



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**INFORME TÉCNICO
DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

MARGARITA RAMÍREZ GUZMÁN

NOMBRE DEL PROYECTO:

**“Evaluación de la sobrevivencia y resistencia
gastrointestinal de *Lactobacillus plantarum* secada por
aspersión”**

NOMBRE DEL ASESOR:

M.C. LUCÍA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO

1. RESUMEN

En los últimos años los alimentos funcionales con microorganismos probióticos han recibido mucha importancia, ya que el consumo tiene efectos benéficos a la salud humana, cuando resisten en una cantidad adecuada y viable al tracto intestinal. Por esta razón, la industria está mejorando procesos para que estos microorganismos no pierdan su viabilidad y cumplan su función.

La baja supervivencia a las condiciones gastrointestinales ha impulsado el desarrollo de técnicas de biopreservación como lo es la microencapsulación. La microencapsulación mediante secado por aspersión es una tecnología que ayuda a proteger a los probióticos de las condiciones ambientales adversas como la humedad, temperatura, calor y pH que pueden disminuir su viabilidad y que puede escalarse a bajo costo.

El presente trabajo muestra la importancia de los probióticos, y particularmente de *Lactobacillus plantarum* BAL-03. El objetivo de este proyecto fue estudiar la sobrevivencia de este microorganismo microencapsulado mediante secado por aspersión en una matriz de leche de soya-maltodextrina, así como su sobrevivencia en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Para ello, se cultivó *L. plantarum* BAL-03 en un reactor de taque agitado a diferentes condiciones de aireación, de agitación y Tween 80, y se secó por aspersión con leche de soya-maltodextrina a un flujo continuo de 9 mL/min y una temperatura interna de 160°C.

A los polvos obtenidos se les determinó el porcentaje de humedad y la actividad de agua (a_w). Mediante el método reportado por Picot & Lacrix (2004) se evaluó la resistencia gastrointestinal simulada. Además se evaluó la viabilidad durante 2, 4 y 8 meses a una temperatura de almacenamiento de 4°C.

Los resultados demostraron que la microencapsulación de probióticos protegió de manera efectiva a los microorganismos a la temperatura de 4°C. Las UFC/g obtenidas en esta prueba para los primeros 8 meses de almacenamiento están dentro de los parámetros establecidos para que sea considerado como un probiótico. Los valores de humedad de 5% a 7.5% y la a_w de 0.21 a 0.35 fueron

obtenidos respectivamente para los polvos durante el octavo mes de almacenamiento.

Con estos datos podemos mencionar que el uso de probióticos aunados a una matriz polimérica protegen la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* de las condiciones de estrés generados durante el proceso de microencapsulación y permiten mantener una sobrevivencia de entre 85 y 95 % y resistencia gastrointestinal simulada de entre 75% y 95% durante los octavo mes de almacenamiento a 4 °C.

2. ÍNDICE TEMÁTICO

| TEMA | PÁGINA |
|--|--------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ÍNDICE TEMÁTICO | 3 |
| 3. ÍNDICE DE TABLAS..... | 5 |
| 4. ÍNDICE DE FIGURAS | 6 |
| 5. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 6. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO | 9 |
| 7. PROBLEMAS A RESOLVER | 10 |
| 8. OBJETIVOS..... | 11 |
| 8.1 General..... | 11 |
| 8.2 Específicos | 11 |
| 9. JUSTIFICACIÓN..... | 12 |
| 10. MARCO TEÓRICO | 14 |
| 10.1 Probióticos..... | 14 |
| 10.1.1 Mecanismo de acción | 18 |
| 10.1.2 Microorganismos utilizados como probióticos | 20 |
| 10.1.2.1 Género <i>Lactobacillus</i> | 24 |
| 10.1.2.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> | 27 |
| 10.2 Criterios para la evaluación de los probióticos..... | 28 |
| 10.3 Microencapsulación: como estrategia de conservación de microorganismos probióticos | 28 |
| 10.3.1 Caracterización de las microcapsulas..... | 29 |
| 10.3.2 Secado por aspersion | 31 |
| 10.3.3 Agentes encapsulantes | 32 |
| 10.4 Vehículos para probióticos en panificación | 33 |
| 10.4.1 Leche en polvo | 35 |
| 10.4.2 Harinas | 36 |
| 10.4.3 Empleo de probióticos en jugos | 36 |
| 10.4.4 Empleo de probióticos en lácteos fermentados | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 11. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 40 |
| 11.1 Material biológico..... | 40 |
| 11.2 Sistema de fermentación..... | 41 |
| 11.3 Centrifugación de la biomasa..... | 43 |
| 11.4 Preparación de los agentes encapsulantes..... | 43 |
| 11.5 Preparación de la emulsión a secar..... | 43 |
| 11.6 Secado por aspersión..... | 43 |
| 11.7 Determinación de viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> durante el almacenamiento..... | 44 |
| 11.8 Simulación gastrointestinal <i>in vitro</i> | 44 |
| 11.9 Determinación de a_w y porcentaje de humedad..... | 45 |
| 12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 46 |
| 12.1 Supervivencia de <i>L. plantarum</i> BAL-03 después de la microencapsulación mediante secado por aspersión..... | 46 |
| 12.2 Resistencia gastrointestinal simulada de <i>L. plantarum</i> durante el almacenamiento de los polvos..... | 49 |
| 12.3 Actividad a_w y porcentaje de humedad de microcapsulas durante su almacenamiento..... | 53 |
| 13. CONCLUSIONES..... | 59 |
| 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 60 |

3. ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | PÁGINA |
|---|---------------|
| Tabla 1. Retos involucrados en la incorporación de probióticos en alimentos | 16 |
| Tabla 2. Factores que afectan la viabilidad del probiótico durante el procesamiento y consumo | 17 |
| Tabla 3. Microorganismos empleados comúnmente como probióticos.. | 21 |
| Tabla 4. Bacterias lácticas probióticas existentes en el mercado a nivel mundial..... | 22 |
| Tabla 5. Criterios aplicados en la selección de bacterias probióticas para su uso humano | 23 |
| Tabla 6. Bacterias ácido lácticas lácticas homofermentativas y heterofermentativas | 26 |
| Tabla 7. Clasificación y características de algunos métodos de encapsulación | 31 |
| Tabla 8. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteo | 39 |
| Tabla 9. Bacterias lácticas utilizadas en diversos alimentos..... | 40 |
| Tabla 10. Condiciones de cultivo de <i>L. plantarum</i> BAL-03. Factores y niveles evaluados..... | 41 |
| Tabla 11. Tratamientos del diseño experimental Box Behnken | 42 |
| Tabla 12. Supervivencia de <i>L. plantarum</i> BAL-03 microencapsulado a los dos, cuatro y ocho meses de almacenamiento a 4°C..... | 47 |
| Tabla 13. Resistencia gastrointestinal simulada de <i>L. plantarum</i> BAL-03 después del secado por aspersion, a los dos, cuatro y ocho meses de almacenamiento | 50 |

4. ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA..... | PÁGINA |
|---|---------------|
| Figura 1 Población bacteriana a lo largo del tracto digestivo humano..... | 15 |
| Figura 2 Mecanismos de acción de los probiótico | 19 |
| Figura 3 La microbiota normal y los probióticos interactúan con el organismo anfitrión en actividades metabólicas | 20 |
| Figura 4 Distintos tipos de microcapsulas a) Esferica monopared b) Irregular monopared c) Monopared con varios núcleos d) Multipared con un núcleo e) Multipared con núcleo matricial altamente disperso en la matriz polimérica | 30 |
| Figura 5 Representación esquemática de una microcapsula | 30 |
| Figura 6 Supervivencia de <i>L. plantarum</i> BAL-03 microencapsulado durante el almacenamiento | 48 |
| Figura 7 Resistencia gastrointestinal simulada de <i>L. plantarum</i> BAL-03 después del secado por aspersión, dos, cuatro y ocho meses de almacenamiento. | 51 |
| Figura 8 Viabilidad de <i>L. plantarum</i> BAL-03 después del secado por aspersión..... | 52 |
| Figura 9 Viabilidad de <i>L. plantarum</i> BAL-03 durante la simulación gastrointestinal a los 2 meses de almacenamiento | 52 |
| Figura 10 Viabilidad de <i>L. plantarum</i> BAL-03 durante la simulación gastrointestinal a los 4 meses de almacenamiento | 53 |
| Figura 11 Viabilidad de <i>L. plantarum</i> BAL-03 durante la simulación gastrointestinal a los 8 meses de almacenamiento | 53 |
| Figura 12 Actividad acuosa de las microcapsulas | 55 |
| Figura 13 Humedad de las microcapsulas..... | 56 |
| Figura 14 Temperatura de las microcapsulas..... | 58 |

5. INTRODUCCIÓN

La evolución de los alimentos a lo largo del tiempo ha estado influenciado por los cambios políticos, culturales y sociales; sin embargo, en la actualidad el consumidor, está más preocupado por su salud y alimentación (Sanz et al. 2003).

La nutrición ha sido enfocado suministrar la cantidad idónea de alimentos que cubran los requerimientos nutricionales en una dieta bien balanceada, proveyendo al consumidos satisfacción y bienestar. Es por esto que ahora se están descubriendo atributos funcionales en muchos alimentos tradicionales y a su vez, desarrollando nuevos productos alimenticios con componentes benéficos a la salud. Dentro de la clasificación de los alimentos funcionales se encuentran los alimentos probióticos (Amores et al., 2004) que contienen bacterias probióticas.

Actualmente, uno de los retos para la tecnología alimentaria, respecto a la adición de probióticos en un alimento, es garantizar que dichos microorganismos lleguen vivos al intestino grueso, manteniendo el cultivo funcional con una concentración en el orden de 1×10^6 UFC/g al momento de su consumo.

Por lo tanto, se han investigado alternativas para evitar la pérdida y el daño a los probióticos, demostrándose que estos cultivos pueden preservarse significativamente mediante la encapsulación en una variedad de materiales e introduciendo a los microorganismos en una matriz o material de recubrimiento, para que su estabilidad metabólica y actividad funcional sea conservada.

Se han empleado distintas técnicas de encapsulación de probióticos. Estos métodos de encapsulación de acuerdo a la tecnología utilizada e insumos se pueden clasificar en: físicos, químicos y fisicoquímicos (Martín et al. 2009). Encontramos 3 métodos principales para encapsular: Secado por aspersion, extrusión y emulsificación. Secado por aspersion es el más utilizado en la industria de los alimentos y permite el uso de materiales termolábiles.

La preservación de microorganismos por diferentes metodologías de secado, se han utilizado durante décadas, uno de los métodos que se destacan es el secado por aspersion, más conocido como *spray dry*.

La microencapsulación por secado por aspersion y el uso de probióticos es una alternativa para proteger a los microorganismos de las condiciones deletéreas

(muerte) tales como jugos gástricos, biliares, oxígeno, pH, procesamiento, almacenamiento, obteniendo una supervivencia mayor y asegurando su llegada hasta el colon.

Debido a su alta tasa de funcionamiento, de fácil aplicación y bajo costo, además del alto grado de supervivencia de los microorganismos, el secado por aspersion, es una de las técnicas más prometedoras y favorables para la producción de probióticos secos (Papapostoulo et al. 2008). Por tanto es una opción para la preservación y la concentración de microorganismos.

Obtener probióticos secos por aspersion con número elevado de bacterias viables es deseable porque proporciona un buen almacenamiento, transporte y finalmente emplearlo para el desarrollo de alimentos funcionales (Ananta et al. 2004).

Algunos de los microorganismos utilizados pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*, también llamadas bacterias ácido-lácticas (BAL). Estas bacterias pueden considerarse el grupo bacteriano más ligado a los humanos. El término "Bacterium acidi lactici" se debe a Weigmamn que lo propuso en 1889 al definir las como bacterias que forman leche ácida a partir del azúcar de la leche (Fernández, 2000; Jay, 2000).

Éstas forman parte de la microbiota natural de muchos alimentos y no existe ninguna indicación de que represente un riesgo para la salud del consumidos, por lo tanto las BAL como algunos de sus metabolitos son considerado como GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA de EUA.

El objetivo del presente proyecto fue evaluar la sobrevivencia y resistencia gastrointestinal de *Lactobacillus plantarum* BAL-03 secada por aspersion y almacenada bajo condiciones de refrigeración.

6. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

El proyecto se llevó a cabo en laboratorios ubicadas dentro del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, particularmente en el Laboratorio de Microbiología (Laboratorio 3) del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustibles y en el Laboratorio de Investigación (Edificio D) del departamento de Postgrado e Investigación de ITTG, ubicado en carretera Panamericana km 1080, colonia Terán, con coordenadas 16°45'26.76"N 93°10'20.34"O.

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez que forma parte del Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos de México, cuya misión y visión son las siguientes:

- Misión: Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respecto al medio ambiente y apego a los valores éticos.
- Visión: Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

7. PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS

Lactobacillus plantarum, es una cepa autóctona que fue aislada de la “taberna” bebida fermentada del estado de Chiapas, cuyos estudios han demostrado importantes características probióticas. Para ser empleado con dicha función, es necesario establecer condiciones óptimas de producción para garantizar una elevada concentración celular del microorganismo, así mismo con la necesidad de conservar a *L. plantarum* durante su posterior aplicación, se propuso emplear la técnica de microencapsulación mediante secado por aspersión.

L. plantarum BAL-03 tiene una buena calidad probiótica, consiguiendo una adecuada supervivencia durante su almacenamiento al no ser adicionada a un vehículo alimenticio, y después de ser expuesto a condiciones gastrointestinales.

Asimismo, se podría permitir el inicio de estudios para la conservación de *L. plantarum* BAL-03 microencapsulado dentro de un alimento en polvo tal como leche, harinas, concentrado de bebidas etc. convirtiendo estos tipos de alimentos clasificados de manera convencional con alto valor nutritivo y sobre todo una fuente rica de probióticos. Así que estos nuevos alimentos ayudarían a mejorar la digestión y estimular las defensas naturales, sobre todo evitar la colonización del intestino por gérmenes patógenos.

8. OBJETIVOS

8.1 General

- Evaluar la sobrevivencia y resistencia gastrointestinal de *Lactobacillus* secado por aspersión y almacenado bajo condiciones de refrigeración.

8.2 Específicos

- Evaluar la viabilidad de *L. plantarum* BAL-03 después del microencapsulado, así como su estabilidad durante un periodo de 4, 6 y 8 meses en refrigeración (4 °C)
- Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo celular sobre la resistencia gastrointestinal simulada de *L. plantarum* BAL-03 después de la microencapsulación y durante los diferentes periodos de almacenamiento.
- Evaluar la actividad acuosa (a_w) y el porcentaje de humedad durante el almacenamiento de los polvos generados mediante secado por aspersión.

9. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad ha aumentado el interés de la relación que existe entre la alimentación y la salud. El crecimiento en los últimos años sobre el consumo de los alimentos funcionales se debe a que se le atribuyen diferentes propiedades benéficas para la salud humana si se consumen en cantidades adecuadas. (Arvanitoyannis, 2005). La industria alimentaria está efectuando una gran inversión en el desarrollo de este tipo de productos, que se refleja en el aumento de su presencia en los supermercados. Tenemos como ejemplos los alimentos probióticos, son alimentos funcionales que contienen bacterias probióticas vivas y entre ellos encontramos principalmente leches fermentadas. Nuevas investigaciones han demostrados que los quesos y helados son buenos vehículos para la incorporación de probióticos. (Ong et al. 2006).

De entre los microorganismos probióticos más importantes, con efectos demostrados a la salud, se encuentran a las bacterias ácido lácticas (BAL), fundamentalmente pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*.

Las bacterias ácido lácticas han sido importantes en los alimentos por su considerable contribución al valor de los productos; ellas juegan un papel muy importante en la salud y bienestar humano y animal, son los microorganismos más aprovechados como cultivos iniciadores en la producción de varios productos alimentarios como, queso, carnes fermentadas, pescados, vegetales y principalmente el yogurt, así como inoculantes para ensilados (Álvares, 2010). Con la demanda de los alimentos probióticos algunos beneficios que aportan son la intolerancia a la lactosa, infecciones estomacales, cáncer de colon, la estimulación de la respuesta inmunitaria, la mejora del equilibrio de la microflora intestinal, entre otros.

Los efectos benéficos de las bacterias ácido lácticos sobre la salud humana han sido ampliamente reconocidos y demostrados mediante numerosos estudios. Sin embargo su baja supervivencia a las condiciones gastrointestinales y escasa resistencia a las condiciones ambientales como el pH, el oxígeno, la temperatura, afectan de manera negativa a su calidad probiótica.

Por todo esto, se tiene la necesidad que de los microorganismos sean protegidos por una barrera física que eluda su exposición a las condiciones adversas del entorno.

En los últimos años, se han impulsado métodos para la biopreservación de los probióticos, entre estas técnicas se encuentra la microencapsulación de las BAL, estas protegen a las células conservando la sobrevivencia en el alimento. El secado de aspersion es un método de microencapsulación sencillo y económico en comparación con otros métodos. Se ha utilizado exitosamente para proteger diversos microorganismos en las condiciones adversas durante el almacenamiento y el tránsito por el tracto gastrointestinal. 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 por producto.

En este trabajo se evaluó la calidad probiótica de *Lactobacillus plantarum* BAL-03 microencapsulado con leche de soya mediante secado por aspersion cultivado a diferentes condiciones de crecimiento celular. Este microorganismo fue aislado de una bebida fermentada del estado de Chiapas “taberna” cuyos estudios previos ya han demostrado su capacidad probiótica in vitro e in vivo, por lo que se vuelve interesante poder mantener o elevar la calidad probiótica de este microorganismo.

10. MARCO TEÓRICO

10.1 Probióticos

La palabra probiótico se deriva de dos grandes palabras griegas: pro (a favor de) y bióticos (vida). Fuller (1989), conceptualizó a los microorganismos probióticos como "un suplemento alimenticio con microorganismo vivos que afecta benéficamente al huésped mejorando el equilibrio microbiano intestinal", este concepto logró mayor aceptación que la de Lilly y Stillwell (1965) refiriéndose a "una sustancia que estimula el crecimiento de otros microorganismos". Actualmente, la definición más reciente, y la más aceptada hasta nuestros días es la publicada por la FAO/WHO (2002) (Food and Agriculture Organization/ World Health Organization) la cual nos dice lo siguiente: "los microorganismos probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped" De acuerdo a lo anterior, los microorganismos probióticos son las bacterias "benéficas" que residen normalmente en el tracto intestinal y aunque la palabra bacteria se asocia generalmente con los gérmenes, las bacterias benéficas ayudan al cuerpo con la función de mantener la salud y combatir a las enfermedades (Dave & Shah 1998; Kailasapathy & Sultana, 2003)

Algunos requisitos que deben poseer los microorganismos probióticos son: estos microorganismos deben (Ramos- Cormezana et al., 2005; Saulnier et al., 2009):

- ✚ Estar correctamente identificados a nivel género, especie y cepa.
- ✚ Ser de origen humano por poseer mayor facilidad para colonizar el intestino humano.
- ✚ Carecer de patogenicidad, de factores de virulencia y de la capacidad de reproducir metabolitos indeseables.
- ✚ Estar reconocidos como seguros (término "GRAS" o "Generally Recognized as Safe").
- ✚ Mostrar tolerancia a las condiciones del entorno donde ejercen el beneficio
- ✚ Ser viables en el momento de su consumo, y que se verifique su funcionalidad probiótica en ensayos de intervención en humanos.

Fuller (1989) menciona que sólo podrá considerarse como probióticos, aquellos microorganismos presentes como células viables, preferentemente en grandes cantidades (10^6 a 10^8 UFC/g). De igual manera, se ha reportado que la cantidad en la que deben localizarse los probióticos en un producto, al menos al momento de su consumo, se encuentra en el orden de 1×10^7 UFC/g de microorganismo vivos (Guarner & Schaafsma 1998; Ouwehand & Salminen 1998; Ding & Shah 2007), para que de esta manera se pueda adjudicar los beneficios a la salud de los consumidores. Shah et al., (1995), menciona que para los productos comerciales que se consumen regularmente, el nivel mínimo sugerido de células viables de probióticos es de 1×10^5 UFC/g.

La población bacteriana en el estómago es baja ($<10^3$), debido al pH ácido en este sitio, ya que las secreciones ácidas, biliares y pancreáticas destruyen casi todas las bacterias que pasan por este lugar, por lo que, difícilmente, estas pueden incrementarse al llegar al intestino delgado, ya que el tiempo de tránsito es reducido (4 a 6 h). (Fig 1). El número de bacterias aumenta progresivamente de aproximadamente 10^4 células en el yeyuno a 10^7 UFC/g de contenido en el íleon distal. En el intestino grueso las bacterias se incrementan a niveles de 10^{11} a 10^{12} UFC/g, puesto que el tiempo de tránsito de este sitio hasta el recto es de 54 a 56 horas (World Gastroenterology Organization, 2008).

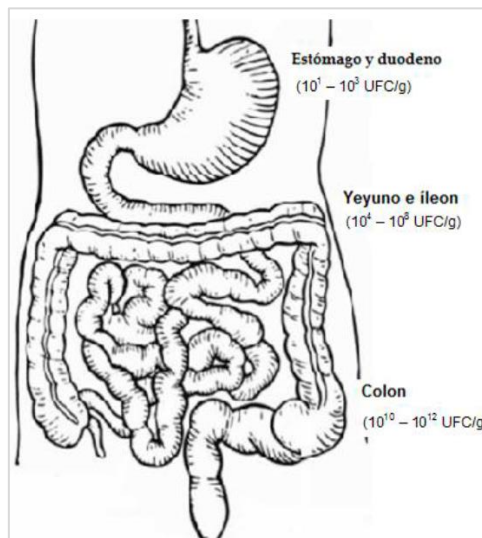


Figura 1 Población bacteriana a lo largo del tracto digestivo humano (adaptado de Holzapfel et al, 1998)

Se han estudiado la influencia del estrés, la acidez gástrica, las sales biliares, la sensibilidad a enzimas, los niveles de oxígeno, el pH, la presencia de inhibidores, la temperatura de almacenamiento y la composición de matrices de alimentos, sobre las pérdidas de la viabilidad y sobrevivencia de los microorganismos probióticos (Tabla 1).

Tabla 1. Retos involucrados en la incorporación de probióticos en alimentos

| Aspectos | Retos de los probióticos |
|---|---|
| Factores asociados en el procesamiento de alimentos | <ul style="list-style-type: none"> • El tratamiento con calor y el secado mejoran la vida anaquel de un alimento, pero son perjudiciales para la viabilidad de las bacterias probióticas. • La restricción de la multiplicación de células bacterianas probióticas, una vez adicionada al alimento, provoca deterioro del producto. <ul style="list-style-type: none"> • Las condiciones perjudiciales para la supervivencia de cultivos probióticos en productos lácteos fermentados por: acidez, pH, peróxido de hidrógeno, temperatura de almacenamiento, presencia de otras especies y cepas, concentración de los ácidos láctico y acético y presencia de la concentración de proteínas de suero de leche. |
| Exposición a ácido gástrico presente en el estómago | <ul style="list-style-type: none"> • La tolerancia a ácido es una cualidad importante que una cepa probiótica debe poseer porque el pH gástrico está alrededor de 2,0. Esta tolerancia puede ser mejorada por diversas vías: regulación de los genes responsables para la protección al estrés y por adaptación al medio ambiente ácido. |
| Exposición a sales biliares presentes en el fluido intestinal | <ul style="list-style-type: none"> • La capacidad de supervivencia en el tránsito mediante el intestino delgado y la tolerancia hacia sales biliares presentes. • Algunas cepas son capaces de desconjugar los ácidos biliares usando la enzima hidrolasa sal biliar. |
| Intolerancia al oxígeno de cepas probióticas | <ul style="list-style-type: none"> • El contenido de oxígeno y el potencial redox del medio ambiente son muy importantes para la viabilidad de los probióticos. • Las cepas probióticas anaerobias son directamente afectadas por la presencia de oxígeno en el ecosistema microbiano intestinal y en condiciones de estrés oxidativo exógeno, causando extensión de la fase lag y limitación del crecimiento, morfología celular alterada y cambios en los perfiles de ácidos grasos celulares. |

Fuente: Singh et al., 2007; Kailasapathy et al., 2006; Stanton et al., 2003; Ahn et al., 2001; Shah et al., 2000.

Los retos más importantes actualmente en cuanto al desarrollo de los alimentos probióticos desde el punto de vista tecnológico son, la viabilidad y estabilidad de éstos a lo largo de la cadena de distribución, desde la producción del alimento hasta su llegada al sitio de acción, es decir hasta el intestino (Guevara, 2008; Puuponen et al, 2002). La Tabla 2, resume los factores que afectan la viabilidad de los probióticos durante el procesamiento y consumo.

Tabla 2. Factores que afectan la viabilidad del probiótico durante el procesamiento y consumo

| Etapas de procesamiento | Factor de inhibición |
|--------------------------------------|--|
| Producción de Probióticos | Presencia de ácidos orgánicos en cultivos. Concentración- altas presiones osmóticas- baja a_w - altas concentraciones iónicas- temperatura- congelación- vacío- secado- aspersión. Almacenamiento prolongado- exposición al O_2 fluctuaciones de temperatura. |
| Adición de probióticos a un producto | Presencia de cepas antagonistas Agotamiento de nutrientes Incremento de acidez, potencial redox (presencia de O_2), presencia de compuestos antimicrobianos Ej: H_2O_2 , bacteriocinas. Temperatura de almacenamiento |
| Tránsito Gastrointestinal | Ácidos y jugos gástricos Sales biliares Antagonismo microbiano |

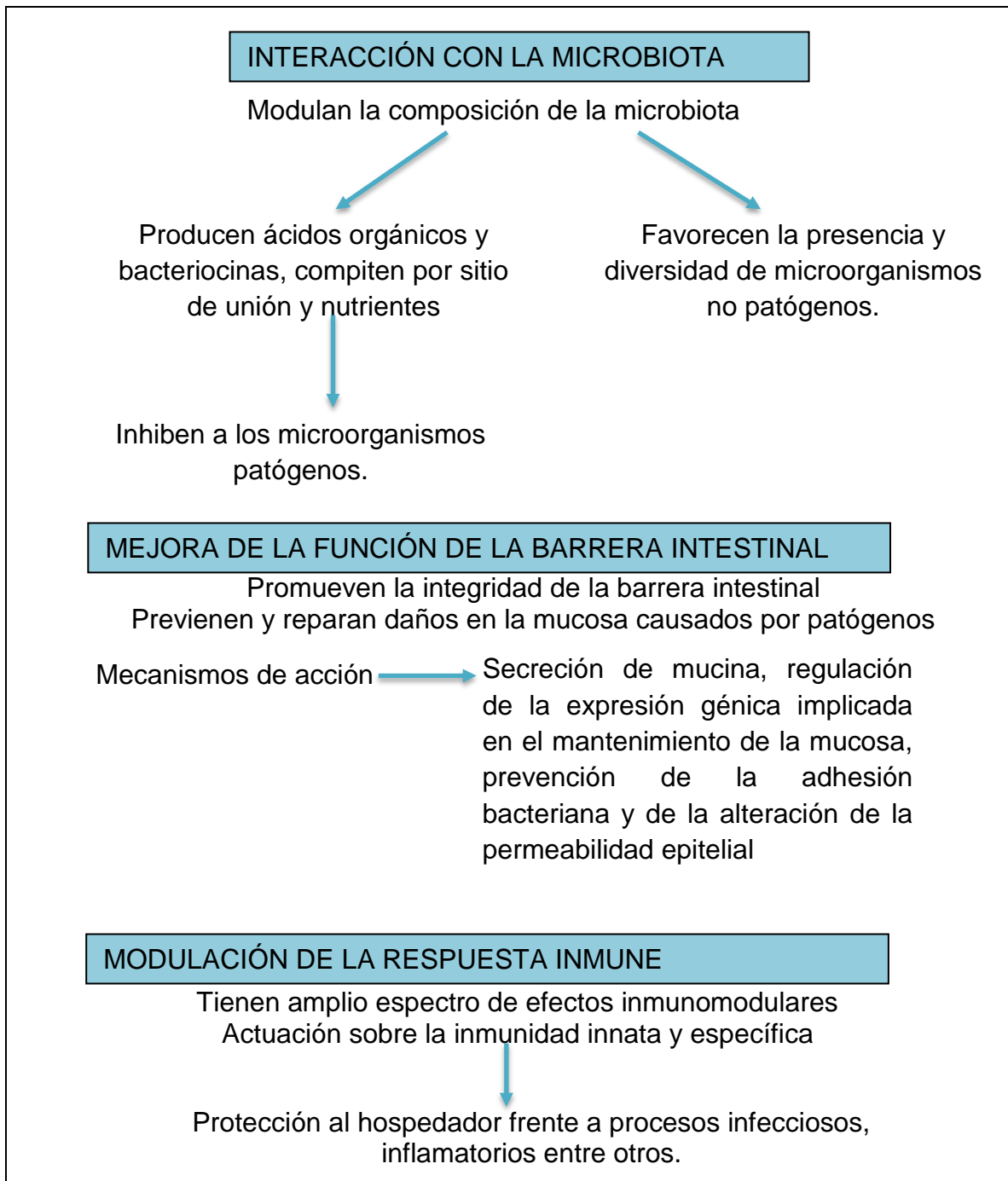
Fuente: Vasiljevic & Shah, 2008

10.1.1 Mecanismo de acción de los probióticos

Los probióticos pueden actuar en el huésped a distintos niveles (Correira et al, 2012):

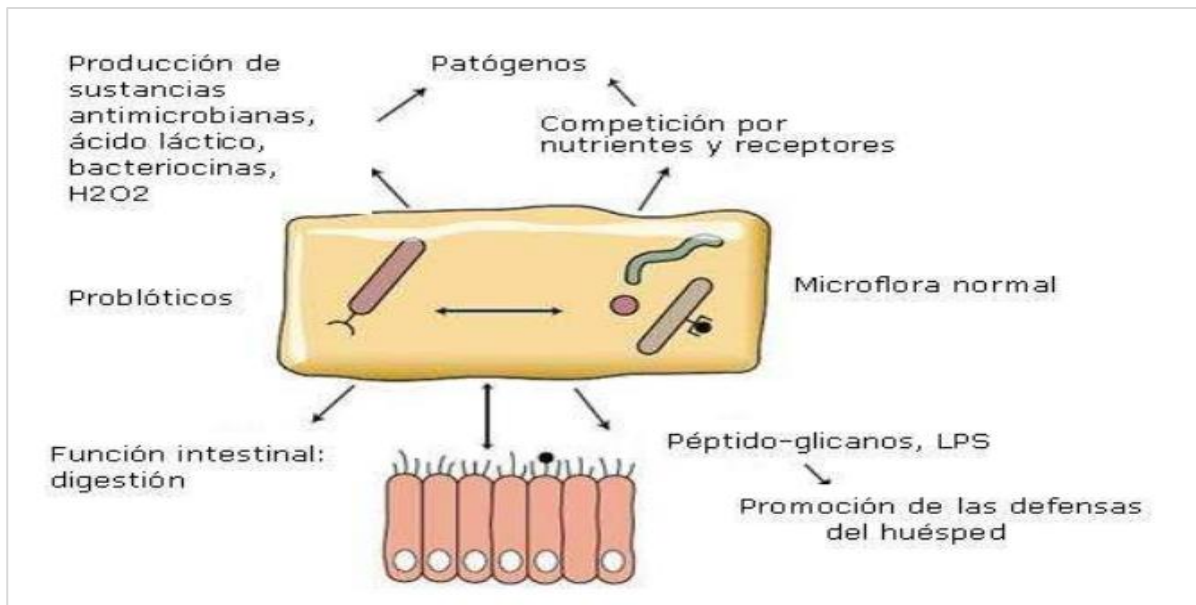
- Adhesión y colonización del intestino
- Los prebióticos afectan a las bacterias intestinales aumentando el número de bacterias anaerobias beneficiosas y disminuyendo la población de microorganismos potencialmente patógenos
- Actuación sobre el lumen intestinal, mediante interacción con la microbiota intestinal o ejerciendo un efecto metabólico directo
- Estimulación sobre la mucosa y epitelio intestinales, incluyendo los efectos de barrera los procesos digestivos y el sistema inmunológico asociado a la mucosa.
- Supresión del crecimiento o unión al epitelio por bacterias patógenas así como la producción de sustancias antimicrobianas
- Mejora la función de barrera intestinal
- Transferencia controlada de antígenos de la dieta
- Estimulación de la inmunidad de sistemática

En la figura 2 se observan los mecanismos de acción de los probióticos reportados por Correira et al., (2012), en la figura 3 se describen las interacciones entre la microbiota normal del organismo humano y los probióticos, reportados por la World Gastroenterology Organization (2008).



Fuente: Correira et al, 2012

Figura 2. Mecanismos de acción de los probiótico



Fuente: World Gastroenterology Organization, 2008.

Figura 3. La microbiota normal y los probióticos interactúan con el organismo anfitrión en actividades metabólicas

10.1.2 Microorganismos utilizados como probióticos: Bacterias ácido lácticas

La mayoría de los probióticos que se utilizan comercialmente en el mercado a nivel mundial pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Tabla 4). Dentro de los lactobacilos se diferencian cepas probióticas en las especies *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. plantarum* y *L. reuteri*, entre otras. Entre las bifidobacterias se encuentran cepas de las especies *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) (Tabla 3). Las bacterias lácticas pueden considerarse el grupo bacteriano más ligado a los humanos. Las bacterias lácticas o BAL son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiologías y metabólicas en común. Conforme lo definido por Carr et al., (2002) y Vázquez et al., (2009), en general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no espurados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos, oxidasa,

catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Además, las BAL son aerotolerantes, pero prefieren condiciones de anaerobiosis (Páez,2013).

Tabla 3. Microorganismos empleados comúnmente como probióticos

| Especie de Lactobacillus | Especie de Bifidobactirum | Otras bacterias ácido lácticas | Otras |
|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> | <i>B. adolescentes</i> | <i>Eneroccus faecium</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>L. casei</i> | <i>B. animalis</i> | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Saccharomyces cerevisae</i> |
| <i>L. crispatus</i> | <i>B. bifium</i> | <i>Leuconstoc mesenteroides</i> | <i>Saccharomyces bouurlardii</i> |
| <i>L. curvatus</i> | <i>B. breve</i> | <i>Pediococcus acidalactici</i> | |
| <i>L. delbrueckii</i> | <i>B. infantis</i> | <i>Streptococcus thermophilis</i> | |
| <i>L. farminis</i> | <i>B. lactis</i> | <i>Streptococcus diacetylactis</i> | |
| <i>L: fermentum</i> | <i>b. longum</i> | <i>Streptococcus intermedius</i> | |
| <i>L. gasseri</i> | <i>B. thermophilum</i> | | |
| <i>L. johsonii</i> | | | |
| <i>L. paracasei</i> | | | |
| <i>L. plantarum</i> | | | |
| <i>L. reuteri</i> | | | |
| <i>L. rhamnosus</i> | | | |

Fuente: Saad et al, 2013

Tabla 4. Bacterias lácticas probióticas existentes en el mercado a nivel mundial

| Cepas probióticas | Origen |
|--|-------------------------------|
| <i>Lactobacillus casei</i> Shirota | Yakult, Japón |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> CTV05 | Gynelogix, EEUU |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> MM53 | BioGaia, Suecia |
| <i>Lactobacillus casei</i> F19 | Arla Foods, Dinamarca/ Suecia |
| <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 | Danisco, Francia |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | Valio, Finlandia |
| <i>Propionibaacterium freudenreichii ssp. shermanii</i> JS | |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM | Rhodia, EEUU |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748 | |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> LA1 (NCC 533) | Nestlé, Suiza |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA10 (NCC 90) | Urex, Canadá |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> RC-14 | |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 | Danone, Francia |
| <i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001 | |
| <i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010 | Probi AB, Suecia |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v | |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 271 | Chr. Hansen, EEUU |
| <i>Lactobacillus casei</i> CRL 431 | |
| <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 | |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 | |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LBY27 | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31 | |

Fuente: Prado *et al.*, 2008

La mayoría de los probióticos son normalmente bacterias lácticas o Bifidobacterias, pero algunos géneros nuevos se están evaluando para el futuro. Estudiar cuales de estas bacterias tienen propiedades beneficiosas es de suma importancia económica y socialmente para la industria alimentaria y la salud pública respectivamente. Los criterios aplicados en la selección de bacterias probióticas se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Criterios aplicados en la selección de bacterias probióticas para su uso humano

| Propiedades | Criterio |
|---------------|---|
| Seguridad | <ul style="list-style-type: none"> Origen humano, provenir de personas sanas No patogénico. Generalmente reconocido con estatus seguro No tener conexión con bacterias que producen diarrea No tener habilidad para transferir genes con resistencia a antibióticos Estabilidad genética |
| Funcionalidad | <ul style="list-style-type: none"> Estabilidad de ácidos y bilis Resistencia a enzimas digestivas Sobrevivencia en el intestino humano y habilidad para adherirse a la superficie del intestino No invasivo Actividad antagonista contra patógenos humanos Producción de metabolitos antimicrobianos especialmente contra patógenos gram-negativos Actividad anticarcinogénica y antimutagénica Reducción de la respuesta inmune en caso de alergia Mejora de la biodisponibilidad de compuestos alimenticios y producción de vitaminas y enzimas Imunoestimulación pero no causante de efectos inflamatorios |
| Tecnológico | <ul style="list-style-type: none"> Buenas propiedades sensoriales Actividad fermentativa Buena supervivencia durante el proceso de liofilización y secado por aspersión Buen crecimiento y viabilidad de productos alimenticios Resistencia de fagos Alta estabilidad durante tiempos largos de almacenamiento. |

Fuente: Holtzapfel & Schillinger, 2002; Saarela et al, 2000; Olejnik et al., 2005).

10.1.2.1 Género *Lactobacillus*

“Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” clasifica al género *Lactobacillus* como “bacilos Gram-positivos no esporulado”, mesófilos, y que requieren medios complejos para su crecimiento.

La morfología de los lactobacilos es variable, desde bacilos largos, rectos o ligeramente curvados, hasta cocobacilos. Su longitud y curvatura depende de la edad del cultivo, la composición del medio y la tensión de oxígeno. La división celular de los lactobacilos tiene lugar en un solo plano, mientras que la tendencia a formar cadenas varía entre las distintas especies e, incluso, entre las distintas cepas, dependiendo de la fase de desarrollo y del pH.

El género *Lactobacillus* comprende bacterias inmóviles, aunque algunas especies se ha visto que son móviles por poseer flagelos peritricos. En cualquier caso su motilidad depende del medio y de la edad del cultivo, y sólo se observa en el momento del aislamiento, perdiéndose al resembrarlas en diversos medios de cultivo.

El género *Lactobacillus*, al igual que el resto de las bacterias lácticas, tiene necesidades nutritivas muy complejas ya que necesitan fuente de energía y de carbono, además de hidratos de carbono, aminoácidos y vitaminas.

Los medios empleados para el crecimiento de los lactobacilos cubren sus necesidades nutritivas y están constituidos por hidratos de carbono fermentables, extractos de carne y extracto de levadura. Además, la mayor parte de las especies necesitan otros compuestos específicos que favorezcan su crecimiento; en algunos casos son esenciales para el desarrollo, tal como ocurre con el jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico (especialmente Tween 80). Los compuestos citados, excepto el jugo de tomate, forman parte del medio de cultivo MRS (De Man et al., 1960) que es. Sin duda, el más utilizado para el crecimiento de los lactobacilos.

Los *Lactobacillus* crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6.4–4.5 y con un óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 3.6 hasta 4.0, y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Estos resultados varían con respecto a la especie

y cepa.

El género *Lactobacillus* es el más grande, comprendiendo alrededor de 80 especies reconocidas y organizadas en tres grupos, basados principalmente en las características fermentativas (Tabla 6). El grupo 1 incluye especies homofermentativas estrictas. El grupo 2 está formado por especies heterofermentativas facultativas. El grupo 3 está formado por especies heterofermentativas estrictas (Jay, 2000; Axelsson, 2004)

Hammes y Vogel hicieron una reorganización de las especies en tres grupos: A, B y C, basándose en caracteres moleculares y en las características fisiológicas. Con esta nueva clasificación las especies se agrupan en relación a sus características fenotípicas (letras mayúsculas) y la adscripción a cada uno de los tres grupos filogenéticos se indica con letras minúsculas (a, grupo I; b, grupo II; c, grupo III). Como ejemplo, *Lactobacillus casei* es Bb.

Grupo A. Homofermentativos estrictos. Incluye los lactobacilos del grupo I y algunas especies de otros géneros que son homofermentativos obligados, significando que solo pueden fermentar los azúcares por la glucólisis.

Grupo B. Heterofermentativos facultativos. Formado por lactobacilos del grupo II y la mayoría de especies de enterococos, lactococos, pediococos, estreptococos, tetragenococos y vagococos. Presentan una situación metabólica intermedia, normalmente se comportan como homofermentativos frente a las hexosas y heterofermentativos con las pentosas.

Grupo C. Heterofermentativos estrictos. Integrado por leuconostocs, lactobacilos del grupo III, oenococos y weissellas que son heterofermentativos estrictos. Solo pueden utilizar la ruta de las pentosas fosfato para la fermentación de azúcares.

Tabla 6. Bacterias ácido lácticas lácticas homo- y heterofermentativas

| Homofermentativas | | Heterofermentativas | |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Organismo | Configuración Lactato | Organismo | Configuración Lactato |
| <i>Lactobacillus</i> | | <i>Lactobacillus</i> | |
| <i>L.b acidophilus</i> | DL | <i>L.b brevis</i> | DL |
| * <i>L.b alimentarius</i> | L(D) | <i>L.b buchneri</i> | DL |
| <i>L.b bulgaricus</i> | D(-) | <i>L.b cellobiosus</i> | DL |
| * <i>L.b casei</i> | L(+) | <i>L.b coprophilus</i> | DL |
| * <i>L.b coryniformis</i> | DL | <i>L.b fermentum</i> | DL |
| * <i>L.b curvatus</i> | DL | <i>L.b fructivorans</i> | DL |
| <i>L.b delbrueckii</i> | D(-) | <i>L.b hilgardi</i> | DL |
| <i>L.b jensenii</i> | D(-) | <i>L.b trichoides</i> | DL |
| <i>L.b lactis</i> | D(-) | <i>Leuconostoc</i> | |
| <i>L.b leichmanii</i> | D(-) | <i>Leuc. cremoris</i> | D(-) |
| * <i>L.b plantarum</i> | DL | <i>Leuc. dextranicum</i> | D(-) |
| <i>L.b salvarius</i> | L(+) | <i>Leuc. lactis</i> | D(-) |
| <i>Pediococcus</i> | | <i>Leuc. mesenteroides</i> | D(-) |
| * <i>P. acidalactici</i> | DL | <i>Leuc. gelidum</i> | D(-) |
| <i>P. Cerevisiae</i> | DL | <i>Leuc. camosum</i> | D(-) |
| * <i>P. pentosaceus</i> | DL | <i>Leuc. argentinum</i> | |
| * <i>P. damnosus</i> | | <i>Leuc. Citreum</i> | |
| * <i>P. dextrinicus</i> | | <i>Leuc. fallax</i> | |
| <i>Tetragenococcus</i> | L | <i>Leuc.</i> | |
| <i>T. halophilus</i> | | <i>Pseudomesenteroides</i> | |
| <i>T. muriaticus</i> | | <i>Carnobacterium</i> | |
| <i>Streptococcus</i> | | <i>C. divergens</i> | |
| <i>S. bovis</i> | D(-) | <i>C. mobile</i> | |
| <i>S. thermophilus</i> | D(-) | <i>C. ganillarum</i> | |
| <i>Lactococcus</i> | | <i>C. piscicola</i> | |
| <i>Lc. Lactics subesp. cremoris</i> | L (+) | <i>Weissella</i> | |
| <i>Lc. Plantarum</i> | L (+) | <i>W. confusa</i> | DL |
| <i>Lc. Raffinolactis</i> | | <i>W. hellenica</i> | D(-) |
| <i>Vagococcus</i> | | <i>W. halotolerants</i> | DL |
| <i>V. fluvialis</i> | | <i>W. kandleri</i> | DL |
| <i>V. salmoninarum</i> | | <i>W. minor</i> | DL |
| | | <i>W. paramesenteroides</i> | D(-) |

Nota: DL= 25% al 75% del ácido láctico es de la configuración L; D o L= el isómero registrado constituye hasta el 90% o más del ácido láctico, D(L): ; L(D)= el isómero entre paréntesis representa hasta el 15-20% del ácido láctico total. *Bacterias heterofermentativas facultativas

Fuente: Jay, 2000

Es responsabilidad de la microflora intestinal, fundamentalmente las bifidobacterias y los lactobacilos, la producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico, como consecuencia de la fermentación de carbohidratos no digeribles.

Estos productos disminuyen el pH en el colon creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse. Los prebióticos constituyen el sustrato fundamental (el "alimento") de las bacterias probióticas.

Las bacterias probióticas, junto con los prebióticos que contribuyen a su crecimiento, se denominan "simbióticos". Ambos trabajan juntos en una sinergia promoviendo de manera más eficiente los beneficios de los probióticos.

10.1.2.2 *Lactobacillus plantarum*

Son del género Gram-positivas, no formadora de esporas, forman colonias de tamaño grande, cremosas, de color beige, con bordes homogéneos y cóncavas en agar MRS y homofermentativas. Su crecimiento óptimo ocurre a un pH de 6.0 con una temperatura de 36°C (Vásquez, 2009).

Lactobacillus plantarum se caracterizan por ser un microorganismo auxótrofo, porque no son capaces de sintetizar todos los factores de crecimiento, como las bases nitrogenadas, aminoácidos y vitaminas del complejo B, requiriendo un sustrato ácido; hacen parte de la microbiota de la leche, la carne, los vegetales, las frutas, los vinos, las mucosas intestinales.

En este proyecto se trabajó con la cepa *L. plantarum* BAL-03 elegida de una serie de cultivos del Laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, aislada de una muestra de taberna colectada en la Colonia Benito Juárez del municipio de Villaflores, Chiapas, México.

10.2 Criterios para la evaluación de los probióticos en alimentos

Los requisitos que ha de cumplir un microorganismo para ser considerado probiótico son: (Castro & De Rovetto, 2006).

- Formar parte de la parte microbiota del intestino humano
- No ser ni patógeno ni toxigénico
- Mantenerse viable en medio ácido del estómago y en contacto con la bilis en el duodeno
- Poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales del tracto gastrointestinal
- Adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar a la microbiota nativa ya existente
- Producir sustancias antimicrobianas
- Tener capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y las capacidades metabólicas

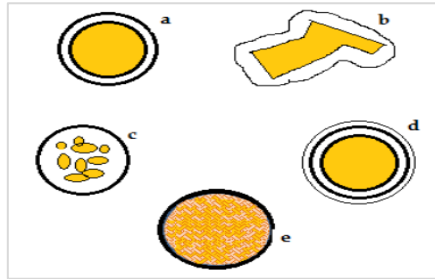
10.3 Microencapsulación: como estrategia de conservación de microorganismos probióticos

Actualmente, se emplean indistintamente los términos encapsulación y microencapsulación en las industrias cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades (Yáñez et al., 2002; Parra, 2011). López et al. (2008). De manera que se ha transformado en un proceso muy interesante en los últimos años, tanto para productos alimentarios como para compuestos químicos, fármacos o cosméticos, manteniendo el propósito de incrementar la estabilidad y la vida media o de anaquel de éstos (Fuchs y col., 2006; Reyes-Nava, 2010). La microencapsulación ha sido exitosamente utilizada para mejorar la sobrevivencia de microorganismos en los productos protegiendo componentes sensibles en los alimentos (Adhikari et al., 2000; Kailasapathy, 2006; Pimentel et al., 2009) y algunos factores ambientales (Weinbreck et al., 2010), por ejemplo calor, oxígeno y humedad (Semyonov et al., 2010), asegurándolos contra la pérdida nutricional. La encapsulación es un proceso en la cual un compuesto bioactivo es encapsulado por un biopolímero (Saénz et al., 2009), por la cual gotas

líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa, refiriéndose a micropartículas como aquellas que tiene un tamaño del orden entre 1 a 250 μm . Champagne y Fustier, (2007) definieron a la microencapsulación como “la tecnología empleada para la envoltura de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas capsulas que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo determinadas condiciones”. En la industria de los alimentos, las aplicaciones de esta técnica se han ido incrementando debido a la protección de los materiales encapsulados de factores como: temperatura, oxígeno, pH, enzimas, presencia de otros nutrientes, calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. El objetivo de este proceso es proteger al componente activo de las condiciones antes mencionadas.

10.3.1 Caracterización de las microcapsulas

Las microcapsulas son esféricas y semipermeables, constituidas por una membrana fuerte y delgada que cubre a un núcleo sólido o líquido, en este caso, una o varias células probióticas. Suelen ser esféricas, sobre todo para el caso de encapsulación de células probióticas, pero pueden tener una gran variedad de estructuras y geometrías. En función de las características fisicoquímicas de la célula del material activo, de la estructura del material de la pared y la técnica de microencapsulación empleada, se podrán obtener diversas estructuras tal y como se muestra en la Figura 4.



Fuente Reyes & Nava, 2010

Figura 4. Distintos tipos de microcapsulas a) Esferica monopared b) Irregular monopared c) Monopared con varios núcleos d) Multipared con un núcleo e) Multipared con núcleo matricial altamente disperso en la matriz polimérica.

La microencapsulación de las células probióticas permitirá a éstas lo siguiente:

- ✚ Resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal
- ✚ Viabilidad y eventual proliferación en el intestino
- ✚ Presentar actividad antagónica frente a patógenos in vitro e in vivo
- ✚ Sinergismos con cepas probióticas
- ✚ Viabilidad en el producto
- ✚ Capacidad comprobable de otorgar beneficios al huésped
- ✚ Capacidad de adherirse y colonizar fácilmente el tracto gastrointestinal compitiendo con patógenos

Fundamentalmente destaca que la permeabilidad de las microcapsulas permite el intercambio de nutrientes y metabolitos con el exterior, lo cual favorece el mantenimiento y funcionalidad de las células encapsuladas (Figura 5)

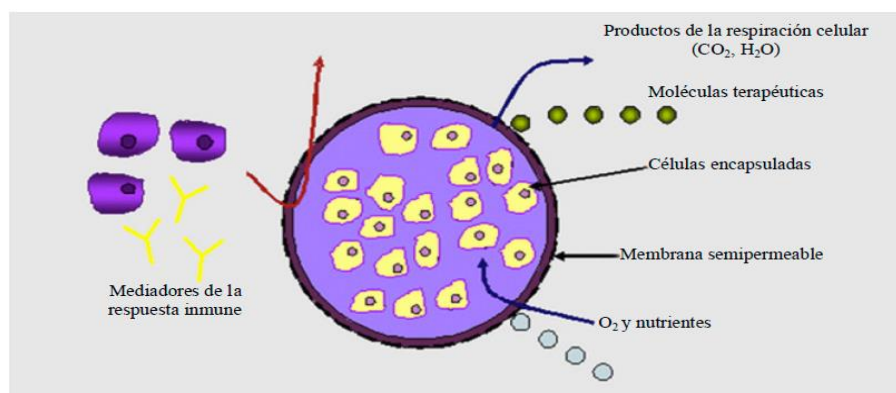


Figura 5. Representación esquemática de una microcapsula (Adaptado de Hernández et al., 2010)

Las técnicas más utilizadas para microencapsulación de microorganismos se citan en la Tabla 7.

Tabla 7. Clasificación y características de algunos métodos de encapsulación

| Tipo de técnica | Metodo de encapsulación | Tamaño de partícula (µm) |
|-----------------|----------------------------|--------------------------|
| Químicas | Coacervación simple | 20-200 |
| | Coacervación compleja | 5-200 |
| | Inclusión molecular | 5-20 |
| | Secado por aspersión | 1-50 |
| Mecánicas | Enfriamiento por aspersión | 20-200 |
| | Extrusión | 200-2000 |
| | Fluidización en lecho | >100 |

Fuente: Madene et al., 2006.

10.3.2 Secado por aspersión

En general el término de secado implica remover una cierta cantidad de agua del material, el principio del secado por aspersión es la producción de un polvo seco por medio de la atomización de una dispersión o emulsión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado, técnica controlado mediante la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura.

Chavéz et al., (2007) reportan que la microencapsulación mediante el secado por aspersión de probióticos tiene un importante objetivo: la preservación y viabilidad durante y después de secar los lactobacilos.

Para una mejor sobrevivencia de los microorganismos en el secado se debe cuidar mucho la temperatura de secado, puesto que una baja temperatura da como resultado un gran rango de sobrevivencia, (Favaro-Trindade &Grosso, 2002).

La microencapsulación por el método de secado por aspersión es el método más común de encapsulación de ingredientes alimenticios, como ejemplos se tienen: vitaminas (C, E), ácido fólico, aromas, orégano, citronela, aceite de cardamomo, bacterias probióticas, lípidos, ácido linoléico, aceites vegetales; minerales como

hierro; pigmentos de antocianina y leche entre otros alimentos (Wandrey *et al.*, 2010; Parra 2011).

Comparándolo con otros métodos, el secado por aspersión proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta, además de ser una técnica rápida, continua y relativamente sencilla con respecto a otros existentes, brinda principalmente la posibilidad de ser escalado hasta nivel industrial.

Entre las propiedades más importantes de los productos encapsulados mediante secado por aspersión se encuentra las siguientes: (Bhandari, 2008)

- Humedad: menor al 5% con una actividad de agua (a_w) de 0.15 a 0.30
- Densidad de partícula: 1.2-1.4 g/ml y está influenciada por la presencia de aire en las partículas.
- Tamaño de partícula: el tamaño promedio rango entre 5-150 μm , pero varía en función de la naturaleza del ingrediente activo y el proceso.
- Forma: la mayoría de las veces se obtiene esfera, pero depende del tipo de material y el proceso. La forma de los encapsulados influyen en el mezclado, fluidez y densidad de la partícula.

No obstante, existe un gran número de investigaciones basadas en este método que reportan resultados satisfactorios con mínimas pérdidas de viabilidad, lo cual indica que hay dos factores claves y determinantes para el éxito del secado por atomización: el tipo de materiales utilizados para encapsular y proteger a los microorganismos probióticos que involucran sus propiedades físico-químicas y la optimización de los parámetros utilizados en el secado.

10.3.3 Agentes encapsulantes

De acuerdo a Saéñz *et al* (2009) existen diferentes agentes encapsulantes que se han utilizado.

Polisacáridos: almidón, maltodextrina, jarabe de maíz y goma arábica

Lípidos: ácido esteárico, mono y diglicéridos

Proteína: gelatina, caseína, suero de leche, soya y trigo

En general para los alimentos que contienen probióticos encapsulados se ha utilizado ampliamente matrices porosas como: almidón, gelatina, maltodextrina, goma arábiga, entre otras (Charalampopoulos et al., 200; Lakkis, 2007)

La maltodextrina es un subgrupo muy importante de carbohidratos, éstas se obtienen por la hidrólisis de almidón. En general tiene una alta solubilidad en agua, baja viscosidad, sabor muy suave e incolora.

10.4 Vehículos para probióticos en panificación

En la actualidad, el concepto de nutrición ha evolucionado notablemente gracias a la investigación constante en ciertas áreas de interés. Los consumidores, conscientes de sus necesidades buscan en el mercado aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar. Así mismo se ve preceptivo que la prioridad de la industria es innovar, conocer y satisfacer los requisitos del consumidor. Siguiendo esta tendencia, reciben abundante información sobre las propiedades saludables de los alimentos, en especial de aquellos alimentos que ejercen una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad. Estos alimentos que promueven la salud han sido denominados Alimentos Funcionales (AF) y las empresas que los producen presentan una rápida expansión mundial.

Una variedad amplia de cepas probióticas se añaden a una serie de alimentos. Los probióticos se encuentran a menudo en productos lácteos, pero cada vez más se están incorporando en otros alimentos, como jugos, barras de granola, chocolates, cereales, etc. La mayoría de microorganismos probióticos son bacterias productoras de ácido láctico, que usualmente son parte de una flora intestinal saludable. Las cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son adicionadas comúnmente a los alimentos y suplementos. Las cepas *Enterococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces bolulardii* (levadura no patogénica) se venden comúnmente como suplementos, pero también pueden añadirse a los alimentos. La viabilidad de probióticos en los alimentos depende de varias condiciones encontradas durante el procesamiento y almacenaje. La pérdida de probióticos durante procesos térmicos depende de la habilidad de la cepa de resistir el calor

(Champagne, 2009). La mayoría de bacterias probióticas son sensibles al calor, de manera que su supervivencia durante los procesos térmicos es un obstáculo mayor. Por lo tanto el calor involucrado en el proceso de horneado puede generar pérdidas significativas en viabilidad durante el proceso productivo y el almacenamiento de pan. El pan es un alimento básico en muchos países, ya que constituye una importante fuente de hidratos de carbono complejos, proteínas, minerales y vitaminas (Rosell, 2007). En cuanto a la industria panadera, esa tendencia ha originado la elaboración de productos de panadería teniendo en cuenta el concepto saludable. Todos los productos integrales o los productos horneados enriquecidas en fibras caerían en esta categoría (Redgwell y Fischer, 2005). El pan funcional es un vehículo ideal para transmitir un mensaje de salud y además es un producto que se encuentra en la base de nuestra dieta.

Sin embargo, el pan funcional que contiene los microorganismos viables no ha sido completamente desarrollado debido a la alta temperatura alcanzada durante la cocción. A veces la supervivencia de muchas bacterias probióticas durante el procesado y almacenamiento es insuficiente y limita su utilidad en aplicaciones de alimentos. Por lo tanto, la alternativa para proporcionar microorganismos viables es la técnica de microencapsulación. La encapsulación protege probiótico de la degradación ambiental y fisiológica (Lian et al., 2002; Capela, Hay & Shah,). La viabilidad de probióticos en los alimentos depende de varias condiciones encontradas durante el procesamiento y almacenaje. Las condiciones de procesamiento durante la producción pueden dar lugar a pérdidas significativas de la viabilidad de probióticos debido al calor, lesiones celulares inducidas por estrés mecánico u osmótico (Bustos & Bórquez, 2013; Fu & Chen, 2011).

La mayoría de bacterias probióticas son sensibles al calor, de manera que su supervivencia durante los procesos térmicos es un obstáculo mayor. Por lo tanto el calor involucrado en el proceso de horneado puede generar pérdidas significativas en viabilidad durante el proceso productivo y el almacenamiento de pan. Así que por lo tanto, constituye un alimento potencial para la obtención de pan funcional que combina las tecnologías de microencapsulación. Actualmente, se están realizando estudios para confirmar el efecto probiótico de estos panes en estudios

in vitro e *in vivo*.

El pan parcialmente cocido es un producto alternativo que muestra una tendencia en expansión, debido a proporcionar pan fresco disponibles a toda hora del día (Rosell, 2009). Este pan sólo requiere una cocción corta para la obtención de pan horneado completo. Uno de los estudios que se ha realizado es la implementación de una estrategia para suministrar probióticos en pan con recubrimientos comestibles. (Altamirano Fortoul, Moreno-Terrazas, Quezada-Gallo & Rosell 2012).

Se muestra que la funcionalidad de recubrimientos comestibles depende de su composición (componentes de suspensión) y el procedimiento de revestimiento (monocapa, capa sucesiva o revestimiento de múltiples) en el producto. Específicamente, las capas sucesivas de los revestimientos a base de almidón y bacterias probióticas microencapsuladas se han aplicado en la superficie del pan precocido, seguido de un proceso de cocción corto. Así que ellos reportaron en 2012 que las barras de pan retienen cantidades relativamente altas de bacterias viables después del proceso de cocción ($2.4-3.05 \times 10^7$ UFC / g) y una pérdida que se observó de 1.0-1.4 log UFC / g después de 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente.

Se puede usar isomaltosa para la formulación de productos alimenticios que son sometidos a tratamientos térmicos, como las magdalenas (muffins) y cereales para el desayuno, para la protección del probiótico usado durante el proceso de horneado. (Radowski, 2006; Martínez-Cervera, Salvador & Sanz 2014).

10.4.1 Leche en polvo

En este tipo de alimento no se encuentra una información adecuada sobre la estabilidad de los probióticos en la leche en polvo y se dispone de poca información sobre la cuestión de la calidad de los probióticos después del secado por pulverización.

Durante el proceso de secado por pulverización se producen daños en las células y una pérdida de viabilidad del cultivo probiótico.

Aunque ciertas empresas que producen cultivos matrices tienen la tecnología necesaria para producir bacterias del ácido láctico liofilizadas, incluidos probióticos que están 'estabilizados' y por consiguiente conservan un alto grado de viabilidad durante el secado y el almacenamiento.

La incorporación de esos cultivos desecados en la leche en polvo podría ser el método elegido para preparar productos a base de leche en polvo que contengan probióticos.

Peak New Zeland (2015) ha desarrollado una fórmula para las leches en polvos, una enfocada para los niños y la otra para adultos. Los ingredientes que tiene son prebióticos y probióticos.

10.4.2 Harinas

Se había evaluado el uso de la harina de arroz como sustrato para el cultivo de *Lactobacillus casei*, encontrando que ésta favorecía el crecimiento de esta cepa, razón por la cual surgió la inquietud por elaborar una bebida funcional a partir de un hidrolizado de harina de arroz que incluyera un probiótico como *Lactobacillus delbrueckii* reconocido por sus beneficios terapéuticos (Chaparro et al., 2011).

10.4.3 Empleo de probióticos en jugos

Los probióticos han sido ampliamente desarrollados e incorporados en matrices lácteas. Sin embargo, las personas con intolerancia y alergia a la lactosa, vegetarianos e hipercolesteolémicos, no pueden ingerir este tipo de productos, surgiendo así la necesidad de desarrollar nuevos productos como bebidas y suplementos comprimidos (Prado et al 2008).

Así mismo se sabe que las frutas y verduras son una parte esencial de la nutrición humana. En particular, son ricas en agua, vitaminas (Vitamina C y vitaminas del grupo B), provitamina A, fitoesteroles, muestran una gran variedad de minerales y fitoquímicos. (R. Di Cagno et al., 2011). Por todo esto se convierten en una nueva opción para el desarrollo de alimentos funcionales probióticos. En los últimos años se han realizado varias investigaciones en diferentes tipos de preparaciones y microorganismos para el desarrollo de jugos funcionales.

Se logró evaluar la supervivencia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en jugo de naranja, piña y jugo de arándano. Los resultados mostraron diferencia entre las cepas y su nivel de resistencia a acidez. Todas las cepas sobrevivieron por más tiempo en el jugo de naranja y piña; mientras que *L. casei* DN-114 001, *L. rhamnosus* GG y *L. paracasei* NFBC43338 mostraron mayor crecimiento por encima de 10^6 UFC/mL al cabo de 12 semanas en los jugos de naranja y piña.

De igual manera se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de supervivencia de nuevas cepas de lactobacilos (*L. acidophilus* LB2, LB3 y LB45, *L. brevis* LB6, *L. rhamnosus* LB11 y LB24, *L. fermentum* LB32, *L. plantarum* LB42 y *L. reuteri* LB38) inoculados en una bebida de frutas comercial (Oasis Health Break: piña, manzana, naranja, pera, uva, maracuyá y limón; purés: melocotón, fresa, mango y kiwi) almacenada a 4°C durante un máximo de 80 días. El inóculo inicial fue aproximadamente 10^7 ufc/ml. las especies con mayor capacidad de supervivencia fueron *L. plantarum* LB42, *L. reuteri* LB38, *L. fermentum* LB32 y *L. rhamnosus* LB11 con poblaciones por encima de 10^6 ufc/mL al cabo de 80 días.

10.4.4 Empleo de probióticos en productos lácteos fermentados

Los productos lácteos fermentados hoy en día representan un papel fundamental en la alimentación humana e inciden de manera importante en el estilo de vida de las personas. Así que la leche es un alimento que recibe el hombre desde el momento que nace, y a lo largo de su vida; de acuerdo a su versatilidad y sus derivados, es un alimento indispensable para la mayoría de las culturas.

Debido a su consumo y a su composición nutricional, los productos lácteos son utilizados como vehículo para los microorganismos probióticos, entre los que pueden mencionar: leches fermentadas, yogurt, y quesos (Rowland, 2002).

Los productos lácteos son los vehículos de probióticos más comercializados actualmente; entre estos se encuentra el yogurt, leches fermentadas, kéfir, postres refrigerados y congelados (helados), quesos, entre otros. Es evidentemente que el más conocido a nivel comercial es el yogurt. Los cultivos probióticos pueden ser inoculados al iniciar la fermentación o ser adicionados al producto final de la fermentación.

Para lograr que el cultivo tenga éxito como probiótico, es necesario que este sea capaz de sobrevivir y desarrollarse en el medio durante la fermentación y el almacenamiento del producto (Vidal, 2006).

Para poder llevar acabo los beneficios a la salud, la batería probiótica debe estar viable y disponible en altas concentraciones con un límite $>10^6$ UFC/g en el producto (Vinderola et al., 2002).

Se han encontrado algunos factores responsables de la perdida de la viabilidad de los microorganismos probióticos en los alimentos tales como; acidez del producto, acidez producida durante el almacenamiento en refrigeración, nivel de oxígeno en los productos, sensibilidad a sustancias antimicrobianas producidas al producto.

Las principales funciones de las bacterias lácticas en productos lácteos son: la producción de ácido, la inhibición de microorganismos indeseables, la reducción de riesgos higiénicos, la coagulación de la leche, sinéresis del lactosuero, la reducción del contenido de azúcares, formación de aromas como los producidos por el diacetilo y acetaldehído en la mantequilla (Tabla 8).

Además, las BAL disminuyen la lipólisis, lo cual evita la rancidez en los productos lácteos (Lücke, 1995; Shirai et al., 1996; Garcia et al., 1998, Jay, 2000; Torres; 2000).

Tabla 8. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos.

| Productos | Bacterias principales | Usos |
|-------------------------------------|---|---|
| Yogurt | <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus thermophilus</i> | Provee sabor, gusto suave y delicado y promueve la cuajada mejora la digestión, absorción, contribuye a promover la salud |
| Bebidas fermentadas a base de leche | <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus herveticus</i> | Adiciona sabor, contribuye a promover la salud |
| Quesos | <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i> | Promueve el cuajado, provee aroma y sabor |
| Mantequilla madurada | <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i> | Promueve moderado sabor agrio y aroma |
| Crema ácida | <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Streptococcus lactis spp.</i> <i>diacetylactis</i> | Promover sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacetilo) |
| Yakult | <i>Lactobacillus casei</i> , | Promueve moderado sabor agrio y aroma. Contribuye a promover la salud. |

Fuente: Ramírez, et al., 2011.

Además del uso de las BAL en la elaboración de leches fermentadas y diversas variedades de queso; siendo éstas las aplicaciones principales, dicho tipo de microorganismos también son utilizados en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales para obtener productos tales como salchichas, jamones curados, vinos, licores, encurtidos entre otros productos (Tabla 8 y Tabla 9).

Tabla 9. Bacterias lácticas utilizadas en diversos alimentos

| Género | Principales especies y aplicaciones |
|------------------------|---|
| <i>Streptococcus</i> | <i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> . Mantequilla, queso yogurt <i>S. thermophilus</i> . Yogurt, queso |
| <i>Pediococcus</i> | <i>P. cerevisiae</i> . Cerveza, carne procesada <i>P. halophilus</i> . Salsa de soya |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citrovarum</i> . Alimentos fermentados, producción de dextran. |
| <i>Lactobacillus</i> | <i>L. bulgaris</i> . Yogurt, bebidas fermentadas a base de leche <i>L. helveticus</i> . Queso, yogurt, bebidas a base de leche fermentada <i>L. acidophilus</i> . Yogurt, bebidas a base de leche fermentada, preparación de <i>Lactobacillus</i> . <i>L. casei</i> . Quesos, leche refinada, bebidas a base de leche fermentada, preparación de <i>Lactobacillus</i> . <i>L. plantarum</i> . Diversos alimentos fermentados, ensilajes. <i>L. fermenti.</i> , <i>L. brevis</i> . Productos fermentados. |
| <i>Bifidobacterium</i> | <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> . <i>B. logum</i> , <i>B. adolescents</i> . Leche fermentada, preparación de bacterias lácticas. El intestino de infantes y adultos. <i>B. thermophilum</i> , <i>B. Pseudolongum</i> . El intestino de animales |

Fuente: Torres, 2002.

11. MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 Material biológico

Se utilizó *Lactobacillus plantarum* BAL-03, perteneciente a la colección de cultivos del Laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, cepa que se mantiene conservada en 40% (v/v) de glicerol a -18 °C. Los cultivos stock utilizados para cada unidad experimental se obtuvieron mediante la reactivación de *L. plantarum* BAL-03 utilizando caldo MRS (Difco®), un inóculo al 10 % (v/v) e incubación a 36°C durante 8 horas.

11.2 Sistema de fermentación

Para la cosechar de la biomasa a microencapsular se empleó un biorreactor de tanque agitado modelo Z611000310 (Applikon, Schiedam, The Netherlands) con capacidad de 3L. El biorreactor se equipó con los accesorios necesarios para el control de agitación, aireación, temperatura y pH. Todas las unidades experimentales se realizaron bajo geometría estándar y con el 75% de volumen operación usando caldo MRS (Difco®). La esterilización se realizó en autoclave a 12 libras durante 15 minutos. El medio se dejó a prueba de esterilidad a temperatura ambiente durante 24 horas.

El reactor se inoculó al 10% v/v en condiciones de esterilidad. La aireación se realizó utilizando una bomba de aire (7500 CO, HI-TECH, Meika) equipada con filtro y mediante un difusor tipo “L”. Para el control de la temperatura se utilizó una chaqueta de calentamiento (Z311020030, Applikon, Schiedam, The Netherlands). El pH se determinó mediante un sensor online (Z001023551, Applikon, Schiedam, The Netherlands) ajustándose constantemente con NaOH 1N.

Las condiciones de cultivo de *L. plantarum* BAL-03 en el fermentador se presentan a continuación (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones de cultivo de *L. plantarum* BAL-03. Factores y niveles evaluados.

| Factor | Nivel bajo (-) | Nivel medio (0) | Nivel alto (+) |
|--------------|----------------|-----------------|----------------|
| A: Aireación | 0.0 vvm | 0.25 vvm | 0.5 vvm |
| B: Agitación | 100 rpm | 200 rpm | 300 rpm |
| C: Tween 80 | 1 mL/L | 3 mL/L | 5 mL/L |

Las unidades experimentales evaluadas se muestran en seguida (Tabla 11).

Tabla 11. Tratamientos del diseño experimental Box Behnken.

| Tratamiento | Agitación (rpm) | Aireación (vvm) | Adición de Tween 80 (%) |
|-------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| 1 | 200.0 | 0.0 | 5.0 |
| 2 | 200.0 | 0.0 | 1.0 |
| 3 | 200.0 | 0.25 | 3.0 |
| 4 | 200.0 | 0.25 | 3.0 |
| 5 | 200.0 | 0.5 | 5.0 |
| 6 | 300.0 | 0.0 | 3.0 |
| 7 | 100.0 | 0.25 | 1.0 |
| 8 | 300.0 | 0.25 | 1.0 |
| 9 | 300.0 | 0.25 | 5.0 |
| 10 | 200.0 | 0.25 | 3.0 |
| 11 | 100.0 | 0.25 | 5.0 |
| 12 | 100.0 | 0.0 | 3.0 |
| 13 | 100.0 | 0.5 | 3.0 |
| 14 | 300.0 | 0.5 | 3.0 |
| 15 | 200.0 | 0.5 | 1.0 |

Para el desarrollo del experimento se utilizó el diseño experimental Box Behnken de 15 unidades experimentales, el cual procede de la metodología de superficie de respuesta con un diseño factorial 3^3 completo aleatorio con punto central.

11.3 Centrifugación de la biomasa

Se tomó 800 mL de caldo obtenido en el sistema anterior a las 8 horas de fermentación y se centrifugó en tubos Falcon® de 50 mL, previamente esterilizados, a 4000 rpm y 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se desechó en condiciones de esterilidad y la biomasa sedimentada se conservó.

Esta etapa se llevó a cabo justamente antes de la preparación de la emulsión.

11.4 Preparación de los agentes encapsulantes

Como agentes encapsulantes se utilizó maltodextrina (HYNAMALT), goma arábica (HYCEL DE MEXICO, S.A de C.V) e inulina (Preventy). Las soluciones de maltodextrina y goma arábica fueron preparadas por separado a una concentración de 35 y 7.5% (p/v) respectivamente, hidratadas durante 15 horas en agua purificada y posteriormente esterilizadas a 121°C durante 15 minutos.

11.5 Preparación de la emulsión a secar

Para la preparación de la emulsión en cada unidad experimental, se mezclaron 160 mL de leche de soya, 4 g de inulina como prebiótico, 80 mL de goma arábica al 7.5% (p/v), el pellet por centrifugación y 160 mL de maltodextrina al 35% (p/v). Cada componente se agregó uno a uno en el orden mencionado y mezclando con un homogenizador eléctrico IKA® T25 digital ULTRA-TURRAX® a 5200 rpm con un tiempo total de 15 minutos. Se conservó 1 mL de la emulsión resultante para su siembra en placa.

11.6 Secado por aspersión

La emulsión resultante de cada tratamiento se alimentó a un secador por aspersión escala laboratorio marca BÜCHI Mini Spray Dryer Modelo B-290 a una temperatura interna de 160°C y un flujo continuo de 9mL/min de acuerdo a Culej (2015). Las microcápsulas obtenidas se recuperaron del interior del ciclón y de la tolva de recepción, se pesaron para el cálculo del rendimiento del proceso, se conservaron en bolsas metálicas herméticas selladas al vacío y se almacenaron a 4°C.

11.7 Determinación de viabilidad de *Lactobacillus plantarum* durante el almacenamiento

La viabilidad en el polvo, se rehidrató 1 g de éste en 9 mL de agua peptonada estéril 15 g/L. La muestra fue agitada en un vortex hasta tener una suspensión homogénea, se realizaron diluciones seriadas según fue requerido.

Se llevó a cabo el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) y el porcentaje de sobrevivencia de *L. plantarum* BAL-03 después del proceso de secado por aspersión se determinó mediante la ecuación 1.

$$\text{Supervivencia \%} = \frac{\log N}{\log N_i} * 10^{\sim} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde N es el número de colonias presentes después del secado y Ni el número de colonias determinados en la emulsión.

La determinación de todas estas variables se realizaron para cada unidad experimental, inmediatamente después del secado, al primer, segundo, cuarto y octavo mes de almacenamiento.

11.8 Simulación gastrointestinal *in vitro*

La simulación gastrointestinal se llevó a cabo según el método reportado por Picot y Lacroix (2004). Para ello, se tomó 1 g de las microcápsulas y se suspendió con ayuda de un vortex en 9 mL de jugos gástricos. El cual consistió en una solución de pepsina (HYCEL) 0.27 g/L usando como disolvente HCl 0.1N a pH 1.9. Mismo que se filtró con una membrana de nitrocelulosa de 0.45 um y diámetro de 25mm (SIGMA-ALDRICH) antes de añadirlo al polvo. Se tomó 1 mL de esta mezcla para su siembra en placa y así determinar la viabilidad de *L. plantarum* BAL-03 al inicio de la prueba, correspondiente a la etapa gástrica.

La suspensión anterior se mantuvo durante 1 h a 37°C y 90-100 rpm usando una agitadora MarQ 2000 (Thermo Scientific). Después de dicho tiempo, se ajustó el pH hasta 7.5 con una solución de NaOH 1 N y se tomó 1mL de la suspensión para su siembra en placa.

Posteriormente, se adicionó 1.5 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio (0.5 M, pH 7.5) estéril, 1 mL pancreatina (HYCEL) disuelta en buffer salino de fosfato (0.02M y pH 7.5) a una concentración de 1.95 g/L y 2 mL de solución de sales biliares (FLUKA) 15g/L filtrados de la misma manera que los jugos gástricos. El volumen final de la suspensión resultante se aforó a 15mL con agua destilada estéril. Se procedió a incubar durante 6 h a 37°C y 90-100 rpm. Después de dicho tiempo, se realizó una siembra en placa para determinar la viabilidad de *L. plantarum* BAL-03 al final de etapa intestinal.

Todas las soluciones se prepararon al momento de su uso. Las siembras en placa se realizaron usando diluciones seriadas hasta el orden de 10^{-6} .

Se llevó a cabo el conteo de las UFC's y el porcentaje de sobrevivencia de *L. plantarum* BAL-03 de la simulación gastrointestinal se llevó a cabo con la ecuación 2.

$$\text{Supervivencia } \% = \frac{\log N}{\log N_i} * 100 \quad \text{.....Ecuación 2)}$$

Donde N es el número de UFC presentes en la última etapa de la simulación y Ni el número de UFC en la primera etapa.

11.9 Determinación de actividad acuosa y porcentaje de humedad

La actividad acuosa de las microcápsulas (*Aw*) se midió con un hidrómetro Rotronic HigoPalm modelo Aw-DIO. Se coloca una muestra del polvo dentro de una placa de Petri situándolo dentro del equipo y se efectúa la lectura.

El porcentaje de humedad se determinó mediante la NMX-F-026-1997 LECHE. DENOMINACIÓN. ESPECIFICACIONES COMERCIALES Y MÉTODOS DE PRUEBA.

12.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.1 Sobrevivencia de *L. plantarum* BAL-03 después de la microencapsulación mediante secado por aspersión

La Tabla 12 muestra los resultados alcanzados durante ocho los meses de monitoreo, se observa en general una sobrevivencia entre el 85-95%. Estos datos obtenidos, demuestran que el microorganismo tiene una gran resistencia en lo que respecta al estrés por secado y a su posterior almacenamiento en refrigeración.

La finalidad de este proyecto es cumplir con los estándares de viabilidad entre 1×10^5 y 1×10^8 UFC/g recomendados por autores como Fuller (1989); Shah et al., (1995); Guarner & Schaafsma (1998); Ouwehand & Salminen (1998); Ding & Shah (2007), estándares necesarios para que este microorganismo sea considerado un probiótico, en lo que respecta a “viabilidad”.

En la Tabla 12, se hace la exposición de los resultados obtenidos de los ciclos logarítmicos obtenidos hasta el octavo mes de almacenamiento. Por lo que se puede decir que sí se cumple con los estándares mencionados anteriormente.

Tabla 12. Supervivencia de *L. plantarum* BAL-03 microencapsulado, a los dos, cuatro y ocho meses de almacenamiento a una temperatura de 4°C

| Tratamiento | Después del secado | | A los 2 meses de almacenamiento | | A los 4 meses de almacenamiento | | A los 8 meses de almacenamiento | |
|-------------|--------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| | Supervivencia (%) | Viabilidad (Log ₁₀ UFC/g) | Supervivencia (%) | Viabilidad (Log ₁₀ UFC/g) | Supervivencia (%) | Viabilidad (Log ₁₀ UFC/g) | Supervivencia (%) | Viabilidad (Log ₁₀ UFC/g) |
| 1 | 98.31 | 10.89 | 93.68 | 10.2 | 91.67 | 9.98 | 97.80 | 10.28 |
| 2 | 89.52 | 11.60 | 100 | 11.81 | 93.63 | 10.86 | 93.70 | 10.87 |
| 3 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 4 | 101.17 | 10.83 | 91.99 | 9.98 | 92.94 | 10.06 | 91.05 | 9.91 |
| 5 | 96.14 | 11.08 | 96.97 | 10.74 | 96.9 | 10.74 | 90.71 | 9.87 |
| 6 | 97.60 | 11.23 | 97.1 | 10.9 | 100 | 11.49 | 98.78 | 11.03 |
| 7 | 99.57 | 10.91 | 98.32 | 10.73 | 93.34 | 10.19 | 95.09 | 10.16 |
| 8 | 93.06 | 11.01 | 89.08 | 9.8 | 96.96 | 10.68 | 86.27 | 8.80 |
| 9 | 95.44 | 11.93 | 91.22 | 10.88 | 88.91 | 10.61 | 87.77 | 9.80 |
| 10 | 91.52 | 10.79 | 94.79 | 10.24 | 93.07 | 10.05 | 92.67 | 9.87 |
| 11 | 90.24 | 10.93 | 95.95 | 10.48 | 90.09 | 9.85 | 101.64 | 10.37 |
| 12 | 85.35 | 10.94 | 98.89 | 10.82 | 96.92 | 10.6 | 91.84 | 10.79 |
| 13 | 91.18 | 10.21 | 99.12 | 10.12 | 96.17 | 9.82 | 93.61 | 9.20 |
| 14 | 89.58 | 10.78 | 99.83 | 10.76 | 95.08 | 10.25 | 90.96 | 9.72 |
| 15 | 92.14 | 10.92 | 81.37 | 8.9 | 87.25 | 9.53 | 91.84 | 8.93 |

NR=No realizado

En la Figura 6 se presentan las gráficas de sobrevivencia de *L. plantarum* BAL-03 microencapsulado, en algunos tratamientos se puede observar un ligero aumento, así como ligeras pérdidas en ciertos monitoreos.

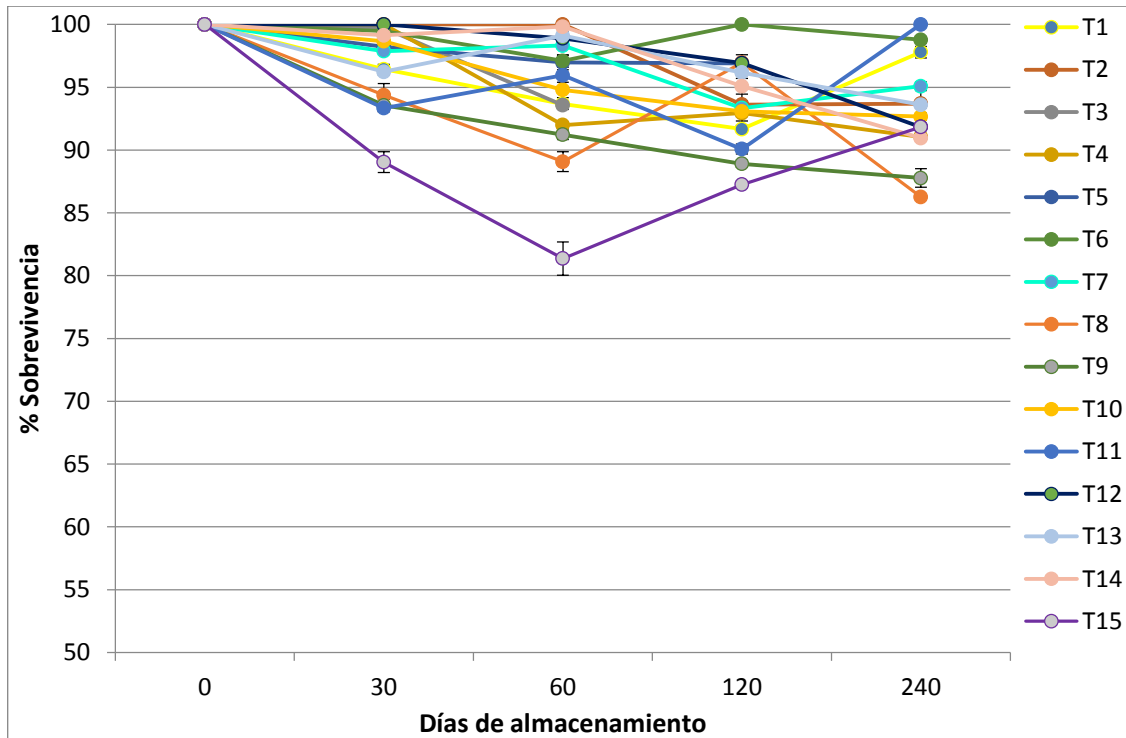


Figura 6. Sobrevivencia de *L. plantarum* BAL-03 microencapsulado durante el almacenamiento

Dos de los factores que no se controlaron, durante el almacenamiento, fueron la presencia de oxígeno y la exposición de la luz, contribuyendo a una disminución en la sobrevivencia de los microorganismos microencapsulados por secado por aspersión. La bolsa que se utilizó durante tres monitores de viabilidad fue la misma (después del secado hasta el cuarto mes de monitoreo), esto significa que la bolsa originalmente sellada al vacío fue abierta en tres ocasiones y vuelta a sellar, sin embargo en este proceso pudo haber interacción del oxígeno y de la luz con el material almacenado. Y con el octavo mes se utilizó una segunda bolsa del mismo tratamiento experimental. Las aplicaciones de esta técnica (secado por aspersión) se han ido incrementando debido a la protección de los materiales encapsulados de factores como presencia de oxígeno, calor y humedad,

permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. La microencapsulación ha sido exitosamente utilizada para mejorar la sobrevivencia de microorganismos en los productos protegiendo componentes sensibles en los alimentos (Adhikari et al., 2000; Kailasapathy, 2006; Pimentel et al., 2009) y algunos factores ambientales (Weinbreck et al., 2010), por ejemplo calor, oxígeno y humedad (Semyonov et al., 2010), asegurándolos contra la pérdida nutricional.

De acuerdo a lo citado por Wang & Chou (2003) otro factor importante en los cultivos secos, es el contenido de agua y el porcentaje de humedad, entonces los microorganismos tendrán una mejor sobrevivencia cuando la actividad de agua sea baja esto dependerá del tipo de microorganismo estudiado, la composición del fluido en el que se encuentra y el tipo de almacenamiento. Bhandari (2008) cito que una de las propiedades de los productos microencapsulados mediante secado por aspersión es la actividad de agua debe encontrarse entre 0.15 a 0.30%.

Las variaciones en la viabilidad celular pudieron ocasionarse durante la disolución de las microcápsulas para la siembra en placa, ya que posiblemente no todas ellas liberaron el material activo, es decir, probablemente hubo células sin expresarse en el medio de cultivo. Este hecho sí puede ser suceder ya que las condiciones de rehidratación y revitalización celular son fenómenos importantes que deben ser tomados en cuenta.

Las propiedades de rehidratación de los polvos encapsulados pueden afectar la viabilidad de los microorganismos al ser un paso crítico en su recuperación, porque las células que se sometieron a una posible lesión subletal pueden no ser capaces de reparar dicho daño si se rehidratan en condiciones inapropiadas (Pedroza, 2002).

12.2 Resistencia gastrointestinal simulada de *L. plantarum* BAL-03 durante el almacenamiento de los polvos

Una variable más que nos permite evaluar la calidad probiótica de *L. plantarum* BAL-03 después del secado por aspersion y durante el almacenamiento es la resistencia gastrointestinal simulada, dicha simulación se llevó a cabo en tres etapas: exposición ante condiciones gástricas (pH ácido de 1.9 y degradación enzimática con pepsina 0.27g/L), exposición a pH neutro, 7.5 y exposición a degradación enzimática con pancreatina 1.95g/L y sales biliares 15g/L durante 6 h. La resistencia de *L. plantarum* BAL-03 microencapsulado, a la simulación gastrointestinal se midió mediante el porcentaje celular al término de las etapas de simulación gastrointestinal (Tabla 13).

Tabla 13. Resistencia gastrointestinal simulada de *L. plantarum* BAL-03 después del secado por aspersion, a los dos, cuatro y ocho meses de almacenamiento

| Tratamiento | Después del secado (%) | A los 2 meses de almacenamiento (%) | A los 4 meses de almacenamiento (%) | A los 8 meses de almacenamiento (%) |
|-------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 81.32 | 87.38 | 86.13 | 95.44 |
| 2 | 86.04 | 82.44 | 78.27 | 90.80 |
| 3 | NR | NR | NR | NR |
| 4 | 81.18 | 90.08 | 85.21 | 76.78 |
| 5 | 91.27 | 89.71 | 88.03 | 89.34 |
| 6 | 90.17 | 90.65 | 83.54 | 79.10 |
| 7 | 83.12 | 87.09 | 83.52 | 88.81 |
| 8 | 86.72 | 89.2 | 79.6 | 86.89 |
| 9 | 86.3 | 80.9 | 81.64 | 88.62 |
| 10 | 94.9 | 82.6 | 80.6 | 88.94 |
| 11 | 86.63 | 85.99 | 89.58 | 94.43 |
| 12 | 91.06 | NR | 91.44 | 83.67 |
| 13 | 88.97 | 84.1 | 89.59 | 95.96 |
| 14 | 85.41 | 83.61 | 85.24 | 89.17 |
| 15 | 88.62 | NR | 92.53 | 100 |

NR=No realizado

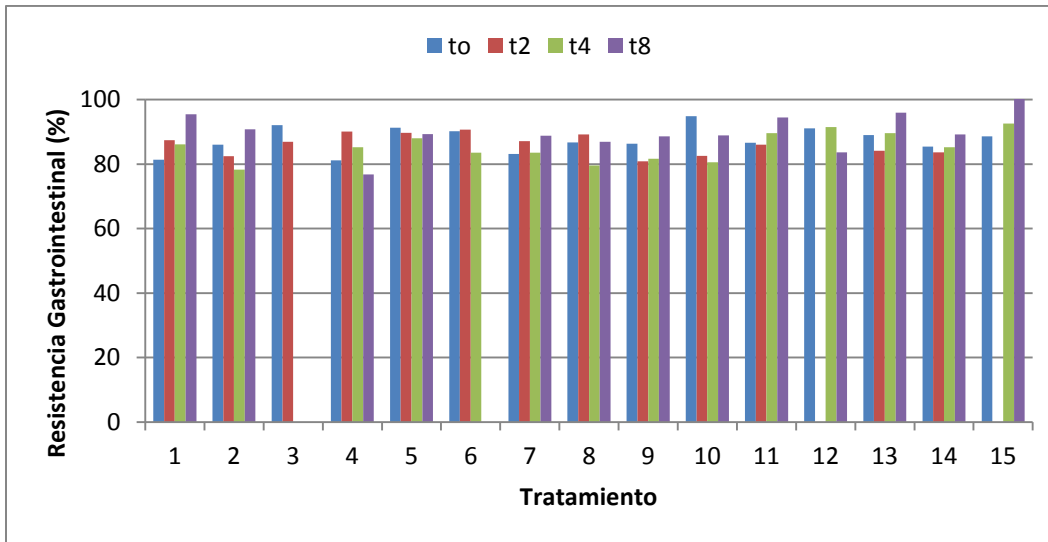


Figura 7. Resistencia gastrointestinal simulada de *L. plantarum* BAL-03 después del secado por aspersión, dos, cuatro y ocho meses de almacenamiento.

La tabla 13 y figura 7, representan la resistencia gastrointestinal de *L. plantarum* BAL-03 microencapsulado, encontrándose altos porcentajes de sobrevivencia después del secado y aún después de dos, cuatro y ocho meses de almacenamiento en la mayoría de los tratamientos.

Los tratamientos presentan resistencia en el rango de 80-90% lo cual indica que después de la simulación gastrointestinal existe un porcentaje de microorganismos activos suficientes para garantizar la colonización intestinal. Autores como Guarner & Schaafsma, 1998; Ouwehand & Salminen, 1998; Ding & Shah 2007 mencionan que una sobrevivencia de 1×10^7 UFC/g es considerado con suficiente calidad probiótica.

En las figuras 8, 9, 10 y 11, se muestra el efecto celular durante la simulación gastrointestinal, mostrándose el comportamiento de la viabilidad de *L. plantarum* BAL-03 microencapsulado mediante secado por aspersión en unidades Log_{10} (UFC/g) almacenadas a 4°C.

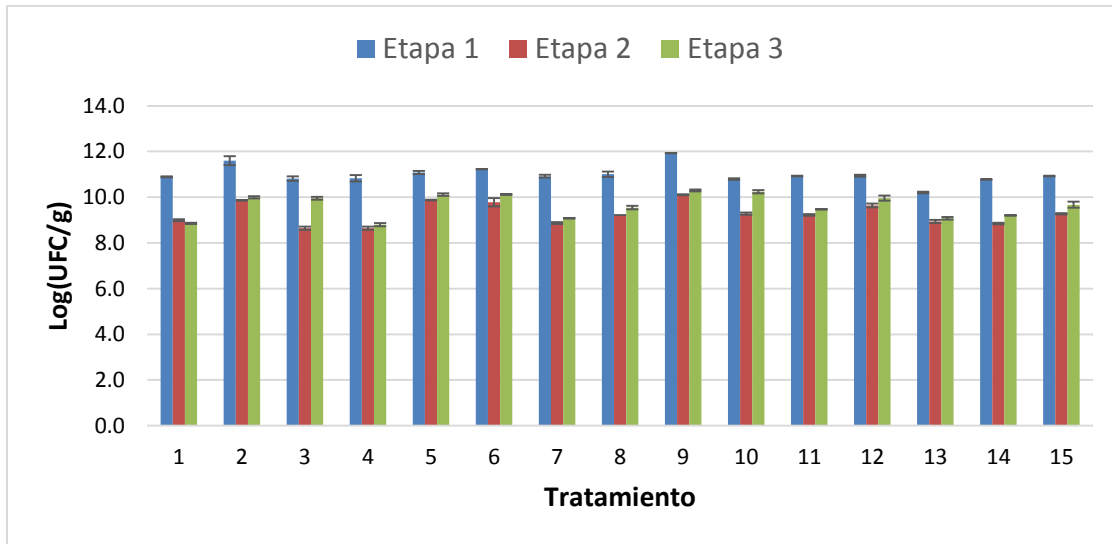


Figura 8. Viabilidad de *L. plantarum* BAL-03 durante la simulación gastrointestinal después del secado

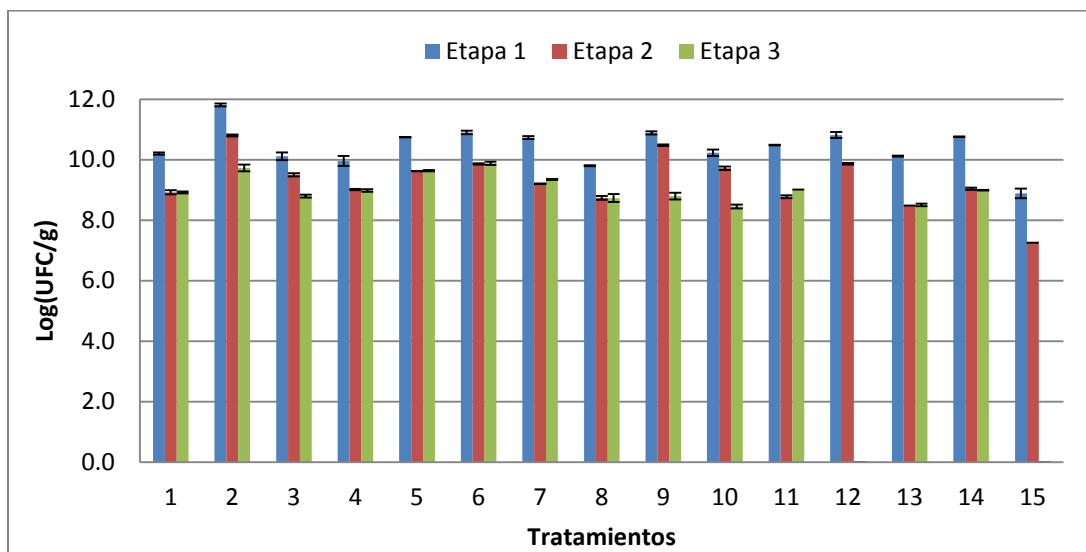


Figura 9. Viabilidad de *L. plantarum* BAL-03 durante la simulación gastrointestinal a los 2 meses de almacenamiento

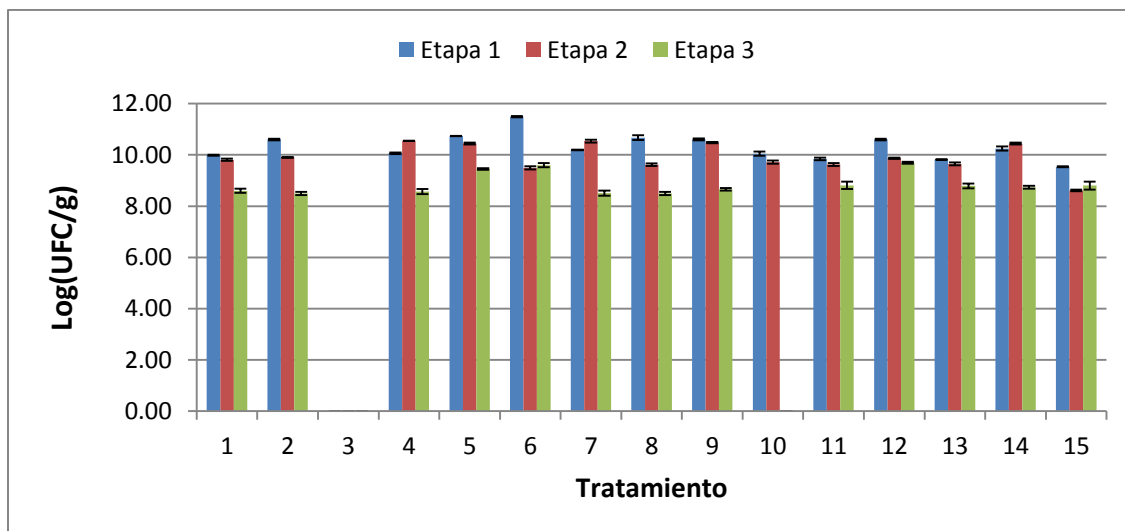


Figura 10. Viabilidad de *L. plantarum* BAL-03 durante la simulación gastrointestinal a los 4 meses de almacenamiento

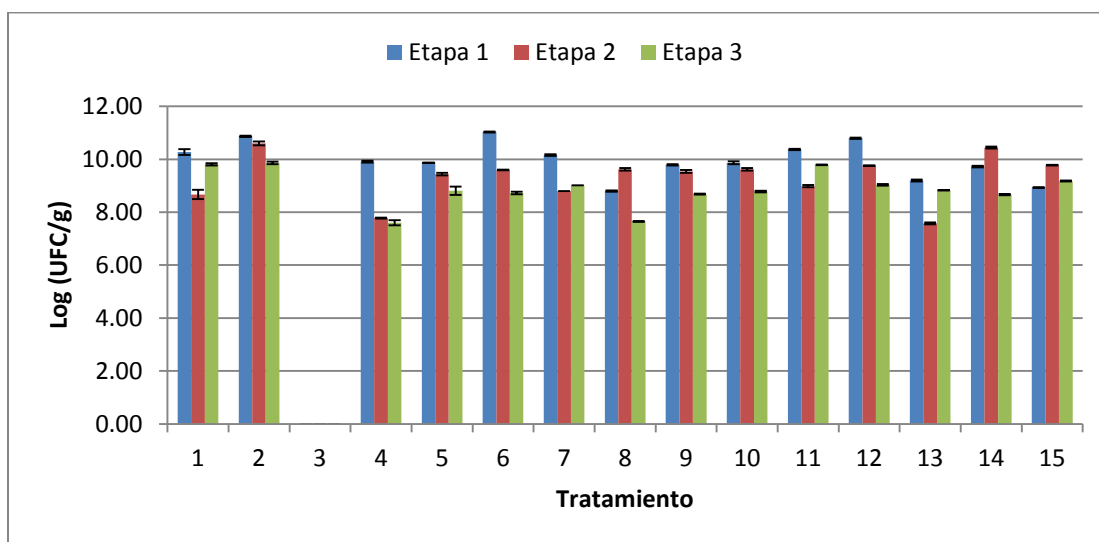


Figura 11. Viabilidad de *L. plantarum* BAL-03 durante la simulación gastrointestinal a los 8 meses de almacenamiento

La supervivencia de las bacterias probióticas, en condiciones gástricas, depende ampliamente de la estabilidad de la cepa usada, así como de los materiales utilizados para la microencapsulación (Rokka & Rantamäki, 2010). La evaluación de la resistencia de las cepas probióticas es comúnmente estudiada bajo

condiciones fisiológicas simuladas (en jugo gástrico, sales biliares y jugo pancreático).

El jugo gástrico simulado que consistió en una solución de pepsina e hidróxido sodio a pH de 1.9 que es ajustada con ácido clorhídrico. La solución intestinal simulada consiste en bilis y pancreatina a un pH de 7.4-7.5 (Del Piano et al., 2006; Rokka & Rantamäki, 2010).

Se puede observar en las Figura 10 y Figura 11 que pertenecen al cuarto y octavo mes respectivamente, que la viabilidad disminuyó notoriamente en la mayoría de los tratamientos de la etapa 1 a la etapa 2 observándose un descenso máximo de un ciclo log. Este descenso de la etapa 1 a la etapa 2 puede atribuirse al bajo pH del “estómago” junto con la acción proteolítica de la pepsina, teniéndose en cuenta que su máxima actividad se encuentra a pH 1.5-2.0.

Vinderola et al., (2011) reportaron que los probióticos tienen la capacidad de resistir pH ácidos entre 3-4, siendo el pH óptimo de crecimiento de *L. acidophilus* por encima de 5.5, cepa probiótica estudiada por ellos.

Después de 6 h, el ajuste gradual del pH llevado a cabo durante la etapa intestinal, simula la lenta transición del pH gástrico al pH intestinal alcanzar un valor de pH de 7.5 en presencia de sales biliares y de pancreatina, así que los recuentos viables se mantuvieron e inclusive hubo un ligero aumento pero menor que la concentración bacteriana inicial.

Por esto último, se dice que *L. plantarum* BAL-03 demostró tener la capacidad de recuperarse del daño subletal causado por el pH gástrico.

Con el fin de ejercer sus efectos benéficos en el huésped, en general se acepta que las bacterias probióticas deben estar vivos en el producto en el momento del consumo, y también capaz de alcanzar el intestino grueso en cantidades suficientemente altas para facilitar la colonización y proliferación (Shah, 2000).

Picot y Lacroix (2004) evaluaron la resistencia gastrointestinal simulada de *Bifidobacterium breve* R070 y *Bifidobacterium longum* R023 microencapsulados con suero de leche mediante secado por aspersion, descubriendo que la viabilidad de ambos microorganismos después de ser expuestos 30 minutos a la solución de pepsina pH 1.9 disminuyó 7 y 6 ciclos logarítmicos, respectivamente; asimismo,

después de la exposición a pancreatina y sales biliares a pH de 7.5 por 6 horas el recuento incrementó significativamente, recuperando 6 y 3 ciclos logarítmicos. Estos resultados fueron atribuidos al daño temporal ocasionado por el pH ácido. De igual manera con lo reportado de Petreska et al., (2011), quienes evaluaron la viabilidad de *L. casei* microencapsulado mediante secado por atomización ante condiciones gastrointestinales simuladas, ellos reportaron una disminución de aproximadamente un ciclo logarítmico después de exponer al microorganismo a un pH de 1.5 durante 60 min posteriormente en la segunda etapa (etapa intestinal) hubo un incremento en el recuento celular, pero sin alcanzar la viabilidad inicial.

12.3 Actividad acuosa y porcentaje de humedad de microcapsulas durante su almacenamiento

En los siguientes gráficos se presentan los resultados de actividad acuosa (Figura 12) y porcentajes de humedad (Figura 13).

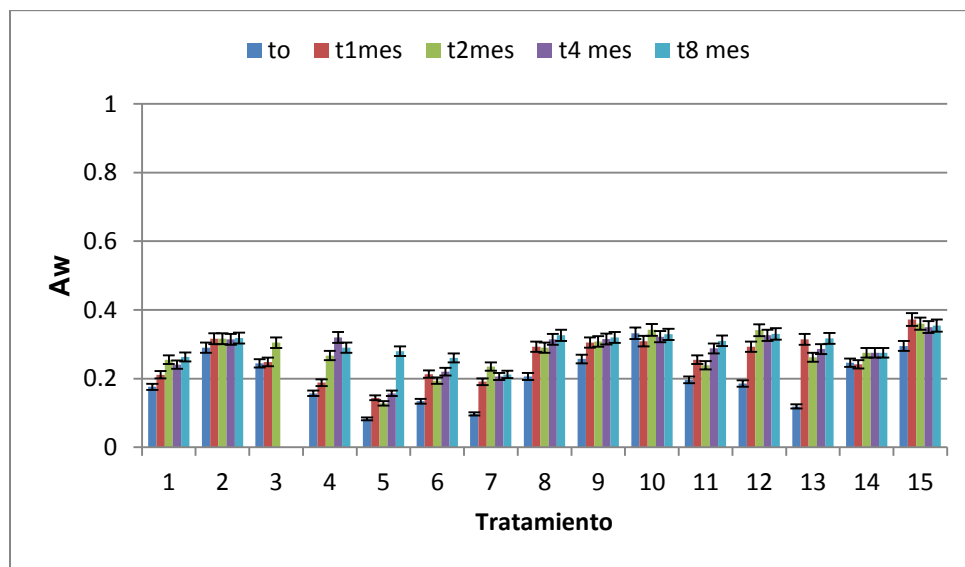


Figura 12. Actividad acuosa de las microcapsulas

Se observa que en la actividad acuosa de las microcapsulas se obtuvieron resultados muy variados entre cada tratamiento, tanto después del secado como durante el almacenamiento.

De igual modo, para cada unidad experimental la actividad acuosa fue variando ya que existió aumento así como disminución de las mismas, estas variaciones se deben muy probablemente a que los polvos estuvieron a la exposición del medio ambiente y de la manipulación durante los monitoreos realizados. Según Bhandari (2008) el rango se encuentra de 0.15-0.30 de a_w , menor será la actividad de organismos que permitan la descomposición del material microencapsulado.

Es importante recalcar, que el error del hidrómetro utilizado durante estas evaluaciones pudo haber sido un factor muy importante para obtener valores confiables.

En lo que respecta al cuarto mes de monitoreo los tratamientos 2, 4 y 15 se presentaron con una alta actividad acuosa, con un valor arriba de 0.3. En el octavo mes con un alto a_w estuvieron los tratamientos 8, 10 y 15, con estos resultados obtenidos se observa que los tratamientos están por encima del “valor máximo” citado por Bandhari (2008) de la actividad de agua.

Al encontrar que la mayoría de los resultados no están por encima del rango establecido para polvos microencapsulados, se podría suponer que los productos microencapsulados analizados en este trabajo están adecuadamente bien almacenados.

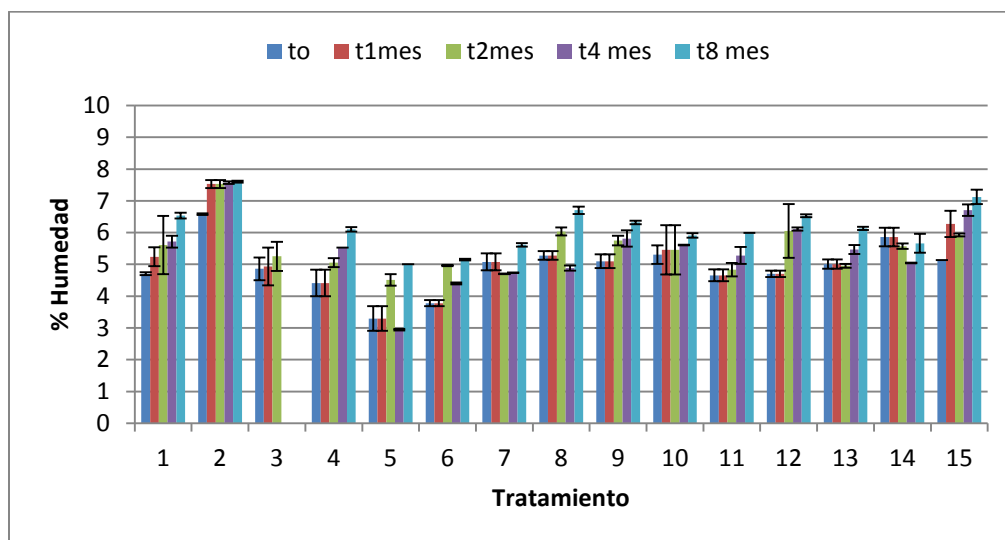


Figura 13. Humedad de las microcapsulas

Se monitoreo la humedad y el a_w de los polvos microencapsulados para ver la efectividad del secado, pero los resultados de ambos fueron muy variados para cada tratamiento realizado.

En algunas unidades experimentales se aprecia que la humedad aumentó conforme al paso del tiempo de almacenamiento, en otras se podría decir que se mantuvo y en otras hubo una disminución.

Se puede observar por ejemplo que la unidad experimental número 5 hay una ligero descenso del porcentaje de humedad (Figura 13) del cuarto mes respecto a to (después del secado), esto no es posible ya que los polvos constantemente se exponen a un ambiente húmedo al abrir las bolsas metálicas, este descenso se puede atribuir a que existió un mal manejo de la metodología experimental o un error humano.

Los porcentajes de humedad obtenidos en el cuarto mes de monitoreo se encuentran entre el rango de 2.9-7.5%, la mayoría está por arriba de 4.5%, para el octavo mes se puede observar que todos los valores del porcentaje de humedad están arriba del 5%, una consecuencia que puede acarrear al tener valores mayores a 4% es una pérdida de estabilidad microbiológica.

La NMX-F-026-1997 especifica que el porcentaje de humedad máximo para leche en polvo deshidratada es del 4%. Comparando este polvo obtenido en este proyecto, no se cumple totalmente la norma.

Es importante mencionar que la actividad acuosa y porcentaje de humedad del polvo recuperado dependen principalmente de la temperatura de salida del aire en el proceso de secado. Para obtener valores apegándonos a la Norma Mexicana, se requiere que la temperatura de salida del aire del secador se encuentre entre 85-90°C (Corcoran, 2004), estas variables que no se pudieron controlar con el equipo utilizado.

El contenido de humedad de los polvos con probióticos es un factor crítico que influye en la estabilidad de la vida útil de las bacterias y está relacionado con la actividad acuosa.

En algunos tratamientos se observa que a mayor humedad, la actividad de agua aumenta o viceversa; sin embargo, en otros esto no sucede.

Como dato adicional (Figura 14) se tuvo el registro de las temperaturas de las microcapsulas en el momento de determinar a_w , teniendo en cuenta que el polvo microencapsulado no se exponen a temperaturas mayores. Si bien, los valores registrados en el grafico se observan en el rango de 30°C consideradas todavía como temperatura ambiental.

Sin embargo los valores obtenidos no fueron constantes, una explicación del por qué la actividad de agua fue muy variada en cada tratamiento, de acuerdo Carrillo et al., (2011) la a_w depende de la temperatura dado que ésta influye también sobre la presión de vapor de agua (P) ($a_w=P/P_o$).

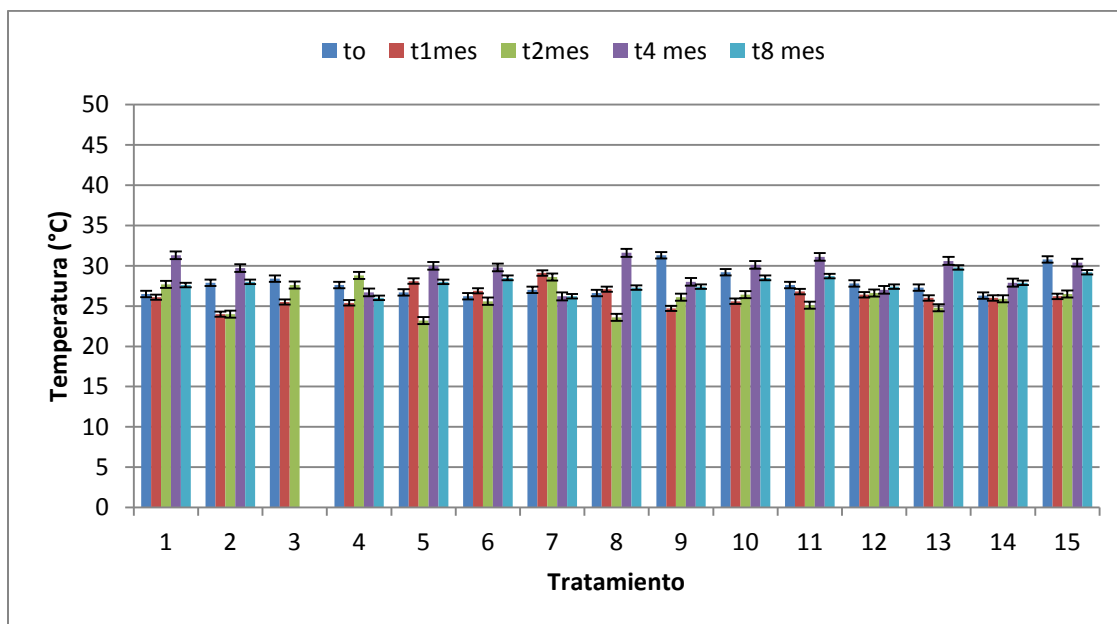


Figura 14. Temperatura de las microcapsulas

13. CONCLUSIONES

- La sobrevivencia de *L. plantarum* BAL-03 cultivada a diferentes condiciones microencapsulada con leche de soya-maltodextrina secada por aspersión mantuvo una sobrevivencia entre el 85-95% durante ocho meses de almacenamiento a 4°C.
- La resistencia gastrointestinal simulada de *L. plantarum* BAL-03 cultivada a diferentes condiciones y microencapsulada con leche de soya-maltodextrina secada por aspersión, se mantuvo entre el 81-95% durante ocho meses de almacenamiento a 4°C.
- Las características de humedad y a_w de las microcapsulas de *L. plantarum* BAL-03 evidenciaron variaciones durante el almacenamiento, lo cual no provocó que la sobrevivencia y resistencia gastrointestinal de las microcapsulas disminuyeron de los niveles requeridos para ser considerado como un probiótico.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 166-174.
2. Álvarez, M. J. Araujo, C. Araya, R. (2010). Aspectos probióticos y tecnológicos de las bacterias lácticas.
3. Amores, R., Calvo, A., Maestre, J. r. y Martínez Hernández, D. (2004). *Probióticos. Revista Española de Quimioterapia*. 17(2): 131-139
4. Ananta, E., Volkert, M. and Knorr, D., (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal* 15, 399-409.
5. Araneda, C., Valenzuela, F. (2009). Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. *Revista Ciencia Ahora* 22(11): 9-19.
6. Arvanitoyannis. I. S. y M. V. Houweling. (2005). Functional foods: a surbey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Rev. in Food Sci. and Nutrition*. 45: 385-4004.
7. Axelsson, L. T (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen. S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds), *Lactic acid bacteria; microbiological anda functional aspect*, pp. 1-66.
8. Bustos, P., & Bórquez, R. (2013). Influence of osmotic stress and encapsulating materials on the stability of autochthonous *Lactobacillus plantarum* after spray drying. *Drying Technology*.
9. Capela, P., Hay, T.K. C., and Shah N.P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39, 203–211.
10. Carr, F. J., Chill., D. Y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28(4): 281-370.
11. Castro L. A. y De Rovetto, C. (2006). Probioticos: utilidad clinica, *Colombia Médica*. 37. Saad, N., Delateee, C., Urdaci, M., Schmitter. J.M., Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Science and Technology*, 50 , 1-16.

12. Champagne, C. P. (2009). Some technological challenges in the addition of probiotic bacteria to food. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, 761-864.
13. Champagne C. P. & Fustier P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 1–7.
14. Chaparro M. P., Figueroa L. M., Otálvaro A. M. (2011). Evaluación de la harina de arroz (Fedearroz 50) como sustrato para la producción de probióticos, CIBIA VIII, Perú.
15. Chen, L., G. E. Remodetto y M. Subirade. (2006). Food protein based material as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Sci. & Tech.* 17(5): 272-283.
16. Cook, M. T., Tzortzis G, Charalampopoulos D. Khutoryanskiy VV. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. 162(1): 56-67
17. Correira, M. I. T. D., Juliana C., liboredo, R.D., Marcella L.D. Consoli R. D., (2012). The role of probiotic in gastrointestinal surgery. *Nutrition*, 50, 230-234.
18. Dave, R.I. and Shah, N.P. (1998). *Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts. Journal Food Australia.* 49: 164-168.
19. De Man, J. C., Rogosa. M., and SHARPE, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. 3. *Appl. Bact.*, 23: 130-135.
20. Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G.P., Allesina, S., Barba, M., Decidda, F., Lorenzini., P., Ballaré, M., Montino. F., Orsello, M., Sartori, M., Garello, E., Cramagnola, S., Pagliarulo, M. 2006. Probiotics: from reserch to consumer. *Digestive and Liver Disease.* 38 (2):: S248-S255.
21. Ding, W.K. and Shah, N.P. (2007). Acid, Bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of food science.* 72: M446 – M450.
22. García, M. Revah, S. y Gómez, L. (1998.)Productos lácteos. En *Biología Alimentaria*, Limusa Noriega Editores, pp. 163-178.
23. Guarner, F. and Schaafsma, G. (1998). Probiotics. *International Journal Food Microbiology.* 39: 237-238.

24. Guevara, N. A. (2008). ¿Qué son los alimentos funcionales y cuál es el papel de los probióticos en estos alimentos? Temas selectos de ingeniería de alimentos 8-15.
25. FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.
26. Favaro-Trindade, C.S. & Grosso, C.R.F. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, 19, 485–494.
27. Fernández, E. E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. pp. 43-60.
28. Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5), 1127e1149.
29. Hernandez, R.M., Orive, g., Murua, A., Pedraz, J.L (2010). Microcapsules and microcarries for in situ cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62, 711-730.
30. Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N. and Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*. 75: 27-35.
31. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis int't Veld, JH. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal Food Microbiology*. 41: 85-101.
32. Holzapfel W. H. and Schillinger U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109-116.
33. Jay, J. M. (2000). *Modern food microbiology*. 6th edition, Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
34. Kailassapathy K. and Sultana, K. (2003). Survival and b-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. *Australian Journal of Dairy Technology*. 58: 223–227.

35. Lakkis JM (2007) Encapsulation and controlled release technologies in food systems.
36. Lian, W.C., Hsiao, H.C., and Chou, C.C. (2002). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 293-301.
37. López, D., Gómez, M. 2008. Preparación de microesferas mediante secado por aspersion. *Rev. Cubana Farm.* 42(3)
38. Lücke, F.K. (1995). Indigenous lactic acid bacteria of various food commodities and factors affecting their growth and survival. *Lactic acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and applications*, pp. 219-252. Springer-Verlag, Germany.
39. Madence, A., Jacquot, M., Sher, J. y Desobry, (2006). Flavour encapsulation and controlled release a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1-21
40. Martín Villena MJ, Morales Hernández ME, Gallardo Lara V y Ruiz Martínez MA. (2009). Técnicas de micro encapsulación: una propuesta para micro encapsular probióticos. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España
41. Martínez-Cervera, S., Salvador, A., & Sanz, T. (2014). Comparison of different polyols as total sucrose replacers in muffins: Thermal, rheological, texture and acceptability properties. *Food Hydrocolloids*, 35, 1–8.
42. Olejnik A., Lewandowska M., Obarska. and Grajek W. (2005). Tolerance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains to Low pH, Bile Salts and Digestives Enzymes. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Food Science and Technology*. 8(1).
43. Ouwehand, A. C. and Salminen, S. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd edn. Edited by S. Salminen & A. von Wright. New York: Marcel Dekker. pp. 139–160.
44. Ong, L.,A. Henriksson y N. P. Shah. (2006). Development of probiotic.. Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* And the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J.* 16: 446-456.

45. Páez, R. B. (2013). Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para aplicación en alimentos. Estudios microbiológicos y tecnológicos (tesis). Universidad nacional de la plata.
46. Papapostolou H, Loulouda A. Bosnea, Athanasios A. Koutinas, M. Fermentation Efficiency Of Thermally Dried Kefir. *Bioresource Technology* 2008; 99 (2008): 6949-6956.
47. Parra, R. 2011. Microencapsulación de alimentos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*.
48. Pedroza-Islas, R. Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. *Memorias del Sexto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México, 438-447, 3 al 6 Septiembre, 2002.
49. Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M.A., Tortoló-Cabañas, K., Gastón-Peña, C. (2013) Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos ICIDCA. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, pp. 14-25
50. Picot, A. Lacroix, C. (2004) Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal* 14 505–515.
51. Prado, F C, Parada, J L, Pandey, A and Soccol, C (2008) Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res. Int* 41 111-123.
52. Puupponen, R., A. M. Aura, K. M. Oksma, P. Millärinen, M. Saarela, T. Mattila y K. Poutanen. (2002). Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Sci. & Tech.* 13;3-11.
53. R. Di Cagno, R. F. Surico, G. Minervini. (2011). "Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria," *Food Microbiology*, pp. 900–909.
54. Radowski, A. (2006). Isomalt in breakfast cereals, granola bars, and muesli. *Cereals Food World*, 51, 254–256.
55. Ramos-Comenzana, A., Fuentes, S., Ferrer-Cebrian, R., & Monteoliva-Sanchez, M. (2005). *Probiotics Lactobacillus dose required to restore and*

- maintain a normal vaginal flora. Fems Immunology and Medical Microbiology*, 32(1), 37-41.
56. Redgwell, R., & Fischer, M. (2005). Dietary fibre as a versatile food component: an industrial perspective. *Molecular Nutrition Food Research*, 49, 421e435.
 57. Reyes-Nava, L. A. (2010). Optimización y carterización de la microencapsulación de la protease hemisferina refinada. Tesis de Maestria en Ciancias en Biprocesos. UPIBI-IPN, México, D.F.
 58. Rokka, S.; Rantamäki, P. Protecting probiótica bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur. Food Technol.* 231: pp. 1-12, 2010.
 59. Rosell, C. M. (2007). Vitamin and mineral fortification of bread. In B. Hamaker (Ed.), *Technology of functional cereal products*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.
 60. Rosell, C.M. (2009). Trends in bread making: Low and subzero temperatures. In: *Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products*. Ed M.L. Passos, C.L. Ribeiro. Taylor and Francis, CRC Press. Pp 59-79.
 61. Rowland, I. Ortega, R. M., Aranceta, J. M. y Renguejo, A. M. (2002). Alimentos funcionales Nuevas tendencias en Alimentos Funcionales Probióticos. pp. 1-8
 62. Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J and Mattila-Sandholm T. (2000). Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
 63. Saulnier, D.M., Kolida, S., & gibson, G. R. (2009) Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Current Pharmaceurical Design*, 15(13), 1403-1414.
 64. Sanz Y., M.C. Collado y J. Dalmau. (2003). Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*, 6 (9). 476-482
 65. Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 894–907.
 66. Shah NP. Lankapthra WEV. Britz ML, Kyle WSA. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*. 5:515-521.

67. Shirai, K., Guerrero, I. y Lara, P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*. 47:125-137.
68. Torres, M.R. (2002). Flora intestinal, probióticos y salud. Segunda edición, Formas finas.
69. Wandrey, C., Bartkowiak, C., Harding, S. (2010). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing.
70. World Gastroenterology Organisation. 2008. Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Diarrea aguda.
71. Vásquez, M.S.M.; Suárez, M.H.; Zapata, B.S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.* 36(1):64- 71.
72. Vidal, D. R. 2006. Probióticos: aspectos microbiológicos y tecnológicos. *Journal Alimentación, Nutrición y Salud* 13:(2) 48-52.
73. Vinderola, C.G., Mocchiuti, P y Reinheimer, J. (2002). Interactions Among Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria Used for Fermented Dairy Products. *Journal of Food Science*. 85: 721-729.
74. Wang, Y.C. Chou, C.C. (2003). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. p 209-217.
75. World Gastroenterology Organisation, (2011). WGO Practice Guideline: Probiotics and prebiotics, 15.
76. Yáñez, J., Salazar, J., Chaires, L., Jimenez, J., Marquez, M., Ramos, E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva* 21:313-319.