



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Reporte de residencia:

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS
ENCAPSULADOS MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN

Presenta:

FRANCISCA ALEJANDRA VÁZQUEZ LUNA

Asesor:

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

Revisores:

M.C. LUCÍA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO

DR. PATRICIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE

Diciembre, 2013

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

ÍNDICE

I. Introducción.....	3
II. Justificación.....	5
III. Objetivos.....	6
III.1 Objetivos Generales.....	6
III.2 Objetivos Específicos.....	6
IV. Caracterización del área en que participó.....	7
V. Problemas a resolver, priorizándolos.....	7
VI. Alcances y limitaciones.....	8
VII. Fundamento Teórico.....	9
VII.1 <i>Acrocomia aculeata</i>	9
VII.2 La taberna y el vino de palma.....	10
VII.2.1 Proceso de obtención de la “taberna”.....	13
VII.2.2 Condiciones de fermentación.....	14
VII.2.3 Microorganismos que participan en la fermentación.....	16
VII.3 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	18
VII.3.1 Características generales.....	18
VII.3.2 Metabolismo de los carbohidratos.....	21
VII.3.3 Importancia tecnológica de las BAL.....	24
VII.4 Encapsulación.....	34
VII.4.1 Métodos industriales de encapsulación.....	35
VII.4.1.1 Aspersión por enfriamiento o congelamiento.....	35
VII.4.1.2 Extrusión.....	36
VII.4.1.3 Cobertura por lecho fluidizado.....	36
VII.4.1.4 Atrapamiento en liposomas.....	37
VII.4.1.5 Coacervación.....	37
VII.4.1.6 Liofilización.....	38
VII.4.1.7 Secado por aspersión.....	39
VIII. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.....	44
IX. Resultados.....	47
X. Conclusiones y recomendaciones.....	58
XI. Referencias bibliográficas y virtuales.....	59

I. INTRODUCCIÓN

El vino de palma, es una bebida fermentada obtenida de diferentes tipos de árboles de palma, tal como la palma de aceite (*Elaeis guineensis*), Raffia (*Raphia hookeri*) y otras especies; su composición rica en nutrientes sirve como un buen medio para el crecimiento de numerosos microorganismos como bacterias y levaduras (Bechem et al. 2007). Tiene diversos usos, pero sin duda alguna, el producto más cotizado de la palma de coyol y por el que más se le conoce es la “taberna”, bebida dulce, efervescente, fermentada, embriagante y de gran aceptación entre la población local por su exquisito sabor, más fino y delicado que el pulque (Rodríguez, 2008).

La taberna, aparte de ser una bebida reconocida por los chiapanecos, debido a su sabor característico, se le ha reconocido por tener propiedades medicinales, pues es empleada para: desinflamar, cicatrizar úlceras, tratamientos de vesícula, próstata y como laxante (*vox populli*). Amoa-Awua et al. (2007) analizaron los cambios biológicos y microbiológicos en el vino de la palma y encontraron que levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) fueron importantes durante el proceso de fermentación, mientras que las bacterias ácido acéticas (BAA) son las causantes del desarrollo del sabor a vinagre. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un importante grupo de microorganismos gram positivos los cuales producen ácido láctico como el principal producto metabólico a partir de carbohidratos a través del proceso de fermentación (Reddy, 2007). En la industria de alimentos, las BAL son comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores para la elaboración de diversos productos fermentados (Yang, 2005).

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas) o microorganismos son introducidos en una matriz o sistema pared con el objetivo de darle estabilidad y protección. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado y se obtienen productos con mejores características sensoriales y nutricionales. Existen diversos métodos de encapsulamiento, entre ellos el más utilizado por ser un método económico, de fácil operación y que genera buenos rendimientos del proceso es el secado por aspersion.

Los ingredientes más utilizados como agentes encapsulantes o material pared son las gomas, carbohidratos, lípidos y proteínas. Dichos ingredientes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersion y tener muy buenas propiedades de formación de películas para proveer una capa que proteja al ingrediente activo del choque térmico.

II. JUSTIFICACIÓN

En algunas regiones del estado de Chiapas se produce una bebida tradicional fermentada llamada taberna a partir de la savia de la palma de coyol *Acrocomia aculeata*. El proceso de obtención de esta bebida implica la tala de la palma, para posteriormente realizar la incisión o canoa a la altura del palmito. La fermentación es espontánea, lo que significa que el consorcio microbiano que realiza la fermentación proviene de la propia planta, del medio ambiente, de los utensilios de corte y del propio productor.

La calidad sensorial y microbiológica de esta bebida natural varía considerablemente y esto se debe a que dichos atributos sensoriales dependen de los microorganismos implicados en la fermentación.

Diversos estudios realizados en el ITG han reportado la presencia de un consorcio microbiano muy variado durante la obtención de la taberna entre ellos bacterias ácido lácticas. Dichos microorganismos ya fueron aislados e identificados por técnicas moleculares en el ITG.

La caracterización cinética de cada microorganismo y su encapsulamiento mediante secado por aspersión permitirán obtener un consorcio iniciador para estandarizar el proceso de producción de taberna, mientras que el encapsulamiento facilitará la conservación de las cepas y el manejo e incorporación del consorcio iniciador durante la fermentación.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de las condiciones del secado por aspersión sobre la supervivencia de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) aisladas de una bebida fermentada.

III.2 Objetivos Específicos

- ✚ Evaluar el efecto de la temperatura y el flujo de alimentación sobre la viabilidad de tres cepas de BAL durante el secado por aspersión.
- ✚ Evaluar la supervivencia de los microorganismos encapsulados durante el almacenamiento.
- ✚ Evaluar el rendimiento del proceso de secado.

IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, en el laboratorio de investigación (Edificio D) y en el de biología molecular y analítica (Edificio Z) del departamento de posgrado e investigación. Dichos laboratorios cuentan con los equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo de investigación entre ellos un secador por aspersion de laboratorio (Buchi), un homogenizador Ultra Turrax, incubadoras y campana de inoculación para determinar la viabilidad celular. En el laboratorio de analítica se utilizó una centrifuga refrigerada modelo 5810R para la obtención del pellet microbiano.

V. PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS

El empleo de microorganismos autóctonos aislados y seleccionados por su potencial fermentativo para la producción de taberna permitirá estandarizar o mejorar el proceso fermentativo y por consiguiente la calidad de la bebida en términos sensoriales y microbiológicos.

El secado por aspersion es una técnica sencilla y económica que permitirá conservar de manera viable a las BAL en forma de polvo; lo que facilitará su manejo e incorporación a cualquier sistema alimentario. Además dichos microorganismos podrán emplearse para el desarrollo de nuevos productos.

VI. ALCANCES Y LIMITACIONES

Es importante mencionar que se lograron todos los objetivos planteados en el protocolo, por lo que, actualmente se cuenta con las condiciones óptimas de secado por aspersión que permite maximizar la supervivencia de los microorganismos después del secado y durante el almacenamiento.

Estos polvos constituyen una alternativa para la conservación, manejo y transporte de los microorganismos.

VII. FUNDAMENTO TEÓRICO

VII.1. *Acrocomia aculeata*

Acrocomia aculeata (Figura 1a) es una palma que alcanza una altura de aproximadamente 15 m y 40 cm de diámetro, se caracteriza por tener en su tallo espinas negras que alcanzan los 7cm de longitud, mismas que se disponen principalmente en la parte superior del mismo; presenta hojas pinnado-compuestas y las flores se encuentran en una panícula (Figura 1b, c). Los frutos son nueces globosas, ligeramente comprimidas, su cáscara es amarillo verdosa, dura y delgada; la pulpa es muy fibrosa y escasa, de color pardo amarillenta, la cubierta de la semilla es de color negro, también dura, contiene un endospermo, el cual es rico en aceite, fructifica de Septiembre a Noviembre (Miran F., 1975).



Figura 1. a) *Acrocomia aculeata* o palma de coyol, b) detalle de las espinas del tallo, c) detalle de los frutos

Como otras palmas, esta especie es perennifolia (presenta hojas durante todo el año), pero las hojas viejas no caen inmediatamente, permaneciendo colgadas por un tiempo más o menos largo, lo que da la impresión de que la palma se está secando (Mc-Currach, 1977). Esta palma se encuentra distribuida a lo largo de la planicie costera del Golfo de México y del Pacífico; en Chiapas, se encuentra específicamente en la región de la Frailesca, Centro y el Soconusco (Zuart-Macías et al., 1999).

Acrocomia aculeata tiene diversos usos: con el fruto sin cáscara se pueden elaborar dulces con azúcar o panela; con el mucílago o baba del coyol revuelta con harina se preparan obleas; las flores frescas se consumen

cocidas y combinadas con huevo; también son vendidas como ornato, especialmente para el arreglo de altares. La almendra contiene un aceite de baja calidad que no se industrializa, sin embargo es usado en medicina tradicional, ingerido y aplicado directamente, tiene propiedades analgésicas; la raíz es usada como remedio contra la diabetes y la ingestión de la savia tiene propiedades digestivas y diuréticas. En Guatemala, la parte dura de la nuez es usada para fabricar artesanías como anillos y rosarios; las hojas y el tallo se emplean como materiales de construcción rústica (Maldonado-Mares, 1992).

Pero sin duda alguna, el producto más cotizado de la palma de coyol y por el que más se le conoce es la "taberna", bebida fermentada embriagante blanquizca, de gran aceptación entre la población local por su exquisito sabor, más fino y delicado que el pulque. Es una bebida dulce efervescente, que se produce y consume en la región sur de México y se asemeja al "Vino de palma" de África. Se le atribuyen propiedades medicinales para desinflamar, cicatrizar úlceras, tratamientos de vesícula, próstata y como laxante (*vox populi*).

Si bien se han dado avances en la posible explicación de las propiedades (Santiago-Urbina et al., 2013; Ayora talavera et al., 2013), no obstante, hasta el momento se desconocen los agentes microbiológicos o bioquímicos específicos, que le confieren estas características. Estas propiedades curativas de la "taberna" no son de sorprender ya que otras bebidas fermentadas también son empleadas para beneficios similares, principalmente con los relacionados con el sistema digestivo o como un suplemento alimenticio, ya que contienen proteínas, vitaminas y un bajo contenido de grasas, además de que la fermentación que producen son láctica, alcohólica y acética, contando con la presencia de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias de las especies de *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Estas últimas, están comprendidas dentro de un grupo muy importante de microorganismos, llamadas bacterias ácido lácticas (BAL) ya que aportan beneficios a la salud del consumidor.

VII.2. La taberna y vino de palma.

La taberna es obtenida de la palma *Acrocomia aculeata* mejor conocida como palma de coyol. Su nombre deriva del Náhuatl "coyoli", que significa "cascabel" y antiguamente se le conocía como "cuauhcoyolli" o

sea árbol de cascabeles, ya que al agitar el fruto seco, éste produce un sonido semejante (Cabrera, 1991).

En México, "la taberna" es una bebida alcohólica tradicional producida por la fermentación natural de la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*). Es una bebida dulce efervescente, que se produce y consume en la región sur de México y se asemeja al "Vino de palma" de África.

Así mismo, se ha demostrado que la presencia de microorganismos en algunos alimentos y bebidas fermentadas tiene la propiedad de mejorar la digestión y la flora intestinal. A este tipo de alimentos se les da el nombre de probióticos. Por consiguiente, es muy importante conservar a estos microorganismos y estudiarlos a fondo de forma individual, con el objetivo de poder emplearlos para la elaboración de una bebida fermentada tipo "taberna".

Diversos análisis realizados a los cultivos microbianos del vino de palma han demostrado que *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* y, en ocasiones, *Micrococcus sp.* y *Bacillus sp.* están presentes durante la fermentación (Bassir, 1962; Faparusi y Bassir 1972). Amoa-Awua et al. (2007) analizaron los cambios microbianos y biológicos en vino de palma y encontraron que las levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) estuvieron presentes en el proceso de fermentación, mientras que las bacterias ácido acéticas (BAA) fueron la causa del desarrollo de un sabor avinagrado.

Alcántara et al. (2010) en estudios *in vitro* reportaron que durante las primeras etapas de la fermentación de la taberna, el consorcio microbiano estaba formado principalmente por *Zymomonas mobilis*, *Fructobacillus spp.*, *Pantoea agglomerans*. Posteriormente, a las 60 h de fermentación, las bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus nagelii*, *L. succicola* y *L. spp.* se encontraron en una proporción del 30%. Y finalmente después de 108 h de fermentación la comunidad bacteriológica incluía *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus nagelii* y *Acetobacter pasteurianus*. Esta investigación sugiere que *Zymomonas mobilis* representa una proporción muy importante en el consorcio microbiano de la taberna (60-80%) durante toda la fermentación.

Actualmente, en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez se están desarrollando diversas investigaciones en torno a la caracterización molecular de los principales microorganismos presentes durante la fermentación *in vivo* de la taberna. Alegría (2011) evaluó la dinámica

poblacional de las levaduras, bacterias ácido láctica (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) que participan en el proceso fermentativo de la taberna mediante análisis molecular. Con esta investigación se lograron aislar 64 cepas de levaduras, 35 cepas de BAA y 30 cepas de BAL en los primeros 5 días de fermentación, de acuerdo a la morfología macroscópica y microscópica.

El vino de palma obtenido de la savia de diversas especies de palmas es una bebida común en muchas partes de África y Asia (Balick, 1990). En México, "la taberna" es una bebida alcohólica tradicional de color blanco producido por la fermentación natural de la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*). La "taberna" juega un papel importante como una bebida alcohólica tradicional en las zonas rurales del sureste de México y otras áreas de Centroamérica, por lo que es importante determinar los aspectos microbiológicos de su fermentación. Siendo importante los efectos de la "taberna" ya que puede incluir mareo y debilitamiento, este último se caracteriza por que quien la ingiere no puede sostenerse en pie aun cuando se sienta sobrio.

Balick (1990) evaluó el vino de palma de coyol para conocer si se encontraba presente algún otro componente nutricional útil en este vino. Este autor reportó un contenido de alcohol del 12.86%, además de la presencia de diversos minerales, haciendo énfasis en la concentración de potasio, desde el punto de vista nutricional (cuadro 1). Si el análisis se calcula sobre una base seca, el contenido de proteína aumenta, pero no lo suficiente para considerar el vino de coyol como un alimento nutritivo.

Cuadro 1. Análisis en base seca del vino de la palma de *Acrocomia aculeata*

Análisis	Promedio
pH	4.0
Sólidos solubles (°Brix)	16
Proteínas (%)	0.61
Calcio (ppm)	142
Cobre (ppm)	0.9
Fosfato (ppm)	38
Hierro (ppm)	2.5
Magnesio (ppm)	57
Manganeso (ppm)	0.5
Potasio (ppm)	2540
Sodio (ppm)	24
Zinc (ppm)	0.2

VII.2.1 Proceso de obtención de la “taberna”

La “taberna” o vino de coyol se obtiene de árboles adultos, esto quiere decir que la palma debe de tener una edad de 15 años como mínimo para que llegue el momento en que se pueda cortar para la extracción del líquido. Las palmas que pueden ser maniobradas en posición horizontal son elegidas para el corte. Esto es necesario para permitir el máximo flujo de la savia (Figura 2).



Figura 2. Tallos de la palma de coyol para la obtención de la taberna

El proceso para producir la taberna consiste en tirar la palma de coyol arrancándola desde la raíz, se le quitan todas las hojas y en la parte del “cogollo” (palmito) se le hace un incisión en forma rectangular de 10 cm de ancho por 15 cm de largo y de aproximadamente unos 30 cm de profundidad, ésta es denominada “canoa” (Figura 3) y se espera a que brote la savia del árbol. Es importante no cortar demasiado por debajo del palmito, ya que esto limita el flujo máximo de la savia. La savia se recoge dos veces al día en la mayoría de los árboles, aunque cuando el flujo de la savia de las palmeras es muy fuerte la recolección puede llegar a realizarse hasta tres veces durante los primeros días. Este líquido es un agua-miel dulce incoloro con sabor a agua de coco que se fermenta rápidamente.

Es necesario vaciar y raspar todos los días la canoa para que la savia siga drenando, obteniéndose en promedio de 2 a 4 litros de taberna diarios por cada palma durante aproximadamente dos meses (proceso dependiendo del tamaño del árbol). La savia colectada generalmente se coloca en

depósitos en donde continúa la fermentación. Es costumbre también beberla directamente del tronco por medio de un carrizo largo (Balick, 1990).

La mayoría de los árboles son talados por la mañana, se dejan fermentar naturalmente por 24 horas, éste proceso es conocido como “hirviendo” o “ebullición del vino” (Balik, 1990).



Figura 3. Elaboración de taberna. a) Corte del tallo de *A. aculeata*; b) Canoa de drenaje de la savia; c) Taberna

VII.2.2 Condiciones de fermentación

El vino de palma se presenta como un líquido blanquecino por fermentación natural de la savia (Uzogara et al., 1990; Uzochukwuru et al., 1991). La savia no fermentada es un líquido dulce y limpio, es un jarabe incoloro que contiene aproximadamente del 10 al 12% de azúcares, de ellos principalmente sacarosa (Bassir, 1962; Okafor, 1975). Posteriormente durante la fermentación de la savia, debido al crecimiento de la flora microbiana natural, los niveles de azúcar disminuyen rápidamente hasta la conversión en alcohol y otros productos (Obire, 2005); de esta forma, la savia cambia a un aspecto blanquecino conforme se da la proliferación de la suspensión microbiana, resultando en el crecimiento de microorganismos fermentativos (Okafor, 1975a,b). El pH de la taberna al final del proceso de fermentación es aproximadamente de 3.5 (Escalante et al., 2008).

El vino de palma, se caracteriza por la efervescencia provocada por la liberación de gas, resultado de la fermentación de la sacarosa contenida por los microorganismos fermentativos (Bassir, 1962). Estudios microbiológicos previos en *E. guineensis* y *R. hookeri*, reportan la presencia de una amplia variedad de bacterias y levaduras que envuelven al proceso de fermentación (Faparunsi y Bassir, 1972.) Estos microorganismos han sido también reportados presentes en diversas fuentes, incluyendo en el equipo de muestreo, en los contenedores, en el medio ambiente, entre otros.

La fermentación del vino de palma se puede describir en tres niveles o como en 3 etapas de fermentación. El primer nivel tiene lugar en el receptáculo de corte en la palma en sí, esto ocurre como un proceso de fermentación de cultivo continuo, aunque el recolector de vino de palma periódicamente perturba la población microbiana en el fermentador biológico (un semi-continuo). El segundo nivel se produce cuando el vino de palma se acumula en la canoa. La acumulación de alcohol en el recipiente es más rápido que en el tronco del árbol, porque no hay pérdida del producto, aunque hay dilución continúa de los contenidos por el goteo del jugo de la fermentación. El más alto nivel de acumulación de alcohol ocurre durante la distribución y mercadeo. Esta tercera etapa de la fermentación se produce como un proceso por lotes en condiciones anaeróbicas, que favorecen la fermentación por las levaduras (Amoa-Awua et al., 2006).

Se ha demostrado que la savia de la palma es un medio rico capaz de soportar el crecimiento de varios tipos de microorganismos. Un gran número de mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas fueron encontrados en el vino de palma durante las primeras horas después de haber realizado la canoa. La concentración de alcohol en las muestras de vino de palma resultaron ser bajos y depende de varios factores, incluyendo a la naturaleza y al tipo de fermentación.

El consorcio de bacterias presentes, depende del estado de la fermentación y de la composición de la savia (Bassir, 1962). Aunque la producción de alcohol es normalmente realizada por levaduras (Ingraham y Ingragam, 2004).

VII.2.3 Microorganismos que participan en la fermentación.

La presencia de varios microorganismos especialmente bacterias y levaduras son responsables de la fermentación del vino de palma (Bassir, 1962; Faparusi, 1966; Okafor, 1977). Durante la fermentación, los azúcares en la savia de la palma son metabolizados a alcohol y ácidos orgánicos (Okafor, 1975b).

El vino de palma es una bebida efervescente de color blanco lechoso, estas propiedades se deben a la presencia de microorganismos vivos como bacterias y levaduras (Okafor, 1975a, b), su agradable sabor dulce se pierde pronto y se sustituye por acidez causada por la acción bacteriana. Es producido por la fermentación de la savia de plantas tropicales de la familia *palmae* y es consumido en grandes cantidades en el sureste de Nigeria. Contiene componentes nutricionales importantes, incluyendo aminoácidos, proteínas, vitaminas y azúcares (Okafor, 1987). Esto hace de este vino un medio de cultivo para el crecimiento de un consorcio de microorganismos, cuyo crecimiento, puede modificar las condiciones físico-químicas del vino, dando lugar a la competencia y sucesión de organismos.

Amoa-Awua et al. (2007) evaluaron el contenido microbiológico y bioquímico del vino de palma de aceite (*Elaeis guineensis*) determinados durante 5 semanas y durante el almacenamiento. *Saccharomyces cerevisiae* fue la única especie aislada de las muestras en los primeros días de la fermentación. *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* fueron denominadas bacterias del ácido láctico y ácido acético, se aislaron bacterias sólo después del tercer día cuando los niveles de alcohol eran considerables. El pH, las concentraciones de ácido láctico y ácido acético durante el drenado se encontraron entre 3.5-4.0, 0.1-0.3 y 0.2-0.4 respectivamente, mientras que el contenido de alcohol de las muestras recolectadas durante el día tenían entre un 1.4%-2.82%. El vino de palma que se había acumulado durante la noche presentó un contenido de alcohol de entre 3.24%-4.75%; mientras que el vino de palma almacenado durante 24 horas, presentó un contenido de alcohol del 7.0%. El pH confirma la importancia de las bacterias ácido lácticas en la fermentación del vino de palma.

Ogbulie et al. (2007) estudiaron la flora microbiana presente de las dos especies de palma (*Elaeis guineensis* y *Rhaphia hookeri*), los cambios bioquímicos asociados con la fermentación de la savia y el efecto de los conservadores tradicionales asociados a la vida de anaquel de los productos. Los análisis microbiológicos revelaron que bacterias heterótrofas y coliformes fueron obtenidas de las muestras de *R. hookeri*, mientras que de la palma *E. guineensis* se aislaron principalmente levaduras. La incidencia media de los géneros bacterianos y levaduras reveló un fuerte aumento de 0 a 72 h por las bacterias heterótrofas totales, mientras que los coliformes y las levaduras mostraron un progresivo aumento de fermentación a las 48 h seguida de una disminución fuerte se observada a las 72 h. Esta tendencia sigue el mismo orden hasta que los signos de deterioro de las muestras del vino de palma fueron observados.

Las pruebas de identificación en la palma *E. guineensis* revelaron el aislamiento de otros géneros de bacterias como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium* y *Staphylococcus*, mientras que especies de *E. coli* y *micrococcus* con la excepción de *Brevibacterium sp*, fueron obtenidos de *R. hookeri*. El recuento de heterótrofos totales y el nivel de pH se observó que disminuían mientras avanzaba la fermentación. Fue determinada la evaluación sensorial de las propiedades del vino de palma empleando conservadores naturales (*Saccoglottis gabonensis*, *Vernonia amygdalina*, *Euphobia sp.*, *Nauclea sp.* y *Rubiaceae sp*).

El nivel de inhibición exhibido por los extractos de las plantas conservadas en los aislados revelaron que los extractos acuosos de las plantas no inhibieron el crecimiento, mientras que el extracto etanólico de las plantas si mostró una inhibición evidente, excepto en el género de las ácido lácticas como *Euphobia sp.* Y *Nauclea sp.*, que no tuvieron ningún efecto inhibitorio sobre *Bacillus sp.*

Alcántara et al. (2010) identificaron a los microorganismos durante la fermentación de la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*). Al inicio de la fermentación se encontraron *Zymomonas mobilis*, *Fructobacillus sp*, *Pantoea agglomeran*, a las 60h se encontraron bacterias ácido lácticas relacionadas a *Lactobacillus nagelii*, *L. succicola* y *L. sp.* y al final de la fermentación, 108 h después se encontró una comunidad bacteriana que incluía *Z. mobilis*, *Lactobacillus nagelii* y *Acetobacter pasteurianus*. En éste reporte, sugirieron que *Zymomonas mobilis* representa una proporción muy importante en la comunidad bacteriana (60-80%), así como, *Lactobacillus*

nagelii durante el proceso de fermentación de la taberna. Los resultados de la investigación de la composición de la diversidad bacteriana fue baja durante el inicio de la fermentación y disminuyó a medida del avance de la misma.

En diversas sociedades africanas, el vino de palma juega un rol importante en las prácticas habituales, especialmente la de productos destilados del vino de palma. Debido al rol central que las bebidas alcohólicas han jugado en la sociedad tradicional, es importante que la microbiología y la bioquímica del proceso de fermentación se conozcan bien (*Okafor, 1972; Hartley, 1984*).

VII.3 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL fueron descubiertas en 1857 por Louis Pasteur siendo profesor de química y decano de ciencias en la universidad de Lille en Francia mientras realizaba estudios tras la consulta de los vinicultores de la región, de por qué se les descomponía y acidificaba el vino. En pocas semanas descubrió que la sustancia que lo alteraba era el ácido láctico, producto de la fermentación láctica desencadenada por ciertos microorganismos. El término 'Bacterium acidi lactici' se debe a Weigmamn que lo propuso en 1889 al identificarlas como bacterias que forman leche ácida a partir del azúcar de la leche (*Fernández, 2000; Jay, 2000*).

VII.3.1 Características generales

Para el año de 1919 Orla-Jensen elaboró una monografía basándose en:

- **Criterios morfológicos:** el grupo estaría constituido por cocos y bacilos Gram positivos, no esporulados e inmóviles.
- **Criterios fisiológicos:** microorganismos que al fermentar azúcares forman principalmente ácido láctico, catalasa-negativos, microaerófilos o anaerobios, mesófilos y de requerimientos nutritivos complejos.

Las BAL también se clasifican según la temperatura ideal de crecimiento en mesófilas y termófilas.

- **Mesófilas:** Temperatura ideal de incubación: 20-25 °C, volumen de cultivo líquido 1-2%, tiempo de incubación: 18-20 horas, acidez final 0.8% de ácido láctico. Especies: *Lactococcus lactis subs cremoris*, *Lactococcus lactis subs cremoris*, *Lactococcus lactis*, *biovariedad diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides subs cremoris*. Utilización: kumis, quesos semi-madurados (Blanco S., Delahaye P y Fragenas N., 2006).
- **Termófilas:** Temperatura ideal de incubación: 40-45°C, volumen de cultivo líquido 2-3%, tiempo de incubación: 2-4 horas, acidez final 0.9% de ácido láctico. Especies: *Lactobacillus delbrukii subso bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (Blanco et al., 2006).

Las BAL pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* son los principales miembros de las BAL, siendo *Lactobacillus* el más grande de estos géneros (Bouzar et al., 1997; Devlieghere et al., 2004; Galvez et al., 2007; Jagnow y Wolfgang, 2007).

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común.

Desde el comienzo de la humanidad las BAL han sido empleadas para la fabricación y conservación de alimentos. El descubrimiento de su acción sobre la leche fue probablemente accidental pero su utilización fue perpetuada en forma de cultivos iniciadores, mediante una simple recuperación de una parte del medio de fermentación para promoverla en otros alimentos y bebidas además de que contribuyen a desarrollar sabor y aroma, así como a retardar su deterioro (Gilliland, 1990).

El tipo y características de los organismos iniciadores que son utilizados en la producción de leches fermentadas, son los dos más importantes factores que terminan la calidad del producto final. El criterio esencial para la

selección de iniciadores incluye acidificación, aroma, sabor, estabilidad y textura (Laws *et al.*, 2001). Estos se pueden clasificar de varias maneras, dependiendo de su forma, temperatura de crecimiento, funciones etc. (Neira y López, 2001).

Éstas forman parte de la microbiota natural de muchos alimentos y no existe ninguna indicación de que representen un riesgo para la salud del consumidor, por lo tanto las BAL como algunos de sus metabolitos son considerados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) de EEUU (Hugas, 1998).

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, tolerancia a la alcalinidad y acidez (Axelsson, 2004).

En la actualidad el grupo de las BAL está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gram (+) generalmente inmóviles y no esporulados catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales ligados al heme o de citocromos, y obtienen su energía por fosforilación a nivel del sustrato a la vez que oxidan carbohidratos; no tienen un ciclo de Krebs funcional. Todas estas bacterias son consideradas anaerobias aerotolerantes, y al contrario que las anaerobias estrictas, no son sensibles al oxígeno por lo que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él (Madrigan *et al.*, 2004).

La mayoría de las BAL son mesofílicas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5°C y otras a 45°C. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4.5 (Jay, 2000). Estas tienen posibilidades anabólicas muy limitadas lo que contribuye a reducir el rendimiento de su cultivo y crecimiento formando colonias muy pequeñas. En preparaciones para el microscopio aparecen aisladas o formando cadenas (Walker, 2000). Son muy exigentes en su nutrición al requerir una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas principalmente del grupo B y fuentes de carbono). La mayor parte de las

BAL obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Leveau y Bouix, 2000; Madigan et al., 2004).

VII.3.2 Metabolismo de los carbohidratos

Una diferencia destacada entre subgrupos de las BAL es la naturaleza de sus productos finales, formados durante la fermentación de los azúcares (Madigan et al., 2004). Las BAL pueden ser consideradas como homo o heterofermentativas, dependiendo de cómo fermentan los azúcares en condiciones de crecimiento no limitadas. Las BAL homofermentativas usan la glucólisis vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), resultando el ácido láctico como el producto final (Figura 4). Las BAL heterofermentativas usan la vía 6-fosfogluconato/fostocetolasa (6-PG/PK) o de las pentosas fosfato produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) y etanol (o ácido acético) como productos principales (Figura 5).

En base a estas dos vías de fermentación, las BAL han sido divididas en tres categorías metabólicas:

- homofermentativas estrictas
- heterofermentativas estrictas
- heterofermentativas facultativas.

Las homofermentativas estrictas sólo pueden fermentar hexosas por la glicólisis, mientras que las heterofermentativas estrictas usan solamente la vía 6-PG/PK y las heterofermentativas facultativas tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo homofermentativo su metabolismo principal; si se modifican algunas condiciones de cultivo, tales como la concentración de glucosa, pH y la restricción de nutrientes, se induce la vía 6-PG/PK causando la fermentación heteroláctica (Jay, 2000; Axelsson, 2004).

Este cambio no se debe a que el metabolismo de los azúcares derive hacia la vía 6-PG/PK, sino que se refleja un cambio en el modo en que se metaboliza el piruvato se produce menos lactato y el resto del piruvato se convierte en Acetil-CoA. Bajo condiciones de exceso de nutrientes la concentración de intermediarios catabólicos de los azúcares es elevada y el piruvato se convierte en lactato (Delgadillo et al., 1994).

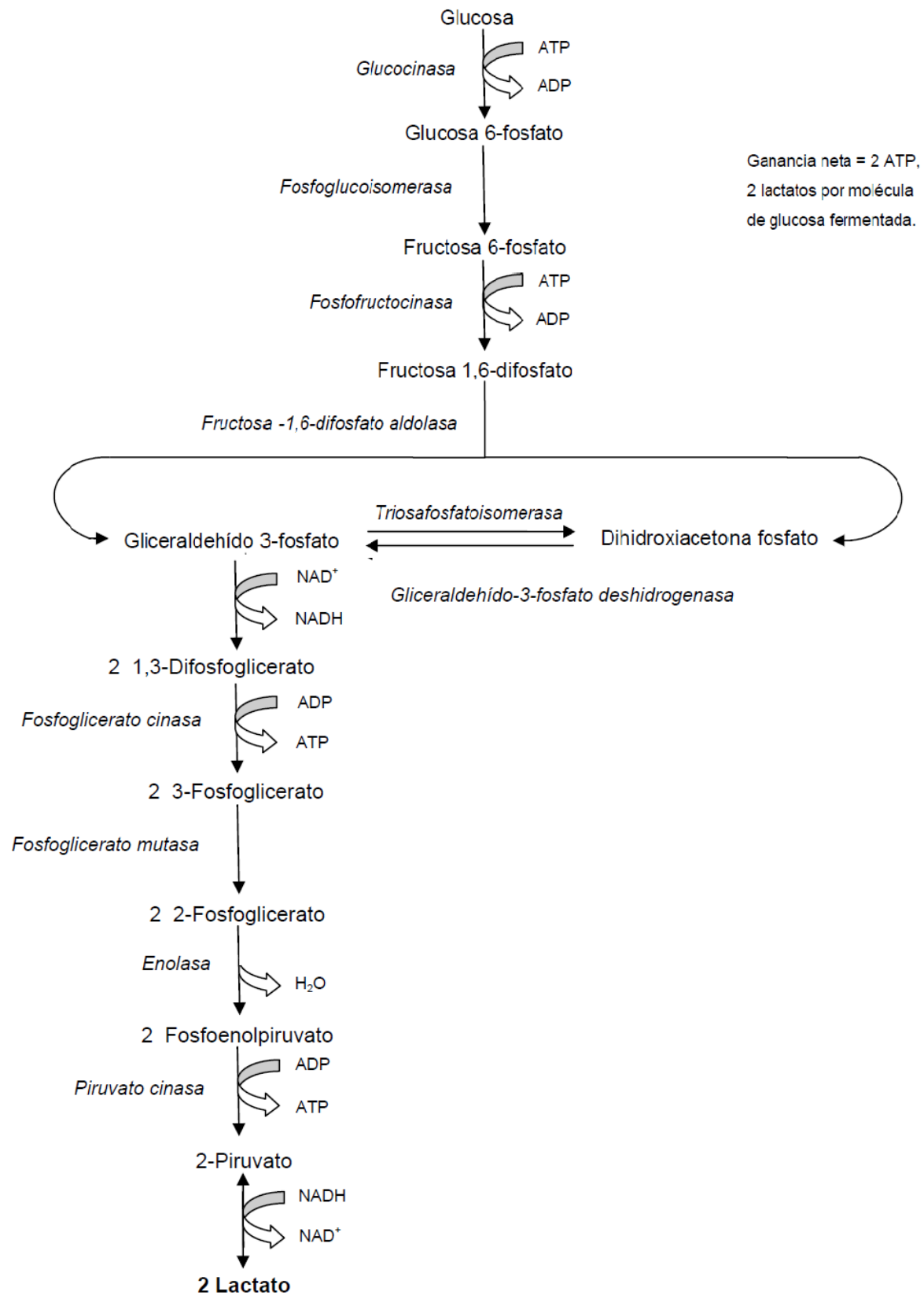


Figura 4. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias Acido Lácticas.

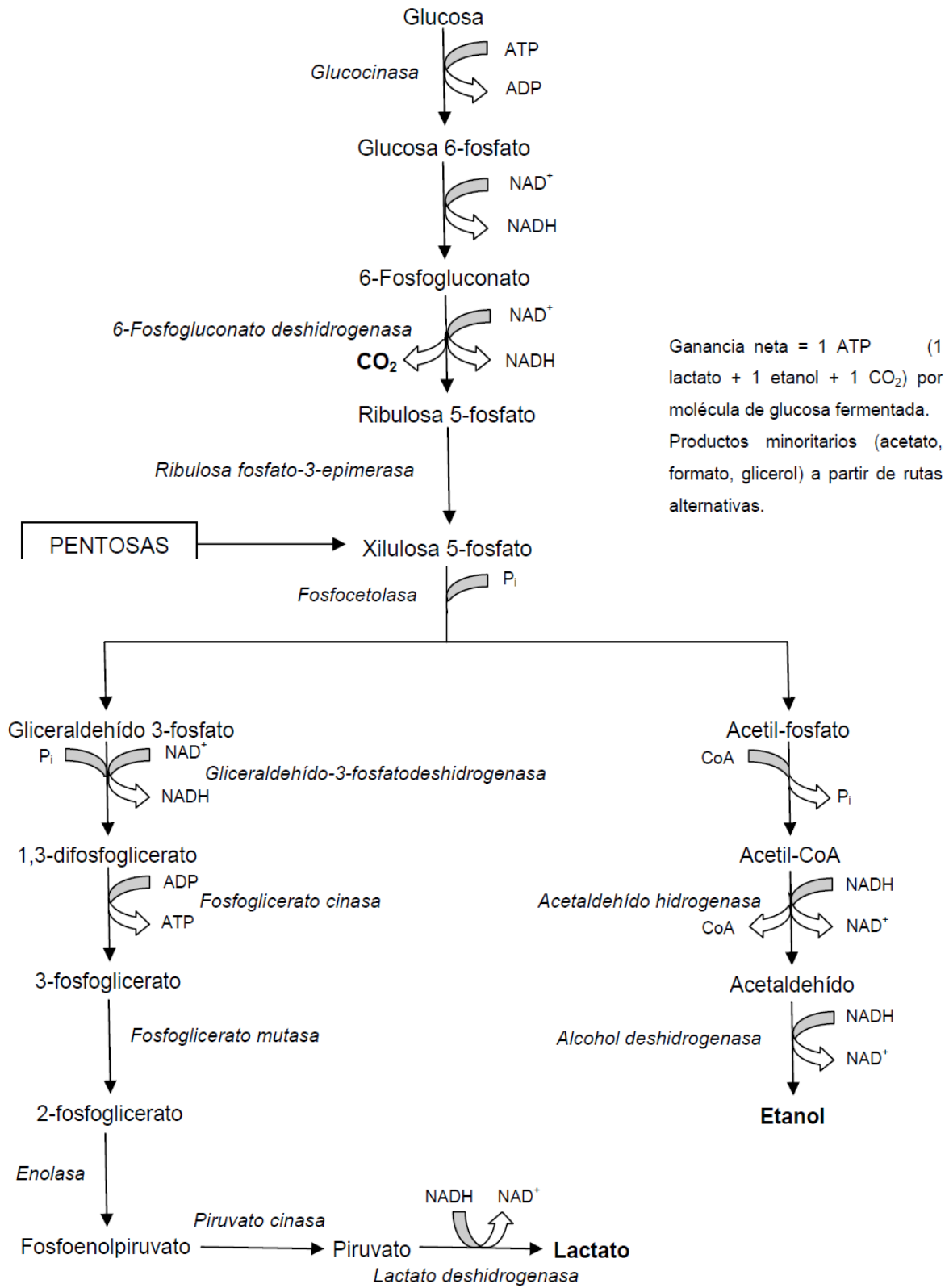


Figura 5. Vía Heterofermentativa de la glucosa por Bacterias Ácido Lácticas.

La diferencia de una vía a otra viene marcada por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, enzima clave en la glucólisis. Las heterofermentativas, carecen de esta aldolasa y no pueden romper la fructosa 1,6-difosfato. En su lugar, oxidan la glucosa 6-fosfato hasta 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan hasta xilulosa 5-fosfato que se escinde hasta gliceraldehído 3-fosfato y acetil-fosfato por medio de la fosfoacetolasa, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP (Adenosina trifosfato), mientras que el acetil-fosfato acepta electrones del NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida) que se ha generado durante la formación de xilulosa 5-fosfato, dando lugar directamente a etanol sin producir ATP. Por ello, las heterofermentativas producen solamente 1 mol de ATP de la glucosa en lugar de 2 como hacen las homofermentativas. Como las heterofermentativas descarboxilan el 6-fosfogluconato, producen CO₂ como producto de fermentación (Prescott et al., 1999).

Para el microorganismo, el producto importante es el ATP, que se usa en multitud de reacciones que requieren energía, y los otros productos de fermentación son meros productos de desecho. Sin embargo, estos últimos no son considerados como tales por los destiladores, cerveceros, promotores de derivados lácteos o panaderos. Por todo ello, la fermentación no es sólo un proceso que produce energía, sino un medio para obtener productos naturales que son de utilidad para el consumo humano (Madigan et al., 2004).

Todos los representantes de los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragemcoccus* y *Vagococcus*, junto con algunos *lactobacilos*, son homofermentativos, mientras que todas las especies *Camobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weísseila*, así como algunos *lactobacilos*, son heterofermentativos (Jay, 2000).

VII.3.3 Importancia tecnológica de las BAL

Son ampliamente distribuidas en diferentes ecosistemas, además de generarse a gran escala procesos para la producción comercial de alimentos fermentados, bebidas alcohólicas, ensilados, levaduras para la producción de cerveza, vinos y bacterias ácido lácticas (BAL) para la utilización en vegetales, fermentación cárnicas (Almanza y Barrera, 1991),

queso, mantequilla, yogurt, salchichas, ensilajes, olivos, uvas, y cereales como pan y cerveza preservado y proporcionando propiedades sensoriales y nutrimentales a los productos alimenticios (*Arribas y Polo, 2008; Hugenholtz, 2008; Savadogo et al., 2006*).

Las BAL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; ellas son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad por acidificar y por lo tanto preservar alimentos de las esporas, sino también su aplicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (*Axelsson, 1993*).

El conocimiento de cultivos lácticos se originó en el siglo XVIII, cuando agricultores de África, Asia y Europa observaron el comportamiento de la leche cruda en los meses cálidos. La leche coagulaba y bajo estas condiciones presentaba un sabor diferente, en ocasiones presentaba un sabor diferente, en ocasiones agradable, entonces los campesinos fueron seleccionados las de mejor sabor para inocular la leche al día siguiente (*Bedolla et al., 2004*). Las BAL vivas pueden estar contenidas en un grupo de microorganismos llamados cultivos lácticos o iniciadores (*Bertrand et al., 2003 y Bouzar et al., 1997*), se emplean en la industria láctea para la elaboración de leches fermentadas, quesos, mantequillas y otros productos que para su elaboración requieren ser fermentadas (*Bertrand et al., 2003*).

Además de producir el ácido láctico, las bacterias acidificantes, llamadas también bacterias iniciadoras, contribuyen al sabor, aroma, textura y el valor nutricional de alimentos fermentados a través de la producción de exopolisacáridos (EPS) y modificación proteica (*Arribas y Polo, 2008*), lo anterior debido a su actividad metabólica, siendo las proteínas, azúcares y lípidos, quienes contribuyen a la digestibilidad de alimentos y preservación del producto final (*Pescumma et al., 2008*).

Algunas funciones en la tecnología de productos alimenticios de las BAL son: formación de sabor ácido, inhibidores de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma, producción de gas requerida para la formación de "ojos" en los quesos, proteólisis requerida para la maduración de los quesos (*Hernández et al., 2007*), también han sido muy utilizadas como probióticos (*Hill et al., 2002 y Hui, 1993*).

BAL producen pequeñas cantidades de acetaldehído y diacetilo por la fermentación de citratos, otorgando sabor y aroma agradable. Además producen dióxido de carbono, que van a formar los ojos de algunos quesos y el carácter espumoso de algunas leches fermentadas (*Blanco et al., 2006*).

La actividad lipolítica y proteolítica tiene influencias en la formación de compuestos de sabor y aroma típicos de variedad de quesos maduros, como son los ácidos grasos libres y transformaciones enzimáticas de algunos aminoácidos produciendo amoniaco, ácidos orgánicos (ácido acéticos, ácido propiónico, ácido isobutírico) y dióxido de carbono (*Blanco et al., 2006*; y *Mathot et al., 2003*).

La primera y principal función de las BAL es la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico (*Bouzar et al., 1997*) a una velocidad conveniente para asegurar una fermentación consistente y exitosa (*Jagnow y Walfang, 1991*). El ácido láctico puede ser obtenido a través de la fermentación de la lactosa, que da un sabor ácido fresco en leches fermentadas, mejora cuerpo y textura (*Kailasapathy, 2006* y *Bertrand et al., 2003*). Además, aseguran la calidad y uniformidad del producto final (*Bertrand et al., 2003*) y en varios casos al valor nutricional de productos alimenticios (*Kailasapathy, 2006*). Poseen actividades proteolíticas y lipolíticas, especialmente durante la maduración de los quesos, producción de otros componentes (alcohol) en la elaboración de kumis (*Almanza y Barrera, 1991*).

Las BAL producen una serie de sustancias llamadas metabolitos que pueden cumplir funciones en los alimentos entre las que se destacan:

- **Producción de ácido propiónico:** esta fermentación la efectúan bacterias heterofermentativas utilizadas en queserías (Emmental, Suizo, Gruyere, etc.) donde el ácido láctico es transformado en ácido propiónico y acético con desprendimiento de CO₂ el cual forma los ojos en los quesos (*Jagnow y Walfang, 1991*).
- **Fermentación de ácido cítrico:** esta fermentación la efectúan bacterias heterofermentativas, utilizadas en mantequillas y quesos, ya que transforman el ácido cítrico en productos aromatizantes como la acetoina y el diacetilo (*Leuconostoc citrovorum, Streptococcus diacetylactis*) (*Hernández et al., 2007*). Estos compuestos, así como imparten aroma y sabor a los productos lácteos también tienen efecto antimicrobiano. El

acetaldehído puede inhibir la división celular en *Escherichia coli*, y diacetilo inhibe levaduras, bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Jagnow y Walfang, 1991).

- **Ácido Láctico.** Este ácido ha tenido a lo largo de la historia utilidades para fermentación y preservación de comestibles. Fue primero descubierto en leche cortada por Scheele en (1780), quien inicialmente lo consideró a este como un componente de la leche. En 1789, Lavoisier llamó a este componente de la leche “ácido láctico”. En 1857, Pasteur describió que no era componente de la leche, pero sí un metabolito de la fermentación generado por ciertos microorganismos. Es clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) (Ghasemi et al., 2009 y Savadogo et al., 2006). Este ácido es uno de los más importantes producidos por las BAL (Jagnow y Walfang, 1991). Dentro de los microorganismos producidos pueden citarse *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *tetragenococcus* y *Bifidobacterium*, siendo el *Lactobacillus delbrueckii* el microorganismo más utilizados (Moreira et al., 2000).

Este es el primer ácido orgánico funcionalmente versátil produciendo biotecnológicamente teniendo un amplio rango de aplicaciones. Este es un producto de procesos de fermentación natural que ocurre en la mantequilla, queso, cerveza, leche cortadas y algunos otros alimentos fermentados. Este es utilizado como acidulante/agente buffer de pH o inhibidor de esporas cesados, como dulces, pan y productos de panadería, bebidas no alcohólicas, sopas, solventes, productos lácteos, mermeladas, gelatinas y mayonesas (Devlieghere et al., 2004). En ciertos alimentos no es posible agregar ácido láctico en grandes cantidades por su olor y sabor fuerte. Es así que puede ser reemplazado por cierta cantidad de ácidos acético por ácido láctico, el cual también tiene una actividad antimicrobiana (Moreno y Polo, 2008).

- **Sustancias antimicrobianas.** Las BAL producen varios componentes antimicrobianos los cuales inhiben el crecimiento de organismos esporádicos relevantes. Recientemente, está demostrado que la adición de levaduras fermentadas por *Lactobacillus plantarum*, inhibe el crecimiento de *Fusarium* (Vazquez y Murado, 2008). La inhibición de *B. cereus* por BAL ha sido intensivamente estudiada en varios alimentos fermentados como productos lácteos, productos basados en cereales y productos de semilla de soya.

- **Peróxido de hidrógeno.** Es metabólicamente producido por el grupo lactococcus a través de la acción de NADH oxidasa la cual cataliza la oxidación de NADH por oxígeno molecular (Macedo *et al.*, 2002). El sistema lactoperoxidasa es un sistema antimicrobiano natural que se encuentra en la leche, ha sido exitosamente utilizado para extender la vida útil de la leche y queso cottage inhibiendo patógenos en leche y productos lácteos procesados, inhibe microorganismos como *Pseudomona* y *Staphylococcus aureus* y *ssp.* (Jagnow y Walfang, 1991).
- **Bacteriocinas.** La utilización de las BAL y/o sus metabolitos para la preservación de alimentos es generalmente aceptado por consumidores como algo "natural" y "promotores de salud" (Olson y Aryana, 2008). Las BAL produce un conjunto de sustancias antimicrobianas (como acetoina, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuterociclina, péptidos antifúngicos y bacteriocinas) (Osorio y Roldan, 2003 y Savadogo *et al.*, 2006) que ha sido utilizadas como biopreservadoras en productos alimenticios, incluyendo productos lácteos como quesos frescos y madurados con el objetivo de evitar la proliferación de patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Clostridium* y *Staphylococcus aureus* (Azkaya *et al.*, 2007). Las bacteriocinas son componentes proteínicos antibacterianos que son producidos por BAL comúnmente presentes en alimentos (Panesar *et al.*, 2007). Son péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático (Jagnow y Walfang, 1991). Han sido objeto de muchas investigaciones en recientes años por su novedoso uso potencial como preservantes naturales en alimentos y propósitos médicos (Parra *et al.*, 2008). Las bacteriocinas típicamente tiene un estrecho espectro antibacterial. Así, algunas bacteriocinas de BAL pueden inhibir el crecimiento de Gram-positivas patogénicas y bacteriocinas son una alternativa para satisfacer el crecimiento de consumidor por la demanda de alimentos que son higiénicamente seguros (Ananou *et al.*, 2008).

Las producciones de bacteriocinas son muy exigentes debido a la necesidad para enriquecer el medio de crecimiento conteniendo nutrientes como carbohidratos, ácidos nucleicos, minerales y principalmente aminoácidos, proteínas o hidrolizados de proteínas. Por ejemplo, los medios de laboratorio estándar (MRS, TGE, APT) resuelven el problema de fuentes de proteína, incorporando productos como bactopectona, triptona, extracto de carne o extracto de levadura en las formulaciones las cuales alcanza costos altos. Entre las moléculas

producidas por estos microorganismos los cuales presentan actividad antimicrobiana están ácido láctico y ácido acético, etanol, diacetilo, 2-3-butanodiol y bacterinas (Reddy et al., 2007; Rivas et al., 2007).

- **Exopolisacáridos (EPS).** Son polisacáridos de cadena larga consistentes de ramificaciones de unidades repitentes de azúcares. Estas unidades de azúcar son principalmente, glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones (Laws et al., 2001). Como las BAL son GRAS, son candidatas para la producción segura de EPS funcionales (Rodríguez et al., 2003). Las BAL son caracterizadas por su conversión de una gran proporción de su fuente de carbono, azúcares fermentables, a ácido láctico; las BAL son capaces de desviar una pequeña proporción de azúcares fermentables hacia la biosíntesis de EPS (Rodríguez, 2002), dependiendo también de las condiciones de cultivo y medio de composición (Lin y Chang, 2007).

Los polisacáridos pueden ser divididos en dos grupos: homopolisacáridos compuestos por monosacáridos como el dextrano y heteropolisacáridos compuestos ramnosa, manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido glutámico (Ross et al., 2002). El factor que afecta el comportamiento reológico del coágulo de caseína es la producción de EPS por los cultivos iniciadores. Algunos cultivos de *S. thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *Bulgaricus* son capaces de producir polisacáridos de alto peso molecular con diferentes estructuras (Ryan et al., 2008).

Los exopolisacáridos (EPS) desempeñan un papel industrial en la producción de derivados lácteos fermentados, en particular en la producción de yogurt, queso, crema fermentada entre otras. Su aporte contribuye a la textura, reología, sabor, percepción sensorial y estabilidad final de un producto (Shene y Bravo, 2006; Serna y Rodríguez, 2005). Además, los EPS han sido utilizados extensivamente como geles, emulsificantes y suspensiones de estabilizantes (Tavaria et al., 2002); otros beneficios fisiológicos incluyen la colonización gastrointestinal de bacterias probióticas incrementando la residencia de los EPS en el tracto gastrointestinal (Vuyst et al. 2003). Además, los EPS producidos por BAL han sido pretendidos al tener efectos anti-tumor, anti-úlceras, efectos inmunostimulatorios y disminución de niveles de colesterol en la sangre (Tavaria et al., 2002).

- **Formación de sabores y otros por olores por BAL.** La mayoría de las BAL tiene solamente una habilidad limitada para sintetizar aminoácidos. Para el

crecimiento en leche, las BAL son componente dependientes del sistema proteolítico al degradar parcialmente caseínas y generar aminoácidos libres y, especialmente, péptidos libres. Estos péptidos son además hidrolizados a aminoácidos por la acción combinada de péptidasas. Durante este proceso en el queso, un número de péptidos amargos son formados como intermedios y degradados. Como un directo impacto en el sabor y olor del queso. Un amplio rango de componentes de sabor y olor pueden ser producidos como resultado de la conversión de aminoácidos como metionina, leucina y fenilalanina (Arribas y Polo, 2008).

- **Producción de endulzantes bajos en calorías.** Una aplicación de las BAL es la conversión de lactosa azúcar de la leche en alcoholes azúcares (polioles) como manitol y sorbitol. El manitol es a menudo formado por BAL que han tenido o no lactato deshidrogenado (LDH), especialmente bajo condiciones anaeróbicas. En lugar de piruvato, otros intermedios como las hexosas en la glucólisis, sirve como aceptores de electrones. En esta ruta, manitol y sorbitol pueden ser obtenidos a través de la reacción de fructosa 1-fosfato (Arribas y Polo, 2008).
- **Producción de vitaminas.** Las vitaminas B, fosfato, riboflavina, vitamina B12 pueden ser producidas por diferentes bacterias de grado alimentario. Algunas BAL y también bacterias producen ácido propionicas (Arribas y Polo, 2008).
- **Bebidas lácticas.** El mercado de bebidas representa una industria grande y en crecimiento. Recientemente, ha sido muy difundido en interés en el consumo de bebidas lácticas basadas en lactosuero constituyendo un segmento emergente de productos lácteos no convencionales (Pescumma et al., 2008); microorganismos como *Lactobacillus debrueckii sub sp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* han sido estudiadas recientemente por su habilidad de degradar proteínas de lactosuero en productos lácteos (Pescumma et al., 2008 y Valbuena et al., 2005). La utilización de lactosuero en polvo o líquido en bebidas lácteas es muy común (Almeida et al., 2009). La fermentación de lactosuero por BAL podrían disminuir el contenido alto de lactosa contenido en el lactosuero, produciendo principalmente ácido láctico y otros metabolitos como aromas contribuyendo al sabor, olor y textura e incrementando solubilidad de carbohidratos y dulzor del producto final (Pescumma et al., 2008). Leche fermentada y su relación con BAL han demostrado beneficios saludables como productos funcionales; estos productos están

caracterizados por ser refrescantes teniendo una textura suave y baja viscosidad. El consumo de bebidas lácticas se ha incrementado en varios países (Vinderola et al., 2006). El yogurt es un producto fermentado elaborado a partir de leche en el cual toman acciones las BAL transformando las azúcares en ácido láctico y otros compuestos dando lugar a un producto como sabor, aroma y textura característicos (Vuyst et al., 2003). En la fermentación láctica de la leche para yogurt, pueden intervenir el *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus delbrueckii* y algunos microorganismos probióticos como *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* entre otros (Walstra et al., 2001 y Wekman y Madoox, 2003). Estos microorganismos pueden ser denominados probióticos los cuales se encuentran disponibles en alimentos fermentados como el yogurt (Yang et al., 2008). Las BAL al mezclarse como otras especies como las propionibacterias: *Propionibacterium jensenii* y *Propionibacterium thoenii* (*jensenii*) no han tenido efecto negativo sobre *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* en yogurt (Zisu y Shah, 2008).

- **Ensilados.** El ensilaje es un método de preservación para cultivos o cosechas húmedos, que están basados en una fermentación natural ácido láctico convirtiendo carbohidratos solubles en agua en ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Como un resultado, el pH disminuye y el forraje es preservado. Inoculantes conteniendo principalmente ácido láctico.

El ensilaje es un método de preservación para cultivos o cosecha húmedos, que están basados en una fermentación natural ácido láctica convirtiendo carbohidratos solubles en agua en ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Como un resultado, el pH disminuye y el forraje es preservado. Inoculantes conteniendo principalmente BAL son empleadas como aditivos de ensilaje para mejorar eficacia en la preservación. Entre las BAL, las más frecuentemente utilizada son especies homofermentativas como *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* y *pediococcus*. Estas son utilizadas por su eficiente utilización de carbohidratos hidrosolubles de las cosechas, la producción intensiva de ácido láctico y descenso rápido en pH. Otras BAL son también incluidas como *Lactobacillus buchneri*, una BAL heterofermentativa la cual produce altas concentraciones de ácido acético en el ensilaje que inhiben hongos y así preservan ensilajes susceptibles de esporas y exposiciones al aire. Una

inoculación de 10^6 - 10^8 células viables por gramo de cosecha es a menudo suficiente para la inoculación de BAL en el ensilaje (Weinberg et al., 2003).

- **Probióticos.** Las BAL referidas como probióticos en la década de los 60, sin embargo en la década de los 70's la palabra probiótico tomó una terminología diferente al describir extractos de tejidos que estimulaban crecimiento microbiano. A los finales de los 70's se redefinió como organismo y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal (Savadogo et al., 2006). La más reciente y acertada descripción de probióticos se hizo a finales de los 80 redefiniéndose como suplementos dietarios microbianos, viables, seleccionados que cuando son introducidos en suficientes cantidades, afectan benéficamente el organismo humano a través de sus efectos en el tracto intestinal (Khalil et al., 2007 y Grajek et al., 2005). También la FAO ha adoptado la definición de probióticos como "microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio saldable en el huésped (Grajek et al., 2005). BAL son utilizadas en alimentos para proporcionar una amplia variedad de beneficios saludables. Los efectos fisiológicos relacionados con bacterias probióticas incluye reducción de pH en el intestino, producción de algunas enzimas digestivas y vitaminas, producción de sustancias antibacteriales como por ejemplo ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, diacetilo, acetaldehído, sistema lactoperoxidasa, lactonas y otras sustancias sin definir, reconstrucción y construcción de microflora intestinal normal después de desórdenes causados por diarrea, terapia de antibióticos y radioterapia, reducción de colesterol en la sangre, supresión de infecciones bacteriales, eliminación de carcinogénesis, mejoramiento de la absorción de calcio (Grajek et al., 2005). Además del efecto benéfico en la salud del huésped, un cultivo debe ser ingerido en cantidades suficientes. La concentración sugerida de BAL está en el rango 10^6 - 10^7 ufc/g de producto (Ruiz et al., 2008 y Hummela et al., 2007).

Conway en (1996) enumeró los siguientes microorganismos como especies utilizadas en la preparación de probióticos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei subsp. Ramnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lantarum*, *Streptococcus thermophiles*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*,

Bifidobacterium adolescentis, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*. Cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium* aislados del tracto intestinal humano o animal también han sido probióticos muy estudiados (Conway, 1996 y Dunne et al., 2009).

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de laboratorios o industrias alimenticias a nivel internacional así como en colecciones de cultivos. Algunos ejemplos de estos microorganismos son los siguientes: *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Rhone-Poulenc., Estados Unidos), *Lactobacillus reuteri* 106 (Biogaia, Estados Unidos), *Bifidobacterium longum* bb536 (Morinaga Milk Ind. Japón), *Lactobacillus plantarum* 299 (proViva, Finlandia), *Lactobacillus casei* YIT9018, Shirota, (Yakult, Japón) y *Lactobacillus Johnsoni* LJ-1 (Nestlé Suiza), *Lactobacillus casei* CRL 431 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (CEREALA, Argentina). *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 (Patente en trámite número p040103130, CEREALA, Argentina) entre otros (Taranto et al., 2005).

Los probióticos han sido definidos como microorganismo vivos, los cuáles cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico en la salud del huésped. Entre los microorganismos probióticos, las bacterias ácido lácticas (LAB) son las más importantes y comúnmente son asociadas con el tracto gastrointestinal de los seres humanos. Tienen efectos benéficos en la microflora intestinal, incluyendo estimulación inmune, reducción del colesterol, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, ayudan a prevenir el cáncer y enfermedades diarreicas, mejoran la absorción del calcio y la síntesis de vitaminas, entre otros (Yan Li et al., 2009).

Después de que las bacterias ácido lácticas pasan a través del estómago, se adhieren al epitelio del tracto intestinal y crecen. De acuerdo a la Federación Internacional de Lácteos, las bacterias probióticas se deben encontrar activas y a una concentración no menor a 1×10^7 UFC/g en el producto. Desafortunadamente la mayoría de los microorganismos probióticos, incluyendo a las BAL pocas tienen la capacidad para sobrevivir a condiciones extremas de acidez y sales biliares comúnmente encontradas en el tracto gastrointestinal de los humanos (Chandramouli et al., 2004).

Los ácidos biliares inhiben el crecimiento de algunos microorganismos probióticos gram positivos como los del géneros de *Bifidobacterium* y

Lactobacillus, mientras que los microorganismos gram-negativos como *E. coli* presentan mayor resistencia bajo estas condiciones de acidez (Floch et al., 1970). La inmovilización de probióticos por medio de la microencapsulación puede mejorar la supervivencia de estos microorganismos en los productos durante el procesamiento como en almacenamiento y la digestión (Capela et al., 2005).

Para mejorar la supervivencia de las BAL, se han propuesto diversos trabajos que permitan incrementar la resistencia de estos microorganismos en condiciones adversas, entre ellos, la selección apropiada de cepas resistentes a la acidez y al bilis, el empleo de contenedores impermeables de oxígeno, la adaptación al estrés, la incorporación de micronutrientes como péptidos y aminoácidos y la microencapsulación (Anal y Singh, 2007, Kim et al., 2008).

VII.4 Encapsulación

Los procesos de encapsulación empezaron a desarrollarse entre 1930 y 1940 por la National Cash Register (NCR), en Ohio, EEUU, para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina con agente encapsulante (Fanger, 1974). La utilización de microcápsulas abarcan una amplia gama de campos: la eliminación controlada de sabores, colores, aromas, perfumes, drogas, fertilizantes y precursores en impresiones (Popplewell et al., 1995). La aplicación en alimentos es más reciente, debido sobre todo a un abaratamiento de la tecnología, que ha despertado el interés de la industria alimentaria. Este proceso permite, en función de la tecnología aplicada, encapsular nutrientes para que no sean atacados, degradados u oxidados, así como enzimas o células completas, permitiendo que los sustratos y productos entren y/o salgan de la cápsula.

La encapsulación es un proceso en el cual las células son retenidas dentro de una matriz encapsulante para disminuir el daño celular o la pérdida de las células, y ha sido ampliamente utilizado para proteger microorganismos incluyendo a los probióticos durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal en humanos (Kailasapathy, 2002). Se ha estudiado la encapsulación de células bacterianas en geles de alginato para incrementar la viabilidad de las bacterias probióticas en productos acidificados como el yogurt (Kailasapathy, 2002).

La elección del método de secado adecuado es muy importante, a fin de aumentar la tasa de supervivencia durante la deshidratación y su posterior almacenamiento. La liofilización y el secado por aspersion, por lo general han sido los métodos más utilizados para el encapsulamiento. Sin embargo, durante estos procesos, las bacterias son sometidas a condiciones adversas, como a bajas temperaturas y baja actividad de agua, que pueden producir daños estructurales y fisiológicos a las células bacterianas resultando en la pérdida de viabilidad de muchas especies (Xiao Yan Li et al., 2009).

VII.4.1 Métodos industriales de encapsulación

Se han desarrollado diferentes técnicas para la producción y obtención de microcápsulas. En general, todas estas metodologías se pueden dividir en tres grandes grupos: A) Procesos físicos: enfriamiento por aspersion, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, co-extrusión, extrusión, fusión, cristalización, secado por aspersion B) Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas. C) Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular. La selección del proceso de encapsulación según la aplicación que se le vaya a dar tiene en cuenta el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulador y la sustancia a encapsular; las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Jafari et al, 2008b).

VII.4.1.1 Aspersion por enfriamiento o congelamiento

En esta técnica, el material a encapsular es mezclado con el acarreador y es atomizado en aire frío. Las microcápsulas son producidas por atomización de la emulsión o suspensión que contiene el material pared y la sustancia activa sólida o líquida. Las sustancias que se usan como coberturas en la mayoría de los casos son aceites vegetales (Teunou y Poncelet, 2005). La reducción de la temperatura produce una solidificación del lípido pared y el atrapamiento de la sustancia activa en el centro de la cápsula, consiguiendo casi siempre microcápsulas insolubles en agua (Madene et al, 2006).

VII.4.1.2 Extrusión

La microencapsulación por extrusión, involucra el paso de una emulsión del material activo y el material pared (más la adición de algún lípido) a través de un dado a alta presión. La extrusión constituye el segundo proceso más usado, después del secado por aspersión; específicamente es utilizado para la encapsulación de sabores. Un proceso típico involucra la mezcla de sabores con jarabe de maíz o almidón modificado caliente, extruyendo la mezcla en forma de esferitas (pellets) dentro de un baño con un disolvente frío como el isopropanol. El disolvente frío solidifica el jarabe en un sólido amorfo, envolviendo los compuestos que imparten sabor. Los sabores extrudidos proporcionan una mayor vida de almacenamiento comparados con los que no son encapsulados. Las condiciones de temperatura, flujo de alimentación y volumen a encapsular son los parámetros más importantes en el resultado; aun así, presenta muchos inconvenientes en el producto tales como hendiduras, paredes delgadas o poros en la estructura de la coraza (Yuliani *et al*, 2006).

VII.4.1.3 Cobertura por lecho fluidizado

Esta tecnología es caracterizada por tener buenas propiedades de mezclado así como una eficiente transferencia de calor y masa además de una distribución de temperatura uniforme en el lecho. En esta operación se suspenden las partículas sólidas que se quieren encapsular en una corriente de aire a alta velocidad dentro de una cámara con temperatura y humedad controladas, donde el material pared es atomizado. La cantidad de partículas cubiertas depende de la longitud de la cámara y del tiempo de residencia dentro de ésta. La técnica es aplicable a coberturas que funden fácilmente como aceites vegetales hidrogenados, estearinas, ácidos grasos, emulsificantes, ceras o coberturas solubles como almidones, gomas y maltodextrinas (Rosenkranz *et al*, 2007). En la encapsulación de sólidos pequeños, las partículas se fluidizan con un gas o un líquido.

VII.4.1.4 Atrapamiento en liposomas

La formación de liposomas es la interacción hidrofóbica/hidrofílica entre lípido/lípido y lípido moléculas del agua (Mozafari, 2005). Se han utilizado en la liberación de medicamentos y se conforman de una o más capas de lípidos permitidos en el procesamiento de alimentos; la permeabilidad, estabilidad, actividad superficial pueden variar con el tamaño y la composición del lípido pared. Existen tres tipos de liposomas: multilaminar, vesículas de un compartimiento y macrovesículas. La sonicación permite la formación de las primeras, mientras que las macrovesículas son formadas por inyección de soluciones de lípido en una solución reguladora de fosfatos. Los liposomas pueden obtenerse con cargas positivas por la adición de aminos o con cargas negativas por la adición de fosfatidil serina o diacetil fosfato. Sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas pueden ser encapsuladas en liposomas; los compuestos hidrofílicos se disuelven en agua y se mezclan con una película lipídica para formar liposomas, mientras que los materiales hidrofóbicos se embeben en una película delgada de lípido. La liberación del principio activo se realiza por difusión a través de la pared que puede ser de una o dos capas de lípidos; por destrucción de la vesícula, dada una concentración crítica de iones o por un cambio de pH. Se pueden añadir algunas sustancias para reducir la permeabilidad de la membrana e incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa tales como el colesterol y tocoferoles (Taylor et al, 2007).

VII.4.1.5 Coacervación

En una solución coloidal, las cargas pueden orientarse formando puentes que dan origen a una disminución de la solubilidad del coloide; como consecuencia una parte del coloide puede separarse en una nueva fase, convirtiendo al sistema en bifásico. La fase rica en coloide es un estado disperso que aparece como gotas de líquido amorfo, a las que se les denomina gotas de coacervado. La coacervación puede iniciarse de diferentes formas: cambios de pH, temperatura o adición de una segunda sustancia como una sal iónica; este método es eficiente pero costoso. Para el proceso de microencapsulación se han usado algunos biopolímeros como coberturas (goma arábica y grenetina). La microencapsulación por coacervación requiere que el material a encapsular y el material pared se mezclen; la cobertura se deposita sobre el material activo (Madene et al, 2006).

VII.4.1.6 Liofilización

En particular, es el proceso más común para la producción de grandes cantidades de cultivos microbiológicos concentrados. Sin embargo, durante estos procesos, las bacterias son sometidas a condiciones adversas, como a bajas temperaturas y baja actividad de agua, que pueden producir daños estructurales y fisiológicos a las células bacterianas resultando en la pérdida de viabilidad de muchas especies (Xiao Yan Li et al., 2009).

Los objetivos de la conservación del cultivo se podrían resumir en los siguientes aspectos:

- a) Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
- b) Preservar los niveles de su productividad inicial
- c) Lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad.

Esto último puede ser un factor esencial en la selección de un método de preservación. En todo trabajo de microbiología se deben conocer las características de la población con la cual se va a trabajar (propiedades morfológicas y bioquímicas).

El conocimiento de las características del cultivo es esencial en la elección de un método de preservación. La identidad del cultivo puede conocerse en base a sus características de crecimiento en uno o más medios específicos, tomando en consideración propiedades macro y microscópicas exhibidas, o en base a una evaluación más exhaustiva empleando muchos ensayos bioquímicos, biológicos, inmunológicos y genéticos.

En general los cultivos no son estudiados en detalle debido a la casi imposibilidad de determinar en cada etapa si ha habido o no alteración genética. En la mayoría de las situaciones solamente se pueden notar cambios mensurables u observables tales como pigmentación, morfología, reacciones fermentativas, propiedades microscópicas, etc. El análisis de estos parámetros junto con la determinación cuantitativa del recuento de colonias antes y después del proceso la técnica de conservación a elegir.

VII.4.1.7 Secado por aspersion

La operación de secado por aspersion (Figura 6) consiste en la transformación de una alimentación en estado líquido a un producto sólido y seco, al poner en contacto dicha alimentación en forma de gotas finas con una corriente de aire caliente. El tiempo de contacto es muy corto y en consecuencia el daño debido al calor también es mínimo (Masters, 1985).

El secado por aspersion consiste en cuatro etapas (Masters, 1985).

- A. Atomización.
- B. Contacto aire – gota.
- C. Evaporación.
- D. Recuperación del producto seco

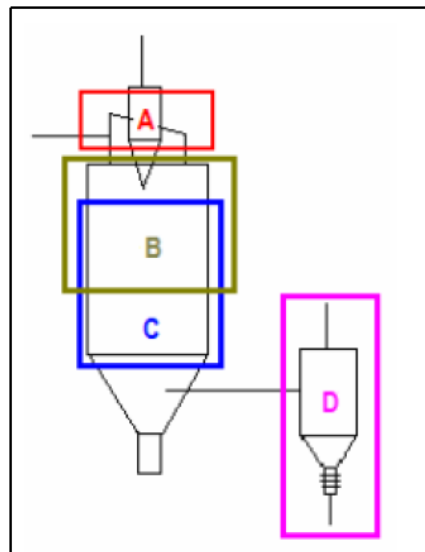


Figura 6. Proceso de secado por aspersion Fuente: Mendoza et al, 2003.

La microencapsulación es una técnica en la que un compuesto o producto activo (core) es rodeado por una cubierta (shell) de ciertos polímeros para proporcionarle protección frente radicales libres, humedad, oxidación debido a la luz o al oxígeno u otras condiciones que son desfavorables para su estabilidad (Desai y Park, 2005).

El principio del secado por aspersion es la producción de un polvo seco por medio de la atomización de una emulsión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora instantáneamente, permitiendo que el material activo presente en la

emulsión, quede atrapado dentro de una película de material encapsulante (Mendoza et al., 2006).

Una de las principales ventajas de utilizar el secado por aspersion como método de encapsulación es que los tiempos de secado son muy cortos, es decir, materiales termosensibles como las enzimas pueden ser secados satisfactoriamente sin provocar un daño tan severo en su estructura (Nonhebel et al., 1979). Además de los bajos tiempos de residencia que se emplean, provee un efecto refrigerador debido a la evaporación, ya que a pesar del aporte de aire caliente, este sustrae calor por la vaporización del disolvente.

Uno de los problemas que presentan los materiales que contienen alto contenido de azúcares y ácidos orgánicos en el proceso de secado por aspersion, es el aglomerado de las partículas ya que estos compuestos tienen temperaturas de transición vítrea bajas lo que conlleva a la existencia de un estado pseudo líquido (gomoso) del material amorfo. Lo anterior causa la aglomeración de partículas ocasionando bajas producciones del producto y problemas operacionales. Una solución a este problema de pegajosidad es el uso productos ayudantes de secado como los encapsuladores que mezclados con la muestra líquida evitan la pegajosidad y aglomeración del producto obtenido (Miravet y Gracia, 2009).

Los principales encapsulantes utilizados para este método son: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, sacarosa, dextrana, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa); gomas (arábica, mezquite, agar, alginato de sodio, carragenina); lípidos (ceras, parafinas, grasas, ácido esteárico, tristearina, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, gluten, caseína). Estos encapsulantes deben tener la capacidad de proporcionar una emulsión estable durante el proceso de secado por aspersion y tener muy buenas propiedades de formación de película para proveer una capa que proteja al ingrediente activo de la oxidación (Desai y Park, 2005 y Yáñez et al., 2002).

El secado por aspersion como método de encapsulación ha sido ampliamente estudiado para estabilizar bacterias probióticas en diversas matrices alimentarias compuestas principalmente por proteínas, polisacáridos, azúcares y la combinación de ellos.

La leche descremada en polvo provee en una buena protección para *Lactobacilli* encapsulados por secado por aspersión durante el almacenamiento a 37° C, obteniéndose una reducción de solo 0.5 log en la cuenta viable después de 5 semanas (Ananta et al., 2005). Wang et al. (2004) encapsularon leche de soya fermentada con cultivos probióticos por secado por aspersión reportando una viabilidad del 40% a 25° C después de 4 meses en almacenamiento. Desmond et al. (2002) reportan un mejoramiento en la supervivencia de *Lactobacillus paracasei* durante el secado por aspersión y almacenamiento durante 4 semanas empleando goma arábica al 10% y leche descremada en polvo al 10% en lugar de leche descremada al 20%.

Los azúcares, especialmente los disacáridos, pueden reemplazar a las moléculas de agua removidas durante el secado permitiendo la conservación de la estructura de la membrana, con ello se evitan los daños celulares y se mejora la supervivencia de los microorganismos. Así mismo, la formación de enlaces por puente de hidrógeno con proteínas previene la desnaturalización (Ananta et al., 2005). Algunos azúcares como la sacarosa o trealosa tienen la función de crió y/o osmoprotectores (Ananta et al., 2004).

Guevara et al. (2009) sostienen que *L. reuteri* resultó ser más resistente al proceso de encapsulación mediante secado por aspersión al utilizar maltodextrina al 25% p/p como agente encapsulante y que la optimización del secado por aspersión permite aumentar la viabilidad de microorganismos probióticos. Boza et al. (2004) mencionan que a menores viscosidades se puede obtener una alta viabilidad del microorganismo encapsulado mediante secado por aspersión. Así mismo, dichos estudios indican que los microorganismos encapsulados tienen un mejor crecimiento comparado con los microorganismos sin encapsular. Esto demuestra que los microorganismos encapsulados obtuvieron del agente encapsulante (aguamiel-maltodextrina) una fuente de alimentación, lo cual valida el supuesto de que el aguamiel funciona como prebiótico del *L. casei*. En base a este resultado se puede sugerir que el polvo obtenido del *L. casei* encapsulado con aguamiel-maltodextrina, puede utilizarse como un ingrediente en un producto funcional, como puede ser un cereal o un producto para bebe.

Oldenhof et al. (2005) obtuvieron el mejoramiento de la supervivencia de *Lactobacilli* encapsulados por secado por aspersion empleando una mezcla 50:50 de maltodextrina DE5-8 y sacarosa. La sacarosa interactúa con los lípidos y proteínas, mientras que la maltodextrina funciona como un compuesto osmóticamente inactivo que aumenta su tamaño y causa el espaciamiento de las células fortaleciendo la matriz vítrea.

Normalmente, los probióticos son encapsulados a temperaturas elevadas al inicio y al término del secado por aspersion, alrededor de 100°C y 60° C respectivamente, con la finalidad de obtener polvos secos con contenidos de humedad próxima a 4%, condición necesaria para un almacenamiento seguro. Sin embargo, a estas temperaturas y a velocidades de secado muy rápidas es más probable que la supervivencia de los microorganismos se vea afectada. La mortalidad de las bacterias comienza a ocurrir durante el proceso de secado y continúa durante el almacenamiento (*Chávez y Ledebøer, 2007*).

En la actualidad se reconocen una serie de condiciones óptimas requeridas para proteger a los probióticos durante el secado por aspersion y su almacenamiento (*Chávez y Ledebøer, 2007*):

- El tipo de cepa y tolerancia al estrés: esta es una función fisiológica intrínseca que depende de cada cepa.
- Agente encapsulante: comúnmente proteínas y/o carbohidratos.
- Temperatura de secado: los probióticos son sensibles a la temperatura; la mortalidad incrementa con la temperatura del secado y se acentúa a temperaturas mayores a 51° C.
- Tiempo (exposición al calor): la mortalidad es proporcional al tiempo de exposición al calor, de esta manera el tiempo de calentamiento debe ser lo más corto posible.
- El estrés osmótico, oxidativo y mecánico debe ser minimizado; aditivos como osmoprotectores y antioxidantes debe ser incluidos.
- Transición vítrea: los alimentos en polvo deben estar en estado vítreo para impedir los procesos de deterioro.
- Encapsulamiento/cubierta: la barrera o cubierta contra el medio ambiente agresivo debe permanecer estable, especialmente en el tracto gastrointestinal.

- Actividad de agua/contenido de humedad: generalmente son aceptados valores de actividad de agua por debajo a 0.25 y el contenido de agua al 5% para asegurar la estabilidad del producto. Los valores de actividad de agua entre 0.11 y 0.23 previenen el daño celular durante el almacenamiento; valores más elevados están relacionados con el aumento de la muerte de *L. delbruekii*.
- Condiciones de almacenamiento: Estas son críticas para la supervivencia en probióticos deshidratados para generar protección contra la temperatura, oxígeno, luz y humedad. El almacenamiento al vacío es el mejor tratamiento.

La optimización de las condiciones de secado y de la formulación de los agentes encapsulantes debe ser mejorada, en particular su impacto en la estabilidad durante el almacenamiento de los probióticos encapsulados.

VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Las cepas encapsuladas fueron *Lactobacillus pentosus* (BAL 03), *Lactobacillus sp* (BAL 05) y *Lactobacillus succicola* (BAL 10) las cuales fueron donadas por el laboratorio de Investigación del ITTG.

- Encapsulamiento

- ✓ Preparación del agente encapsulante

Como agente encapsulante se empleó una mezcla de maltodextrina 10DE (MD) y alginato de sodio (AG). La concentración de Maltodextrina fue al 30% (p/v) y la de Alginato de Sodio al 3% (p/v). Los agentes encapsulantes fueron hidratados con agua destilada a 40°C durante 24 horas. Posteriormente, se mezclaron en una relación de 60-40% MD-AG y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

- ✓ Preparación del pellet

Para cada experimento se prepararon 200mL de caldo MRS inoculados con cada microorganismo al 2% y se incubaron a una temperatura de 35°C durante 24 horas. Posteriormente, los medios fueron centrifugados a una velocidad de 4,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C para obtener el pellet. El pellet obtenido fue resuspendido en la solución del agente encapsulante estéril y homogenizado en un homogenizador Ultra Turrax 25 Basic durante 5 minutos a una velocidad de 5,000 rpm. Posteriormente fue alimentado directamente al secador por aspersion.

- ✓ Secado por Aspersion

Las emulsiones fueron deshidratadas en un secador por aspersion tipo laboratorio Marca Buchi. Se evaluó el efecto de la temperatura del aire de entrada (90 y 120 °C) y el flujo de alimentación al secador (3 y 9 mL/min). El polvo obtenido fue evaluado en términos del rendimiento del proceso de secado y viabilidad de los microorganismos. Posteriormente, el polvo fue almacenado bajo condiciones de vacío en bolsas de plástico a temperatura ambiente.

- Viabilidad celular

La viabilidad de los microorganismos se determinó mediante recuento en agar MRS con la técnica vaciado en placa. Kachi *et al.* (2009) reportan el porcentaje de supervivencia en las muestras encapsuladas como:

$$Supervivencia(\%) = \frac{\log \frac{UFC}{mL} \text{ muestra hidratada}}{\log \frac{UFC}{mL} \text{ solución alimentada}} \times 100$$

- ✓ Monitoreo inicial

La cuenta viable inicial de los microorganismos se realizó con la muestra de la emulsión homogenizada antes de meterlo al secador. Se tomó 1 mL de la emulsión y se diluyeron en 9 mL de agua destilada, posteriormente se realizaron diluciones seriadas. Se inocularon 100 µL en cajas con Agar MRS. Las cajas se incubaron a una temperatura de 35°C durante 48 horas.

- ✓ Monitoreo final

Se rehidrató 1 g de polvo obtenido después del secado en 9 mL de agua peptonada. Las muestras fueron agitadas en un vortex durante 10 minutos o hasta tener una suspensión homogénea, se realizaron diluciones seriadas según fue requerido y se inocularon 100 µl en agar MRS. Las cajas se incubaron a una temperatura de 35°C durante 48 horas.

- ✓ Rendimiento del proceso de secado

El rendimiento del proceso de secado se evaluó de acuerdo a la relación de los gramos obtenidos de polvo y la concentración de sólidos en la solución de alimentación (concentración de agente encapsulante).

$$Rendimiento(\%) = \frac{g \text{ de polvo obtenido}}{g \text{ agente encapsulante}} \times 100$$

- Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental factorial 2^2 aleatorizado con una repetición. Los factores fueron la temperatura y el flujo de alimentación al secador y los niveles fueron 90 y 120 °C y 3 y 9 mL/min respectivamente. Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA simple con un nivel de significancia de 0.05. Así mismo se realizó una prueba de medias por Tuckey con la finalidad de comparar los tratamientos. El software utilizado fue Statgraphics Centurion, versión 15.2.05, 2007.

IX.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Viabilidad celular durante el encapsulamiento**

En la cuadro 2 se muestran los resultados de la viabilidad celular de las BAL encapsuladas. Se observa que la viabilidad celular de todas las BAL evaluadas durante el proceso de secado tienen un alto porcentaje de supervivencia, es decir, en todos los tratamientos se obtuvo el 100 por ciento de supervivencia inmediatamente después del secado, con excepción del experimento No. 8 correspondiente al tratamiento con temperatura de 120°C y con flujo de alimentación de 9 mL/min, en la cual se obtuvo un 95.06% de supervivencia.

Cuadro 2. Viabilidad celular de las BAL después del secado por aspersion.

Tratamiento	BAL	Temperatura	Flujo	Viabilidad celular %	Media
1	03	90	3	100	100 _a
1	03	90	3	100	100 _a
2	03	120	3	100	100 _a
2	03	120	3	100	100 _a
3	03	90	9	100	100 _a
3	03	90	9	100	100 _a
4	03	120	9	100	100 _a
4	03	120	9	100	100 _a
5	05	90	3	100	100 _a
5	05	90	3	100	100 _a
6	05	120	3	100	100 _a
6	05	120	3	100	100 _a
7	05	90	9	100	100 _a
7	05	90	9	100	100 _a
8	05	120	9	100	95.06 _b
8	05	120	9	90.13	95.06 _b
9	10	90	3	100	100 _a
9	10	90	3	100	100 _a
10	10	120	3	100	100 _a
10	10	120	3	100	100 _a
11	10	90	9	100	100 _a
11	10	90	9	100	100 _a
12	10	120	9	100	100 _a
12	10	120	9	100	100 _a

Resultados similares fueron reportados por Kanchi *et al.* (2009) quienes obtuvieron más del 97% de sobrevivencia celular de tres cepas probióticas de BAL encapsuladas empleando maltodextrina y leche descremada al 10%. Sin embargo, otros autores han encontrado resultados inferiores. Lian *et al.* (2002) encontraron que la supervivencia de *Bifidobacteria* después el secado por aspersión fue del 80% empleando leche de soya como agente encapsulante. A mismo Chávez y Ledebøer (2007) obtuvieron una viabilidad celular desde el 56% hasta el 100% cuando se combina leche de soya con algún carbohidrato durante el secado por aspersión.

Realizando un análisis ANOVA multifactorial con valor de $P < 0.05$ se puede observar que ni en el flujo de alimentación ni la temperatura de secado tienen un efecto estadístico significativo sobre la viabilidad de las BAL (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza de los factores evaluados durante el encapsulamiento de las BAL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
A: BAL	8.11808	2	4.05904	1.00	0.3864
B: Flujo	4.05904	1	4.05904	1.00	0.3299
C: Temperatura	4.05904	1	4.05904	1.00	0.3299
RESIDUOS	77.1217	19	4.05904	1.00	
TOTAL (CORREGIDO)	93.3579	23			

Es decir, las condiciones del secado ni la cepa de la bacteria ácido láctica influyeron en la supervivencia de los microorganismos durante el proceso de encapsulamiento.

En la Figura 7 se demuestra que no existe diferencia estadística significativa en las BAL, las cuales fueron identificadas como BAL 03 (*Lactobacillus pentosus*) BAL 05 (*Lactobacillus sp*) y BAL 10 (*Lactobacillus succicola*). Sin embargo, la BAL 05 es menos resistente al secado que la BAL 03 y 10.

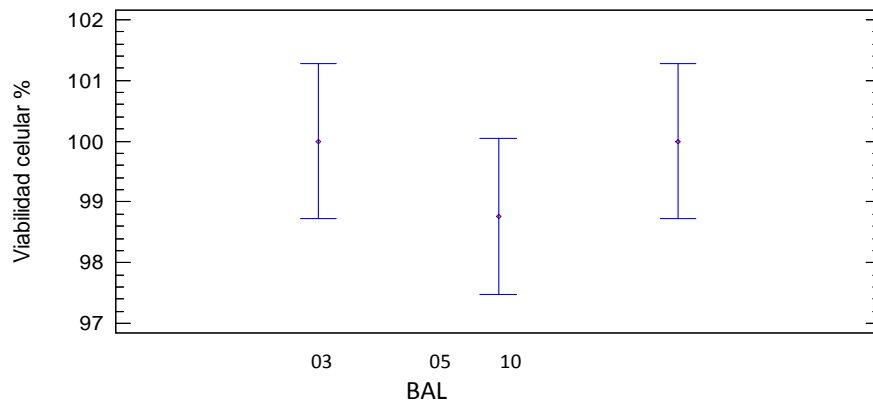


Figura 7. Viabilidad de diferentes BAL después del secado por aspersión

Empleando una prueba de Tukey para comparar el efecto de los niveles de cada factor sobre la viabilidad celular se observa que no existe diferencia estadística significativa entre ellos, sin embargo a menor temperatura y menor flujo durante el proceso de secado se lograron obtener los porcentajes de sobrevivencia más elevados (Figura 8 y 9).

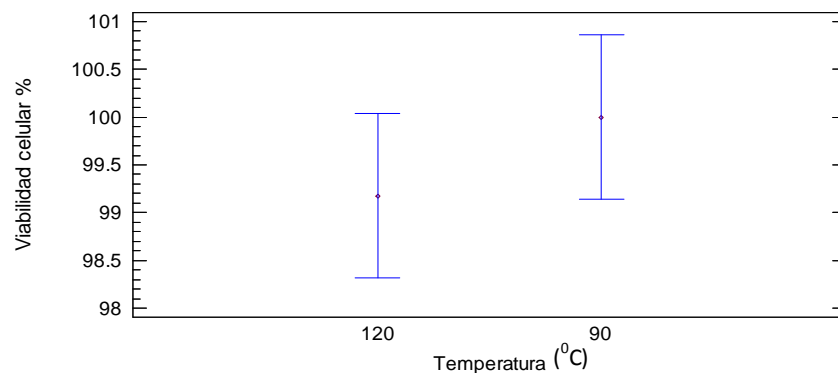


Figura 8. Efecto de la temperatura de secado sobre la viabilidad celular de BAL durante el encapsulamiento

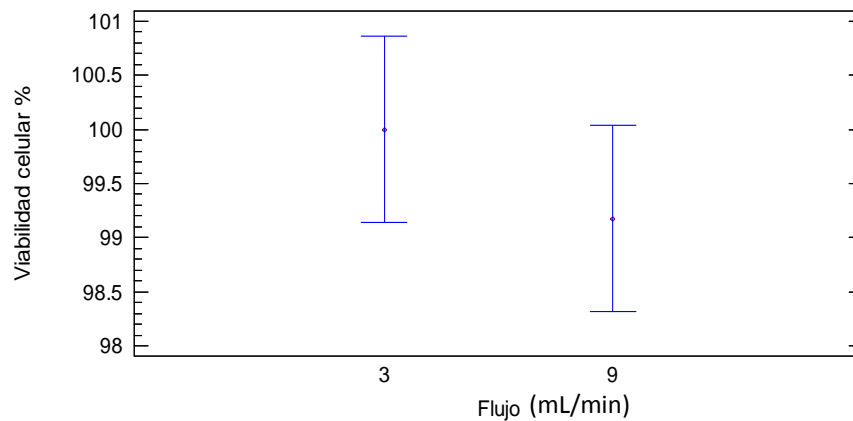


Figura 9. Efecto del flujo de alimentación sobre la viabilidad celular de BAL durante el encapsulamiento

Diversas investigaciones realizadas empleando *L. rhamnosus* GG en fase de crecimiento estacionario y en presencia de povidona (10% p/v) como agente encapsulante reportaron sobrevivencias celulares muy bajas cuando el proceso se realizó a 150°C. Por otro lado, *Corcoran et al. (2004)* obtuvieron una supervivencia del 31% encapsulando a 170° C. Esta supervivencia podría estar sujeta a la especie bacteriana, a los agentes encapsulantes utilizados y las condiciones de proceso, entre otros (*Anal et al., 2007; Lian et al., 2002*).

- **Rendimiento del proceso de secado**

De igual forma se realizó un ANOVA simple con un nivel de confianza de 95%, donde se obtuvieron los rendimientos del secado representados en el Cuadro 4.

Las condiciones del proceso que generan el rendimiento más alto fueron 120° C y 3mL/min correspondientes a un 57.55% con la BAL 10 (*Lactobacillus succicola*). Así mismo cuando el secador fue operado a 90° C y 9mL/min con la BAL 05 (*Lactobacillus sp*) se obtuvo un rendimiento del 27.09% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Rendimiento del proceso de secado

Tratamiento	BAL	Temperatura	Flujo	Rendimiento de secado	Media
1	03	90	3	39.06	42.71 _{cd}
1	03	90	3	46.35	
2	03	120	3	48.44	48.18 _{de}
2	03	120	3	47.92	
3	03	90	9	27.6	28.65 _a
3	03	90	9	29.69	
4	03	120	9	29.69	29.69 _a
4	03	120	9	29.69	
5	05	90	3	41.15	39.85 _{bc}
5	05	90	3	38.54	
6	05	120	3	51.56	51.56 _{ef}
6	05	120	3	51.56	
7	05	90	9	30.21	27.09 _a
7	05	90	9	23.96	
8	05	120	9	36.98	37.24 _{bc}
8	05	120	9	37.5	
9	10	90	3	43.24	42.98 _{cd}
9	10	90	3	42.71	
10	10	120	3	56.77	57.55 _f
10	10	120	3	58.33	
11	10	90	9	28.13	33.34 _{ab}
11	10	90	9	38.54	
12	10	120	9	44.79	41.41 _{cd}
12	10	120	9	38.02	

Estos resultados se atribuyen a que cuando la temperatura de entrada al secador es más baja, la cantidad de agua eliminada durante el encapsulamiento es menor, provocando que el producto se adhiera a la tolva de secado y por consiguiente una disminución en el rendimiento del proceso. Así mismo, a mayor flujo de entrada al aspersor la cantidad de muestra es mayor, lo que dificulta la vaporización del agua ocasionando el mismo problema de apelmazamiento.

Analizando los resultado con un ANOVA multifactorial con un valor de $P < 0.05$ podemos observar todos los factores evaluados tienen efecto estadístico significativa sobre el rendimiento del proceso de secado (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para rendimiento de secado

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
A: BAL	183.723	2	91.8615	6.76	0.0061
B: Flujo	1215.95	1	1215.95	89.47	0.0000
C: Temperatura	434.095	1	434.095	31.94	0.0000
RESIDUOS	258.209	19	13.5899		
TOTAL (CORREGIDO)	2091.98	23			

Realizando la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% se observa que no existe diferencia estadística significativa entre la BAL 03 y la BAL 05, pero si con el rendimiento obtenido con la BAL 10 la cual generó los mayores porcentajes (Figura 10).

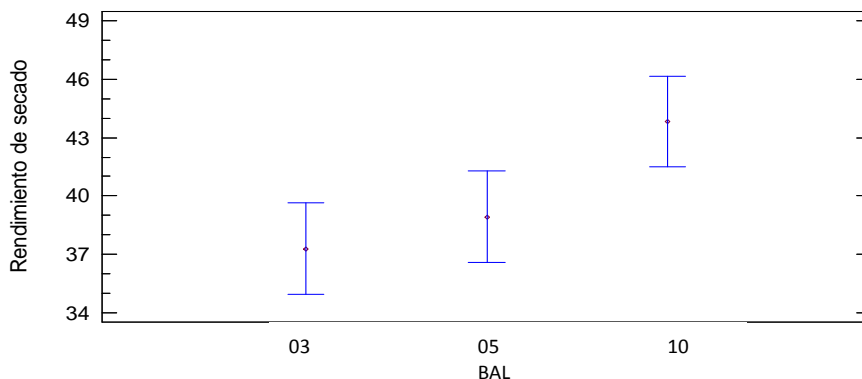


Figura 10. Efecto del tipo de BAL sobre el rendimiento de secado

Respecto a la temperatura de secado y el flujo de alimentación se observa claramente la diferencia estadística que existe entre ambos niveles. A mayor temperatura de secado y menor flujo de alimentación el rendimiento de secado es más alto (Figura 11 y 12).

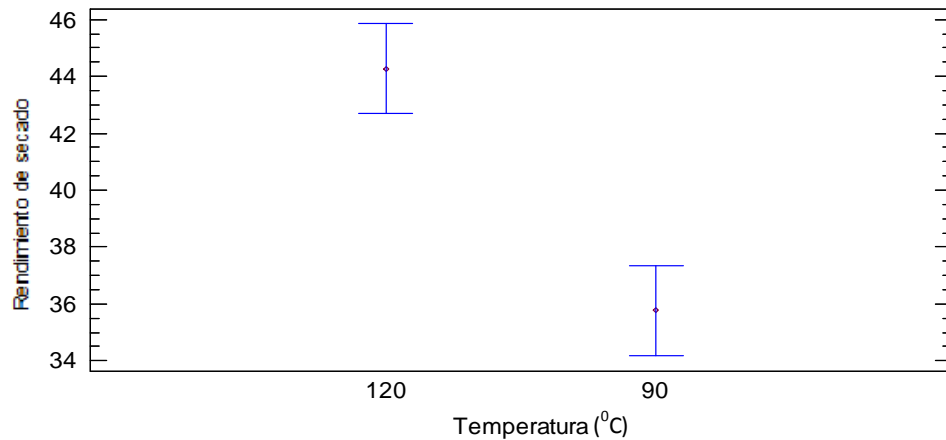


Figura 11. Efecto de la temperatura de secado sobre el rendimiento del proceso

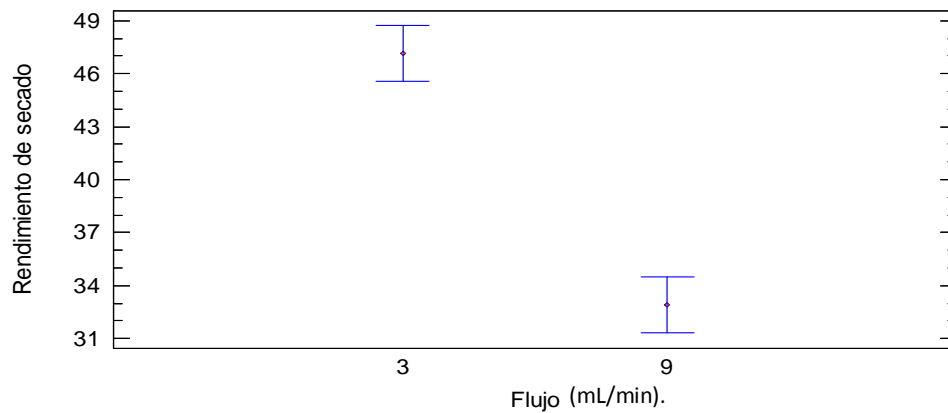


Figura 12. Efecto del flujo de alimentación sobre el rendimiento del proceso

- **Vialidad Celular de las BAL encapsuladas durante el almacenamiento**

Después del secado se almacenaron las muestras encapsulas en condiciones de vacío y a temperatura ambiente durante 8 semanas, realizando un primer monitoreo a la semana 4 y un segundo monitoreo a la semana 8. Se observó que el porcentaje de supervivencia disminuye gradualmente respecto al tiempo de almacenamiento (Cuadro 6). Resultados similares fueron reportados por Wang *et al.* (2004) quienes obtuvieron alrededor de 40% de viabilidad celular a las 4 semanas de almacenamiento a 25° C en cepas probióticas encapsuladas con leche de soya mediante secado por aspersión.

Cuadro 6. Viabilidad celular de las cepas encapsuladas durante su almacenamiento

Tratamiento	BAL	Variables (°C, mL/min)	Después del secado	4 semanas	8 semanas
1	03	90, 3	100 _b	76.53 _a	19.3 _{abc}
1	03	90, 3			
2	03	120, 3	100 _b	55.94 _{ab}	27.8 _c
2	03	120, 3			
3	03	90, 9	100 _b	66.41 _{ab}	17.6 _{abc}
3	03	90, 9			
4	03	120, 9	100 _b	65.22 _{ab}	25.3 _{bc}
4	03	120, 9			
5	05	90, 3	100 _b	38.90 _{bc}	10.6 _{abc}
5	05	90, 3			
6	05	120, 3	100 _b	49.11 _{bc}	14.9 _{ab}
6	05	120, 3			
7	05	90, 9	100 _b	28.17 _{bcd}	16.2 _{abc}
7	05	90, 9			
8	05	120, 9	95.06 _a	36.32 _{cd}	13.4 _a
8	05	120, 9			
9	10	90, 9	100 _b	50.24 _{cd}	17.1 _{abc}
9	10	90, 9			
10	10	120, 9	100 _b	37.30 _{cde}	16.0 _{ab}
10	10	120, 9			
11	10	90, 9	100 _b	48.95 _{de}	13.4 _a
11	10	90, 9			
12	10	120, 9	100 _b	56.70 _e	14.0 _{ab}
12	10	120, 9			

Fahimdanesh et al. (2012) reportaron resultados similares con cepas probióticas de *L. casei* y *B. bifidum* encapsuladas con alginato de calcio y almidón, quienes, después de 4 semanas de almacenamiento a 4°C, reportaron en *L. casei* un 70% de sobrevivencia y en *B. bifidum* un 60% de sobrevivencia.

De acuerdo a un ANOVA multifactorial con un valor de $p < 0.05$ de la supervivencia celular durante las primeras 4 semanas de almacenamiento se obtuvo que el único factor que tiene efecto estadístico significativo es la cepa encapsulada (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza de la viabilidad celular después de 4 semanas

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
A: BAL	3190.66	2	1592.33	15.53	0.0001
B: Flujo	6.4896	1	6.4896	0.06	0.8042
C: Temperatura	12.3553	1	12.4896	0.12	0.7325
RESIDUOS	1951.61	19	102.717		
TOTAL (CORREGIDO)	5161.12	23			

Realizando una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% para evaluar el efecto de cada cepa se encontró que la cepa BAL 03 identificada como *Lactobacillus pentosus* fue la más resistentes durante el almacenamiento alcanzando hasta el 76.53% se supervivencia. Mientras que la viabilidad celular obtenida con la BAL 05 y BAL 10 fue menor pero similar entre ellas (Figura 13).

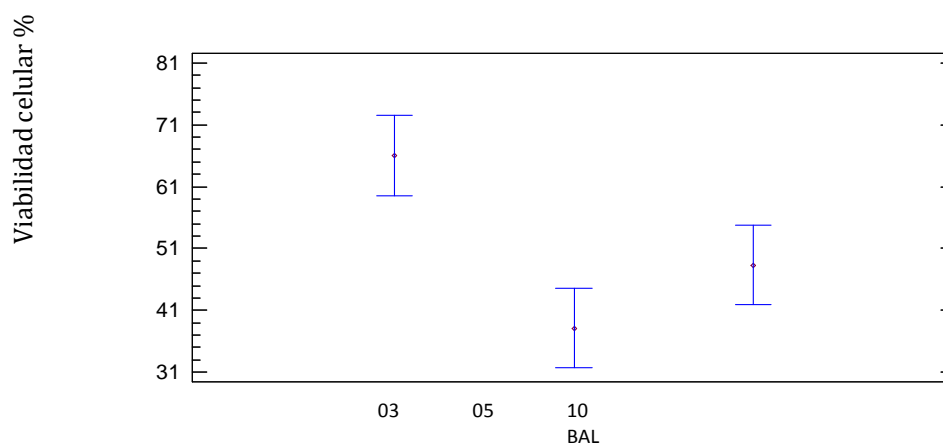


Figura 13. Efecto del tipo de microorganismo durante el almacenamiento (4 semanas)

El ANOVA multifactorial con un valor de $p < 0.05$ para la sobrevivencia celular evaluada a las 8 semanas de almacenamiento muestra que el tipo de cepa sigue siendo el único factor que tiene efecto estadístico significativo sobre la viabilidad celular (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de varianza de la viabilidad celular después de 8 semanas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
A: BAL	345.19	2	172.595	7.14	0.0049
B: Flujo	4.3265	1	4.3265	0.18	0.6770
C: Temperatura	46.3265	1	46.4538	1.92	0.1817
RESIDUOS	459.251	19	24.1711		
TOTAL (CORREGIDO)	855.221	23			

Realizando una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% se evaluó el efecto de cada cepa durante el almacenamiento, donde se encontró que la cepa BAL 03 identificada como *Lactobacillus pentosus* sigue siendo la más resistente durante el almacenamiento alcanzando hasta el 27.8% de viabilidad celular (Figura 14). Esta cepa ha sido evaluada en el ITTG y han reportado que dicha cepa presenta potencial probiótico. Éste tipo de microorganismos se caracterizan por tener un metabolismo celular muy resistente a diversos factores de estrés, por lo que la supervivencia celular durante el almacenamiento podría atribuirse a este hecho.

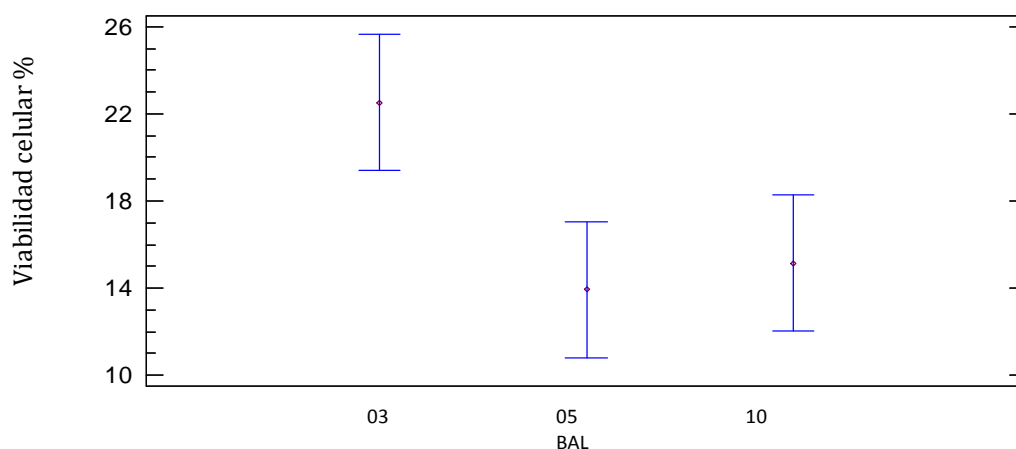


Figura 14. Efecto del tipo de microorganismo durante el almacenamiento (8 semanas)

Mansouripouret *al.* (2013) mencionan que la viabilidad celular de probióticos durante la exposición a tratamientos térmicos depende de cada cepa, debido a que existen especies que son mucho más resistentes a ese tipo de estrés. Además, el empleo de alginato de sodio al 4% como agente encapsulante contribuye al mejoramiento de la viabilidad celular durante el almacenamiento.

Este resultado se puede atribuir a que cada microorganismo es capaz de desarrollar diversos cambios en su metabolismo para maximizar su supervivencia en condiciones de estrés generadas durante el proceso de deshidratación o encapsulamiento. Este estrés se puede deber al cambio de presión osmótica en el medio, ya que se elimina de manera instantánea el contenido de agua en la matriz encapsulante, así como también parte del agua intracelular. Uno de los principales cambios es a nivel membranar, en donde se modifica el perfil de ácidos grasos de la membrana celular para mantener la permeabilidad de la célula (Meng *et al.*, 2007).

El contenido de humedad, la actividad de agua y la temperatura de transición vítrea de los polvos influyen directamente en la estabilidad celular durante el almacenamiento. Los dos primeros son consecuencia directa de la eficiencia del proceso de secado y de la calidad del empaque. La transición vítrea es una propiedad termodinámica de los materiales, la cual es alterada por la presencia de agua. La velocidad de transferencia de masa es considerablemente menor en estado vítreo haciendo que la matriz permanezca más estable durante condiciones adversas o críticas (Chávez y Ledebøer, 2007).

Teixeira *et al.* (1995) reportaron que el polvo obtenido durante el secado por aspersión con valores de actividad de agua entre 0.11 y 0.23 previene la muerte celular durante el almacenamiento de *L. delbrueckii*.

X. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Las condiciones de operación del secador por aspersión y la mezcla maltodextrina-alginato de sodio no afectan la viabilidad celular de las BAL durante el secado por aspersión.
2. Las condiciones de secado óptimas para obtener el 100% de viabilidad celular de las cepas BAL-03, BAL-05 y BAL-10 durante el secado por aspersión son 90° C y 3 mL/min de flujo de alimentación.
3. El rendimiento del proceso de secado a las condiciones que permiten el 100% de viabilidad celular es en promedio del 41%.
4. La viabilidad celular durante el almacenamiento disminuye rápidamente en los dos primeros meses. Por lo que es necesario realizar estudios que permitan evidenciar el efecto de las temperaturas de almacenamiento sobre la viabilidad de los microorganismos.
5. Se recomienda llevar a cabo la identificación molecular de las BAL-03, BAL-05 y BAL-10.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara-Hernández, R; Rodríguez-Álvarez, J; Valenzuela-Encinas, C; Gutiérrez-Miceli, F; Castañón-González, H; Marsch, R; Ayora-Talavera, T y Dendooven, L. (2010) The bacterial community in “taberna” a traditional beverage of Southern Mexico. Letters in Applied Microbiology, vol. 51, pp. 558–563.
- Almanza F. y Barrera E. (1991). Tecnología de leche y derivados. Bogotá Unisur, vol. 6, pp. 61-66.
- Amoa-Awua, W.K.; Sampson, E y Tano-Debrah, K. (2007). Growth of yeasts, lactic and acetic bacteria in palm wine during and fermentation from felled oil palm (Elaeis guineensis) in Ghana. Journal of applied microbiology, vol. 102, pp. 599-606.
- Ananou, A; A-Muñoz, A; A-Gálvez, C; Martínez-Bueno, A; M-Maqueda, A y Valdivia, A. (2008). Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. International DailyJournal, vol. 18, pp. 923-927.
- Ananta E; Birkeland, S. E; Corcoran, B. M. y Fitzgerald, G. (2004). Processing effects on the nutritional advancement of probiotics and prebiotics. Microbial Ecology in Health and Disease, vol. 16, pp. 113-124.
- Ananta, E; Volkert, M y Knorr D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried Lactobacillus rhamnosus GG. International Dairy Journal, vol. 15, pp. 399-409.
- Arribas, M y Polo C. (2008). Ocurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. Food Microbiology, vol. 25, pp. 875-881.
- Axelsson, L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. . New York. A. Editorial Marcel Dekker, vol 2, pp. 1-66.
- Balik, Michael J. (1990). Production of coyol wine from Acrocomia Mexicana (Arecaceae) in Honduras. New York.
- Barakar-R, K; Griffiths-M, W y Harris-L. J. (2000). Isolation and characterization of Carnobacterium, Lactococcus and Enterococcus sp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. Unt. J. Food Microbiol, vol. 62, pp. 83-94.

- Bassir, O. (1962). Observation of Palm wine. West Afr. J. Biol. Appl. Chem. vol. 6, pp. 20-25.
- Bedolla-B, Salvador. (2004). Introducción a la Tecnología de los Alimentos. México: Editorial Limusa, pp. 78.
- Bellows-R, J. y King-C, J. (2003). Product collapse during freeze-drying of liquid foods. AICHE Symposium Series. vol. 69, pp. 33-41.
- Bertrand-Harb, I; V-Ivanova, M; Dalgalarondo, Y y T. Haertllé. (2003). Evolution of g-lactoglobulin and g-lactoalbumin content during yogurt fermentation. International Dairy Journal, vol. 13, pp. 39-45.
- Bhandari-B, R; Datta, N. y Howes, T. (1997a). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. Drying Technology, vol. 15, pp. 671-684.
- Blanco, S; Delahaye, P. y Frangeas, N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. Revista Facultad de Agronomía (Maracay) Venezuela. vol. 32, pp. 131-144.
- Bouzar, F; Cerning, J. y Desmazeaud, M. (1997). Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. Journal Dairy Science. vol. 80, pp. 2310-2317.
- Cabrera-Chacón, T. (1991). Plantas de Chiapas: usos, valores e importancia. El Coyol. No.6, Yashte del IHN. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. pp .14.
- Castro, L. y Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. Colonia Médica. vol. 37, pp. 15-22.
- Delgadillo, F; De-Roissart, H; Torriani, S; Curk-M, C. y Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques en: Bactéries lactiques. De Roissart, H., Luquet, F. M. (Eds.) vol 1, Loriga, France. pp. 25-27.
- Desai, K. y Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. Drying Technology Journal. vol. 23. pp.1361-1394.
- Devlieghere, F; Vermeiren, L. y J-Debevere, J. (2004) New preservation technologies: Possibilities and limitations. Review International Dairy Journal, vol. 14, pp. 273-285.

- Duboc, P. y Mollet, B. (2001). Aplications of exopolusaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal. vol. 11, pp. 759-768.
- Faparusi, S. I. (1972). A biochemical study of palm-wine from different varieties of Elaeis guineensis. Ph.D. Thesis, University of Ibadan, Nigeria.
- Gálvez, A; Hikmate, A; Lucas-L, R. y Nabil-B, O. (2007). Bactericin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology. vol. 120, pp. 51-70.
- Genin, N. y Rene F. (1995). Analyze du role de la transition vitreuse dans les procedes de conservation agro-alimentarie. Journal of Food Engineering. vol. 26, pp. 391-407.
- Ghasemi, M; Najafpour, G; Rahimnejad, M; Beigi, P.A; Sedighi, M. y Hashemuyeh, B. (2009). Effect of different media on production of lactic acid form whey by Lactobacillus bulgaricus. African Journal of Biotechnology, vol. 8, pp. 81-84.
- Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. vol. 87, pp. 175-188.
- Hartley, C.W.S. (1984). The oil palm, Elaeis guineensis Jacq. London: Longman Group Ltd. (2ed), pp. 600-603.
- Hernandez-M. Adrian; J, Victor; Angulo, Jesus O; y Garcia, Hugo S. (2007). Preparation of a whey-bases probiotic product with Lactobacillus reuteri and Bifidobacterium bifidum. Journal Food Technology Biotechnological, vol. 45, pp. 27-31.
- Hill, C; Okeeffe, T; y Ross, P. (2002). Antimicrobial factors produced by lactic acid bacteria. Enciclopedia of Food Sciences and nutrition, vol. 14, pp. 273-285.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and mead products. Meat Sci. vol. 49, pp. 139-150.
- Hugenholtz, J. (2008). Review the lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredients production. International Dairy Journal. vol. 18, pp. 466-475.
- Hui, Y. (1993). Dairy Science and Technologyn Handbook, Product Manufacturing. Washington: VCH publishers, vol. 2, pp. 121.
- Jagnow, G. y Wolfgang, D. (1991). Introducción con experimentos modelo. Ed. Zaragoza; Acribia. pp. 157-167.

- Jay J. M. (2000). Microbiología moderna de los alimentos. 4ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza. España. vol. 19, pp. 106-108, 441-475.
- Jouppila, K. y Roos, Y. H. (1994b). Glass transitions and crystallization in milk powders. Journal of Dairy Science. vol. 77(7), pp. 2907-2915.
- Jouppila, K. y Roos, Y. H. (1994a). Water sorption and time-dependent phenomenon of milk powders. Journal of Dairy Science. vol. 77(7), pp. 1799-1807.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their affect on the sensory properties of yogurt. LWT. vol. 39. pp. 1221-1227.
- Laws, Y; Gu, Y. y Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Biotechnology Advances. vol. 19, pp. 33-45.
- Leveau, J. Y. y Bouix, M. (2000). Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 167-187, 206, 227-242.
- Lin, T. y Chang, M. (2007). Exopolysaccharides production as effected by lactic acid bacteria and fermentation time. Food Chemistry. vol. 10, pp. 1419-1423.
- Macedo, M. G; C-Lacroix, N; Gardner, J. y Champagne, C.P. (2002). Efect medium supplementation on exopolysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus RW-959M in whey permeate. International Dairy Journal of Biotechnology. vol. 12, pp. 211-217.
- Madrigan-M, T; Martinko-J, M. y Parker, J. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. Madrid, España. 10ª ed. Ed. Prentice Hall. pp. 122, 352, 400-402, 991.
- Maldonado-Mares, G. (1992). Frutas Tropicales de Tabasco, Centro de Investigación de Ciencias Biológicas Unidad Sierra. Editorial Impresory Distribuidora S.A., Villahermosa, Tabasco. pp.100.
- Mansfield, M. L. (1993). An overview of theories of the glass transition. In J.M.V. Blanshard P.J. Lillford (Eds.), The glassy state in foods. Nottingham University Press, Leicestershire. pp. 103-122.
- Masters, K. (1985). Spray Drying Handbook. Longman Scientific & Technical. Essex.

- Mathot, E; Beliard, E. y Thuault, D. (2003). Streptococcus thermophilus 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of clostridium tyrobutyricum in hard cheese. Journal Dairy Science, vol. 86. pp. 3068-3074.
- Mc-Currach, C. (1977). Palms of the world. Harper Brothers. New York, USA. pp. 45.
- Miran, F. (1975). La vegetación de Chiapas. Ediciones del Gobierno del Estado. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. vol 1, 2ª. Edición. pp 235-236.
- Miravet, Gracia. (2009). Secado por atomización de zumo de granada. Tesis presentada para optar el grado de Máster en Ingeniería Ambiental y Procesos Químico y Biotecnológicos, Universidad Politécnica de Cartagena.
- Moreno, M. y Polo M. (2008). Ocurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. Food microbiology. vol. 25, pp. 875-886.
- Neira, E. y López, J. (2001). Guía técnica para la elaboración de productos lácteos. Bogotá, Colombia: litografía Enzas Ltda. pp. 33-45.
- Ogbulie, T.E; Ogbulie, J.N; y Njoku, H.O. (2007). Comparative study on the microbiology and shelf life stability of palm wine from Elaeis guineensis y Rhapsia hookeri obtained from Okigwe. Nigeria.
- Okafor, N. (1975b). Microbiology of Nygerian palm wine with particular reference to the bacteria. Journal of Applied Bacteriology. vol. 38, pp. 81-88.
- Okafor, N. (1972). Palm wine yeast from parts of Nigeria. J. Food Sci. Agric, vol. 23, pp. 1399-1407.
- Okafor, N. (1975a). Preliminary microbiological studies on the preservation of palm wine. Journal of Applied Bacteriology, vol. 38, pp. 1-7.
- Okafor, N. (1977). The microbiological method from palm wine preservation. J. Appl.Bact. vol. 43, pp. 159-161.
- Olson, D. y Aryana, K. (2008). An excessively high Lactobacillus acidophilus inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. LWT. vol. 41, pp. 911-918.

- Osorio, L. y Roldan, J. (2003). Volvamos al campo. Lácteos y derivados. Ed. Ltda. Bogotá Grupo latino, pp. 44.
- Panesar, P. John, F; Kennedy, Dina; N, Gandhi; y Katarzyna, Bunko. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production a review. Food Chemistry. vol. 105, pp. 1-14.
- Parra, R; Rodríguez, J. y Martínez, G. (2008). Efecto de la stevia y gelatina como aditivos en la elaboración de un yogurt probiótico durante el periodo de incubación. En: 4 Coloquio Internacional y Nutrición. Universidad de Antioquia. pp. 53.
- Pescumma, M; Héber, Elvira-M. y Mozzi, Fernanda. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. Food Microbiology. vol. 25. pp. 442-451.
- Prescott, L. M; Harley, J. P; y Klein, D. A. (1997). Microbiología. 4ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Zaragoza. España. pp. 515-518.
- Reddy, G; Altar, M; Naveena, B. J. y Venkateshwar, M. (2007). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation a review Biotechnology advances. vol. 32. pp. 456-463.
- Roos, Y. H; Karel, M. y Kokini J. L. (1996). Glass transition in low moisture and frozen foods: effect on shelf life and quality. Food Technology. pp. 95-108.
- Ross, P; Morgan, S. y C-Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: ast, present y future. International Journal of Food Microbiolog. vol. 79, pp.3-16.
- Ryan, L; Bello, F. y Arendt, E. (2008). The use of sourdough fermented by antifungal BAL to reduce the amount of calcium propionate in bread. International Journal of Food Microbiology. vol. 23, pp. 875-881.
- Senoussi, A; Dumoulin, E. D; y Berk, Z. (1995). Retention of diacetyl in milk during spray-drying and storage. Journal of food Science, vol. 60(5), pp. 894-905.
- Serna, L. y Rodriguez, S. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico. Estado del arte. Ciencia y Tecnología Alimentaria. vol. 1, pp. 55-65.

- Shene, C. y Bravo, S. (2006). Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* for exopolisaccharide production in continuous culture. Enzyme and Microbial Technology, vol. 10, pp. 1006-1015.
- Uzochukwuru, Bua; Balogh, Fe y Ngoddy, P. (1972). Standard pure culture inoculums of natural fermented Palm sap. Nig. J. Microbiol. vol. 9, 67-77.
- Uzogara, Sg; Agu, L y Uzogara, E.O. (1990). A review of traditional fermented food condiments and beverages in Nigeria. Their Benefits and possible problems. Ecol. Food Nutrient, vol. 24, pp. 267-288.
- Vazquez, J. y Murado, M. (2008). Enzymatic hydrolysates from food wastewaters as a source of peptones for lactic productions. Enzyme and Microbial Technology. vol. 43. pp. 66-72.
- Walker, S. T. (2000). Microbiología. 1ª ed. Ed. McGraw Hill Interamericana. México, DF. pp. 3001-302.
- Wang, Y. C; Yu, R. C. y Chou, C. C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydratation and storage. International Journal of Food Microbiology. vol. 93, pp. 209-217.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941). Isolierung and cristallisation of Garungs ferments. Biochemische Zeitschrift. vol. 310. pp.384-421.
- WEINBERG Z., MUCK R. Y WEIMER P. (2003). The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen Fluid. Journal of Applied Microbiology. vol. 94, pp. 1066-1071
- WHORTON C. Y REINECCIUS G. A. (1995). Evaluation of the mechanisms associated with the release of encapsulated flavor materials from maltodextrin matrices. In S. J. Rish and G. A. Reineccius (Eds.), Encapsulation and controlled release of food ingredients. pp. 142-159. ACS Symposium Series 590.
- Yáñez, J; Salazar, J; Chaires, L; Jiménez, J; Márquez, M. Y Ramos E. (2002). Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. Avance y Perspectiva. vol. 21, pp. 313-319.