

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA

**TRABAJO PROFESIONAL  
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**INGENIERO BIOQUÍMICO**

**QUE PRESENTA:**

**JORGE ARTURO MARTINEZ LOPEZ**

**CON EL TEMA:**

**“EFECTO DEL SECADO POR ASPERSIÓN SOBRE LA  
SOBREVIVENCIA DE *BIFIDOBACTERIUM LACTIS*  
DESPUES DEL SECADO Y DURANTE EL  
ALMACENAMIENTO”**

**MEDIANTE:**

**OPCION III  
(PROYECTO DE INVESTIGACIÓN)**

**TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS**

**OCTUBRE 2014**

"2014, Año de Octavio Paz"

DIRECCIÓN  
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 01 de julio del 2014

OFICIO NUM. DEP-CT-195-2014

**C. JORGE ARTURO MARTÍNEZ LÓPEZ**  
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.  
P R E S E N T E.

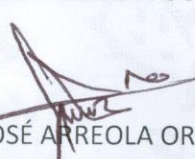
Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DR. MIGUEL ABUD ARCHILA , ING. MARGARITA MARCELIN MADRIGAL e ING. ROBERTO DAVID VAZQUEZ SOLÍS, En el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

**" EFECTO DEL SECADO POR ASPERSIÓN SOBRE LA SOBREVIVENCIA DE BIFIDUMBACTERIUM LACTIS  
DESPUÉS DEL SECADO Y DURANTE EL ALMACENAMIENTO."**

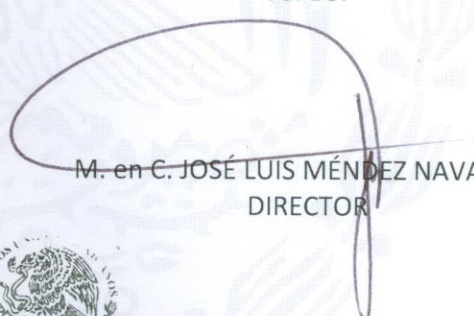
Registrado mediante la opción:  
**III (PROYECTO DE INVESTIGACIÓN)**

**ATENTAMENTE**  
**"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"**

Vo. Bo.




ING. JUAN JOSÉ ARREOLA ORDAZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISION DE  
ESTUDIOS PROFESIONALES



M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO  
DIRECTOR

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares  
C.c.p.- Expediente  
I'JLMN/I'JJAO/I'eeam



Secretaría de Educ. Pública  
Instituto Tecnológico  
de Tuxtla Gutiérrez,  
Div. de Est. Profesionales

## Agradecimientos

A la Dirección General de Educación Superior Tecnológica por el financiamiento del proyecto 4635.12-P.

A mi madre por el apoyo incondicional que me ha brindado para poder llegar a este nivel académico

Al Dr. Miguel Abud Archila por su colaboración y conocimiento brindado al dirigir este proyecto de investigación.

A Anahí Jobeth Borrás Enríquez por su apoyo y colaboración en la realización de este proyecto.

A los maestros que fueron responsables de mi formación durante la carrera y que me ayudaron en dudas presentadas en la elaboración del proyecto de investigación.

A mis compañeros y a todos aquellos que tuvieron algo que ver con este proyecto.

## Resumen

Para producir un alimento probiótico se necesita adicionar microorganismos y para lograrlo tenemos que asegurar que el microorganismo se mantenga vivo y óptimo para ofrecer beneficios a la salud del huésped. La microencapsulación es un proceso que permite proteger y mantener en forma óptima estos microorganismos vivos. Por esto, el objetivo de este trabajo fue encapsular *Bifidobacterium lactis* mediante secado por aspersión empleando como agentes encapsulantes la mezcla de  $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica variando la concentración y el flujo de alimentación con el fin de encontrar las condiciones de funcionamiento del secador en donde la viabilidad de la bacteria sea menos afectada por el proceso de microencapsulación, así como determinar la viabilidad de dicha bacteria durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración. El proceso de secado mostró un rendimiento entre el 56 y 78 % con una viabilidad de entre 82 y 99 %, mostrando que el experimento en el cual se utilizó un flujo de alimentación de 5 mL/min y una concentración del agente encapsulante del 15% tuvo 78% de rendimiento de secado y una viabilidad del 91%. Sin embargo, se encontró que no existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los parámetros evaluados. Los resultados de la prueba de simulación gástrica mostraron que el polvo con mayor resistencia a los jugos gástricos fue aquel que mayor concentración de agente encapsulante fue utilizado durante la aspersión. Durante el periodo de almacenamiento, los resultados mostraron que entre mayor sea la concentración del agente encapsulante y el flujo de alimentación, éstos le confieren mayor protección a la bacteria.

**Palabras clave:** microencapsulación, secado por aspersión, *Bifidobacterium lactis*

<b>Tabla de contenido</b>	<b>págs.</b>
Resumen .....	I
Lista de figuras .....	II
Lista de tablas .....	III
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Probióticos.....	3
2.2 Tipos de probióticos .....	4
2.2.1 Probióticos naturales .....	4
2.2.2 Productos comercializados.....	4
2.2.3 Suplementos alimenticios.....	5
2.2.4 Productos medicinales o agentes bioterapéuticos.....	5
2.3 Bifidobacterias.....	5
2.4 <i>Bifidobacterium lactis</i> .....	6
2.5 Microencapsulación.....	7
2.5.1 Procesos físicos .....	8
2.5.1.1 Microencapsulación mediante secado por aspersion .....	8
2.5.1.2 Liofilización .....	10
2.5.2 Procesos químicos .....	11
2.5.2.1 Polimerización interfacial.....	11
2.5.2.2 Incompatibilidad polimérica .....	11
2.5.3 Procesos fisicoquímicos .....	11
2.5.3.1 Coacervación.....	11
2.5.3.2 Liposomas .....	12
2.5.3.3 Gelificación iónica.....	12
2.5.3.3.1 Gelificación externa .....	12
2.5.3.3.2 Gelificación interna .....	13
2.6 Coberturas utilizadas en microencapsulación .....	13
2.7 $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica como agente encapsulante .....	14

2.8 Estudio de condiciones gastrointestinales simuladas.....	15
3. Justificación.....	17
4. Objetivos .....	18
4.1 Objetivo general .....	18
4.1.1 Objetivos específicos.....	18
5. Materiales y métodos .....	19
5.1 Materiales.....	19
5.2 Cepas microbianas y activación celular.....	19
5.3 Obtención de la pasta celular .....	19
5.4 Preparación y encapsulación de la solución probiótica .....	20
5.5 Viabilidad de las bacterias encapsuladas.....	21
5.6 Viabilidad de las bacterias encapsuladas en condiciones ácidas y biliares..	22
5.7. contenido de humedad y actividad de agua .....	23
5.8 Diseño experimental y análisis estadísticos .....	23
6. Resultados y discusión.....	24
6.1 Rendimiento de proceso.....	24
6.2 Viabilidad de las bacterias microencapsuladas después de ser sometidas a condiciones ácidas y biliares.....	28
6.3 Viabilidad de las bacterias microencapsuladas durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración .....	31
7. Conclusiones y recomendaciones.....	36
8. Bibliografía .....	37

## Lista de figuras

Figura 1 Estructura general de una microcápsula. ....	8
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de secado por aspersión.....	9
Figura 3. Ciclodextrina $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , respectivamente, representando en cada una de ellas el diámetro de su concavidad. ....	15
Figura 4. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto al rendimiento del secado por aspersión.....	25
Figura 5. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto a la viabilidad de los microorganismos microencapsulados.....	26
Figura 6. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto a la actividad de agua de los polvos probióticos. ....	26
Figura 7. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto al contenido de humedad de los polvos probióticos.....	26
Figura 8. Viabilidad de los probióticos en el polvo sometidos a condiciones gástricas simuladas.....	28
Figura 9. Viabilidad de los probióticos en el polvo sometidos a condiciones gástricas simuladas.....	29
Figura 10. Viabilidad de los probióticos en los experimentos 1, 5, 8 y 11, de los polvos probióticos con punto inicial único. ....	30
Figura 11. Viabilidad de <i>Bifidobacterium</i> en los polvos durante el almacenamiento. ....	31
Figura 12. Viabilidad de <i>Bifidobacterium</i> en los polvos durante el almacenamiento con un punto inicial único. ....	32
Figura 13. Viabilidad de <i>Bifidobacterium</i> en polvos respecto a la concentración del material de pared durante el almacenamiento. ....	33
Figura 14. Viabilidad de <i>Bifidobacterium</i> en polvos respecto al flujo de alimentación durante el almacenamiento. ....	34

## Lista de tablas

Tabla 1. Diferentes agentes encapsulantes.....	13
Tabla 2. Diseño de experimento para el encapsulado por aspersión de Bifidobacterium lactis. ....	21
Tabla 3. Resultados del rendimiento de polvo asperjado, viabilidad, actividad de agua y porcentaje de humedad obtenidos después de la microencapsulación de Bifidobacterium lactis .....	24
Tabla 4. Análisis de varianza de las diferentes determinaciones en la optimización del secado por aspersión. ....	27



## **1. Introducción**

Las enfermedades gastrointestinales ocupan una de las primeras causas de consulta médica y son también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Generalmente, las enfermedades gastrointestinales son ocasionadas por varios motivos que pueden ser orgánicos y psicológicos, pero también son causadas por bacterias, virus o parásitos que penetran al organismo por medio de alimentos y agua contaminada principalmente con materia fecal, que también se disemina por el ambiente. Actualmente, las investigaciones se encuentran dirigidas en la posibilidad de crear productos que favorezca la salud del individuo, logrando evitar y/o disminuir enfermedades.

El concepto de nutrición ha sido modificado con el paso de los años, donde en un inicio la dieta solo aportaba los nutrientes necesarios a la idea de consumir alimentos que, además de nutrir, promuevan la salud. Uno de los alimentos más famosos que entra en este nuevo concepto de dieta son los alimentos lácticos. Hace alrededor de 100 años atrás se sabe que la adición de microorganismos vivos a los productos lácteos además de conservar el alimento, proveen de un efecto benéfico en las personas que lo consumen. Eli Metchnikoff en 1907 propuso que el envejecimiento es consecuencia de la acción de las sustancias tóxicas producidas por la flora intestinal y sugirió que la ingesta de bacterias benéficas que se encontraban en los productos lácticos podrían bloquear estas toxinas y prolongar la vida; la observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a él, y afirmó que "la dependencia de los microorganismos intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microorganismos nocivos por microorganismos útiles".

Diversos microorganismos pueden ser adicionados en alimentos, además de eso, conocer el tipo de microorganismo no es suficiente, ya que, en los procesos industriales para poder elaborar productos alimenticios y adicionarlos con estos, es

un reto. Es importante saber que el microorganismo debe mantenerse vivo y óptimo en condiciones adecuadas para ofrecer beneficios a nuestra salud.

La microencapsulación es un proceso que permite proteger y mantener vivos en forma óptima a estos microorganismos y existen diversas maneras de llevarla a cabo, pero estudios anteriores demostraron que el secado por aspersion es una buena técnica para microencapsular estos microorganismos, el tiempo corto de proceso, y el tamaño de partícula es adecuado para la formulación de alimentos.

Estudios han mostrado que los microorganismos del género *Bifidobacterium* pueden ser una buena opción para la elaboración de alimentos probióticos. Por lo tanto, una vez seleccionados los tipos de microorganismos que serán utilizados, es importante estandarizar las técnicas para determinar la viabilidad de estos microorganismos. Así, los análisis de viabilidad deberían permitir la determinación de la evolución tanto de los cultivos iniciadores así como de los probióticos previamente encapsulados. De igual manera, los análisis de viabilidad permitirán conocer la resistencia de este producto en condiciones de digestión gastrointestinal simulada y en un periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Probióticos

Por los problemas de alimentación que existen en el mundo, se han estudiado diversos tipos de bacterias que pueden dar un tipo de beneficio siendo consumidos, los profesionales en la salud han prestado más atención en los efectos de los alimentos con microbios vivos (probióticos) en la salud humana. El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, que afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles (Metchnikoff, 1907). Por entonces el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y. Estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos (Tissier, 1906). Henry Tissier aisló por primera vez una bifidobacteria de un lactante alimentado a pecho, a la que denominó *Bacillus bifidus communis*. Tissier postulaba que las bifidobacterias desplazarían a las bacterias proteolíticas que provocan la diarrea y recomendó la administración de bifidobacteria a lactantes que padecían de este síntoma (Tissier, 1906).

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En 1917, antes del descubrimiento de Alexander Fleming de la penicilina, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* de las heces de un

soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote grave de shigellosis. Los trastornos del tracto intestinal frecuentemente eran tratados con bacterias no patógenas viables, para cambiar o reemplazar la microflora intestinal. La cepa de *Escherichia coli* de Nissle 1917 es uno de los pocos ejemplos de un probiótico que no es una bacteria ácido láctica. (Guarner, 2008).

## **2.2 Tipos de probióticos**

Existen diferentes grupos de probióticos y hay grandes diferencia entre ellos.

### **2.2.1 Probióticos naturales**

Los probióticos naturales están presentes en la alimentación de todos los días, pero no siempre lo sabemos. En forma natural, los probióticos se encuentran en lácteos fermentados como yogures, leche y queso; vegetales fermentados como aceitunas, soya, cereales; productos cárneos y pescados fermentados y bebidas alcohólicas artesanales. Sin embargo, se requieren estudios científicos que garanticen la existencia de cepas probióticas entre la microflora láctica silvestre de los alimentos.

### **2.2.2 Productos comercializados**

Durante años, distintas poblaciones han consumido probióticos naturales en su dieta. La industria tomo nota de esta realidad y comenzó a comercializar los productos que contenían probióticos haciendo foco en ello, por ejemplo, “me caes bien”, el eslogan de YAKULT. Es algo similar a lo que sucede con las formulaciones para los lactantes, que tratan de emular la leche materna con el objetivo de generar el desarrollo de una microflora intestinal benéfica, como la leche Nan 2 de Nestlé.

### **2.2.3 Suplementos alimenticios**

Se tratan de suplementos dietarios que contienen probióticos en forma de capsulas o en polvo. No es un medicamento y su distribución se rige por las leyes de los alimentos.

### **2.2.4 Productos medicinales o agentes bioterapéuticos**

Los agentes bioterapéuticos son probióticos con un efecto terapéutico probado; es decir, es un medicamento. El uso de probióticos en medicina se conoce también con el nombre de “bioterapia”. Los agentes bioterapéuticos son microorganismos que tienen un efecto demostrado, y deben de cumplir con ciertas características como ser resistentes a la gran mayoría de los antibióticos que se usan comúnmente, tener efectos terapéuticos inmediatos, tener efectos múltiples, inhibición de la adhesión de los patógenos, efectos de inmunomodulación, competencia con las toxinas por los receptores de estas y, por supuestos, competencia por los nutrientes.

## **2.3 Bifidobacterias**

Las bacterias del género *Bifidobacterium* son bacterias Gram positivas, catalasa negativo, no forman esporas, son estrictamente anaeróbicas. Su temperatura óptima de crecimiento es entre 37°C y 41°C (alcanzando una mínima de entre 25°C a 28°C y una máxima que fluctúa entre los 43°C a 45°C) y su pH óptimo oscila entre los 6.5 -7.0 (límite inferior entre 4.5-5.0 y un límite superior 8.0-8.5). Degrada exclusivamente la glucosa y produce ácido acético y ácido láctico en una proporción de 3:2 respectivamente (Roy, 2001).

Castillo señala que estos microorganismos son de forma de bastón delgado con extremos algo más ahusados y generalmente bifurcados; recién aislado presenta con frecuencia engrosamientos terminales. Los bacilos, que jamás se presentan en

cadena, a lo sumo en parejas, son bastantes delgados y miden 2 – 8  $\mu\text{m}$  de largo (Castillo, 2005).

Entre los principales beneficios atribuidos a las bifidobacterias, está la inhibición de bacterias patógenas, disminución de riesgos de cáncer al colon, aumento de la absorción de calcio y de la síntesis de vitaminas (Aklam et al, 2004).

Baron et al. (2000) señalan que *Bifidobacterium lactis* produce principalmente ácido láctico, a partir de muchos azúcares y se considera como una especie de *Lactobacillus* por producir además acetaldehído, diacetilo y etanol sin la generación de  $\text{CO}_2$ . Se descubrieron varias propiedades de este microorganismo, probándose que era incapaz de reproducirse en presencia de oxígeno. Por esta razón se clasificó en un género anaeróbico estricto llamado *Bifidobacterium* (Baron et al, 2000).

Este cultivo termófilo, se aplica principalmente en la elaboración de productos lácteos (fermentados o dulces). Tiene una sensibilidad salina al 2.5% NaCl de un 50% de inhibición y con un 3.0% de un 100% inhibición.

## **2. 4 *Bifidobacterium lactis***

*Bifidobacterium lactis* es una bacteria buena que tiene muchos componentes nutricionales importantes. Ayuda a luchar contra el daño que causan las bacterias malas del cuerpo y ayuda a la digestión. Se encuentra generalmente en los intestinos de los humanos. *Bifidobacterium lactis* es uno de los probióticos más benéficos y generalmente se añade a productos lácteos como el yogur.

El estreñimiento es un problema médico molesto de los intestinos que hace que la evacuación de heces sea dificultosa. Se considera crónica cuando dura más de tres días por semana. De acuerdo al Centro Nacional de Información de Biotecnología, los productos que contienen *Bifidobacterium lactis* sirven para aliviar el estreñimiento. Es especialmente útil cuando lo consumen los adultos. Se han

realizado estudios para determinar si ayuda a provocar evacuaciones frecuentes. *Bifidobacterium* puede ser útil para aliviar el estreñimiento cuando se consume por un periodo de tres a seis semanas.

La inflamación en el colon es un problema médico doloroso que sucede debido a una gran cantidad de factores médicos. Una de las causas principales es la acumulación de grandes cantidades de toxinas en el colon. Esto puede causar que el colon se inflame y se hinche, lo que se conoce como colitis. De acuerdo a la Sociedad Americana de Microbiología, *Bifidobacterium lactis* son microorganismos que viven en el colon para favorecer la eliminación de desechos tóxicos. Algunas de las cepas más comunes de la bacteria pueden encontrarse en alimentos como la leche, el queso e incluso en la leche de fórmula infantil para favorecer una buena salud del colon y disminuir las probabilidades de experimentar inflamación en él.

## **2.5 Microencapsulación**

Los procesos de microencapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante mediante un proceso de coacervación. La utilización de microcápsulas abarca una amplia gama de campos: la liberación controlada de sabores, colores, aromas, perfumes, drogas, fertilizantes y precursores en impresiones (Fernandez et al, 2005).

La microencapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales) son introducidas en una matriz o sistema pared con el objeto de evitar su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se libera gradualmente del agente que lo ha englobado o atrapado y se obtienen productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales. Se utiliza también el término microencapsulación en la industria

alimentaria o farmacéutica cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o pequeñas cantidades (Fernandez et al, 2005).

La microencapsulación actualmente, se aplica para preservar y/o proteger numerosos ingredientes comerciales. El material que es cubierto se define como fase interna y el material que recubre es denominado pared y generalmente no reacciona con el material a encapsular (Figura 1) (Islas, 2002).

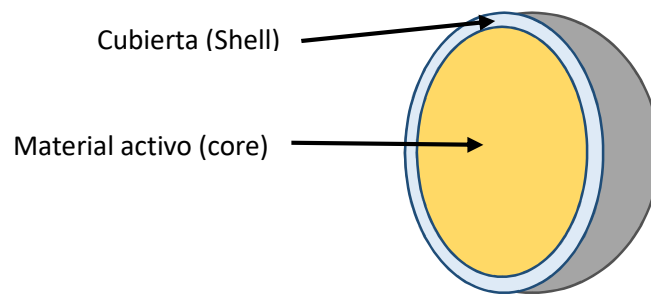


Figura 1 Estructura general de una microcápsula (Berna, 2009).

Existen diversos métodos para la producción de microcápsulas. En general, estos métodos se pueden dividir en tres grupos:

- Procesos físicos: secado por aspersión, liofilización
- Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molécula
- Procesos fisicoquímicos: coacervación, liposomas y gelificación iónica.

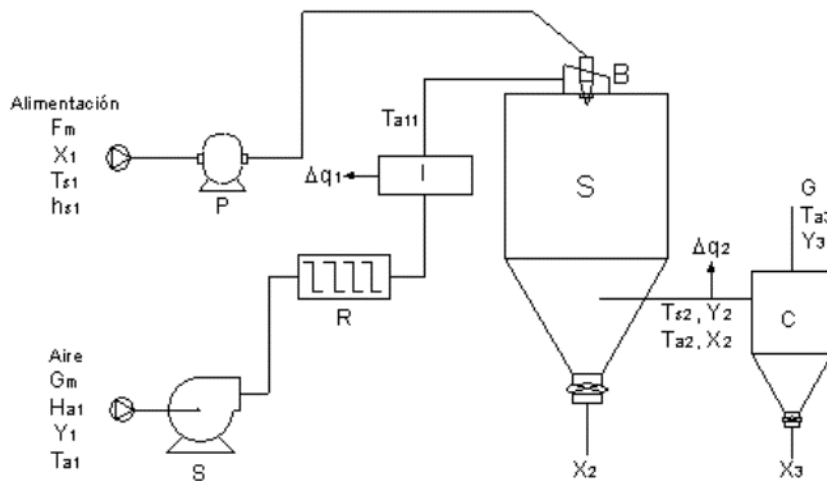
## **2.5.1 Procesos físicos**

### **2.5.1.1 Microencapsulación mediante secado por aspersión**

El secado por aspersión (figura 2) es usado ampliamente en las industrias de los alimentos debido a que es un método económico y efectivo en la protección de materiales, como en la deshidratación de leche. Los almidones modificados, la maltodextrina y las gomas son empleados como acarreadores o materiales pared.



El material a encapsular es homogenizado con el acarreador; la mezcla es alimentada al secador por aspersion y se atomiza por medio de una boquilla o disco; las microcápsulas se colectan posteriormente (Fernandez et al, 2005).



- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| S - Cámara de secado        | I - Supuesto intercambiador de calor (ficticio) |
| C - Separador ciclónico     | R - Calentador de resistencias                  |
| B - Boquilla de atomización | S - Soplador                                    |
| P - Bomba de alimentación   |   |

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de secado por aspersion.

Por definición, el secado por aspersion es la transformación de un líquido en un material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente. La distribución del tamaño de las partículas obtenidas por este método es en general menor a 100  $\mu\text{m}$ , aunque debemos destacar que ello depende de las condiciones del proceso. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s). El tipo de material encapsulante tendrá influencia en la estabilidad de la emulsión antes de secar, el

tamaño de la partícula, las propiedades de flujo, las mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (Islas, 2002).

La microencapsulación es una técnica relativamente nueva que sirve para proteger a los materiales encapsulados de factores que puedan causar deterioro, tales como el oxígeno, la luz o la humedad (Tonon et al, 2008).

### **2.5.1.2 Liofilización**

Como se sabe, según la temperatura una sustancia cualquiera tiene los tres estados: sólido, líquido y gaseoso. Si queremos convertir el agua en gaseosa la tenemos que hervir o por lo menos dejarla reposar largo tiempo para que “se seque” espontáneamente. Si queremos que un pedazo de hielo se derrita, le aplicamos el calor ambiental o lo calentamos para acelerar su licuefacción.

La liofilización consiste en sacarle el agua a una sustancia congelada saltándose el paso por el estado líquido: se congela una solución acuosa de la sustancia química que se desea liofilizar y, a esa baja temperatura que impide cambios que produzcan deterioro, se le somete a un alto vacío que pasa el agua del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido. Es una forma de secar un producto químico a temperaturas bajísimas, sin el deterioro que produciría el recalentamiento.

La liofilización es más un proceso para conservación que para destrucción de los microorganismos, los cultivos de microorganismos liofilizados permanecen viables durante muchos años (Villena et al, 2009).

## **2.5.2 Procesos químicos**

### **2.5.2.1 Polimerización interfacial**

En este proceso se produce la polimerización de un monómero en la interface de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana, que dará lugar a la pared de la microcápsulas. Este proceso tiene lugar en tres pasos:

1. Dispersión de una solución acuosa de un reactante soluble en agua, en una fase orgánica para producir una emulsión agua en aceite
2. Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua, iniciada por la adición de un complejo soluble en aceite a la emulsión anterior.
3. Separación de las microcápsulas de la fase orgánica y su transferencia en agua para dar una suspensión acuosa. La separación de las microcápsulas se puede llevar a cabo por centrifugación (Villena et al, 2009).

### **2.5.2.2 Incompatibilidad polimérica**

En este método se utiliza el fenómeno de separación de fases, en una mezcla de dos polímeros químicamente diferentes e incompatibles en un mismo solvente. El material a encapsular interaccionará solo con uno de los dos polímeros, el cual se adsorbe en la superficie del material a encapsular formando una película que los engloba. De manera general, este proceso se lleva a cabo en solventes orgánicos y cuando el material a encapsular es sólido (Villena et al, 2009).

## **2.5.3 Procesos fisicoquímicos**

### **2.5.3.1 Coacervación**

Es un método físico-químico que se basa en la separación de fases, consiste en tres pasos: 1. Formación de un sistema de tres fases químicamente inmiscibles (una fase líquida o fase continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared),

2. Deposición del material polimérico líquido que formará la cubierta sobre el material a cubrir, y

3. Solidificación de la cubierta.

Con esta técnica se pueden obtener microcápsulas esféricas muy pequeñas, de hasta de 4  $\mu\text{m}$  y con una carga de material a encapsular de alrededor del 90%. Además, proporcionan una buena protección contra las pérdidas por volatilización y contra la oxidación (Villena et al, 2009).

### **2.5.3.2 Liposomas**

Los liposomas son partículas microscópicas hechas de lípidos y agua principalmente. Son estructuras compuestas de una bicapa de lípidos que engloban un volumen acuoso. Se elaboran con moléculas anfifílicas que poseen sitios hidrofóbicos, por ejemplo, fosfolípidos como la lecitina. En la fase acuosa, se coloca en material a encapsular cuando es hidrofílico o bien se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos, si es lipofílico (Villena et al, 2009).

### **2.5.3.3 Gelificación iónica**

Existen dos técnicas de gelificación siendo esta la de gelificación externa e interna

#### **2.5.3.3.1 Gelificación externa**

En la gelificación externa, la sal de calcio soluble es agregada en el seno de una emulsión A/O. El tamaño de partícula no puede ser bien controlado y las partículas tienden a coagular en grandes masas antes de adquirir la consistencia apropiada.

### 2.5.3.3.2 Gelificación interna

La gelificación interna se basa en la liberación del ion calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio. Esto se lleva a cabo por acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, con participación en la fase acuosa del alginato. Esta técnica permite obtener partículas de un tamaño de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  (Villena et al, 2009).

## 2.6 Coberturas utilizadas en microencapsulación

Independientemente del método elegido para preparar las microcápsulas, el primer paso en la encapsulación será la selección de una matriz de encapsulación adecuada, en la tabla 1 se muestran diferentes agentes encapsulante (Villena et al, 2009).

Tabla 1. Diferentes agentes encapsulantes

Tipos de cobertura	Cobertura específica
Gomas	Agar, alginato de sodio, carragenina, goma arábica
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz
Celulosas	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, trisetearina
Proteínas	Gluten, caseína, albumina
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

## **2.7 Mezcla de $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica como agente encapsulante**

Las ciclodextrinas (CD) fueron descubiertas hace aproximadamente 100 años. En la industria farmacéutica han sido principalmente utilizados para aumentar la hidrosolubilidad, biodisponibilidad y estabilidad de diversas drogas de uso terapéutico.

Las CD son oligosacáridos cíclicos, producidas por síntesis enzimática selectiva (cyclomaltodextrin glucanotransferasa, CGTase). Existen tres CD con similar estructura y constan de seis, siete, u ocho monómeros de glucosa (en forma de anillo) denominándose alfa, beta o gamma ciclodextrina, respectivamente (figura 3).

El acoplamiento específico de los monómeros de glucosa, da a cada ciclodextrina una estructura molecular rígida con una “cavidad interior” de volumen determinado.

Esta “cavidad interna” de naturaleza hidrofóbica, es una característica estructural fundamental de la ciclodextrinas, que le proporciona la capacidad de formar complejos con otras moléculas de muy diversa naturaleza. Estas moléculas, deberán tener un tamaño compatible con la cavidad interna de la CD, permitiendo formar así un “complejo de inclusión” estable.

Las ciclodextrinas presentan como ventajas ser moléculas química y físicamente muy estables con capacidad de formar complejos con una gran variedad de compuestos orgánicos, como resultado de este proceso de “inclusión” de compuestos dentro de la molécula de ciclodextrinas, se logra mejorar las propiedades de biodisponibilidad, solubilidad en agua, estabilidad en presencia de luz, calor y condiciones de oxidación (Velázquez, 2010).

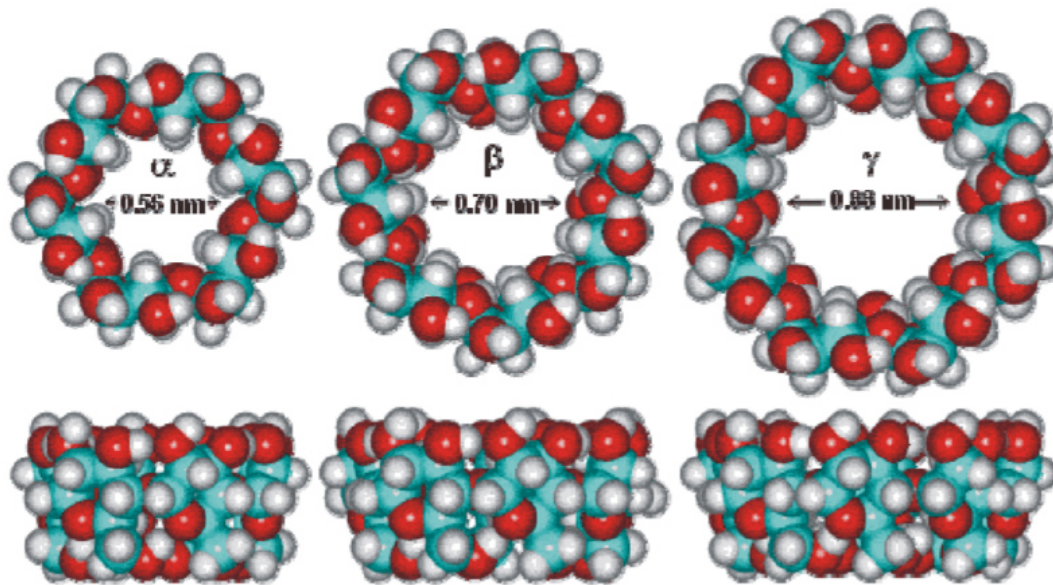


Figura 3. Ciclodextrina  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , respectivamente, representando en cada una de ellas el diámetro de su concavidad.

## 2.8 Estudio de condiciones gastrointestinales simuladas

Las bacterias usadas como complementos probióticos son comúnmente entregados en un sistema de alimentación y, por lo tanto, comienza su viaje a la parte inferior del tracto intestinal a través de la boca. Como tales bacterias probióticas, debe ser resistente a la enzimas en la cavidad oral (por ejemplo, lisozima) (Fuller, 2004) y también debe tener la capacidad de resistir el proceso de digestión en el estómago y el tracto intestinal. Marteau et al. (2002) citaron que el tiempo desde la entrada hasta liberación en el estómago son unos 90 min. Sin embargo, otros procesos digestivos tienen más tiempo de residencia; por lo tanto, hay una necesidad de que las bacterias sean resistentes a las condiciones estresantes del estómago y el intestino superior, que contiene bilis (Marteau et al, 2002).

El estrés celular comienza en el estómago, que tiene pH bajo de 1.5 (Marteau et al, 2002) donde las bacterias pasan a través de la condición ácida de dicho órgano; en

el intestino delgado, el obstáculo más importante para los microorganismos son las sales biliares (Bezkorovainy, 2001), por lo que los probióticos para ejercer sus efectos benéficos no deben sucumbir a la acción de este bactericida natural. La concentración de sales biliares en el intestino humano son variables y difíciles de predecir (Shah, 2000). Las transformaciones microbianas de los ácidos y sales biliares son numerosas. Entre ellas destaca la hidrólisis, reacción muy habitual en el tracto intestinal de los animales (Brian, 2008). En este sentido uno de los microorganismos más estudiados es *Lactobacillus reuteri*. Esta bacteria tiene la capacidad de desconjugar las sales biliares y así inactivar su potente acción biocida (Boever et al, 2000), mecanismo utilizado por la mayoría de las bacterias resistentes a estas sales y que es uno de los factores de disminución del colesterol plasmático (Dora, 2002). Para mejorar la resistencia al paso por el estómago y primera parte del intestino de los probióticos, Stanton et al (2012) recomiendan someter a los microorganismos probióticos a condiciones de estrés sub-letal, como tratamiento con ácidos o calor, que les provoca la expresión de genes de respuesta adaptativa al estrés haciéndolos más resistentes.



### 3. Justificación

Una opción de alimentación para poder favorecer la salud son los alimentos probióticos. Estos están caracterizados por contener microorganismos vivos que al ser alojados en tracto intestinal nos transmiten protección contra microorganismos patógenos. Muchos microorganismos han sido estudiados, y uno de ellos es *Bifidumbacterium lactis*, este microorganismo al alojarse en el tracto intestinal además de ayudarnos contra microorganismos patógenos, ayuda a prevenir el cáncer de colon, a la absorción de vitaminas y minerales y a la absorción de calcio en los huesos, por los beneficios esta bacteria se ha pensado elaborar alimentos que la contenga, pero mantener vivas estas bacterias y protegerlas del daño tracto digestivo es muy importante, por esas razones se han estudiado medios de protección para ellas.

La microencapsulación por medio de aspersión es una técnica para poder conferir protección a la bacteria, y así poder crear una protección con lo cual será necesario tener un agente que forme una pared alrededor de la bacteria y con esto obtener una microcápsula. Esta técnica, por su tiempo corto y bajos costos, se adecua para la elaboración de alimentos.

Si bien se han reportado trabajos sobre la adición de probióticos a alimentos, y específicamente en quesos, también se reportó que el probiótico provoca cambios sensoriales a los alimentos, lo anterior debido a su crecimiento en el mismo. Sin embargo, no existen reportes sobre la adición de microorganismos microencapsulados en quesos que permanezcan estables y se liberen en el ser humano al ser consumidos. En este trabajo se busca optimizar el secado por aspersión de *Bifidobacterium lactis* de tal forma que se cuente con un polvo que contenga el microorganismo viable y que pueda ser adicionado a alimentos durante su preparación.

## **4. Objetivos**

### **IV.1 Objetivo general**

Evaluar la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* en microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión y durante el almacenamiento

#### **4.1.1º Objetivos específicos**

- Encapsular *Bifidobacterium lactis* mediante secado por aspersión, empleando como agentes encapsulante  $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica variando concentraciones y el flujo de alimentación.
- Evaluar la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* posterior al secado por aspersión así como a la simulación de condiciones del tracto gastrointestinal
- Evaluar la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* microencapsulado durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Materiales**

Los materiales utilizados para los análisis de viabilidad fueron el caldo MRS (de Man, Rogosa, & Sharpe), pepsina, pancreatina, sales biliares y L-cisteína, fosfato mono potásico y como agentes encapsulantes fueron empleados  $\beta$ -ciclodextrina y goma arábica.

### **5.2 Cepas microbianas y activación celular**

*Bifidobacterium lactis* se activó en 20 mL de medio de cultivo MRS (de Man, Rogosa, & Sharpe), adicionado con 0.05 % de L-cisteína, con la finalidad de crear un ambiente anaeróbico y así favorecer en su desarrollo. Se realizaron dos activaciones, la primera con la finalidad reestructuración celular, y la segunda activación se hizo para tener un mejor desarrollo de biomasa de nuestra bacteria, con menos estrés viniendo de una cepa liofilizada. La activación se realizó por duplicado y tuvo una duración de 24 horas cada una a 35 °C.

### **5.3 Obtención de la pasta celular**

Para obtener la biomasa necesaria para el microencapsulamiento mediante secado por aspersión, de la última activación se tomó 1 mL y se transfirió a un matraz que contenía 800 mL de caldo MRS adicionado con 0.05% de L-cisteína, de la misma manera que la activación, esta se incubó por 24 horas a 35°C, las bacterias en fase de crecimiento estacionaria se recuperaron mediante centrifugación a 3900 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la biomasa se resuspendió en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7) para un lavado, se sometió a centrifugación nuevamente a las mismas condiciones, de igual manera el sobrenadante se desechó y la pastilla celular se resuspendió con 2 mL de agua

destilada estéril, obteniendo un promedio de 1 g de pasta celular. La pasta se mantuvo en condiciones de refrigeración a 4 °C.

#### **5.4 Preparación y encapsulación de la solución probiótica**

Se prepararon soluciones de  $\beta$ -ciclodextrina a diferentes concentraciones según el diseño experimental, estas soluciones fueron esterilizadas en autoclave a 121°C durante 15 min. Las soluciones preparadas se mantuvieron a condiciones de refrigeración hasta su uso. La pasta celular obtenida de los microorganismos (*Bifidobacterium lactis*) se adicionó en la solución de  $\beta$ -ciclodextrina para obtener 100 mL de solución probiótica y esta se mezcló con un homogeneizador (Ultra-Turrax IKA) a 5600 rpm.

La cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc/g) en la solución probiótica (material pared- pasta celular) será determinar por la técnica de Miles y Misra que consiste en sembrar por triplicado alícuotas de 20  $\mu$ L de cada una de las diluciones seriadas. Se realizaron diluciones seriadas de 1 mL de la solución probiótica desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  en solución amortiguadora de fosfatos, se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ l y se sembró en cajas Petri con agar MRS adicionado con L-cisteína al 0.05 %. Las placas se colocaron dentro de un desecador de policarbonato a una presión de vacío de 17 pulg Hg, para favorecer condiciones de anaerobiosis durante el periodo de incubación de 48 h a 35 °C.

Las bacterias contenidas en la solución probiótica fueron encapsuladas en un secador por aspersión Mini-Spray Dryer B-290. El aire que se utilizó como flujo de arrastre fue previamente filtrado y después calentado a través de resistencias eléctricas. Se utilizó un flujo volumétrico de aire caliente de 28 m<sup>3</sup>/h ajustando el aspirador a un 100% de su capacidad, un total de 11 experimentos fueron realizados, en donde se utilizaron temperaturas de entrada a 160°C y el flujo de alimentación varió dependiendo del experimento, la tabla 2 muestra los diferentes experimentos realizados.

Tabla 2. Diseño de experimento para el encapsulado por aspersion de *Bifidobacterium lactis*.

No. Exp	FA (mL/min)	CMP (%)
1	7.5	25.7372
2	7.5	20
3	10.37	20
4	10	25
5	5	15
6	7.5	20
7	7.5	20
8	7.5	14.2628
9	4.63	20
10	5	25
11	10	15

FA=flujo de alimentación, CMP=Concentración de material de pared

Los polvos probióticos asperjados fueron monitoreados mediante la técnica de Miles y Misra, descrita anteriormente, durante el almacenamiento.

### 5.5 Viabilidad de las bacterias encapsuladas

Después del encapsulamiento por aspersion de la solución probiótica y la obtención de los polvos probióticos, se tomó 1 g de cada uno de los polvos probióticos y se

realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en solución amortiguadora de fosfatos, de estas diluciones se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ L y se sembró en cajas Petri con agar MRS adicionado con L-cisteína al 0.05 %, siguiendo la técnica de Miles y Misra, las placas se colocaron dentro de un desecador de policarbonato a una presión de vacío de 17 pulg Hg, para favorecer condiciones de anaerobiosis durante el periodo de incubación de 48 h a 35 °C.

### **5.6 Viabilidad de las bacterias encapsuladas en condiciones ácidas y biliares**

El estudio de viabilidad en condiciones gástricas de bacterias probióticas encapsuladas se realizó siguiendo el método propuesto por Picot y Lacroix (2004) con ligeras modificaciones. Las células de *Bifidobacterium lactis* fueron expuestas primeramente a una solución de jugos gástricos simulados (HCl y pepsina pH 1.9 por 30 min) y de forma continua, a una solución de jugos intestinales simulados (Sales biliares y pancreatina a pH 7.5 por 5.5 h) a una temperatura de 37°C monitoreándose los cambios en el contenido total de las bacterias vivas en la mezcla digestiva.

El jugo gástrico simulado fue preparado mediante la dispersión de pepsina (0.26 g/L) en HCl 0.1N ajustando el pH a 1.9 con HCl 1N. El jugo pancreático fue simulado mediante una dispersión de pancreatina (1.95 g/L) en un Buffer de fosfatos de sodio estéril (0.02M, pH 7.5) ajustando el pH a 7.5 con NaOH 1N. La solución concentrada de sales biliares fue preparada disolviendo el extracto biliar en polvo en agua destilada (150 g/L).

Para las bacterias encapsuladas, se tomaron 2 g del polvo y se colocaron en 12.5 mL de agua destilada en una probeta estéril, ajustando el pH a 1.9 con HCl 1N y el volumen a 15 mL con agua destilada estéril. Posteriormente se adicionaron la solución de pepsina (5 mL), teniendo un volumen final de 20 mL. La suspensión bacteriana se incubó a 37°C (baño de agua) durante 30 min. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción incrementando el pH a 7.5 con NaOH 1N y se tomó

una alícuota de 1 mL para determinar el número viable de células en condiciones ácidas. Inmediatamente se agregaron 1.25 mL de Buffer de fosfatos de sodio estéril (0.5M, pH 7.5) y 0.5mL de la solución de sales biliares. Se ajustó a pH de 7.5 y volumen de 22.5 mL con agua destilada estéril. Se agregaron 2.5 mL de jugo pancreático simulado, obteniendo un volumen final de 25 mL. La mezcla se incubó a 37°C y se tomaron alícuotas de 1 mL para la cuantificación bacteriana a 1, 3 y 6 h.

#### **5.7. contenido de humedad y actividad de agua Agregar en el índice**

La actividad de agua fue determinada utilizando un Hygropalm y el contenido de humedad fue determinado en estufa a vacío a 70°C hasta peso constante.

#### **5.8 Diseño experimental y análisis estadísticos**

Se utilizó un diseño experimental compuesto central con dos repeticiones. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza con un nivel de significancia del 95%. Para observar los factores significativos así como una prueba de Tukey para la comparación de medias, utilizando el software Statgraphics versión V.1 Centurion.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Rendimiento de proceso

El proceso de secado por aspersión mostró porcentajes de rendimiento (RPA) entre el 56 y 78%, con una viabilidad (V) entre 82 y 99%, actividades de agua ( $A_w$ ) de 0.17 a 0.43 y con un porcentaje de humedad (H) entre 1.3 a 13.0.

Tabla 3. Resultados del rendimiento de polvo asperjado, viabilidad, actividad de agua y porcentaje de humedad obtenidos después de la microencapsulación de *Bifidobacterium lactis*

No. Exp.	FA (mL/min)	CMP (%)	RPA (%)	V (%)	$A_w$	H (%)
1	7.5	26	56	96	0.26	10.6
2	7.5	20	62	82	0.25	10.3
3	10.37	20	60	90	0.17	9.0
4	10	25	64	85	0.21	10.7
5	5	15	78	91	0.22	10.1
6	7.5	20	76	83	0.36	13.0
7	7.5	20	75	88	0.17	10.5
8	7.5	14	70	87	0.43	12.4
9	4.63	20	61	95	0.28	4.4
10	5	25	60	96	0.40	3.4
11	10	15	56	99	0.22	1.3

No. Exp. = número de experimento; FA= flujo de alimentación; CMP= concentración de material de pared; RPA= rendimiento de polvo asperjado; V= viabilidad;  $A_w$ = actividad de agua; H= porcentaje de humedad.

El estudio de rendimiento y viabilidad indica que el experimento 5 mostró un 78 % de rendimiento y una viabilidad del 91%, en el cual se empleó un flujo de alimentación de 5 mL/min y una concentración de material de pared del 15%, sin embargo, el experimento 11 es el que presenta mayor porcentaje de viabilidad con un 99 % pero con un rendimiento de 56%. Por lo que la elección del mejor tratamiento no es tan simple y entonces será con base a las diferentes variables de



estudio. De igual forma todos los experimentos presentaron porcentajes de viabilidad superiores al 82 %.

La actividad de agua ( $A_w$ ) es una medida del grado de unión del agua que se encuentra disponible en un producto y puede participar en diferentes reacciones y así favorecer o disminuir el crecimiento microbiano. Picot y Lacroix (2004) indican que los alimentos secos o deshidratados deben presentar una  $A_w$  menor a 0.6 para ser considerados estables, esto permite asegurar que el proceso de deshidratación permite proteger a las células mediante la disminución de la actividad de agua presente en la cápsula y con ello reducir las reacciones de inactivación. Sin embargo, una actividad de agua menor ( $A_w < 0.25$ ) garantiza la estabilidad de los microorganismos probióticos encapsulados, por lo cual la mayoría de los experimentos presentan las actividades de agua menores a 0.2, lo que nos indica que las cápsulas son estables.

La prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95%, indicó que el rendimiento de secado, la viabilidad, la actividad de agua y el contenido de humedad no mostraron efecto significativo (figuras 4, 5, 6 y 7). Estadísticamente los resultados en todos los parámetros medidos son iguales, es decir, que cada uno de los experimentos entre si no hay diferencia significativa, la tabla 3 nos indica los valores de  $p$  de cada análisis de varianza

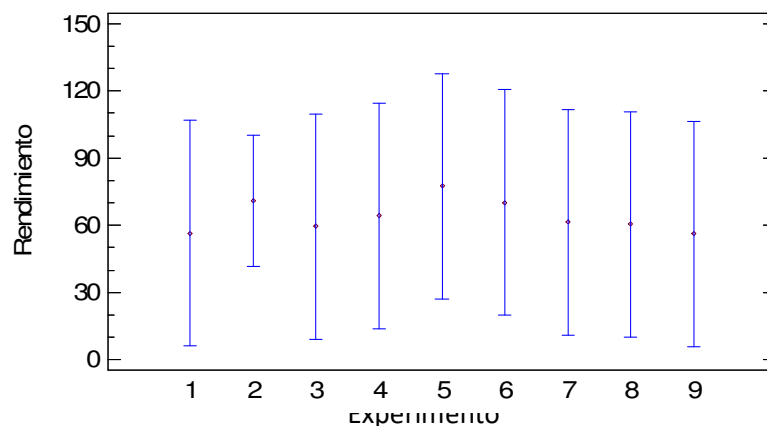


Figura 4. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto al rendimiento del secado por aspersión.

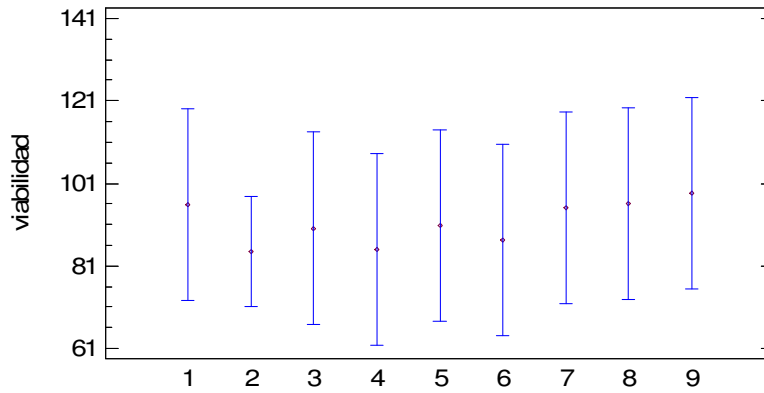


Figura 5. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto a la viabilidad de los microorganismos microencapsulados.

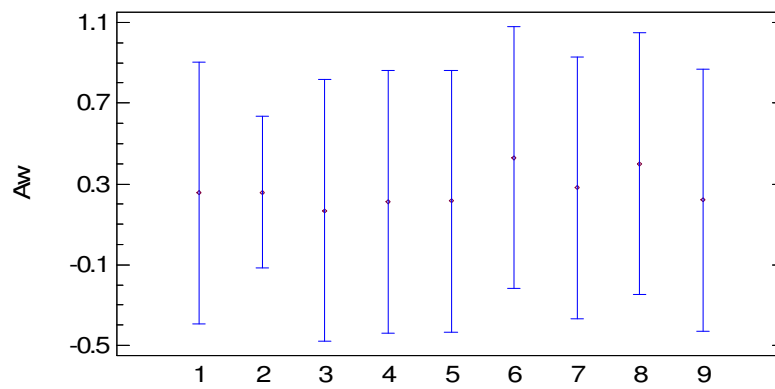


Figura 6. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto a la actividad de agua de los polvos probióticos.

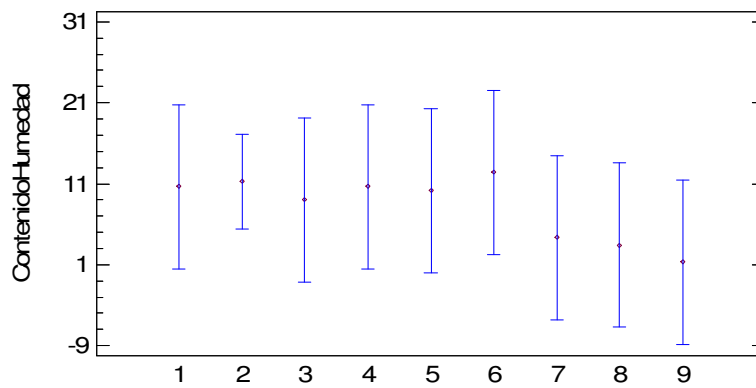


Figura 7. Prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95 % con respecto al contenido de humedad de los polvos probióticos.

El análisis de varianza (tabla 4) indica que, puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe diferencia estadística significativa entre las medias de los parámetros utilizados.

Tabla 4. Análisis de varianza de las diferentes determinaciones en la optimización del secado por aspersión.

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>VALOR</b>
<i>RPA (%)</i>	
<i>Razón-F</i>	1.13
<i>Valor -p</i>	0.5498
<i>V (%)</i>	
<i>Razón-F</i>	3.13
<i>Valor -p</i>	0.2649
<i>AW (%)</i>	
<i>Razón-F</i>	0.85
<i>Valor -p</i>	0.6424
<i>H (%)</i>	
<i>Razón-F</i>	8.06
<i>Valor -p</i>	0.1151

El incremento de la velocidad del flujo de alimentación trae consigo un incremento del porcentaje de sobrevivencia, pero el rendimiento de secado es menor, esto puede deberse a la incompleta atomización y secado, resultando en una mayor protección de las células durante el proceso de asperjado.

En investigaciones previas se indica que *Bifidobacterium lactis* presenta una gran resistencia a la encapsulación por aspersión, observándose con reducciones mínimas o nulas de los ciclos logarítmicos posterior al proceso de aspersión. Favaro-Trindale y Grosso (2007) presentaron porcentajes de viabilidad de alrededor del 98% para *Bifidobacterium lactis* empleando secado por aspersión a temperaturas de 160 y 190°C, datos que resultan similares a los encontrados en este trabajo, a pesar de haber utilizado agentes encapsulantes diferentes.

## 6.2 Viabilidad de las bacterias microencapsuladas después de ser sometidas a condiciones ácidas y biliares

Con el fin de ejercer los efectos benéficos en el huésped, las bacterias probióticas deben estar vivas y presentarse en el momento del consumo y ser capaces de alcanzar el intestino grueso en cantidades suficientemente altas (concentraciones superiores a  $10^6$  ufc/g de producto) para facilitar la colonización y proliferación (Shah, 2000).

Los resultados de la prueba de simulación gástrica mostraron que todos los experimentos sin excepción presentaron un descenso marcado de la viabilidad al ser sometidas a los jugos gástricos simulados (pH de 1.9). La viabilidad de los microorganismos sometidos a la presencia de las sales biliares simuladas se mantiene posteriormente constante durante aproximadamente 3 horas (figura 8).

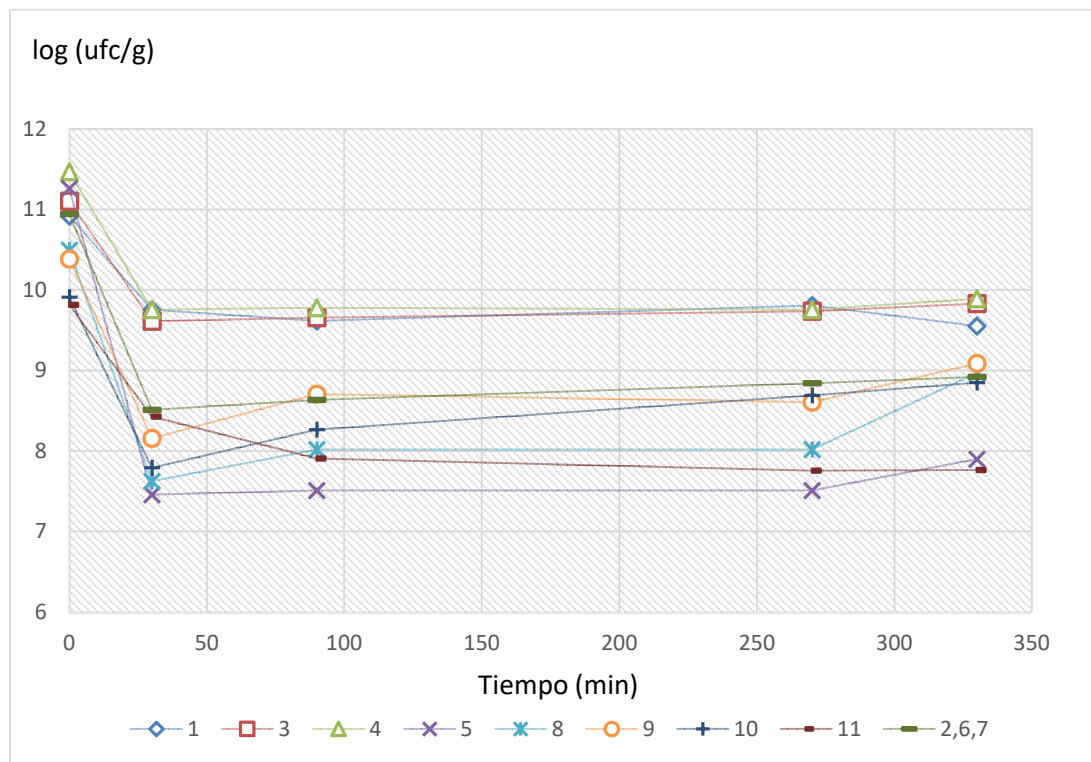


Figura 8. Viabilidad de los probióticos en el polvo sometidos a condiciones gástricas simuladas.

En el último periodo de la simulación (330 min), *Bifidobacterium lactis* tuvo una aparente regeneración celular mostrando un incremento en la viabilidad. Como podemos ver en la figura 8 los experimentos se pueden dividir en tres grupos y los podemos clasificar en muy resistentes, regulares y baja resistencia; cabe destacar que todos los experimentos muestran concentraciones superiores al valor óptimo requerido ( $10^6$  ufc/g), por lo que su efecto benéfico es probable.

Para poder identificar que experimento fue el mejor en la prueba de simulación gástrica, no podíamos utilizar la figura 8, porque en esa grafica los valores iniciales de cada experimento varían en cada uno de ellos. Por lo tanto cada valor de la cinética se dividió entre su valor inicial con la finalidad de que todas las cinéticas comenzaran en 1. La figura 9 muestra estos resultados.

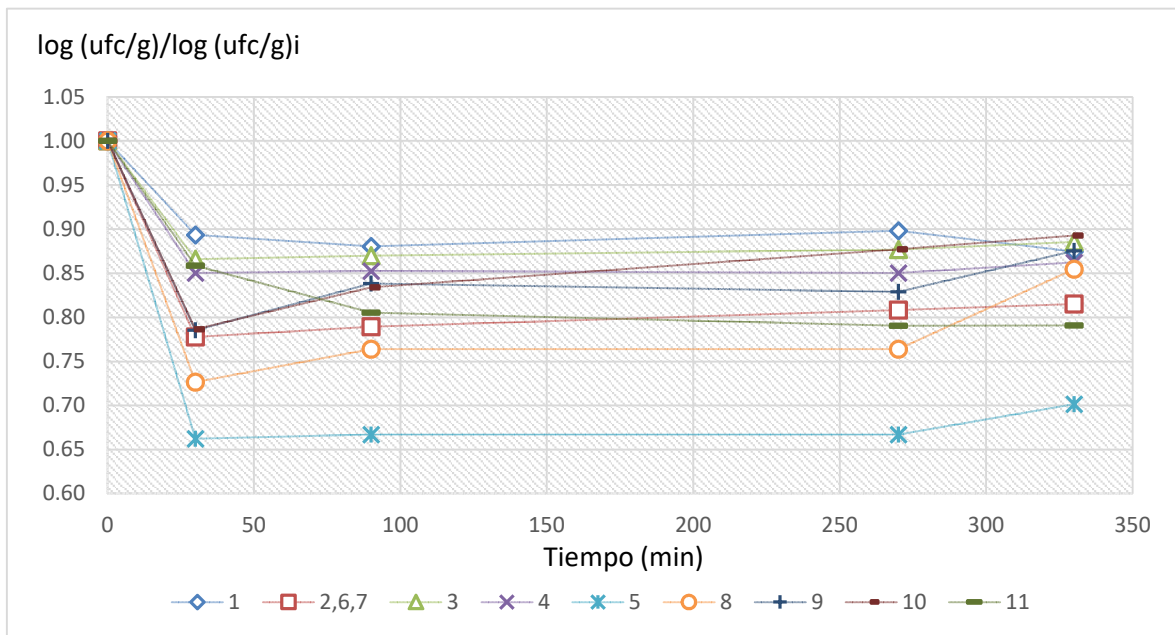


Figura 9. Viabilidad de los probióticos en el polvo sometidos a condiciones gástricas simuladas.

Para apreciar mejor los resultados nos enfocaremos solo en los experimentos 1, 5, 8 y 11. En la figura 10 se evidenció que los polvos obtenidos con el experimento 1 tienen la mayor resistencia a los jugos gástricos simulados, observando el poder de protección que le confiere el agente encapsulante, siendo este el experimento con mayor porcentaje en la concentración de material de pared. El experimento 5 exhibe ser el más susceptible a la condición gástrica, esto podemos relacionarlo además con el bajo rendimiento de polvo probiótico obtenido, por lo que la cápsula no logró una cobertura total y permite el contacto de las bacterias con el ambiente dando lugar a la muerte celular. El experimento 11 tendió a tener una resistencia a la condición gástrica similar al experimento 1.

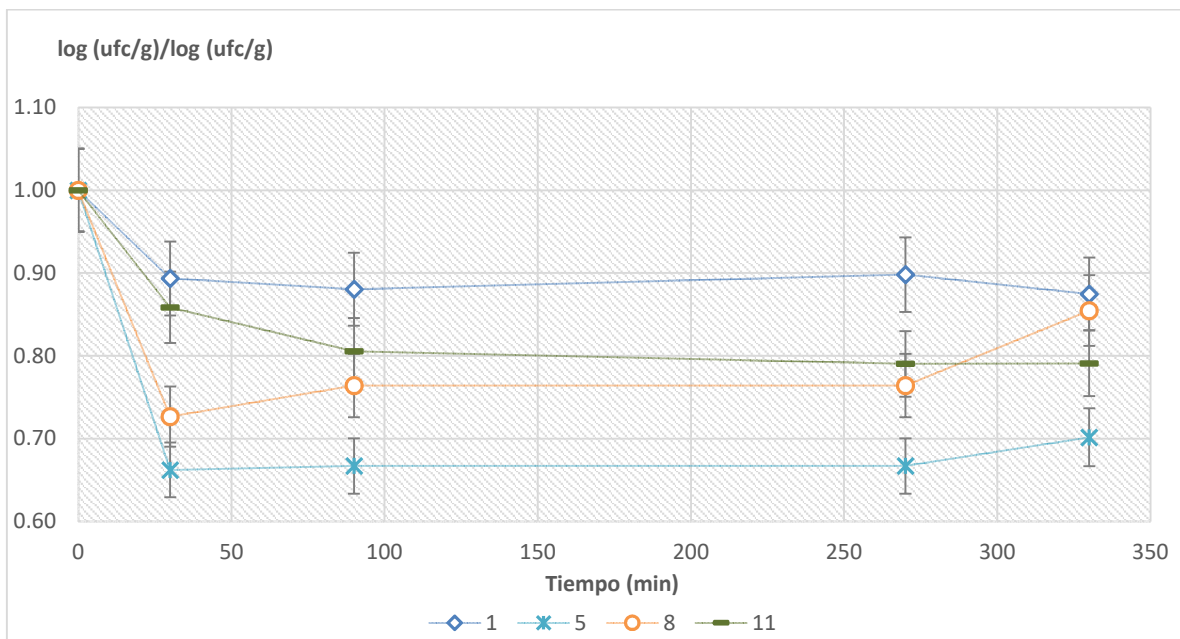


Figura 10. Viabilidad de los probióticos en los experimentos 1, 5, 8 y 11, de los polvos probióticos con punto inicial único.

La viabilidad en todos los experimentos es evidente, y la “regeneración celular” se observa en casi todas las pruebas como lo demostró Vernazza et al (2006) para cinco cepas de bifidobacterias sometidas a simulaciones gástricas. Los probióticos

del experimento 8 mostraron tener una regeneración celular cuando estuvieron en contacto con las sales biliares simuladas. Aunque todos los tratamientos son estadísticamente iguales en el secado por aspersión, en la prueba de la simulación gástrica se muestra el poder de protección que le trasfiere la microencapsulación.

### 6.3 Viabilidad de las bacterias microencapsuladas durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración

El estudio está enfocado en crear un ingrediente a partir de los beneficios que confiere *Bifidobacterium lactis* al cuerpo humano, y poder ser utilizado en el diseño de un queso simbiótico con beneficios a la salud. En este punto del estudio se evaluó la viabilidad del microorganismo microencapsulado durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, con la finalidad de determinar la vida de anaquel del cultivo.

En la figura 11 podemos apreciar la disminución de la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento en una manera general.

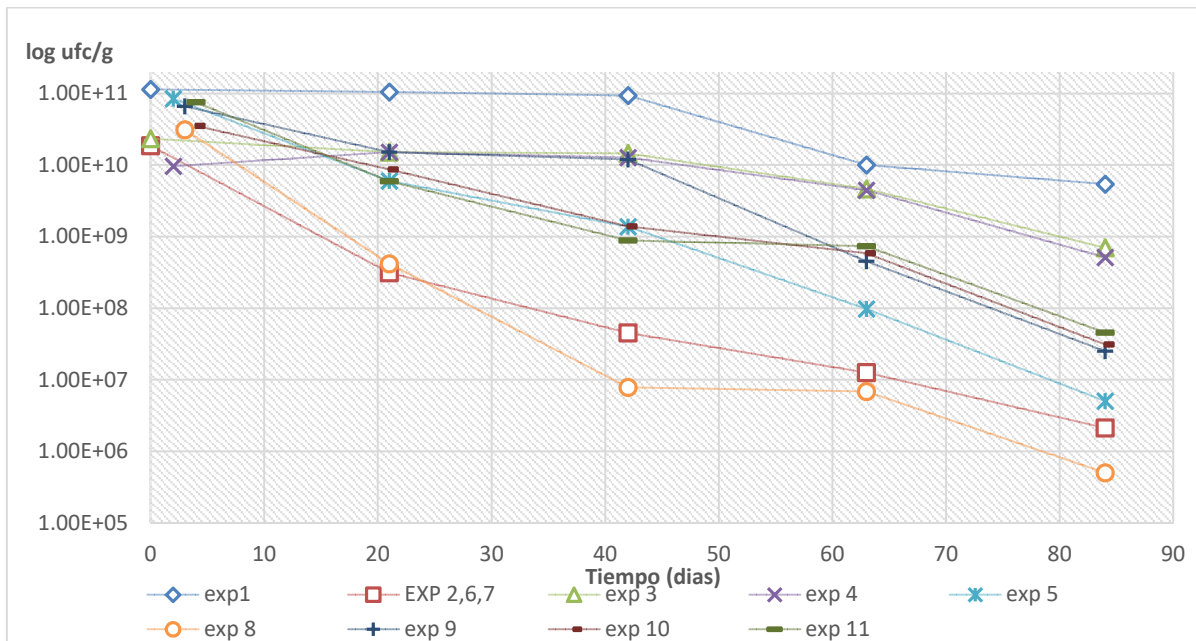


Figura 11. Viabilidad de *Bifidobacterium* en los polvos durante el almacenamiento.

Sin embargo, para una mejor apreciación de la misma forma que anteriormente cada valor de la cinética se dividió entre su valor inicial con la finalidad de que todas las cinéticas comenzaran en 1, lo cual podemos ver en la figura 12.

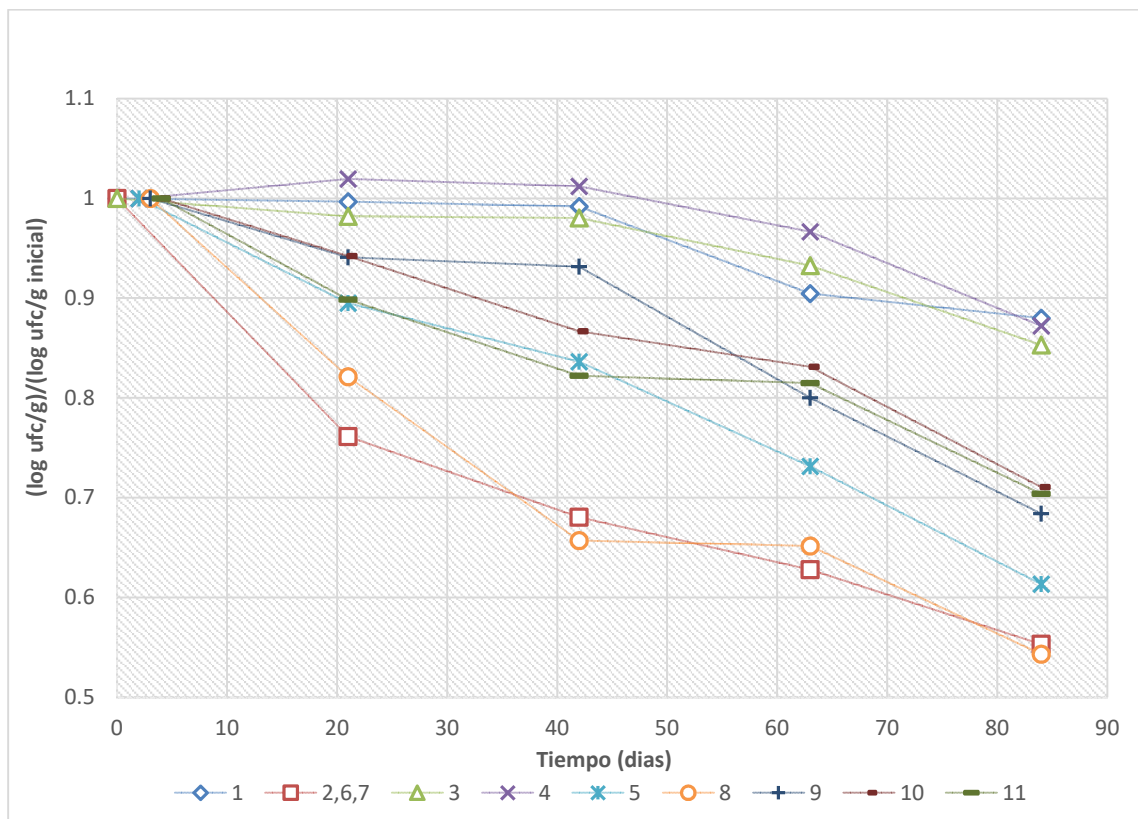


Figura 12. Viabilidad de Bifidobacterium en los polvos durante el almacenamiento con un punto inicial único.

Durante el almacenamiento, los experimentos 1, 3 y 4 tuvieron similares resultados al final del monitoreo siendo los de mejor resistencia y mayor viabilidad, atribuyéndoselo a la concentración del material de pared que fueron 26, 20, 25 % respectivamente. Por otra parte en el experimento 8 y el promedio de los experimentos 2, 6 y 7 son los que presentaron una resistencia inferior a los demás y menor viabilidad.

En la figura 13 podemos apreciar la viabilidad de los experimentos en las diferentes concentraciones de material de pared 26, 20, y 14 % .



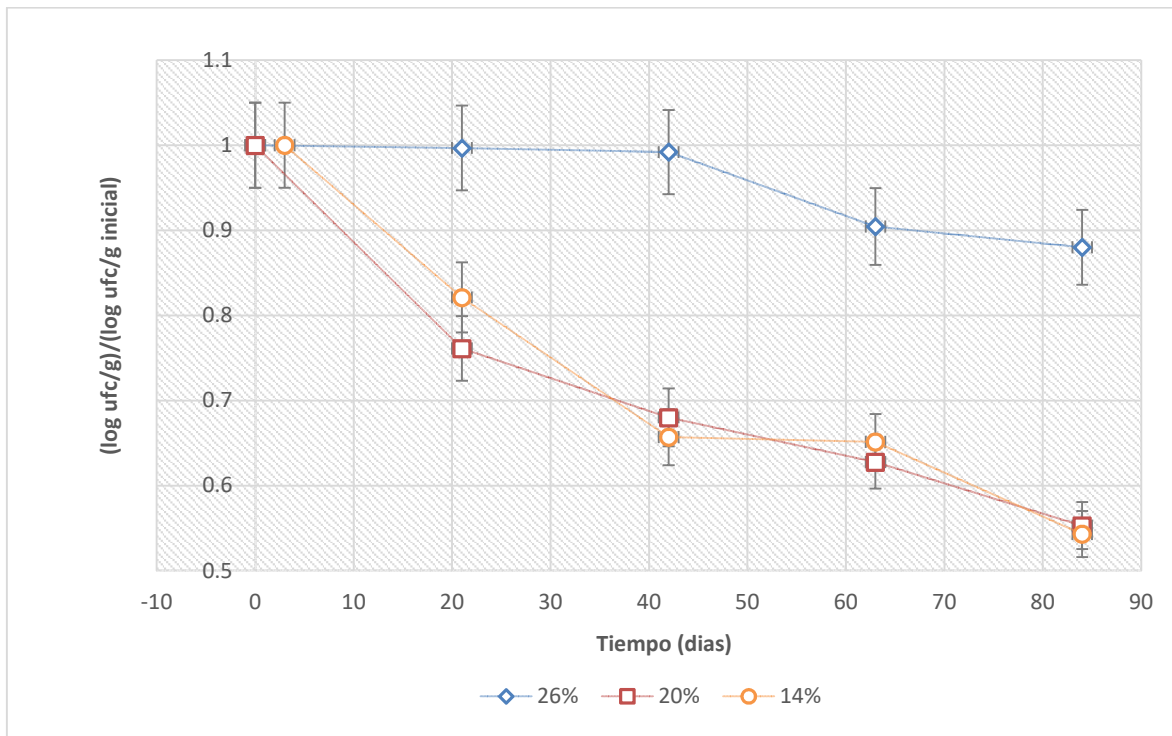


Figura 13. Viabilidad de *Bifidobacterium* en polvos respecto a la concentración del material de pared durante el almacenamiento.

Se puede notar que entre mayor sea la concentración del material de pared le confiere mayor protección a la bacteria, pero en los experimentos se notó que el flujo de alimentación influye también en la protección como se aprecia en la figura 14. Homayouni et al (2009) estudiaron algunas cepas de bifidobacterias como probióticos en helado, demostrando que *Bifidobacterium lactis* tiene una alta resistencia a temperaturas bajas, esto demuestra que nuestra cepa, además de tener una protección extra que le confiere el agente encapsulante, por sí misma tiende a sobrevivir a temperaturas bajas y principalmente sobrevive durante mayor tiempo.

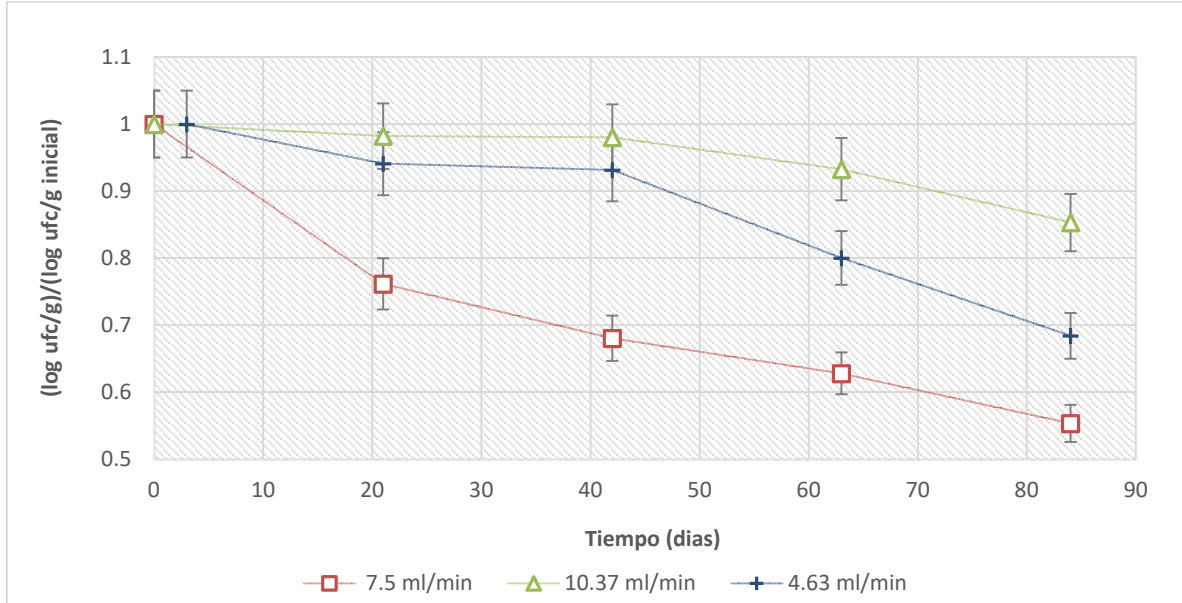


Figura 14. Viabilidad de *Bifidobacterium* en polvos respecto al flujo de alimentación durante el almacenamiento.

Como se muestra en la figura 14, el flujo de alimentación afecta la viabilidad del microorganismo encapsulado. Entre mayor sea la concentración del material de pared y el flujo de alimentación, la protección es mayor, en este caso el tratamiento con 10.37 mL/min. Se puede concluir que, entre mayor sea la concentración del agente encapsulante y mayor sea el flujo de alimentación en el aspersor, mejor será la protección concedida por la microcápsula.

## 7. Conclusiones y recomendaciones

- La microencapsulación mediante secado por aspersion es una técnica apropiada para poder encapsular *Bifidobacterium lactis*, utilizando una temperatura de 160°C, un flujo de alimentación de 5 mL/min y una concentración de material de pared de un 15%, condiciones que promueven un mayor rendimiento del polvo asperjado.
- Un flujo de alimentación de 7.5 mL/min y una concentración de material de pared de 25.73 %, crean mayor protección a la bacteria en condiciones gastrointestinales simuladas y después de 12 semanas de almacenamiento.
- La mezcla  $\beta$ -ciclodextrina-goma arábica como material de pared presenta ser eficiente para la microencapsulación de *Bifidobacterium lactis* al resistir condiciones del proceso de secado por aspersion, el proceso de gastrointestinal simulado y un periodo de 12 semanas de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

## 8. Bibliografía

Akalm, A., Fenderya, S. y Akbulut, N. 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated Storage. INT J FOOD MICROBIOL. 39: 613–621.

Arnaud Picot y Christophe Lacroix 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt, Int Dairy J. 14: 505-515

Baron, M., Denis, R. y Vuillemand, J. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. L`Lait 80: 465–478.

Berna, M. L. 2009. Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de opuntia estricta mediante secado por atomización. universidad politecnica de cartagena, 3-4.

Bezkorovainy, A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut.: Am J Clin Nutr., v. 73(suppl.), p. 399-405.

Boever, P, R Wouters, L Verschaeve, P Berckmans, G Schoeters y W Verstraete, 2000, Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity.: Appl Microbiol Biotechnol. v. 53, p. 709-714.

Brian V. Jones, Maire Begley, Colin Hill, Cormac G. M. Gahan, and Julian R. Marchesi. 2008. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. PNAS. vol. 105: 36. 13580–13585.

Castillo, J. 2005. Lactobacilos. Disponible en: <http://www.monografias.com/Trabajos15/Lactobacilos/Lactobacilos.html>

Catherine Stanton Gerald F. Fitzgerald and R. Paul Ross 2012. Overview of Technology Developments in Probiotic Field. Microbial Ecology in Health & Disease 2012, 23: 18561.

Dora I. A. Pereira and Glenn R. Gibson. 2002. Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68(9):4689.

Favaro Trindale, C. S. 2007. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (lac 4) by complex coacervation followed by spray drying. Trends Food Sci Tech, 24: 685-693.

Fuller, R. (2004) What is a Probiotic? Biologist, 51, 232.

Guarner, F. 2008. probioticos y prebioticos. organizacion mundial de gastroenterologia, 3-4.

Homayouni. 2009. Viabilidad de Algunas Cepas de Probióticos en Condiciones Simuladas de Helado. Mundo lácteo y cárnico.

Islas, R. P. 2002. Particularidades de los procesos para la microencapsulacion de alimentos para larvas de especies acuícolas. Memorias del VI simposium internacional de nutrición acuícola. Quintana Roo.

N. P. Shah. 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. 2000 J Dairy Sci 83:894–907.

Martín Villena M J. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.

Martínez, G. 2007. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. Rev Iberoam Polym. 8: 301-303

Metchnikoff E., 1907. *Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction*. In: The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London: 161-183.

P. Marteau, E. Cuillerier, S. Meance, M. F. Gerhardt, A. Myara, M. Bouvier, C. Bouley, F. Tondou, G. Bommelaer & J. C. Grimaud. 2002- Bifidobacterium animalis strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. Aliment Pharm Ther. 16: 587 - 593.

Roy, D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. International journal of food microbiology, 69: 167-182.

Shah N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. J Dairy Sci. 83: 894-907

Tissier H., 1906. *Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin*. CR. Soc. Biol, 60: 359-361.

Tonon R. V, Brabet C. y Hubinger M. D. 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. J Food Eng. 88:411-418.

Velázquez, M. 2010. Tecnología de las Ciclodextrinas. Obtenido de universal laboratorio: <http://www.laboratoriouniversal.com.uy/biblioteca/ciclodextrinas.pdf>

Yañez Fernández E. J.A. Salazar Montoya, L. Chaires Martinez, J. Hernández, M. Márquez Robles y E. G. Ramos Ramírez. 2005. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. Mundo alimentario: 24-26