de congelación sino que también favorecen la salida de agua del interior del producto, que es recogida en el condensador. De todo lo anterior se deduce que las principales desventajas de esta técnica son la necesidad de congelar la muestra de manera previa a su procesado, lo que afecta a la viabilidad de las células, la necesidad de realizar vacío, que encarece mucho los equipos y dificulta el procesado en continuo, y los largos tiempos de proceso como consecuencia del empleo de bajas temperaturas. Pero además, otro posible inconveniente es el riesgo de contaminación cruzada. Lo que se debe a la formación de aerosoles que dispersan la muestra por el liofilizador (Morgan *et al.*, 2006).

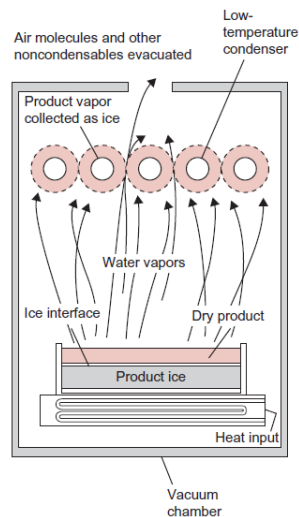


Figura 1.4. Esquema de un sistema de liofilización (Singh, 2014).

La excelente calidad de los productos resultantes de la liofilización se debe a que la ausencia de agua líquida y las bajas temperaturas a las que se desarrolla evitan las reacciones que pudieran deteriorarlos (Ratti, 2001). Se trata de la gran ventaja de esta técnica, aun así se ve ensombrecida por su mayor inconveniente. El elevado coste de operación requerido para, sobre todo, que el proceso ocurra en condiciones de vacío (Nijhuis et al., 1998). Es la razón por la que la aplicabilidad de la liofilización se reduce a productos de elevado valor añadido como los que se tratan en la industria farmacéutica y biotecnológica (Di Matteo *et al.*, 2003). Se hace necesaria, por tanto, la búsqueda de alternativas que suplan las deficiencias de la liofilización y el resto de técnicas actuales de estabilización.

#### 1.4 Nuevas técnicas de estabilización por deshidratación. Aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo a baja temperatura y presión atmosférica

El secado convectivo a baja temperatura y presión atmosférica es una alternativa interesante a la liofilización convencional. En esta técnica se emplean temperaturas inferiores a las de las condiciones ambientales estándar (unos 20°C), ya sea por encima del punto de congelación del producto o por debajo (Ozuna *et al.*, 2014). En el primer caso, el agua se elimina por simple evaporación, pues la muestra se expone a una corriente de aire a baja temperatura y con una humedad relativa baja. Al no ser necesaria una congelación previa, se evitan la degradación y disminución de viabilidad que podría sufrir el biocatalizador. Por otro lado, cuando la temperatura del proceso es inferior al punto de congelación del producto, la evaporación del agua ocurre por sublimación. Esta última modalidad también se conoce como liofilización a presión atmosférica (Di Matteo *et al.*, 2003), y la calidad de los productos resultantes compite con la de los que se obtienen en la liofilización convencional (Alves-Filho *et al.*, 2006; Santacatalina *et al.*, 2012; Soriano, 2014; García-Pérez, 2007). La principal ventaja de las técnicas de secado a baja temperatura es que eliminan la necesidad de una cámara de vacío y del equipo auxiliar asociado. Además, permiten reducir el impacto

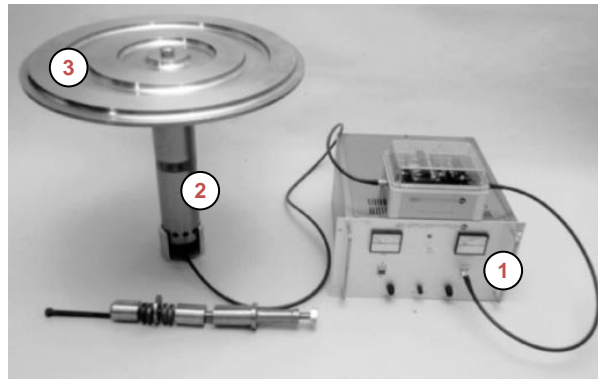


medioambiental fácilmente mediante el uso de algún refrigerante poco contaminante, como es el CO<sub>2</sub> (García-Pérez, 2007). Otra ventaja de esta técnica es que al no requerir condiciones de vacío, se facilita enormemente la producción en continuo, que es muy recomendable a escala industrial. Incluso es factible la utilización de otros gases alternativos al aire como el CO<sub>2</sub> o el N<sub>2</sub> para evitar la oxidación durante la deshidratación. Sin embargo estas tecnologías presentan un gran inconveniente, y es el largo tiempo de proceso requerido para deshidratar el producto (García-Pérez *et al.*, 2012).

El problema se puede solucionar en cierta medida utilizando formas de energía adicionales como las microondas, la radiación infrarroja y las ondas de radio, que se han aplicado a este fin con éxito sobre productos agroalimentarios (Vega-mercado *et al.*, 2001; Chua y Chou, 2005; Mongpraneet *et al.*, 2002; Chou y Chua, 2001). Estas formas de radiación permiten acelerar el proceso de secado gracias al aporte de calor sensible al producto. Sin embargo, no parece una buena alternativa, ya que existe un riesgo importante de sobrecalentamiento si el control de la aplicación no es preciso (Schössler *et al.*, 2012). Sobre todo cuando se trata de material sensible como los biocatalizadores. Los ultrasonidos de potencia se erigen frente a estas técnicas como una alternativa eficaz. Ya que al tratarse de una tecnología no-térmica, no producen un calentamiento significativo en el material (Soriano, 2014; García-Pérez, 2007). Así, se evita el efecto del sobrecalentamiento y los daños que éste pudiera causar sobre la muestra.

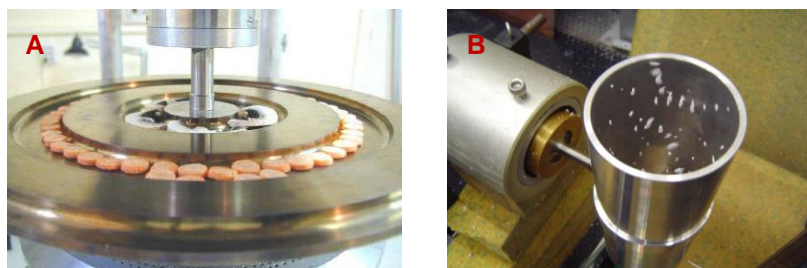
Los ultrasonidos son ondas mecánicas, es decir, requieren un medio para propagarse. Se consideran ultrasonidos a aquellas ondas acústicas que poseen una frecuencia superior a 20 kHz, el umbral de audición del oído humano (Oliucha-Moreno, 2012). Y como cualquier onda, poseen tres parámetros principales que los caracterizan: intensidad o amplitud, frecuencia y velocidad. Así, se pueden distinguir por un lado los ultrasonidos de señal, también conocidos como de baja intensidad o de alta frecuencia. Y por otro los ultrasonidos de potencia, que poseen alta intensidad o baja frecuencia (Awad *et al.*, 2012). Las aplicaciones de los ultrasonidos de señal se basan en que algunos de los parámetros que caracterizan la onda ultrasónica varían en función de las propiedades físicas del medio que atraviesa, y de ello se puede extraer información útil (Corona *et al.*, 2014). Mientras que los ultrasonidos de potencia se utilizan para provocar cambios o acelerar la cinética de transferencia de materia durante un proceso (Oliucha-Moreno, 2012).

A la hora de aplicar los ultrasonidos de potencia en un proceso industrial se requieren tres elementos fundamentales: generador, transductor y emisor (Figura 1.5). El generador transforma la señal eléctrica de la red a la frecuencia deseada. El transductor convierte la señal eléctrica de alta frecuencia en vibraciones mecánicas. El último elemento, el emisor, irradia la energía acústica producida por el transductor al medio a tratar (García-Pérez, 2007; Soriano, 2014).



**Figura 1.5.** Sistema de aplicación de ultrasonidos. 1. Generador/Amplificador, 2. Transductor piezoeléctrico, 3. Emisor de placa escalonada (García-Pérez, 2007).

La aplicación de ultrasonidos en medios gaseosos como el aire presenta algunas dificultades técnicas. Y la transferencia de energía acústica a la muestra es una de ellas. Esto se debe a que la diferencia de impedancia acústica entre emisor y aire, y la absorción de energía por parte de este último son elevadas (García-Pérez *et al.*, 2006). Para solucionar este inconveniente es necesario conseguir una buena adaptación de impedancia entre el emisor y el aire, grandes amplitudes de vibración y una elevada concentración de energía (Gallego-Juárez *et al.*, 1999). En los últimos años se han diseñado sistemas que permiten la aplicación eficaz de ultrasonidos en medios gaseosos, y con ellos se ha conseguido mejorar el secado convectivo de algunos alimentos. Estos sistemas difieren en cuanto a la forma del emisor y el modo de actuación. Pudiéndose distinguir por un lado emisores de placa escalonada rectangular o circular (Figura 1.6 A) y, por otro, emisores de cilindro vibrante (Figura 1.6 B). Los primeros actúan por contacto directo con la muestra, lo que facilita la transferencia de energía acústica (Gallego-Juárez *et al.*, 2007; De la Fuente *et al.*, 2006). Pero presentan como inconveniente la reducida capacidad de adaptación a los sistemas de secado convectivo convencionales (Soriano, 2014). Los emisores de cilindro vibrante constituyen una solución a este problema, pues actúan sin necesidad de que exista contacto directo con el producto. En este tipo de emisor, son las propias paredes del cilindro las que irradian energía acústica al medio (García-Pérez, 2007).



**Figura 1.6.** (A) emisor de placa circular. Este tipo de emisor actúa por contacto directo con la muestra. (B) emisor de cilindro vibrante. En este caso no existe necesidad de contacto entre el emisor y el producto (García-Pérez, 2007).

Durante el proceso de secado, el transporte de agua desde la muestra está limitado por dos resistencias: resistencia interna y resistencia externa. La resistencia interna se opone al movimiento del agua en el interior del producto a secar. La resistencia externa controla el movimiento de agua entre la superficie de la muestra y el aire, y

depende del espesor de la capa límite de convección (Mulet *et al.*, 2011). El papel de los ultrasonidos consiste en aportar la energía necesaria para superar esas resistencias. Al aplicarlos, se producen una serie de rápidas compresiones y rarefacciones que hacen que el agua contenida en la muestra salga a la superficie y pueda contactar con la corriente de aire a baja humedad relativa (Chemat *et al.*, 2011). Esto ocurre gracias a la generación de microcanales que facilitan el movimiento de las moléculas de agua hacia el exterior (García-Pérez, 2007).

Generalmente, la aplicación de ultrasonidos en medio líquido o ultrasonicación se utiliza para inactivar enzimas y microorganismos (Ercan y Soysal, 2013). De hecho, la mayoría de la bibliografía existente se refiere a su uso para tal objetivo (Piyasena *et al.*, 2003; Chemat *et al.*, 2011). Pero en este caso la finalidad y las condiciones en las que se realiza el proceso son distintas. Pues la estabilización de biocatalizadores busca mantener la viabilidad de la estructura biológica durante el mayor tiempo posible. Y además, el medio de secado es gaseoso. Por lo que los fenómenos responsables de la inactivación de biocatalizadores como la cavitación, la formación de radicales libres y las altas temperaturas sencillamente no ocurren en la medida en que puedan dañarlos (Earnshaw *et al.*, 1995). Este estudio es, por tanto, una primera incursión en un área tan poco explorada como es la aplicación de los ultrasonidos a los procesos de estabilización de biocatalizadores.

## 2. Objetivos

## **2. Objetivos**

El objetivo general del presente proyecto es determinar la viabilidad del secado a baja temperatura asistido por ultrasonidos de potencia en la estabilización por deshidratación de biocatalizadores microbianos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar la influencia de los ultrasonidos de potencia sobre la cinética de secado a baja temperatura de la levadura.
- Modelizar las cinéticas de secado para cuantificar la influencia de los ultrasonidos de potencia en los fenómenos de transporte de materia durante el secado a baja temperatura.
- Analizar y comparar la viabilidad de la levadura deshidratada en función de la técnica de secado utilizada.

# 3. Materiales y Métodos

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Materia prima y tratamiento pre-secado

El biocatalizador empleado en este trabajo es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para panificación. El formato del que se partió para realizar las experiencias fue el de “Levadura fresca o prensada” (Lezcano, 2012) de la marca Levital (Figura 3.1), que se adquirió en un supermercado local (Valencia, España). Se trata de bloques de levadura prensada de aproximadamente 25 g que se venden en packs de dos bloques por unidad. La levadura así adquirida era almacenada inmediatamente en refrigeración a 3°C. La determinación del contenido en humedad inicial de los bloques se realizó colocando las muestras en una estufa a 70°C y 0.2 bar hasta alcanzar un peso constante (72 horas) (AOAC, 1997).



Figura 3.1. Bloques de levadura fresca o prensada.

Cada experiencia de secado se realizó a partir de un único bloque de levadura. Así, los bloques se homogenizaron con ayuda de un mortero, tomándose 15 g para las experiencias de secado, 0.5 g para los ensayos de viabilidad (control) y la muestra restante para la determinación del contenido de humedad inicial. De esta manera, se pudo estudiar el efecto de la técnica de secado sobre la viabilidad sin que los posibles efectos de la heterogeneidad del bloque comercial interfirieran en los resultados.

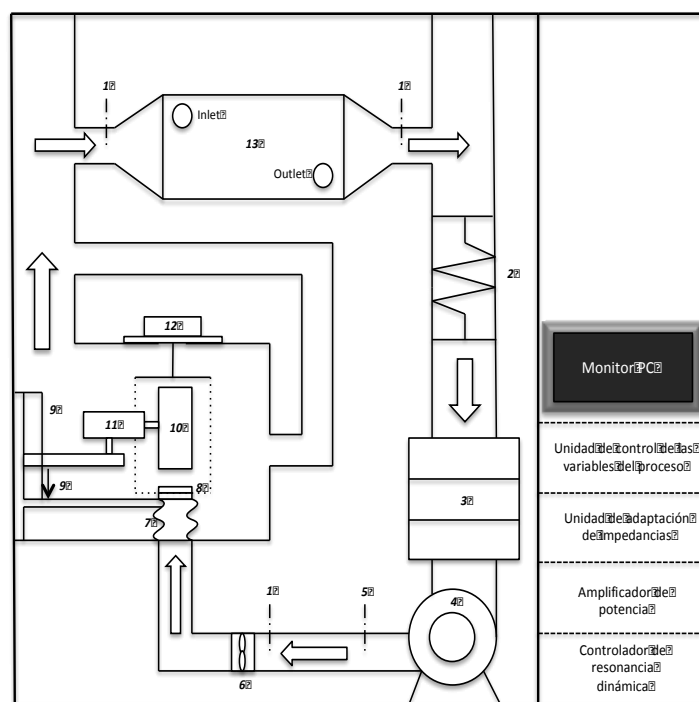
Para las experiencias de secado, se colocaron 15 g de levadura fresca homogenizada en placas Petri estériles (diámetro 8.5 cm) y se les añadió 6 g de agua destilada con el fin de elaborar una pasta de textura densa similar al sedimento de un cultivo en medio líquido de esta levadura. La pasta de levadura presentó una altura de aproximadamente 3 mm en la placa Petri. Tras envolverla con film de plástico para evitar cambios en la humedad, se congeló colocándola a -28°C durante 24 horas, tras las cuales se inició el secado. Este procedimiento fue común a todas las experiencias de secado realizadas, de manera que los posibles daños celulares por la congelación afectaron por igual a todas las muestras.

A la hora de manipular las muestras, se tuvo especial precaución en que todos los utensilios utilizados para cortar o triturar los bloques de levadura se encontraran esterilizados, o en las condiciones más asépticas posibles con el fin de evitar contaminaciones. Para ello, se utilizó un autoclave (P Selecta Presoclave 75) y alcohol etílico (96°) como agente antiséptico.

### 3.2 Técnicas de estabilización. Condiciones experimentales

En este trabajo se utilizó la deshidratación como técnica de preservación o estabilización de la levadura. Se emplearon y compararon tres técnicas de deshidratación diferentes: liofilización convencional (LF), secado convectivo a baja temperatura ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) y presión atmosférica sin aplicación de ultrasonidos de potencia (SUS), y secado convectivo a baja temperatura y presión atmosférica con aplicación de ultrasonidos de potencia (US). Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

El secadero convectivo utilizado en las experiencias SUS y US (Figura 3.2) permite de manera automática registrar el peso de las muestras a intervalos establecidos por el usuario (10 minutos). De manera que se puede obtener la cinética de secado y finalizar el proceso de manera automática cuando se alcanza una pérdida de peso establecida, que en este caso se fijó en el 75%. Además, permite ajustar la velocidad y temperatura del aire que se hace circular a través del sistema. Estos parámetros se establecieron en 2 m/s y  $-10^{\circ}\text{C}$  respectivamente para todas las experiencias. En la Figura 3.2 se muestra un esquema de este equipo que se describirá con más detalle en la sección 3.3.



**Figura 3.2.** Esquema del secadero convectivo utilizado para realizar las experiencias SUS y US (García-Pérez *et al.*, 2012). 1. Sensor de temperatura y humedad relativa; 2. Resistencia eléctrica; 3. Cámara de las bandejas de desecante; 4. Ventilador centrífugo; 5. Sensor Pt-100; 6. Anemómetro; 7. Tubo retráctil; 8. Dispositivo para carga muestra; 9. Mecanismo de desplazamiento vertical; 10. Cilindro vibrante; 11. Transductor ultrasónico; 12. Módulo de pesada; 13. Intercambiador de calor.

En el caso de las experiencias LF, el liofilizador utilizado (LyoQuest, Telstar, Terrasa, España) no permite realizar la pesada de las muestras durante la deshidratación. De este modo, se realizaron experiencias en “batch” de 24 h con una temperatura del condensador y de las bandejas de  $-50$  y  $0^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Estas condiciones de secado permitieron alcanzar el 75% de pérdida de peso de las muestras.



Las placas Petri destapadas se colocaron en las bandejas del liofilizador dispuestas en vertical (Figura 3.3).



Figura 3.3. Liofilizador de bandejas.

### 3.3 Secadero convectivo a baja temperatura

#### 3.3.1 Adecuación de las muestras

En el caso de las experiencias SUS y US, la colocación de las Placas Petri se llevó a cabo mediante un portamuestras especialmente diseñado para esta aplicación (Figura 3.4). Se trata de un ángulo recto de madera que en su parte horizontal dispone de una plataforma para la colocación de la Placa Petri. Mientras que su parte vertical se une a una estructura que queda directamente colgada de la balanza.

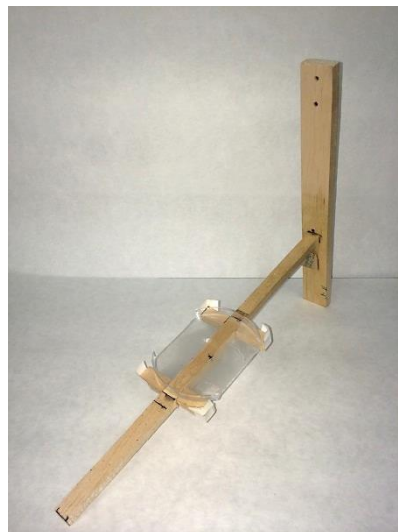


Figura 3.4. Portamuestras utilizado en la liofilización a presión atmosférica.

La cámara de secado consiste en un cilindro vibrante de aluminio excitado acústicamente en cuyo interior se introduce la placa Petri (Figura 3.5). A través del cilindro circula la corriente de aire con las condiciones de velocidad y temperatura

ajustadas por el usuario, en este caso  $-10^{\circ}\text{C}$  y 2 m/s. Las dimensiones del cilindro vibrante son de 120 mm de diámetro exterior, 10 mm de espesor y 310 mm de longitud. Cuando este sistema ultrasónico se excita con una potencia eléctrica de 75 W, es capaz de crear un campo acústico de alta intensidad (hasta 154 dB). El aluminio empleado en su construcción presenta excelentes propiedades elásticas y menos problemas térmicos que otros materiales con propiedades similares (García-Pérez, 2007).



Figura 3.5. Cámara de secado convectivo con amplificador cilíndrico.

### 3.3.2 Regulación de velocidad, temperatura, humedad relativa y sistema ultrasónico

La corriente de aire que atraviesa el cilindro vibrante es producida por un soplante (COT-100, Soler y Palau, España). Un anemómetro ( $\pm 0.1$  m/s; 1468, Wilh. Lambrecht GmbH, Alemania) mide la velocidad de esta corriente, y para controlarla se utiliza un PLC (*Programmable Logic Controller*, cFP-2220, National Instruments, EE.UU), que actúa mediante un algoritmo PID (Proporcional Integral Derivativo) sobre un variador de frecuencia (MX2, Omron, Japón). De esta manera se logran el mínimo de errores y la estabilidad necesarios para que el sistema funcione correctamente.

El control de la temperatura se consigue combinando un intercambiador de calor tipo carcasa y tubos (Área  $13\text{ m}^3$ , Fimetal, España), y unas resistencias eléctricas (potencia máxima de 2500 W, 230 V). El primero emplea un fluido refrigerante glicol-agua 45 % v/v proporcionado por un enfriador (KAE evo-12) que suministra un caudal de 150 L/min a  $-22^{\circ}\text{C}$ . Así, cuando el flujo de aire pasa por el intercambiador de calor disminuye su temperatura. Como ocurre con la velocidad del aire, la temperatura se controla mediante el PLC y un algoritmo PID, que actúa en este caso sobre las resistencias eléctricas. Una sonda Pt-100 es la encargada de medir la temperatura del aire a la entrada de la cámara de secado.

Se utilizan sensores combinados de humedad relativa y temperatura (KDK, Galltec+mela, Alemania) para medir estas variables en la entrada y salida del

intercambiador de calor, y a la salida del soplante (Figura 3.2). Y es que para que la transferencia de agua desde la muestra al aire sea eficaz se debe mantener la humedad relativa por debajo del 20%. Esto se consigue mediante el uso de bandejas portadoras de un material desecante (drying beads, 6-8 mm, Rung Rueng Cosulting, Tailandia) a través de las cuales se hace pasar la corriente de aire. De este modo, se mantuvo la humedad relativa entre el 5 y 20% durante las experiencias de secado. Para regenerar el material desecante se seca en una estufa a 250°C durante 5 horas aproximadamente.

El sistema generador de ultrasonidos se halla compuesto por varios elementos (Figura 3.6). En primer lugar, el generador ultrasónico de potencia (APG-AC01, Pusonics, España) es el encargado de generar la señal eléctrica a la frecuencia de trabajo (21.9 kHz). A continuación, el amplificador y controlador dinámico de resonancia (RMX4050HD, QSC, EE.UU.) toma la señal eléctrica y la amplifica. La señal es acondicionada seguidamente por un adaptador de impedancias (resistencia de 50 a 500  $\Omega$  e inductancia de 5 a 9 mH, APG-AC01, Pusonics, España), que la transfiere al transductor ultrasónico (frecuencia 21.9 kHz, impedancia de 369  $\Omega$ , potencia máxima de 90 W). Un amplificador mecánico sirve de puente entre el traductor y el cilindro radiante, que es el que finalmente irradia las ondas acústicas a la muestra. El ordenador (PC) permite controlar el sistema generador de ultrasonidos aparte de la velocidad del aire y la temperatura.

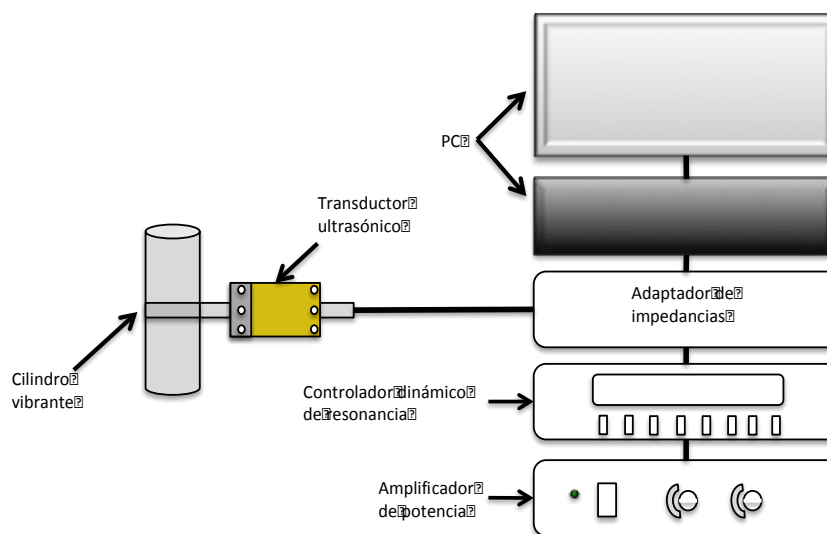


Figura 3.6. Principales elementos del sistema ultrasónico de potencia (Soriano, 2014).

Por último, el secadero también compone de un módulo de pesaje industrial (6000±0.01g, VM6002-W22, Mettler-Toledo, EE.UU.) encargado de pesar la muestra y conectado al PLC mediante un interfaz RS-232.

### 3.3.3 Sistema de gestión

El sistema de gestión permite iniciar, detener o finalizar el proceso de secado aparte de controlar las variables que en él intervienen. Se trata de una aplicación informática

desarrollada en lenguaje de programación LabView (National Instruments, EE. UU). Como se observa en la Figura 3.7 A, los módulos de control que aparecen en la ventana “EXPERIENCIA DE SECADO” posibilitan el ajuste de la temperatura, velocidad del aire, criterio de finalización del proceso e intervalo entre pesadas. Por otro lado, los indicadores numéricos y gráficos muestran las variaciones de temperatura, velocidad del aire y peso en tiempo real. El módulo de “MUESTRA” permite visualizar rápidamente la variación de peso sufrida por la muestra y el porcentaje de peso perdido.

La ventana “CUADRO DE MANDOS” se muestra en la Figura 3.7 B. En ella se puede observar en primer lugar un esquema del secadero que informa en tiempo real del valor de las variables principales en distintos puntos del sistema, tales como la velocidad del aire y la temperatura a la entrada del cilindro, y la humedad relativa del aire al salir del soplante. En la columna de la derecha se observa el panel “MÓDULO SOPLANTE”, en el que se puede ajustar la frecuencia eléctrica y con ella la velocidad del aire. El “MÓDULO DE PESADA” permite tarar la balanza y pesar la muestra manualmente. Y el interruptor del “MÓDULO DE RESISTENCIAS” se activa al inicio de cada experiencia de secado para poder controlar la temperatura.

Al finalizar el proceso, la aplicación genera un archivo con toda la información sobre la temperatura, humedad relativa, velocidad del aire, fecha, duración y evolución del peso de la muestra.

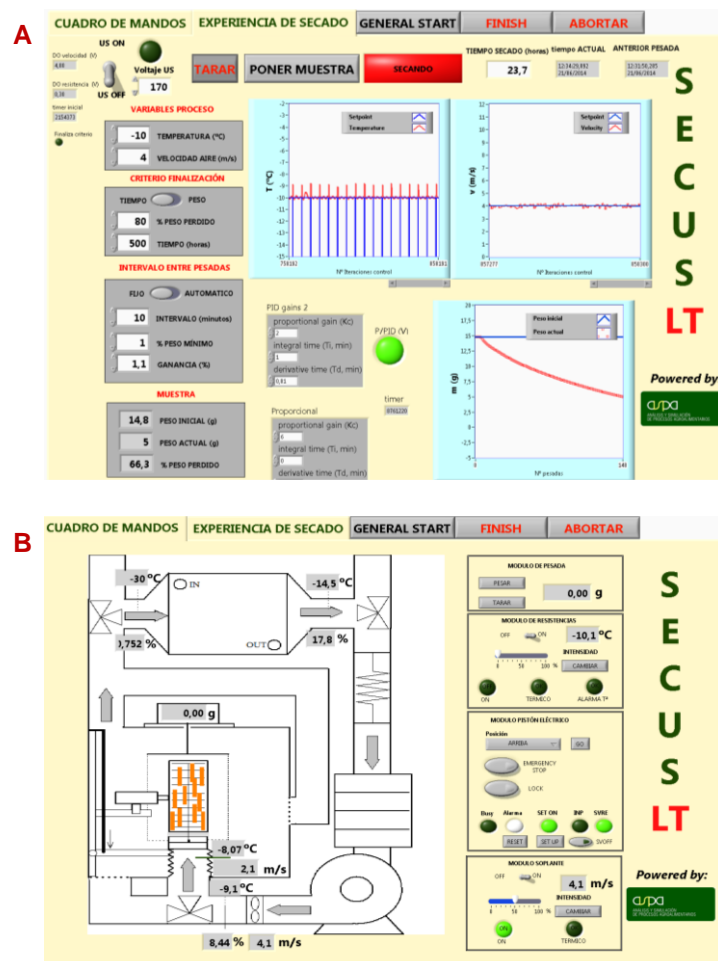


Figura 3.7. Sistema de gestión. (A) ventana de “EXPERIENCIA DE SECADO”. (B) ventana de “CUADRO DE MANDOS”.

### 3.4 Modelización de las cinéticas de secado. Ajuste del modelo.

El modelo empleado para describir matemáticamente las cinéticas de secado del lecho de levaduras, tiene en cuenta tanto la influencia de la resistencia interna como de la resistencia externa al transporte de agua. Se trata de un modelo difusivo y convectivo, pues en él se considera que la transferencia de agua desde el producto al aire está influenciado por la difusión y por el transporte convectivo entre la superficie de la muestra y el aire. La ecuación diferencial de difusión para este modelo se obtiene combinando un balance microscópico de materia en el volumen control con la ley de Fick (García-Pérez, 2007). La Ecuación 3.1 muestra la expresión obtenida para una geometría de lámina infinita, considerando la difusividad efectiva constante, además de la homogeneidad e isotropía de la muestra:

$$\frac{\partial W_p(x,t)}{\partial t} = D_e \left( \frac{\partial^2 W_p(x,t)}{\partial x^2} \right) \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde  $W_p$  es el contenido de humedad local (g agua (w)/g materia seca (ms));  $t$  es el tiempo (s);  $x$  es la dirección de transporte;  $D_e$  es la difusividad efectiva ( $\text{m}^2/\text{s}$ ).

La resolución de esta ecuación requiere una condición inicial y dos condiciones de contorno. En este caso se utilizó como condición inicial el que la humedad de la muestra a tiempo 0 ( $W_0$ ) fuese igual en todos sus puntos (Ecuación 3.2). Y en cuanto a las condiciones de contorno, se empleó en primer lugar, aquella que tiene en cuenta la simetría de la muestra (Ecuación 3.3). La otra condición de contorno aplicada es la que considera la resistencia externa a la transferencia de materia (Ecuación 3.4), así se consideró que todo el flujo de agua que llega a la superficie del sólido por difusión se transfiere al aire por convección.

$$W_p(x, 0) = W_0 \quad (\text{Ec. 3.2})$$

$$\frac{\partial W_p(0,t)}{\partial x} = 0 \quad (\text{Ec. 3.3})$$

$$t > 0; x = L; -D_e \rho_{ss} \frac{\partial W_p(L, t)}{\partial x} = K(a_w(L, t) - \varphi_{\text{aire}}) \quad (\text{Ec. 3.4})$$

donde  $\rho_{ss}$  es la densidad del sólido seco ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $\varphi_{\text{aire}}$  la humedad relativa de la corriente de aire,  $K$  el coeficiente de transferencia de materia ( $\text{kg w}/\text{m}^2/\text{s}$ ) y  $a_w$  la actividad del agua (adimensional).  $D_e$  describe el movimiento del agua hasta la superficie de la muestra, y  $K$  hace lo propio con el paso del agua a la fase gaseosa. Ambos constituyen los parámetros cinéticos del modelo (Soriano, 2014). Los datos de desorción para la levadura *S. cerevisiae* se tomaron de Luna-Solano *et al.* (2005) y fueron contrastados por los presentados anteriormente por Northcote (1953).

La condición de contorno mostrada en la Ec. 3.4 no permite resolver analíticamente la ecuación difusional (Ec. 3.1). Debido a ello se tuvo que aplicar el método numérico de diferencias finitas implícito mediante un algoritmo programado en MATLAB (The Mathworks Inc., Massachusetts, USA) (García-Pérez, 2007). De esta manera se pudo estimar el perfil de humedad de la muestra junto a su valor medio (ambas en función del tiempo de secado),  $D_e$  y  $K$ . Los parámetros cinéticos se identificaron en todas las

cinéticas de secado mediante el ajuste del modelo. Para ello se minimizó la suma de los errores cuadráticos entre la humedad experimental y la calculada utilizando la herramienta de optimización “fminsearch” disponible en Matlab.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonidos sobre los parámetros  $D_e$  y  $K$ , se realizó además un análisis de varianza (ANOVA) ( $p < 0.05$ ) y de diferencias mínimas significativas (LSD, *Least Significant Difference*) empleando el software Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Warrenton, USA).

Por último, la determinación de la bondad del ajuste del modelo se evaluó a partir del porcentaje de varianza explicada (Ecuación 3.5) (Lypson y Sheth, 1973) y el cálculo del error medio relativo (Ecuación 3.6).

$$\%VAR = \left[ 1 - \frac{S_{xy}^2}{S_y^2} \right] \quad (\text{Ec. 3.5})$$

$$\%EMR = \frac{100}{N} \left[ \sum_{i=1}^N \frac{|W_{exp} - W_{cal}|}{W_{exp}} \right] \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde  $S_{xy}^2$  es la desviación estándar de la estimación;  $S_y^2$  la desviación estándar de la muestra;  $N$  el número de muestras;  $W_{exp}$  la humedad media experimental;  $W_{cal}$  la humedad calculada mediante el modelo empleado.

### 3.5 Tratamiento post-secado

Una vez finalizado el proceso de secado, el producto se homogenizó con ayuda de un mortero para obtener un polvo y se transfirió a un vial de plástico estanco (Figura 3.8). Este polvo se almacenó en refrigeración ( $3^\circ\text{C}$ ) hasta su caracterización, que se realizó a las 48 horas de la finalización de la experiencia de secado.



Figura 3.8. Viales de plástico conteniendo el biocatalizador en forma de polvo.

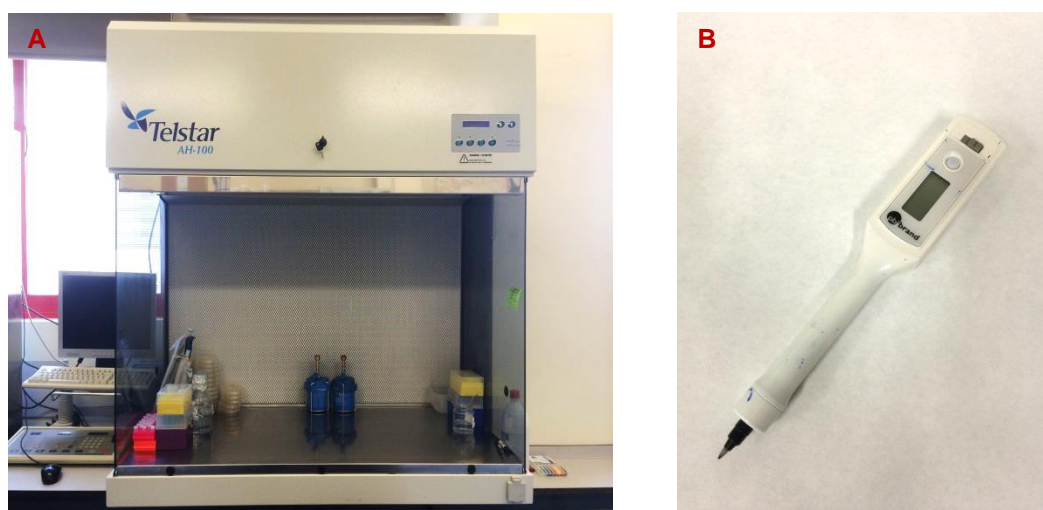
La primera prueba de caracterización consistió en la determinación del contenido de humedad que se realizó de igual modo que para la muestra fresca. Es decir, secando

el producto a 70°C y vacío durante 48 horas. La caracterización se completó con el análisis de viabilidad por recuento de colonias en placas y mediante análisis microestructural por tinción, técnicas que se detallan a continuación.

### 3.6 Análisis de viabilidad

El cultivo y recuento en placa fue la opción elegida para llevar a cabo el análisis de viabilidad. De este modo se comparó, la viabilidad de la levadura fresca (Control) y estabilizada mediante las diferentes técnicas estudiadas (LF, SUS y US).

Para poder llevar a cabo este análisis, primero fue necesario determinar qué dilución de la muestra inicial sólida permitía el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) ya que es necesario que el número de UFC por placa esté comprendido entre 20 y 300 (Breed y Dotterer, 1916; Nyanga y Nout, 2012). Para ello se tomaron 0.5, 1 y 1.5 g del bloque de levadura fresca que se diluyeron en 50 mL de solución salina (0.85% NaCl y agua destilada). La solución salina impide los efectos que pudiera causar la diferencia de concentración de iones a ambos lados de la membrana plasmática, pues aporta las condiciones isotónicas necesarias para evitar que las células estallen. Las mezclas obtenidas se tomaron como punto de partida (dilución 1:1) para obtener series de diluciones de hasta 1 parte de muestra inicial en  $10^5$  de volumen de solución isotónica, las diluciones se realizaron en tubos de microcentrifuga. A continuación, se realizaron las siembras en placas Petri con medio YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) de cada una de las diluciones por triplicado. Todas las siembras se realizaron con la ayuda de material esterilizado, y sobre la cabina de flujo laminar (Telstar AH-100, Figura 3.9 A). Tras 24 horas de cultivo en estufa a 33°C, se pudo determinar que la dilución 1:10<sup>5</sup> obtenida a partir de 0.5 g de bloque de levadura fresca era adecuada para el recuento, que se facilitó mediante el uso de un contador de colonias manual electrónico (PBI Brand, 89748) (Figura 3.9 B).



**Figura 3.9.** Métodos para el análisis de viabilidad. (A) cabina de flujo laminar. (B) contador de UFC manual electrónico.

El procedimiento para el análisis de las muestras secas fue idéntico al comentado para la muestra fresca. En este caso, también se utilizaron 0.5 g de muestra deshidratada y la dilución 1:10<sup>5</sup>.

Se realizó un análisis de varianza para determinar si existieron diferencias significativas en el número de UFC para las distintas técnicas de deshidratación. Con el objetivo de establecer grupos homogéneos se determinaron los intervalos de Tukey ( $p < 0.05$ ) empleando el software Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Warrenton, USA).

### 3.7 Microscopía óptica y métodos de tinción

Con el fin de visualizar el efecto que las distintas técnicas de estabilización estudiadas ejercen sobre la viabilidad de las células, se usó el método de tinción para microscopía óptica recogido en Lange *et al.* (1993). Este método recibe el nombre de “tinción vital de levaduras”, siendo su composición la que sigue para un volumen de 100 mL: 0.02 g Azul de metileno, 2.7 g Potasio dihidrógeno fosfato, 0.024 g Di-Sodio hidrógeno fosfato dodecahidrato y agua desionizada hasta enrasar. Funciona tiñendo las células muertas de azul oscuro, pues estas, al no poseer actividad enzimática son incapaces de reducir el colorante que ha penetrado en su estructura. Las células vivas, en cambio, se vuelven refringentes, ya que sí pueden eliminar el colorante (Painting y Kirsop, 1989; Spreutels *et al.*, 2014). A la hora de adecuar las muestras para ser visualizadas al microscopio, se tomaron 0.5 g de levadura seca o fresca que se disolvieron en 50 mL de solución isotónica, y tras homogeneizar se colocó la muestra con ayuda de un cuentagotas de plástico sobre el portaobjetos. A continuación se añadió una gota de tinción vital. Las imágenes se tomaron en un microscopio óptico (100X) (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Japón) (Figura 3.10), que dispone de una cámara de video de alta resolución conectada a un ordenador.



**Figura 3.10.** Equipo de microscopía óptica utilizado para visualizar las células mediante la tinción vital de levaduras.



### 3.8 Diseño experimental

La Tabla 3.1 resume el número mínimo de experiencias y cultivos realizados de cada tipo de técnica estudiada. Como se observa, tanto de LF como de SUS y US se realizaron al menos tres repeticiones y se cultivaron 3 réplicas de placas control. De las muestras secas se cultivaron 9 placas por experiencia. Lo que suma un total de 27 placas por técnica. Por último, se llevó a cabo la tinción vital de las muestras post-secado de todas las experiencias.

**Tabla 3.1.** Resumen del número de experiencias, cultivos control, cultivos post-secado y tinciones realizados

Técnica	Experiencia	Nº de placas pre-secado (control)	Nº de placas post- secado	Tinción vital
LF	LF 1	3	9	SÍ
	LF 2	3	9	SÍ
	LF 3	3	9	SÍ
SUS	SUS 1	3	9	SÍ
	SUS 2	3	9	SÍ
	SUS 3	3	9	SÍ
US	US 1	3	9	SÍ
	US 2	3	9	SÍ
	US 3	3	9	SÍ
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>27</b>	<b>81</b>	<b>9</b>

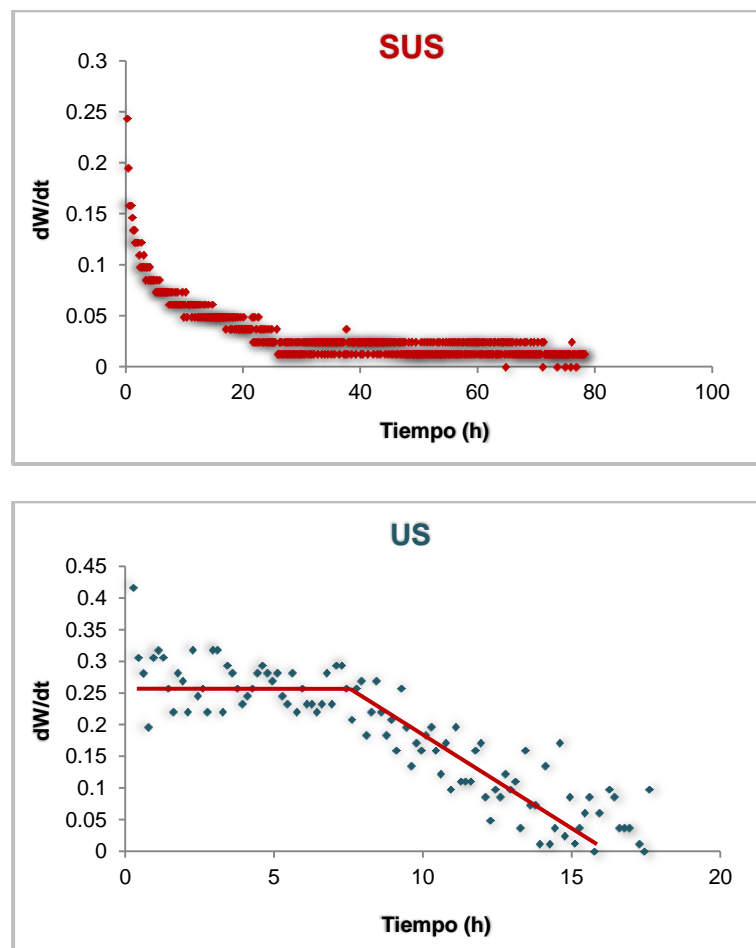
# 4. Resultados y Discusión

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Influencia de los ultrasonidos de potencia en el secado a baja temperatura de *S. cerevisiae*

#### 4.1.1 Velocidad de secado

En la Figura 4.1 se muestra la variación de la velocidad de secado frente al tiempo para las experiencias realizadas a  $-10^{\circ}\text{C}$  con (US) y sin (SUS) aplicación de ultrasonidos de potencia. Como se ha comentado en la sección de introducción, estas experiencias pueden considerarse como de liofilización a presión atmosférica puesto que la baja temperatura establecida ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) mantiene la presión de vapor por debajo del punto triple (García-Pérez *et al.*, 2012). Se puede observar que la evolución de la velocidad de secado fue muy diferente en ambos casos, tal y como se explicará a continuación.



**Figura 4.1.** Variación de la velocidad de secado ( $dW/dt$ ) para las experiencias SUS y US. La gráfica de US muestra en rojo la tendencia que siguen los

La velocidad de secado inicial fue similar en ambos casos (aproximadamente  $0.3 \text{ g w/g ms/s}$ ), pero su evolución durante el proceso fue muy diferente. En el caso de las experiencias SUS, la disminución de la velocidad de secado fue progresiva. Pues en la

Figura 4.1 no se observa ningún periodo de velocidad de secado constante. Así, la eliminación de agua ocurrió en el periodo de velocidad de secado decreciente. Esto indica que en la superficie del lecho de levaduras aparecieron zonas secas cuya extensión fue creciendo a medida que transcurría el proceso de secado. En cambio, en las experiencias US, apareció un periodo de velocidad de secado constante durante las primeras 8 horas, y a partir de este momento se aprecia una disminución gradual de la misma. Esto se debe a que inicialmente la superficie de la muestra se encontraba completamente húmeda, y la aparición de las zonas secas se retrasó. El simple análisis de la velocidad de secado pone de manifiesto que los ultrasonidos provocaron cambios muy importantes en los mecanismos de transporte de agua durante el proceso, afectando a los mecanismos controladores de la velocidad de deshidratación.

En las experiencias sin aplicación de ultrasonidos de potencia, el mecanismo predominante fue la difusión molecular del agua en el lecho de levadura (García-Pérez *et al.*, 2012). El agua presente en el interior de la muestra sale al exterior por el gradiente de presión de vapor existente entre el interior y la superficie de la misma (Singh, 2014). Cuando llega a la superficie, tiene lugar un discreto proceso convectivo debido al gradiente de presión de vapor entre el aire y la superficie de la muestra. Sin embargo, en las experiencias US, ambos mecanismos coexisten durante el periodo de velocidad de secado constante. En el cual, el control de la pérdida de agua radica en la convección. Este periodo de velocidad constante continúa hasta que el contenido en humedad de la muestra se reduce a su punto crítico (Singh, 2014). A continuación la velocidad de secado comienza a disminuir ya que la velocidad de eliminación de agua pasa a estar controlada predominantemente por la difusión.

#### 4.1.2 Cinéticas de secado.

La Figura 4.2 muestra las cinéticas de secado a baja temperatura de levadura con (US) y sin aplicación de ultrasonidos (SUS). Tal y como se observa en dicha figura, la aplicación de ultrasonidos aceleró de manera drástica el proceso de secado respecto a las experiencias SUS.

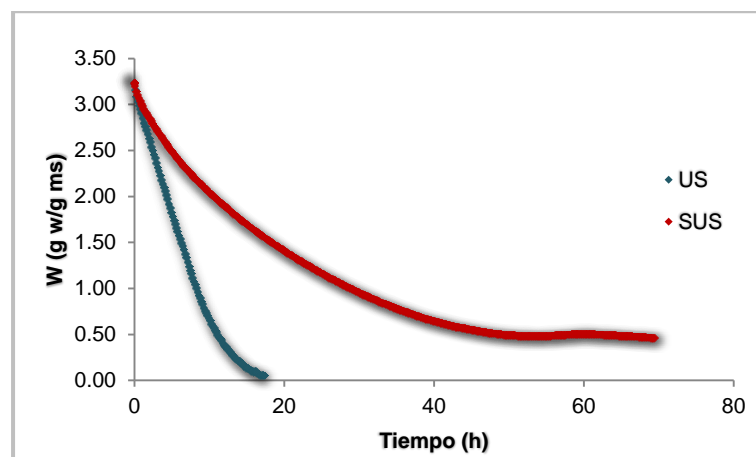
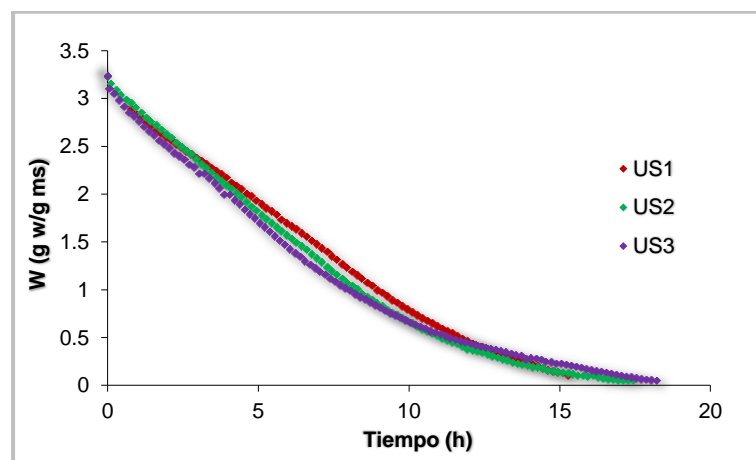


Figura 4.2. Cinéticas de secado de levadura (2 m/s y -10°C) con (US) y sin (SUS) aplicación de ultrasonidos de potencia.

El tiempo requerido en la experiencia SUS para conseguir un contenido de humedad de 1 g w/g ms, fue de 43 horas. En cambio, para las réplicas US, se obtuvo una media de 8 horas. Esto supone un ahorro del tiempo de secado del 80%, que incluso se incrementaría para contenidos de humedad más bajos, tal y como se observa en la Figura 4.2. La reducción del tiempo de secado es comparable a la obtenida por Soriano (2014) al aplicar los ultrasonidos de potencia al secado convectivo de berenjena (87%). Otros estudios de secado a baja temperatura asistido por ultrasonidos, como los que se llevaron a cabo en Ozuna *et al.* (2014), García-Pérez *et al.* (2012) y Nakagawa *et al.* (1996), alcanzaron una reducción de tiempo de un 54% en bacalao, un 70% en zanahoria y un 80% en bloques de surimi respectivamente. Parece ser que la porosidad de la muestra favorece el efecto de los ultrasonidos (Puig *et al.*, 2012). No existen referencias previas sobre la aplicación de esta técnica en el secado de levaduras, ni de otros microorganismos, a baja temperatura.

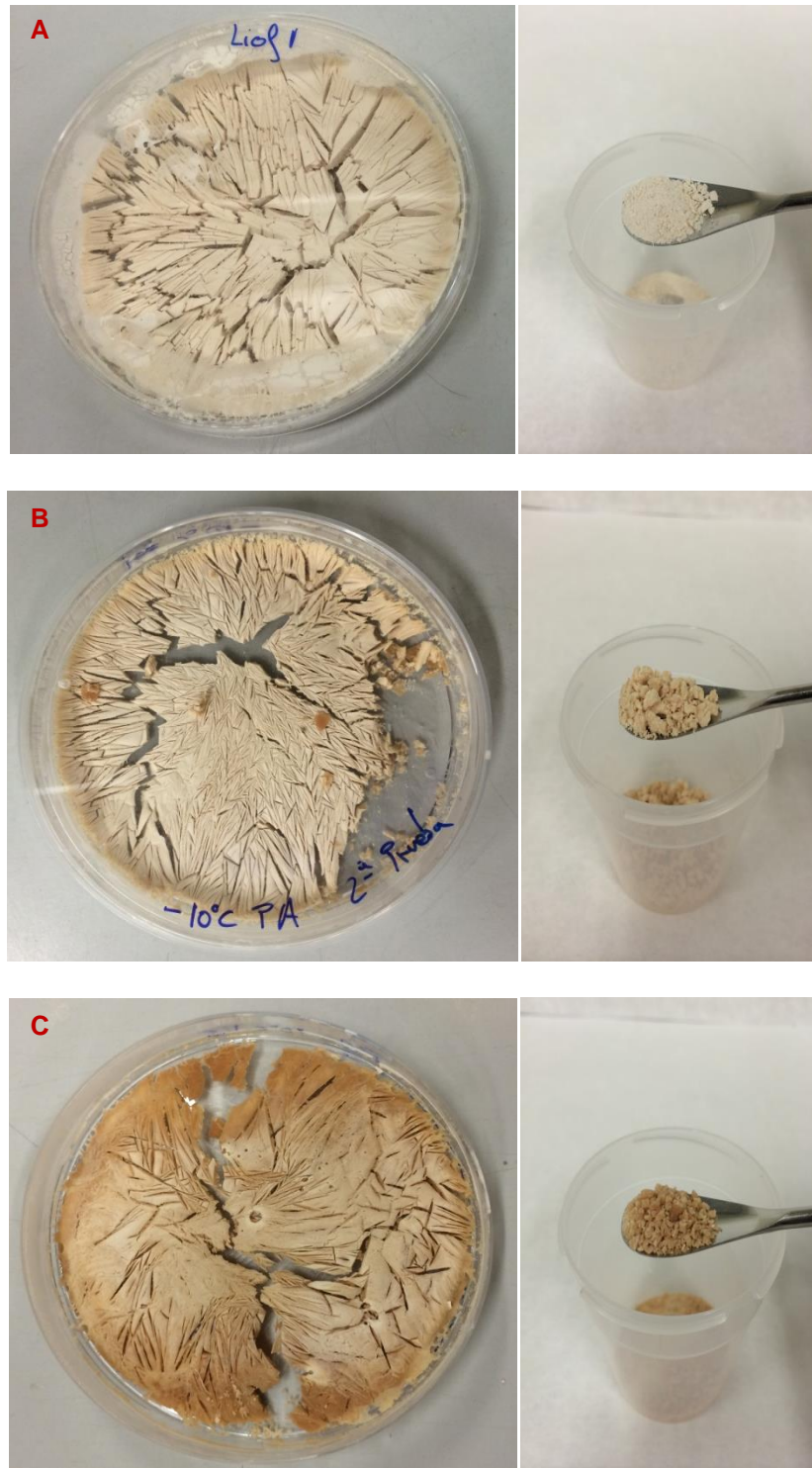
Uno de los factores determinantes del éxito de una técnica de secado es su reproducibilidad, lo que es extensible a cualquier otro proceso industrial. Con el fin de evaluarla, en la Figura 4.3, se comparan todas las repeticiones efectuadas de las cinéticas US. Tal y como se observa en dicha figura, la aplicación de ultrasonidos de potencia al secado convectivo resulta en una técnica de elevada reproducibilidad, con muy poca variabilidad entre las distintas réplicas. Al ser una técnica de estabilización rápida, el secado US no presentó problemas en cuanto al control de la humedad relativa.



**Figura 4.3.** Cinéticas de secado de levadura (2 m/s y -10°C) con aplicación de ultrasonidos de potencia (US). Se muestran todas las réplicas efectuadas.

En el caso de las experiencias SUS la reproducibilidad fue mucho menor. Entre otros factores, la elevada duración del proceso, de hasta varios días, complicó el mantenimiento de la humedad relativa por debajo del 20%. Por lo que fue necesario sustituir el material desecante, en más de una ocasión, durante el transcurso de la experiencia. La humedad relativa es un factor muy importante en el proceso de secado convectivo, ya que no influye únicamente en el gradiente de presión de vapor entre el lecho de levadura y el aire., sino también en el contenido de humedad de equilibrio y, de este modo, en el contenido de humedad de la muestra deshidratada. Es necesario

indicar que en algunas réplicas SUS, no se pudo alcanzar la pérdida de peso pre-establecida del 75%, quedando su humedad por encima de las experiencias US y de las liofilizadas (LF). A efectos de comparación visual, la Figura 4.4 muestra el resultado obtenido tras someter la pasta de levaduras a las técnicas LF, SUS y US durante 24 horas.



**Figura 4.4.** Pasta de levadura deshidratada en placa durante 24 horas mediante liofilización (LF, A), y secada a 2 m/s y  $-10^{\circ}\text{C}$  sin (SUS, B) y con (US, C) aplicación de ultrasonidos de potencia. Se muestra el aspecto de la placa y del producto homogenizado.

En las experiencias LF el resultado fue un producto blanco y quebradizo compuesto por pequeñas fibras. Su estructura porosa facilitó la homogenización a un fino polvo. El valor de la humedad final para estos productos LF fue de 0.02 g w/g ms, un 2% de agua (base húmeda, b.h.). Se trata del menor porcentaje de humedad alcanzado a las 24 h de proceso de entre todas las técnicas estudiadas. Por otro lado, el producto SUS mostró un color más oscuro que el de LF y una textura más compacta. El pardeamiento observado puede ser consecuencia de la exposición al aire. En vistas a una aplicación industrial, el aire podría sustituirse por un gas inerte, como N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>, con el fin de evitar reacciones de oxidación. Tras 24 h de secado SUS, la muestra aún se encontraba muy húmeda, por lo que el tamaño del grano no pudo ser reducido al de LF. La dificultad a la hora de reducirla a polvo se debe a que los gránulos se unían y compactaban por el elevado contenido en humedad. El valor de humedad final tras 24 h de secado fue de 1.5 g w/g ms, (60% b.h.). Por último, en las placas US se pueden observar fisuras y poros originados por efectos mecánicos debido a la incidencia de las ondas acústicas en la superficie del lecho. Se observan zonas muy pardeadas, que coinciden con las partes más cercanas a las paredes de la cámara de secado. Este pardeamiento más intenso puede explicarse considerando la gran turbulencia que los ultrasonidos provocan alrededor de las partículas (García-Pérez *et al.*, 2012). Las partes más oscuras presentaron una mayor dureza debida, probablemente, al mayor grado de deshidratación. La humedad tras 24 h de la pasta US fue prácticamente similar a LF (0.07 g w/g ms, 6% b.h.).

#### 4.1.3 Modelización de las cinéticas de secado

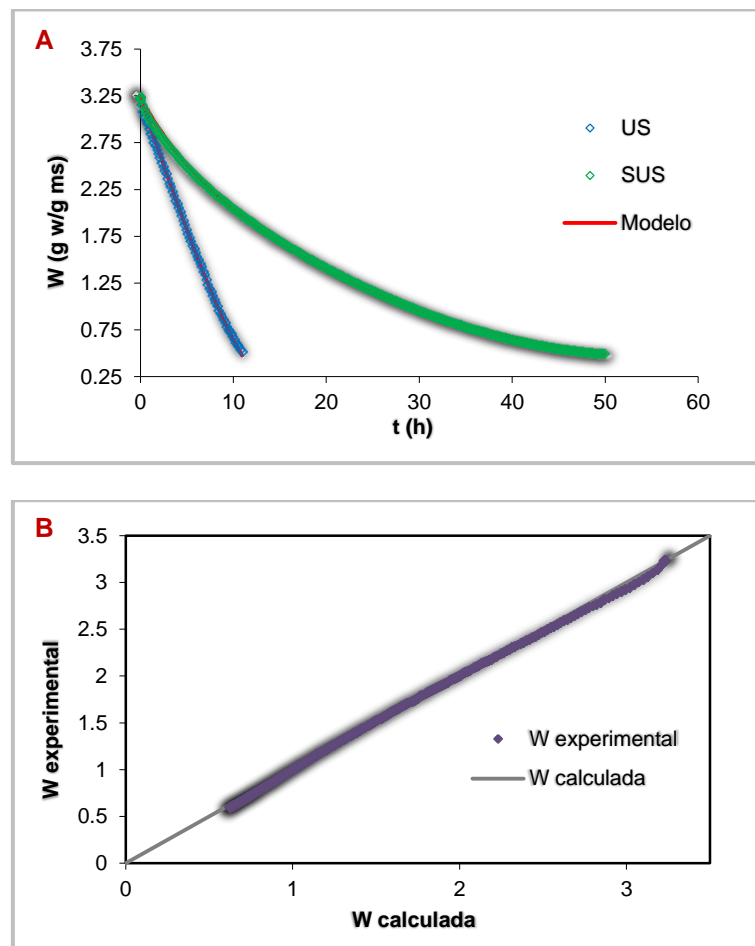
En vistas a cuantificar la influencia de los ultrasonidos de potencia sobre los mecanismos de transporte de materia, se describieron matemáticamente las cinéticas de secado mediante un modelo difusivo y convectivo. El ajuste del modelo a los datos experimentales permitió identificar la difusividad efectiva ( $D_e$ ) y el coeficiente de transferencia de materia (K). Se trata de los parámetros cinéticos del modelo, y aportan información acerca de la importancia que poseen los dos mecanismos considerados sobre el control de la transferencia de materia: la difusión a través del interior de la muestra y la convección en la superficie. En la tabla 4.1 se muestran los valores promedio de  $D_e$  y K obtenidos a partir de las experiencias SUS y US realizadas.

**Tabla 4.1.** Modelización de las cinéticas de secado mediante un modelo difusivo y convectivo.

	SUS	US
$K \times 10^4$ (g w/m <sup>2</sup> /s)	1.72±1.21	2.59±0.30
$D_e \times 10^{10}$ (m <sup>2</sup> /s)	0.49±0.141	216.33±92.39
VAR (%)	99.2	99.4
EMR (%)	3.4	2.9

$D_e$ : difusividad efectiva ± desviación estándar, K: coeficiente de transferencia de materia ± desviación estándar, VAR (%): varianza explicada, EMR (%): error medio relativo.

Los porcentajes de varianza explicada (VAR) junto a los de error medio relativo (EMR) indican que el ajuste del modelo fue satisfactorio. La VAR superó, tanto en SUS como en US, el 99%, y el EMR presentó valores inferiores al 10%. La Figura 4.5 A permite corroborar de manera visual la bondad del ajuste. Tal y como se observa en dicha figura, el ajuste del modelo a las cinéticas de secado SUS y US es muy preciso, ya que la curva formada por los datos calculados se solapa con la de los datos experimentales. Este mismo hecho se pone de manifiesto en la Figura 4.5 B, donde los valores experimentales y calculados se comparan para una experiencia US.



**Figura 4.5.** (A) Modelización de cinéticas de secado de levaduras a 2 m/s y  $-10^{\circ}\text{C}$  con (US) y sin (SUS) aplicación de ultrasonidos. (B) Comparación de la humedad experimental y calculada para la experiencia US

No existen datos en la bibliografía sobre difusividad efectiva para levadura en las condiciones experimentales de este estudio. Sin embargo, Debaste *et al.* (2008) modelizaron el secado en lecho fluido de *S. cerevisiae* aproximando la geometría de las células a la de esferas. De esta manera, pudieron determinar un valor de difusividad efectivo medio, para temperaturas comprendidas entre  $25$  y  $38^{\circ}\text{C}$ , de  $3.6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ , que es similar al obtenido en este trabajo para las experiencias SUS. Estos autores también ponen de manifiesto la importancia de la convección y difusión en el proceso de secado. Spreutels *et al.* (2013) y Spreutels *et al.* (2014) abordaron la modelización del secado de levadura por diferentes métodos, entre otros la atomización a temperaturas comprendidas entre  $30$  y  $60^{\circ}\text{C}$ . De esta manera



comprobaron que la temperatura de secado no es un factor importante únicamente para la velocidad de secado, sino que también influye en la viabilidad celular. Este aspecto se tratará en detalle en el siguiente apartado.

Al comparar los valores de  $D_e$  y  $K$ , se pueden observar diferencias significativas entre las técnicas SUS y US. El mayor efecto de los ultrasonidos recayó en la  $D_e$ , con un incremento de hasta tres órdenes de magnitud. Como se comentó en la sección 4.1.1, el efecto esponja provocado aumenta la transferencia de agua a través de la estructura del material durante el secado (Ozuna *et al.*, 2011). Esto junto con la creación de microcanales y poros facilita la salida de agua hacia el exterior. La producción de estos fenómenos se ve reflejada en el aumento del valor de  $D_e$ . En cuanto al valor de  $K$ , resulta compleja su comparación entre las experiencias SUS y US. Ello es debido al reducido papel de la convección en las experiencias SUS. Así, el valor de  $K$  en las experiencias SUS, se podría considerar un mero artefacto matemático al no ser significativo en el control de la transferencia de materia. En la literatura previa se reporta la capacidad de los ultrasonidos de potencia para mejorar el transporte convectivo como consecuencia de la disminución de la capa límite de convección provocada por las variaciones de presión, velocidades oscilantes y generación de microcorrientes en la interfase sólido-gas (García-Pérez, 2007; Ozuna *et al.*, 2011). Trabajos futuros deben centrarse en esclarecer si existe una mejora de los procesos de convección en el secado de levadura a baja temperatura con aplicación de ultrasonidos.

## 4.2 Influencia de los métodos de estabilización sobre la viabilidad

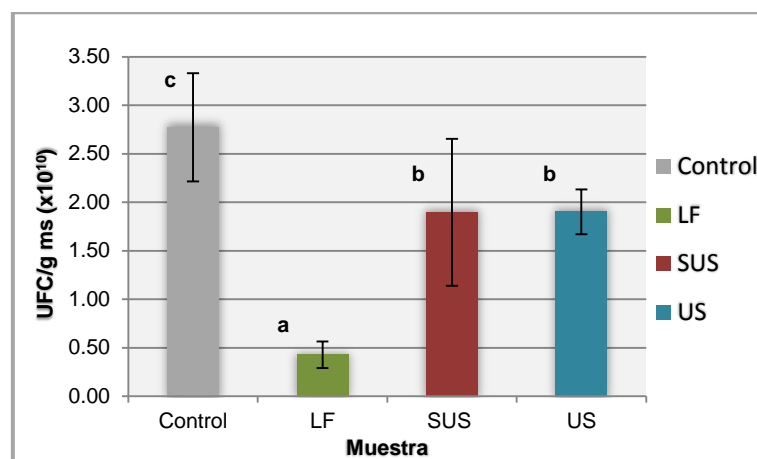
### 4.2.1 Recuento de UFC

La Tabla 4.2 muestra el contenido de humedad (expresado en base húmeda y base seca) tanto de las muestras control (bloque de levadura fresca), como de los productos resultantes del procesado mediante las distintas técnicas de estabilización estudiadas. Se muestran además los resultados del recuento de UFC (valor medio) expresados por gramo de materia seca de producto, y por gramo de materia total de producto. Se asume que el producto está compuesto por levaduras (materia seca) y agua. En la Figura 4.6, se muestra gráficamente, para una mejor comparación, el resultado del recuento de UFC por gramo de materia seca en el producto final.

**Tabla 4.2.** Resultados obtenidos en el análisis de humedad y viabilidad del producto fresco y deshidratado mediante liofilización (LF), y secado a 2 m/s y -10°C con (US) y sin (SUS) aplicación de ultrasonidos de potencia.

	Control	LF	SUS	US
<b>Humedad (% b.h.)</b>	67	2.2	42.1	9
<b>W (g W/g ms)</b>	2.03	0.02	0.73	0.1
<b>UFC</b>	91	42	122	173
<b>UFC/g ms x 10<sup>10</sup></b>	2.77±0.56	0.43±0.14	1.90±0.76	1.90±0.23
<b>UFC/g x 10<sup>10</sup></b>	0.91	0.42	1.08	1.73

Humedad (% b.h.): contenido de agua en base húmeda, W: contenido de agua en base seca; UFC: Unidades formadoras de colonias, UFC/g ms: UFC expresado por gramo de materia seca de producto ± desviación estándar, UFC/g: UFC expresado por gramo de materia total de producto.



**Figura 4.6.** UFC/g ms para las muestras Control, LF, SUS y US (2 m/s y -10°C). Se muestran valores medios ± desviación estándar expresados en formato de gráfico de columnas. Las letras (a, b y c) muestran grupos homogéneos establecidos mediante intervalos de Tukey ( $p < 0.05$ ).

En la Tabla 4.2 se observa que el mayor número de UFC se obtuvo en muestras US (173 UFC por placa). Las muestras SUS poseen un valor similar (122 UFC). Mientras que los valores menores de UFC se obtuvieron para las muestras frescas (91 UFC) y liofilizadas (42 UFC). Estos resultados no son comparables, ya que el contenido de agua final altera el sentido de los resultados. Debido a ello, es necesario expresar los resultados por gramo de materia seca. Así, en la Figura 4.6, se observa que el secado conllevó una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) de la viabilidad, pues el número de UFC para todas las muestras deshidratadas fue inferior al de la levadura fresca. La influencia negativa de la deshidratación en la viabilidad celular ha sido reflejada en la bibliografía previa (Lemetais *et al.*, 2012). La viabilidad alcanzada en estas muestras

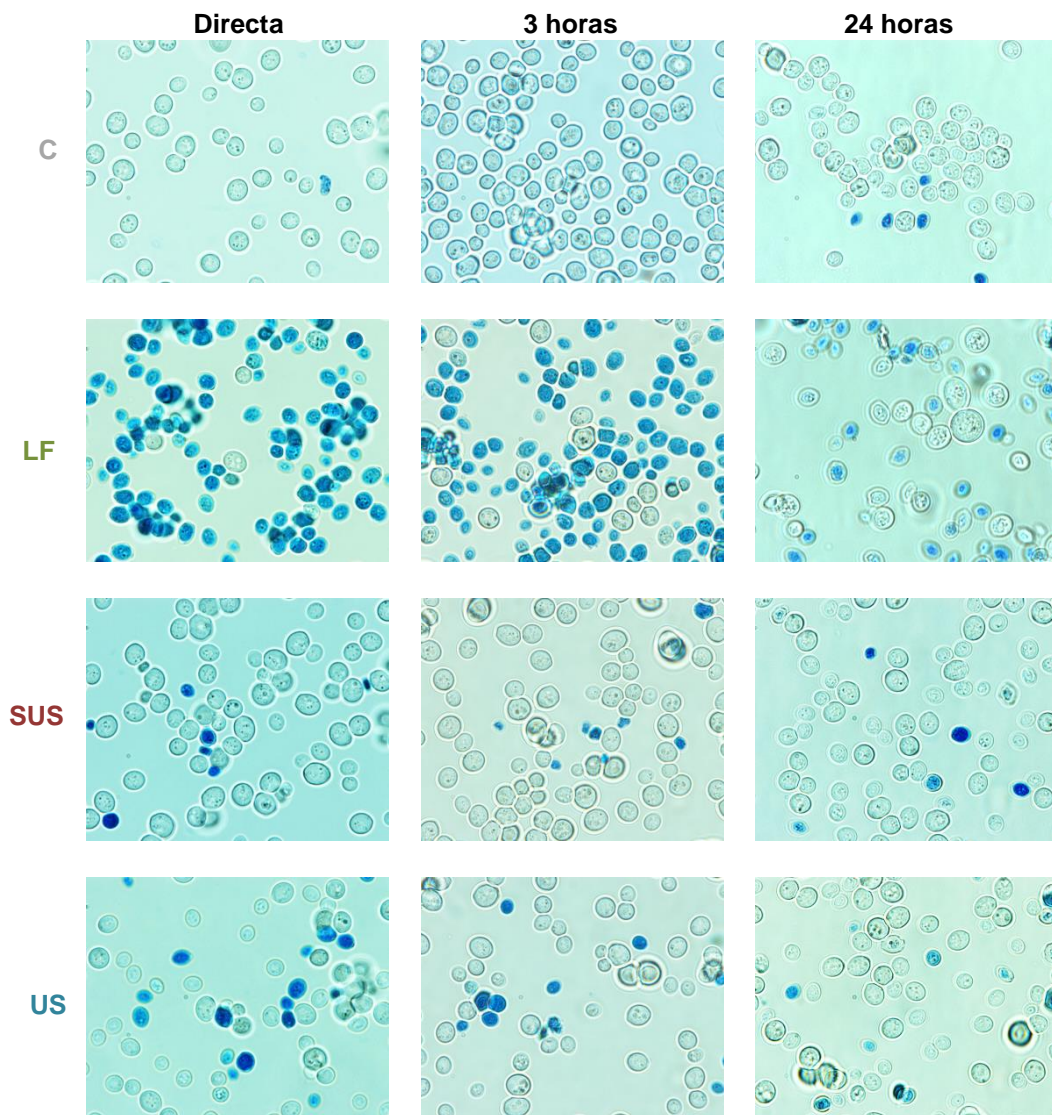
resultó mucho mayor que la mostrada por Luna-Solano *et al.* (2005) en el secado de levadura por atomización. Estos autores muestran una viabilidad de  $1.26 \times 10^6$  UFC/g ms. Sin embargo, Bayrock e Ingledew (1997) obtuvieron valores de viabilidad similares a los de este trabajo mediante secado en lecho fluido. Las muestras liofilizadas presentaron una viabilidad significativamente inferior ( $p < 0.05$ ) a las secadas a baja temperatura SUS y US. El alto nivel de vacío que se aplica durante la liofilización puede repercutir de forma negativa en las células debido al estrés mecánico que conlleva. Miyamoto-Shinohara *et al.* (2010) presentaron valores de viabilidad de  $5 \times 10^8$  UFC/g ms para muestras liofilizadas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las muestras deshidratadas a baja temperatura SUS y US. Se trata de un resultado muy interesante, pues a pesar del gran efecto cinético asociado a la aplicación de ultrasonidos, esta técnica no parece tener un impacto negativo sobre la viabilidad de las células.

El hecho de que la aplicación de ultrasonidos sea una tecnología no-térmica, podría ser la razón de que la viabilidad de las células no se vea alterada en gran medida respecto a las muestras frescas. Y ello, a pesar de las agresivas roturas y deformaciones macroscópicas que sufre la muestra durante el proceso. Sin embargo, este resultado abre la puerta a una serie de interrogantes que requieren estudios adicionales. Como son las condiciones de almacenamiento más adecuadas, la manera óptima de rehidratación o el uso de agentes protectores (Hubálek, 2003; Crowe *et al.*, 2001). Pues como critican Morgan *et al.* (2006), la mayoría de los estudios realizados en el área de estabilización de biocatalizadores aportan únicamente resultados obtenidos justo al término del procesado. Y es que el problema parece ser el largo periodo de tiempo necesario para obtener datos reales sobre la variación de la viabilidad de las células en condiciones de almacenamiento (Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2006). Por lo tanto, será necesario llevar a cabo experiencias adicionales para contrastar estos resultados.

#### 4.2.2 Análisis microestructural

El resultado extraído del recuento en placa en la sección anterior, muestra que la viabilidad de las células sometidas al proceso de liofilización LF fue menor que la de las células estabilizadas mediante SUS y US. Sin embargo, es conocido que las levaduras *S. cerevisiae* poseen mecanismos de tolerancia a condiciones que la célula detecta como extremas. La potenciación de estos mecanismos puede desembocar en el estado de anhidrobiosis. En este estado, la célula suspende los procesos metabólicos hasta que desaparecen las condiciones no aptas para su crecimiento. Surge por tanto la pregunta sobre si el menor recuento de UFC hallado para las experiencias LF se debe a la muerte celular o a la entrada de las mismas en estado de latencia. La baja temperatura y las condiciones de vacío que se emplean en la liofilización convencional podrían ser detectadas por la célula como condiciones no aptas para reproducirse. Por ello muchas podrían iniciar la transición hacia la anhidrobiosis, y esa sería una de las razones del menor número de UFC hallado en LF. Para tratar de responder a este interrogante se realizó un análisis microestructural aplicando técnicas de tinción (Lange *et al.*, 1993). La Figura 4.7 muestra las imágenes

de las levaduras sin rehidratación (Directa), y tras un proceso de rehidratación en solución salina y en ausencia de nutrientes de 3 horas, y 24 horas.



**Figura 4.7.** Tinción de levaduras mediante el método de Lange *et al.* (1993), realizado para todas las técnicas estudiadas (incluido el Control), y a distintos tiempos de rehidratación en solución salina sin nutrientes (Directa, 3 horas y 24 horas).

Esta tinción funciona de manera que las células vivas pueden eliminar el colorante de su citoplasma gracias a que poseen actividad enzimática, por lo que se observan como refringentes. Sin embargo, las células muertas no pueden eliminar el colorante que ha penetrado en su estructura, por lo que se tiñen y aparecen de color azul oscuro. Tal y como se observa en la Figura 4.7., en la muestra fresca casi todas las levaduras aparecen refringentes, es decir son viables. La imagen LF Directa, muestra casi un 100% de células azules que, según este método, deberían considerarse células muertas. Sin embargo, esto entra en conflicto con los resultados del recuento en placa. Pues el valor de UFC/g ms obtenido indica que no todas las células LF están muertas, ya que poseen capacidad para formar colonias. En los métodos SUS y US se observan células vivas desde el principio, y el número no varía con el tiempo de

rehidratación. Es interesante el hecho de que en las experiencias SUS y US solo se haya observado un número pequeño de células en estado de latencia. Este número no variaba incluso tras 24 horas de rehidratación. Por lo que el efecto de los ultrasonidos no parece inducir la transición al estado de anhidrobiosis. Así, se plantea la posibilidad de que las levaduras US puedan ser aplicadas directamente sin necesidad de largos periodos de reconstitución. Por el contrario, las células LF refringentes aumentan con el tiempo de rehidratación. Llegándose a apreciar incluso un aumento del tamaño celular a las 24 horas. Esto indica que las células han retomado su actividad enzimática y han conseguido eliminar el azul de metileno del citoplasma.

El método de tinción se concibió como una forma de analizar y cuantificar la viabilidad celular del producto deshidratado. Pero los resultados han puesto de manifiesto que está influida por el grado de rehidratación de la célula. En vistas a trabajos futuros, se considera necesario determinar las cinéticas de crecimiento de la levadura deshidratada para poder evaluar con mayor rigurosidad las distintas técnicas de secado, pero a priori y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se considera que el secado convectivo a baja temperatura asistido por ultrasonidos es una técnica de enorme potencial para la estabilización de biocatalizadores microbianos.

# 5. Conclusiones

## 5. Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen de este trabajo son las que se exponen a continuación:

- La aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo a baja temperatura (2 m/s, -10°C) de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) incrementó de manera drástica la velocidad del proceso.
- La aplicación de ultrasonidos modificó los mecanismos de transferencia de materia que controlan el proceso de secado. Su efecto fue principalmente la mejora de los mecanismos de difusión interna.
- El modelo difusivo y convectivo empleado describió de manera satisfactoria las cinéticas de secado de la levadura.
- Todas las técnicas de deshidratación estudiadas disminuyeron la viabilidad respecto a la levadura fresca.
- La viabilidad de la levadura liofilizada fue inferior a la de las deshidratadas a baja temperatura con y sin aplicación de ultrasonidos.
- La aplicación de ultrasonidos no afectó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) a la viabilidad de este biocatalizador.
- El análisis microestructural reveló que la transición de las células al estado de latencia y la muerte celular fue menos evidente en la levadura secada a baja temperatura con y sin aplicación de ultrasonidos que en las muestras liofilizadas. Por lo tanto, se puede considerar que el secado convectivo a baja temperatura es una técnica de estabilización no agresiva.
- En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que el secado convectivo a baja temperatura asistido por ultrasonidos de potencia es una tecnología que presenta un enorme potencial de cara a la estabilización de biocatalizadores microbianos.

# 6. Bibliografía



## 7. Bibliografía

**Alves-Filho, O.; Eikevik, T.; Mulet, A.; Garau, C.; Roselló, C. (2006).** Kinetic and mass transfer during atmospheric freeze drying of red pepper. *15<sup>th</sup> International Drying Symposium*: 1315-1321.

**Anal, A.K.; Singh, H. (2007).** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial application and target delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 240-251.

**AOAC. (1997).** *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, Virginia, EEUU.

**Awad, T.D.; Moharram, H.A.; Shaltout, O.E.; Asker, D.; Youssef, M.M. (2012).** Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food. *Food Research International*, 48: 410-427.

**Bayrock, D.; Ingledew, W.M. (1997).** Fluidized bed drying of baker's yeast: moisture levels, drying rates, and viability changes during drying. *Food Research International*, 30: 407-415.

**Belkin S. (2003).** Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 206-212.

**Bjerketorp, J.; Håkansson, S.; Belkin, S.; Jansson, J.K. (2006).** Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive and active. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 1-7.

**Bronshtein, V. (1998).** Preservation by foam formation. United States Patent. Número de patente: 5766520.

**Buitink, J.; Claessens, M.M.A.E.; Hemminga, M.A.; Hoekstra, F.A. (1998).** Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. *Plant Physiology*, 118: 531-541.

**Carpenter, J.F.; Crowe, L.M.; Crowe, J.H. (1988).** Stabilization of phosphofruktokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 923: 109-115.

**Chemat, F.; Huma, Z.; Khan, M.K. (2011).** Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 813-835.

**Chou, S.K.; Chua, K.J. (2001).** New hybrid drying technologies for heat sensitive foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 359-369.

**Chua, K.J.; Chou, S.K. (2005).** A comparative study between intermittent microwave and infrared drying of bioproducts. *International Journal of Food Science and Technology*, 40: 23-39.

**Corcoran, B.M.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. (2004).** Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1024–1039.

**Corona, E.; García-Pérez, J.V.; Santacatalina, J.V.; Ventanas, S.; Benedito, J. (2014).** Ultrasonics characterization of pork fat crystallization during cold storage. *Journal of Food Science*, 79: 829-838.

**Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Oliver, A.E.; Tsvetkova, N.; Wolkers, W.; Tablin, F. (2001).** The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43: 89-105.

**Debaste, F.; Halloin, V.; Bossart, L.; Haut, B. (2008).** A new modeling approach for the prediction of yeast drying rates in fluidized beds. *Journal of Food Engineering*, 84: 335–347

**De la Fuente, S., Riera, E.; Acosta, V.M.; Blanco, A.; Gallego-Juárez, J.A. (2006).** Food drying process by power ultrasound. *Ultrasonics*, 44: 523-527.

**Desmond, C.; Ross, R.P.; O’Callaghan, E.; Fitzgerald, G.; Stanton, C. (2002).** Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 1003–1011.

**Di Matteo, P.; Dons, G.; Ferrari, G. (2003).** The role of heat and mass transfer phenomena in atmospheric freeze-drying of foods in a fluidised bed. *Journal of Food Engineering*, 59: 267–275.

**Donev, T. (2001).** Methods for conservation of industrial microorganisms. *Biotechnology Innovation and Environment Protection*, Módulo 3: Methods in Biotechnology and Environment Protection. Publicación del National bank for industrial microorganisms and cell cultures. Sofía, Bulgaria.

**Earnshaw, R.G.; Appleyard, J.; Hurst, R.M. (1995).** Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 197-219.

**Ercan, S.S; Soysal, C. (2013).** Use of ultrasound in food preservation. *Natural Science*, 5: 5-13.

**Gallego-Juárez, J.A.; Rodríguez-Corral, G.; Gálvez-Moraleta, J.C.; Yang, T.S. (1999).** A new high intensity ultrasonic technology for food dehydration. *Drying Technology*, 17: 597-608.

**Gallego-Juárez, J.A.; Riera, E.; De la Fuente, S.; Rodríguez-Corral, G.; Acosta-Aparicio, V.M.; Blanco, A. (2007).** Application of high-power ultrasound for dehydration of vegetables: processes and device. *Drying Technology*, 25: 1893-1901

**García-Pérez, J.V.; Cárcel, J.A.; De la Fuente, S.; Riera, E. (2006).** Ultrasonic drying of foodstuff in a fluidized bed. *Parametric Study Ultrasonics*, 44: 539-543.

- García-Pérez, J. V. (2007).** *Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos.* Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- García-Pérez, J.V.; Cárcel, J.A.; Riera, E.; Rosselló, C.; Mulet, A. (2012).** Intensification of low-temperature drying by using ultrasound. *Drying Technology*, 30: 1199–1208.
- Gardiner, G.E.; O’Sullivan, E.; Kelly, J.; Auty, M.A.E.; Fitzgerald, G.F.; Collins, J. K.; Ross, R.P.; Stanton, C. (2000).** Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2605–2612.
- Guergoletto, K.B.; Sivieri, K.; Tsuruda, A.Y.; Martins, E.P.; Bertuol de Souza, J. C.; Roig, S. M.; Hirooka, E.Y.; Garcia, S. (2012).** Dried probiotics for use in functional food applications, en Dr. Benjamin Valdez (ed.), *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. Editorial InTech. Universidad Estatal de Londrina, Londrina, Brasil.
- Hajare, A.; More, H.; Pisal, S.; (2006).** Vacuum foam drying: New technology for preservation of sensitive biomolecules. *Pharma Times*, 38, N° 6.
- Hubálek, Z. (2003).** Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46: 205-229.
- Ivanova, E.; Teunou, E; Poncelet, D. (2005).** Encapsulation of water sensitive products: effectiveness and assessment of fluid bed dry coating. *Journal of Food Engineering*, 71: 223-230.
- Klok, C. J. (2010).** Anhydrobiosis. biological glass: a strategy to survive desiccation and heat, en: *Outside JEB*. Artículo resumen del *The Journal of Experimental Biology*.
- Lange, H.; Bavouzet, J.M.; Taillandier, P.; Delorme, C. (1993).** Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnology techniques*, 7: 223-228.
- Larena, I.; Melgarejo, P.; De Cal, A. (2003).** Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against Fusarium wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 151: 600–606.
- Lemetais, G.; Dupont, S.; Beney, L.; Gervais, P. (2012).** Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 471-480.
- Lezcano, E. (2012).** Cadena de la levadura. *Alimentos Argentinos*. Informe de producto. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Luna-Solano, G.; Salgado-Cervantes, M.A.; Rodríguez-Jimenes, G.C.; García-Alvarado, M.A. (2005).** Optimization of brewer’s yeast spray drying process. *Journal of Food Engineering*, 68: 9–18.

**Lypson, C.; Sheth, J.J. (1973).** Statistical design and analysis of engineering experiments. McGraw-Hill. New York.

**Miyamoto-Shinohara, Y.; Sukenobe, J.; Imaizumi, T.; Nakahara, T. (2006).** Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology*, 52: 27-32.

**Miyamoto-Shinohara, Y.; Nozawa, Fumie.; Sukenobe, J.; Imaizumi, T. (2010).** Survival of yeasts stored after freeze-drying or liquid-drying. *Journal of Genetics and Applied Microbiology*, 56: 107-119.

**Mongpraneet, S.; Abe, T.; Tsurusaki, T. (2002).** Accelerated drying of welsh onion by infrared radiation under vacuum conditions. *Journal of Food Engineering*, 55: 147-158.

**Morgan, C.A.; Herman, N.; White, P.A.; Vesey, G. (2006).** Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 183-193.

**Mulet, A.; Cárcel, J.A.; García-Pérez, J.V.; Riera, E. (2011).** Ultrasound-assisted hot air drying of foods. *Ultrasound technologies for Food and Bioprocessing*, 19: 511-534.

**Nijhuis, H.H.; Topping, H.M.; Muresan, S.; Yuksel, D.; Leguijt, C.; Kloek, W. (1998).** Approaches to improving the quality of dried fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 13-20.

**Nakagawa, S.; Yamashita, T.; Miura, H. (1996).** Ultrasonic drying of walleye pollack surimi. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 43: 388-394.

**Nivens, D.E.; Mcknight, T. E.; Moser, S.A.; Osbourn, S.J.; Simpson, M.L.; Saylor, G. S. (2004).** Bioluminescent bioreporter integrated circuits: potentially small, rugged and inexpensive whole-cell biosensors for remote environmental monitoring. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 33-46.

**Northcote, D.H. (1953).** The sorption of water vapor by yeast cell wall and other polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 11: 471-479.

**Nyanga, L.K.; Nout, M.J.R. (2012).** Yeasts preservation: alternatives for lyophilisation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 3239–3244.

**Oliucha, D.; Andrés, A.; Heredia, A. (2012).** Estudio de la influencia de los ultrasonidos de potencia en la transferencia de materia, propiedades ópticas y mecánicas durante el tratamiento prefritura de patata. *Actas del Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*.

**Ozuna, C.; Cárcel, J.A.; García-Pérez, J.V.; Mulet, A. (2011).** Improvement of water transport mechanisms during potato drying by applying ultrasound. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 2511–2517.

**Ozuna, C.; Cárcel, J.A.; Walde, P.M.; García-Perez, J.V. (2014).** Low-temperature drying of salted cod (*Gadus morhua*) assisted by high power ultrasound: Kinetics and physical properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 23: 146-155.

**Painting, K.; Kirsop, B. (1989).** A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. World Federation for Culture Collections. *Technical information sheet, 2*.

**Piyasena, P.; Mohareb, E.; McKellar, R.C. (2003).** Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 207– 216.

**Prestrelski, S.J.; Tedeschi, N.; Arakawa, T.; Carpentert, J.F. (1993).** Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal*, 65: 661-671.

**Poirier, I.; Maréchal, P.A.; Richard, S.; Gervais, P. (1999).** *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 87–92.

**Porrata, B.R.; Gutierrez, D.C.; Matínez, G.L. Reisenbichler, A. Bauer, M.; Madeo, F.; Otero, R.C. (2012).** Yeast cell death during the drying and rehydration process, en M.Sc. Ingrid Schmid (ed.), *Flow Cytometry - Recent Perspectives*. Editorial InTech. University of Graz, Graz, Austria.

**Puig, A.; Pérez-Munera, I.; Cárcel, J.A.; Hernando, I.; García-Pérez, J.V. (2012).** Moisture loss kinetics and microstructural changes in eggplant (*Solanum menongena* L.) during conventional and ultrasonically assisted convective drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 624-632.

**Rozenfelde, L.; Rapoport, A. (2014).** Anhydrobiosis in yeast: is it possible to reach anhydrobiosis for yeast grown in conditions with severe oxygen limitation? *Antonie van Leeuwenhoek*. Original Paper.

**Ratti, C. (2001).** Hot air and freeze-drying of high-value food: a review. *Journal of food engineering*, 49: 311-319.

**Santacatalina, J. V.; Cárcel, J. A.; García-Pérez, J.V. (2012).** Estudio de la influencia del secado a baja temperatura en la capacidad de rehidratación y en la textura de berenjena y zanahoria. Actas del Congreso Español de Ingeniería de Alimentos.

**Santivarangkna, C.; Kulozik, U.; Foerst, P. (2006).** Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Food Process Engineering and Dairy Technology*, 42: 271-276.

**Schössler, K.; Thomas, T.; Knorr, D. (2012).** Modification of cell structure and mass transfer in potato tissue by contact ultrasound. *Food Research International*, 49: 425-431.

**Singh, R.P. (2014).** Chapter 12 – Dehydration, en: Introduction to Food Engineering, 5ª Ed. Academic Press. University of California Davis, California, EE. UU.

**Silva, J.; Carvalho, A.S.; Teixeira, P.; Gibbs, P.A. (2002).** Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 77–81.

**Soriano, J.R. (2014).** *Influencia de la temperatura y la velocidad del aire en el secado de berenjena*. Trabajo fin de carrera. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

**Spreutels, L.; Debaste, F.; Legros, R.; Haut, B. (2013).** Experimental characterization and modeling of Baker's yeast pellet drying. *Food Research International*, 52: 275–287.

**Spreutels, L.; Haut, B.; Chaouki, J.; Bertrand, F.; Legros, R. (2014).** Conical spouted bed drying of Baker's yeast: Experimentation and multi-modeling. *Food Research International*, 62: 137–150.

**Tetteroo, F.A.A.; Bruijn, A.Y.; Henselmans, R.N.M.; Wolkers, W.F.; Aelst, A.C.; Hoekstra, F.A. (1996).** Characterization of Membrane Properties in Desiccation-Tolerant and-Intolerant Carrot Somatic Embryos. *Plant Physiology*, 111: 403-412.

**Trofimova, Y.; Walker, G.; Rapoport, A. (2010).** Anhydrobiosis in yeast: influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration-rehydration. *Microbiology Letters*, Federation of European Microbiological Societies. 308: 55-61.

**Uzunova-Doneva, T.; Donev, T. (2002).** Influence of the freezing rate on the survival of strains *Saccharomyces cerevisiae* after cryogenic preservation. *Journal of culture collections*, Volume 3: 78-83.

**Vega-Mercado, H.; Marcela Góngora-Nieto, M.; Barbosa-Cánovas, G.V. (2001).** Advances in dehydration of foods. *Journal of Food Engineering*, 49: 271-289.

**Wolkers, W.F.; Tablin, F.; Crowe, J.H. (2002).** From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, 131: 535-543

**Wolkers, W.F.; Mc Cready, S.; Brandt, W.F.; Lindsey, G.G.; Hoekstra, F.A. (2001).** Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544: 196-206.