



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus paracasei*
subsp. *paracasei* MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

P R E S E N T A:

I. A. OFELIA ALFARO GALARZA

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. HEIDI MARÍA PALMA RODRÍGUEZ**



TULANCINGO DE BRAVO, ENERO 2019



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAp

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Microencapsulacion de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* mediante secado por aspersión", que desarrolla el estudiante OFELIA ALFARO GALARZA

Asistentes:

- Dra. Heidi María Palma Rodríguez
- Dr. Apolonio Vargas Torres
- Dr. Adrián Zaragoza Bastida
- Dr. Norberto Chavarria Hernández

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Ofelia Alfaro Galarza, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 7 de enero de 2019

- Dra. Heidi María Palma Rodríguez
- Dr. Apolonio Vargas Torres
- Dr. Adrián Zaragoza Bastida
- Dr. Norberto Chavarria Hernández

[Handwritten signatures in blue ink over a circular stamp]

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INST. DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

JAEH BIBLIOTECA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios él es sabio, y sabe a qué lugar perteneces, te guía en tu camino, para que al final cumplas tus metas.

Igualmente a mi padre, mi madre y hermanas porque no hay nada más importante que contar con su apoyo, porque son los seres humanos que más admiro y amo en esta vida y porque me han dado la dicha de ser mi familia.

Así mismo a la Dra. Heidi porque se convirtió en más que una profesora, por hacer que crea en mí y por la plena confianza que me ha brindado y gracias por haberme guiado y acompañado en esta aventura.

Gracias a las personas que me han logrado sacar más sonrisas y hacer de esto una nueva experiencia, de verdad Joel, Karla, Roman, Lore, Ana, Esteban, Miguel no tengo como agradecerles tantos momentos los quiero demasiado.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Agropecuarias en el laboratorio de Físicoquímica, Biotecnología y Taller de Fermentaciones bajo la dirección de la Dra. Heidi María Palma Rodríguez. Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de CONACYT (781710).

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Microencapsulación	4
2.1.1. Cápsulas.....	5
2.1.2. Liberación controlada del núcleo.....	7
2.2. Técnicas de microencapsulación.....	8
2.2.1. Secado por aspersion	10
2.2.2. Características de productos microencapsulados a través de secado por aspersion	11
2.3. Materiales encapsulados	13
2.3.1. Definición del término “probiótico”	13
2.3.2. Bacterias probióticas.....	15
2.3.3. Características de los probióticos	17
2.3.4. Probióticos encapsulados	18
2.3.5. Lactobacillus	19
2.3.5.1. <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	21
2.4. Materiales pared	21
2.4.1. Prebióticos	22
2.4.2. Almidón.....	23
2.4.2.1. Almidón de arroz y de malanga	24
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivo general	27
4.2. Objetivos específicos.....	27

V. HIPÓTESIS	28
VI. METODOLOGÍA	29
6.1. Materiales.....	29
6.2. Métodos	29
6.2.1. Obtención de los almidones	29
6.2.1.1. Almidón de arroz	29
6.2.1.2. Almidón de malanga.....	32
6.2.2. Contenido de almidón total	33
6.2.3. Contenido de amilosa aparente	33
6.2.4. Caracterización morfológica de los almidones	34
6.2.4.1. Distribución de tamaño de partícula	34
6.2.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido	34
6.2.5. Caracterización del probiótico <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	35
6.2.5.1. Estandarización	35
6.2.5.2. Curva de crecimiento.....	36
6.2.6. Microencapsulación de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	36
6.2.6.1. Estandarización del inóculo	36
6.2.6.2. Preparación de las dispersiones del material pared.....	37
6.2.6.3. Secado por aspersion.....	37
6.2.7. Eficiencia de encapsulación	39
6.2.8. Caracterización fisicoquímica de microcápsulas	39
6.2.8.1. Actividad de agua (a_w)	39
6.2.8.2. Contenido de humedad	40
6.2.8.3. Densidad de bulto.....	40
6.2.9. Caracterización morfológica de microcápsulas	41
6.2.9.1. Distribución de tamaño de partícula	41
6.2.9.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	41
6.2.9.3. Microscopía Confocal de Barrido Láser	41
6.2.10. Viabilidad de las bacterias encapsuladas durante el almacenamiento	42
6.2.11. Supervivencia de bacterias encapsuladas bajo condiciones gastrointestinales simuladas	42
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
7.1. Contenido de almidón total	44

7.2. Contenido de amilosa aparente.....	44
7.3. Caracterización morfológica de los almidones	45
7.4. Caracterización del probiótico <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>.....	49
7.4.1. Estandarización	49
7.4.2. Curva de crecimiento	49
7.5. Secado por aspersion	52
7.6. Viabilidad y eficiencia de encapsulación.....	55
7.7. Caracterización fisicoquímica de microcápsulas	58
7.8. Caracterización morfológica de microcápsulas.....	61
7.8.1. Distribución de tamaño de partícula	61
7.8.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	63
7.8.3. Microscopía Confocal de Barrido Láser (MCBL).....	65
7.9. Viabilidad de bacterias encapsuladas durante el almacenamiento	67
7.10. Supervivencia de bacterias encapsuladas bajo condiciones gastrointestinales simuladas	71
VIII. CONCLUSIONES.....	75
IX. BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Materiales pared y su potencial mecanismo de liberación.	9
Cuadro 2. Bacterias lácticas usadas más comúnmente.	16
Cuadro 3. Trabajos previos que se han realizado utilizando almidón como material pared.	25
Cuadro 4. Condiciones de secado por aspersión.	38
Cuadro 5. Condiciones del secador por aspersión para el almidón de arroz (AA) y de malanga (AM).	54
Cuadro 6. Eficiencia de encapsulación en las microcápsulas obtenidas a través de secado por aspersión (Temperatura de entrada: 70 °C y flujo de alimentación: 10 mL/min)	56
Cuadro 7. Propiedades fisicoquímicas de encapsulado de almidón de arroz (EA) y de malanga (EM).	59
Cuadro 8. Población microbiana durante almacenamiento a 4 °C.	68
Cuadro 9. Población microbiana durante almacenamiento a 25 °C.	68
Cuadro 10. Digestión in vitro del encapsulado obtenido con almidón de arroz	72
Cuadro 11. Digestión in vitro del encapsulado obtenido con almidón de malanga.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de diferentes tipos de microcápsulas.	6
Figura 2. Etapas del secado por aspersion.....	12
Figura 3. Efectos benéficos de los probióticos	20
Figura 4. Diagrama del planeamiento experimental.....	30
Figura 5. Continúa diagrama del planeamiento experimental.....	31
Figura 6. Tamaño de partícula de almidón de arroz (AA) y almidón de malanga (AM).....	46
Figura 7. Microscopía electrónica de barrido del almidón de arroz (AA) y del almidón de malanga (AM).....	48
Figura 8. Estandarización de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> por etapas.....	50
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	51
Figura 10. Tamaño de partícula encapsulado de arroz (EA) y encapsulado de malanga (EM).....	62
Figura 11. Micrografías de las microcápsulas obtenidas con almidón de arroz y almidón de malanga.....	64
Figura 12. Microscopía confocal de barrido láser de los encapsulados de malanga (A-C) y de arroz (D-F).....	66
Figura 13. Estabilidad a temperatura ambiente (TA) y de refrigeración (TF) de las microcápsulas de almidón de arroz (EA) y almidón de malanga (EM)	70
Figura 14. Digestión in vitro del encapsulado de malanga (EM-DV) y del encapsulado de arroz (EA-DV).....	73

RESUMEN

La sobrevivencia de los probióticos a través del tracto gastrointestinal es uno de los mayores retos de la industria de los alimentos. Por lo tanto, es necesario protegerlos y una opción son los procesos de microencapsulación los cuales pueden incrementar su sobrevivencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector de dos materiales pared, almidón nativo de malanga (5.16 μm) y de arroz (6.99 μm) en la sobrevivencia de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. La microencapsulación fue realizada mediante secado por aspersión con diferentes temperaturas de entrada, seleccionándose la de mayor eficiencia (70 °C). Posteriormente se analizaron las propiedades fisicoquímicas, la eficiencia de encapsulación y la viabilidad gastrointestinal de las microcápsulas; así como los cambios en la morfología mediante técnicas de microscopía electrónica y confocal.

Este estudio mostró que la viabilidad de las microcápsulas en ambos almidones se vio afectada drásticamente con el aumento de la temperatura de entrada, disminuyendo el número de microorganismos de 1.14×10^{10} a 1.33×10^9 UFC para el encapsulado de arroz y de 1.14×10^{10} a 2.44×10^9 UFC para el encapsulado de malanga, lo cual afecta la eficiencia de la encapsulación. El tamaño del gránulo del almidón de malanga mostró una mejor formación de agregados esféricos, influyendo hasta en un ciclo logarítmico en la viabilidad inicial del microorganismo y brindando una mejor protección durante los 30 días a ambas temperaturas de almacenamiento. La microscopía electrónica y confocal mostraron un mejor agregado esférico para el almidón de malanga y menor coloración verde en la periferia del encapsulado, lo cual se relaciona con la capacidad de sobrevivencia de *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

Por lo anterior podemos inferir que el uso de almidón de malanga proporciona una mejor protección en la encapsulación de cepas probióticas. Además, debido a su estructura cristalina nativa, es un excelente material resistente a la digestión gastrointestinal.

ABSTRACT

The maintenance of probiotics viability throughout the gastrointestinal tract is one of the major challenges to the food industry. Therefore, it is necessary to protect them, with encapsulation techniques to increase survival. The objective of this work was to evaluate the protective effect of two different particles sizes of the starch granules in the survival of *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. Native starch of taro (5.16 μm) and rice (6.99 μm) were used as wall material. Microencapsulation of *L. paracasei subsp. paracasei* was realized at air-dryer inlet temperatures of 135, 115 and 70 °C. Physicochemical properties, encapsulation efficiency and gastrointestinal viability, of microcapsules were analyzed; as well as the changes in morpho-structure using an electronic and confocal microscopy techniques. This study showed that the viability of the microcapsules in both starches was affected drastically with the increase of inlet temperature, decreases the microorganisms number (CFU/g), which affect the efficiency of encapsulation. The small size of the taro starch granule showed a better formation of spherical aggregates, influencing until one logarithmic cycle in the initial viability of microorganism (M.O) and better protection at 5 °C and 25 °C during the 30 days of storage. The electronic and confocal microscopy showed a better spherical aggregate, less M.O on the outside of the taro starch microcapsules, and an increase in the green coloration, which is related to the survival capacity of *L. paracasei subsp. paracasei*. The use of taro starch microcapsules provides better protection in the encapsulation of probiotic strains. Furthermore, due to its native crystalline structure, it is an excellent material resistant to gastrointestinal digestion.

I. INTRODUCCIÓN

En épocas recientes ha incrementado el consumo de microorganismos probióticos debido a que se encuentran asociados con múltiples beneficios a la salud sobre todo en el sistema digestivo (Shanahan, 2002), con esto se ha estimulado la creación de nuevos productos los cuales contengan bacterias benéficas para la población en general, en especial para los niños y los grupos de alto riesgo como las personas de la tercera edad y con enfermedades terminales (FAO, 2002). En la microbiota natural de los seres humanos encontramos algunas bacterias como son los *Lactobacillus* y las Bifidobacterias, se ha reportado que estas bacterias desempeñan un papel terapéutico mediante la modulación de la inmunidad, disminuyendo los niveles de colesterol, mejorando la tolerancia a la lactosa y ayudando en la prevención de algunos tipos de cáncer (Kailasapathy, 2006; Lorente & Serra, 2001).

Actualmente en la industria alimentaria, existe un gran problema con respecto a la adición de probióticos en los alimentos, el cual es garantizar que dichos microorganismos lleguen vivos al intestino grueso, es decir; mantener el cultivo funcional. Para poder llevar a cabo esto es necesario tener una concentración de 1×10^7 UFC/mL al momento del consumo (Peredo *et al.*, 2016), para que de esta manera los microorganismos puedan llegar al sitio de acción dentro del organismo y cumplan su función (Anal & Singh, 2007). Por lo anterior, se han buscado diferentes alternativas para evitar la pérdida y el deterioro de los probióticos, así como su protección. La encapsulación, es uno de los métodos que mejores resultados ha dado para lograr este propósito. Dicho proceso consiste en introducir a los

microorganismos vivos en una matriz o material pared, en las cantidades adecuadas para que su estabilidad metabólica y actividad funcional sea conservada (Chen *et al.*, 2005). El secado por aspersión es uno de los métodos que se utiliza para la conservación de cultivos de bacterias ácido-lácticas, este proceso presenta una serie de ventajas sobre otros sistemas de deshidratación de alimentos, como los bajos costos de requerimiento energético, el secado de productos con componentes termolábiles, la menor pérdida de volátiles y de aromas, así como una buena estabilidad del producto durante su procesamiento y almacenamiento (Avila-Reyes *et al.*, 2014).

Por otra parte, el concepto de prebiótico hace referencia a aquel componente de los alimentos que no entra en el proceso de digestión en el intestino delgado, para ser utilizado en el colon como sustrato para el desarrollo de la flora intestinal (Gibson & Roberfroid, 1995) a su vez son fermentados en el intestino grueso por la microbiota residente (Bird *et al.*, 2000). Los prebióticos, ayudan a establecer una flora nativa apropiada que mejore las funciones de defensa inmunológica del intestino del huésped, así como otras funciones (Kaur & Gupta, 2002; Roberfroid & Slavin, 2000). En este sentido, los almidones nativos de arroz y de malanga, están constituidos por gránulos pequeños, en presencia de proteína tienden a formar microcápsulas de aglomerados, por lo que al llegar al colon es fermentado por la microbiota presente. Se consideran prebióticos por la resistencia a la digestión, que puede ser causada por las limitaciones de accesibilidad física, por la estructura granular del almidón nativo o la modificación física de los almidones en el proceso de secado. Por lo tanto, almidones nativos de gránulo pequeño pueden desempeñar el papel prebiótico y

junto con los probióticos ejercen un mayor beneficio a los seres humanos puesto que crean un efecto sinérgico (Homayouni *et al.*, 2007).

II. ANTECEDENTES

2.1. Microencapsulación

La microencapsulación puede ser definida como la tecnología para empaquetar sólidos, líquidos o gases, cubiertos con materiales poliméricos delgados, formando pequeñas partículas, o también puede encontrarse incrustado en una matriz homogénea o heterogénea (Gharsallaoui *et al.*, 2007). El polímero actúa como una película protectora, aislando el núcleo y evitando el efecto de su inadecuada exposición. Esta película protectora se disuelve a sí misma a través de un estímulo específico liberando el ingrediente encapsulado ya sea en lugar o tiempo ideal (Suave *et al.*, 2006). El núcleo puede estar compuesto de uno o de varios ingredientes y su recubrimiento puede ser de una o dos capas. La retención de estos núcleos se debe a su funcionalidad, solubilidad, polaridad y volatilidad.

Existen diferentes razones por lo cual es necesaria la microencapsulación en la industria alimentaria entre ellas están la reducción de la reactividad del núcleo con factores ambientales; para disminuir la velocidad de transferencia del núcleo al ambiente; para un manejo más fácil; para controlar la liberación del núcleo, para diluir el material del núcleo cuando debe ser usado en pequeñas cantidades, entre otras (Shahidi & Han, 1993).

La mayoría de las microcápsulas son pequeñas esferas con diámetros que comprenden entre unos pocos micrómetros y unos pocos milímetros. De cualquier forma, muchas de estas microcápsulas pueden tener poca semejanza con una simple esfera. El tamaño y la forma de las partículas formadas dependen del material

y métodos usados para su obtención. Los diferentes tipos de microcápsulas y microesferas son producidos de una amplia gama de materiales pared (monómeros y/o polímeros) y por una gran variedad de tipos de microencapsulación (Kashappa *et al.*, 2005).

Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del núcleo la composición de la pared y la técnica de microencapsulación usada, diferentes tipos de partículas pueden ser obtenidas (Figura 1).

2.1.1. Cápsulas

Generalmente las cápsulas pueden ser clasificadas de acuerdo al tamaño en: macrocápsulas ($>5,000\mu\text{m}$), microcápsulas ($0.2-5,000\mu\text{m}$) y nanocápsulas ($<0.2\mu\text{m}$). En términos de su forma y construcción las cápsulas pueden ser divididas en dos grupos: microcápsulas y microesferas. Las microcápsulas son partículas que consisten en un núcleo interno, substancialmente central, contiene la sustancia activa, la cual está cubierta con una capa de polímero el cual constituye la cápsula de la membrana. Las microcápsulas pueden ser mononuclear o polinuclear y se distinguen si el núcleo está dividido o no (Favaro-Trindade *et al.*, 2008)

En contraste las microesferas es una matriz en la cual el núcleo esta uniformemente disperso y/o disuelto en una red polimérica. Las microesferas pueden ser homogéneas o heterogéneas dependiendo si el núcleo está en estado molecular (disuelto) o si forma partículas (suspendido).

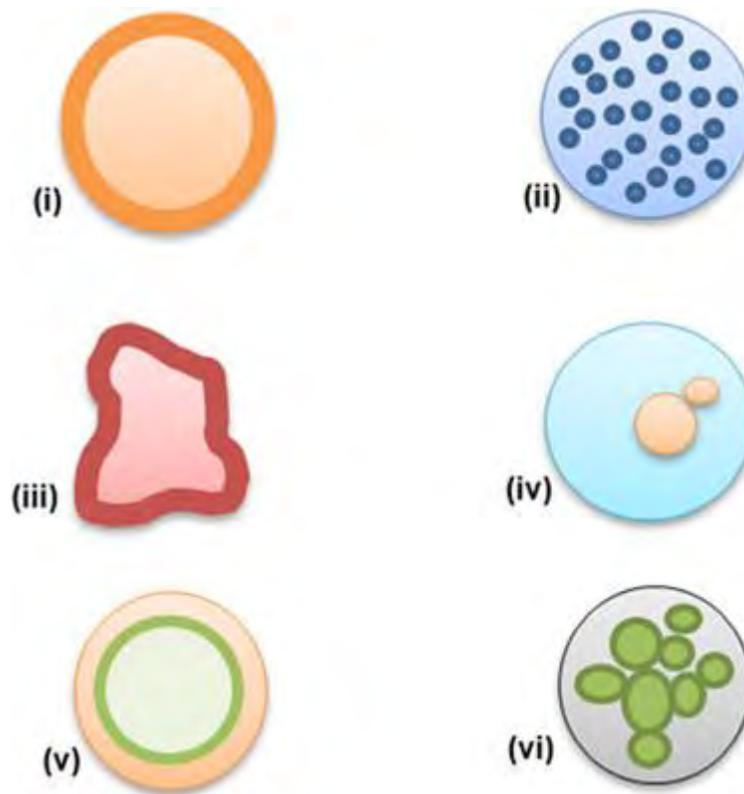


Figura 1. Morfología de diferentes tipos de microcápsulas.

(i) microcápsula simple, (ii) matriz (microesféra), (iii) microcápsula irregular, (iv) microcápsula multinúcleo, (v) microcápsula multipared, y (vi) microcápsula polinúcleo. (Bakry et al., 2016).

2.1.2. Liberación controlada del núcleo

De acuerdo a Gouin (2004), la encapsulación debe permitir que el núcleo se encuentre aislado hasta que la liberación sea deseada. Por lo tanto, la liberación en tiempo y lugar apropiado es una propiedad extremadamente importante en el proceso de encapsulación, mejorando la eficiencia, reduciendo la dosis requerida de aditivos y expandiendo las aplicaciones a compuestos de interés. El factor principal que afecta la velocidad de liberación está relacionado con las interacciones entre el material pared y el núcleo.

Adicionalmente, otros factores influyen la liberación, como la volatilidad del núcleo, el radio entre el núcleo y el material pared, tamaño de la partícula y grado de viscosidad del material pared. Las principales condiciones involucradas en la liberación del núcleo son difusión, degradación, uso de solventes, pH, temperatura y presión. En la práctica una combinación de más de un mecanismo es usado (Kashappa *et al.*, 2005).

La difusión ocurre principalmente cuando la microcápsula de la pared está intacta; la velocidad de liberación se debe a las propiedades químicas del núcleo y el material pared y propiedades físicas de la misma pared. Por ejemplo, algunos ácidos pueden ser liberados durante un paso del proceso, pero protegidos por un paso siguiente. En algunos casos, algunos conservadores son requeridos en la superficie del producto, pero deben ser controlados.

La liberación ocurre cuando las enzimas como proteasas y lipasas degradan las proteínas o lípidos, respectivamente (Hickey *et al.*, 2007). En contacto con un

solvente puede disolverse completamente, liberando rápidamente el núcleo, o empezando a expandirse favoreciendo la liberación.

Cuando cambia el pH existen alteraciones en la solubilidad del material pared permitiendo la liberación del núcleo. Por ejemplo, los microorganismos probióticos pueden ser microencapsulados para resistir el pH del estómago y solo ser liberados en pH alcalino del intestino (Toldrá & Reig, 2011).

Cambios en la temperatura promueven la liberación del núcleo. Existen dos conceptos diferentes: liberación temperatura-sensibilidad, para materiales que se expanden o colapsan cuando la temperatura crítica es alcanzada, el cual involucra derretimiento del material pared hasta que la temperatura aumenta. La liberación por presión ocurre cuando la presión es aplicada a la pared de la cápsula, para así liberar algunos sabores durante la masticación (Wong *et al.*, 2009).

Algunos materiales pared y posibles mecanismos de liberación para las microcápsulas se encuentran en el Cuadro 1.

2.2. Técnicas de microencapsulación

El problema que se presenta cuando se desea incorporar probióticos a cualquier formulación, es la escasa resistencia de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura. Por todo esto, es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas

Cuadro 1. Materiales pared y su potencial mecanismo de liberación.

Material Pared	Mecánico	Mecanismos de liberación		
		Térmico	Disolución	Químico
Soluble en agua				
Alginato	x		x	
Carragenina	x		x	
Caseinato	x		x	
Quitosano	x			
Celulosa Modificada	x		x	
Gelatina	x			
Guma Xantana	x	x		
Goma Arábica	x	x		
Látex	x		x	
Almidón	x		x	
Insoluble en agua				
Etilcelulosa	x			
Alcoholes grasos	x	x		x
Ácidos grasos	x	x		x
Ácido hidrocarbonado	x	x		
Mono, di y triacil glicerol	x	x		
Ceras naturales	x	x		
Polibuteno	x	x		
Polietileno	x	x		

Fuente: Adaptado de (Favaro-Trindade *et al.*, 2008)

del entorno. Para ello, recurrimos a las técnicas de microencapsulación, que consisten en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica. La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto y del mecanismo de liberación deseado (Villena *et al.*, 2009).

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

- ✓ Procesos físicos: liofilización, cobertura por lecho fluidizado, extrusión y secado por aspersión.
- ✓ Procesos químicos: polimerización interfacial, inclusión molecular, coacervación, liposomas y gelificación iónica.

2.2.1. Secado por aspersión

El secado por aspersión es uno de los procesos más empleados en la microencapsulación, en el cual el centro activo es “atrapado” dentro de una matriz protectora formada por el material pared. Es un proceso económico y flexible, además utiliza equipo fácilmente disponible y produce partículas de buena calidad (Palma-Rodríguez, 2012).

El secado por aspersión es un proceso continuo que involucra varias etapas, la primera es la dispersión del centro activo en el material pared, seguida de la atomización de la dispersión dentro de la cámara de secado (Figura 2A), la evaporación (Figura 2B) y finalmente la separación del producto seco (microcápsulas) (Figura 2C) (Palma-Rodríguez, 2012).

Generalmente, las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión son del tipo matriz. En éstas, el centro activo se encuentra en forma de micropartículas o microgotas distribuidas dentro de una matriz sólida y seca. El tamaño promedio de las microcápsulas que se pueden obtener puede ser pequeño, desde 10 a 50 μm , hasta partículas más grandes de 2 a 3 mm (Palma-Rodríguez, 2012).

2.2.2. Características de productos microencapsulados a través de secado por aspersión

Las propiedades que presentan los productos encapsulados son de referencia para la evaluación en términos de su calidad y función. Asimismo, éstas tienen influencia durante el envasado de dichos polvos, en el transporte dentro de tuberías, reconstitución del producto, solubilidad, estabilidad en el almacenamiento y mezclado (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Entre las propiedades más importantes de los productos encapsulados mediante secado por aspersión se encuentran las siguientes:

- ✓ Humedad: Debe ser menor al 7% con una actividad de agua (a_w) de 0.15 a 0.30.

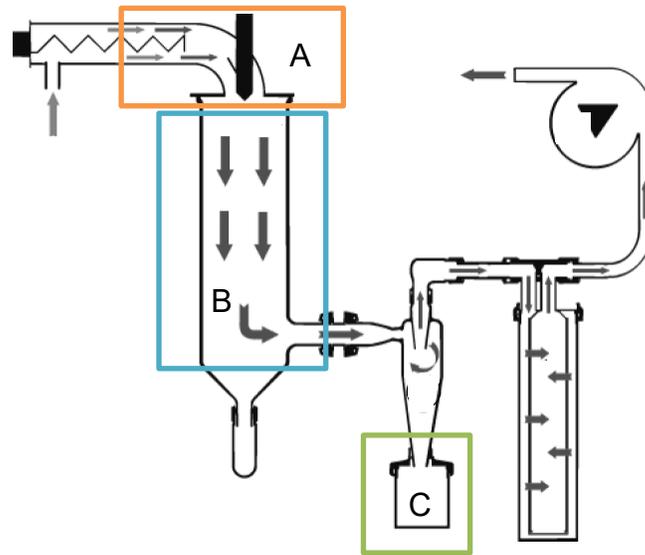


Figura 2. Etapas del secado por aspersión.

A) Atomización, B) Contacto aire-gota y evaporación, C) Recuperación del producto. (Palma-Rodríguez, 2012).

- ✓ Tamaño de partícula: El tamaño promedio se encuentra entre 5 -150 μm , pero varía en función de la naturaleza del ingrediente activo y el proceso.
- ✓ Forma: La mayoría de las veces se obtienen esferas, pero depende del tipo de material. La forma de los encapsulados influye en el mezclado, fluidez y densidad de la partícula.

2.3. Materiales encapsulados

La microencapsulación es una efectiva manera de crear alimentos que no solo sean fuente de nutrientes con apariencia sensorial sino también como una fuente de alimentos benéficos para los individuos, como incrementar el nivel de calcio para prevenir la osteoporosis, usar microorganismos productores de ácido láctico para disminuir el colesterol y agregar componentes fenólicos para prevenir problemas al corazón (Oliveira *et al.*, 2007). Algunos ingredientes que han sido encapsulados son: acidulantes, saborizantes, edulcorantes, colorantes, conservadores, aromas, enzimas, vitaminas y probióticos.

2.3.1. Definición del término “probiótico”

La palabra "probiótico" se traduce de la palabra griega que significa "para la vida". Una definición fue dada por Parker como "Organismos y sustancias las cuales contribuyen al balance de la microbiota intestinal". De cualquier forma, esto fue subsecuentemente refinado por Fuller (1989) como "Suplemento alimentario microbiano vivo que afecta benéficamente al huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal".

Esta última definición es la más usada y científicamente aceptada. Por lo tanto, un probiótico incorpora microorganismos vivos en la dieta, los cuales son benéficos para la salud.

Los probióticos tienen una larga historia. Los primeros registros de la ingesta de bebidas bacterianas por los humanos tienen más de 2000 años. A inicios de este siglo los probióticos fueron puestos sobre la base científica por el trabajo de Metchnikoff en el Instituto Pasteur en París. Él observó la longevidad en los campesinos búlgaros y asoció esto con su elevada ingesta de leches agrias. Durante estos estudios, hipotetizó que la microbiota benéfica podría tener efectos adversos sobre el huésped y que el consumo de ciertas bacterias podían ser causantes de estos efectos (Kaur & Arora, 2017).

Metchnikoff refinó el tratamiento utilizando cultivos puros de lo que ahora es llamado *Lactobacillus delbruckeii* subsp. *bulgaricus*, los cuales, con *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, son usados para fermentar la leche en la producción del yogurt tradicional. Subsecuentemente nuevas búsquedas han sido dirigidas hacia el uso de bacterias intestinales aisladas (Fernandes *et al.*, 1987). A través de los años muchas especies de microorganismos han sido usadas, generalmente bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacilli*, *Streptococci*, *Enterococci*, *Bifidobacteria*) aunque también *Bacillus* spp y hongos como *Saccharomyces* spp. y *Aspergillus* spp.

Las bacterias usadas son generalmente anaeróbicas y no sobreviven a temperaturas extremas. Para que un probiótico sea efectivo debe ser sensible a la

preparación en una forma viable a gran escala. Durante el uso y bajo el almacenamiento, los probióticos deben permanecer viables y estables, además de estar disponibles para sobrevivir al ecosistema intestinal y el huésped deberá tener beneficios al albergarlo (Desai, 2008).

2.3.2. Bacterias probióticas

Las bacterias probióticas están definidas como “microorganismos vivos, los cuales, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped” (FAO, 2002). Existe una amplia gama de productos comerciales con probióticos, los cuales contienen diferentes cepas probióticas que proporcionan diversos efectos benéficos a la salud.

La mayoría de probióticos usados hoy en día (Cuadro 2) pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Minocha, 2009), aunque también existen otros géneros como *Propionobacterium*, *Enterococcus*, y *Escherichia* que también están disponibles (Ouwehand *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Bacterias lácticas usadas más comúnmente.

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. Faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii ssp (bulgaricus)</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. themophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

Fuente: (Parvez *et al.*, 2006).

2.3.3. Características de los probióticos

La mayoría de los probióticos están relacionados a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Guarner *et al.*, 2007). De cualquier manera, para considerar el uso de diferentes cepas como probióticos deberá ser un habitante normal del tracto intestinal saludable, sobrevivir al tracto digestivo superior y capaz de sobrevivir y crecer en el intestino (resistente a ácidos y sales biliares), seguro para el consumo humano y tener la habilidad de adherirse al revestimiento intestinal y colonizarlo (Guarner & Schaafsma, 1998; Morelli, 2000). Las bacterias ácido lácticas tienen un buen historial de seguridad en comparación con otros probióticos y rara vez están involucrados en enfermedad. Por lo tanto, estos microorganismos han sido reconocidos como GRAS por sus siglas en inglés (Generally Recognized as Safe status) (Salminen *et al.*, 2002)

Para que los organismos puedan ser considerados como probióticos, se deben tener en cuenta los siguientes puntos (Harish & Thomas, 2006).

- ✓ Debe ser aislado de la misma especie de la del huésped
- ✓ Debe ser demostrable que tiene efectos benéficos sobre el huésped
- ✓ Debe ser no patogénico
- ✓ Debe ser capaz de sobrevivir al tránsito a través del tracto gastrointestinal

2.3.4. Probióticos encapsulados

Desde los descubrimientos de Metchnikoff, se ha atribuido a los microorganismos probióticos, propiedades benéficas sobre humanos y animales, lo que ha inducido a su aplicación en diversos alimentos vehículos, que le permiten al consumidor alcanzar estos beneficios. Adicionalmente, la combinación apropiada de prebióticos y probióticos produce mayor beneficio al consumidor y puede producir un efecto sinérgico. Las técnicas de encapsulación son una alternativa cuando se intenta proteger a estos microorganismos del efecto de agentes medioambientales que pueden afectar su viabilidad, durante el procesamiento, almacenamiento, consumo y a su paso por el tracto gastrointestinal al permitirles mantener su viabilidad y funcionalidad con en el tiempo (Semyonov *et al.*, 2010), reduciendo el daño celular al retener las células dentro de materiales encapsulantes que generan su aislamiento (Ranadheera *et al.*, 2010).

Resultados de investigaciones muestran que además de la técnica de encapsulación, el efecto de protección depende en gran medida de las propiedades funcionales del material pared. Ingredientes no digeribles de los alimentos como los prebióticos, a los que se les atribuyen cualidades protectoras sobre la microbiota gastrointestinal benéfica de humanos y animales podrían aplicarse como material de recubrimiento. Estos por ser alimentos no digeribles, resistentes a las enzimas digestivas, benefician al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y /o actividad de las bacterias en el colon. Debido al potencial sinérgico entre probióticos y prebióticos, se crea un beneficio al huésped, existiendo una mayor supervivencia e implantación de microorganismos vivos en el sistema

gastrointestinal. Existen varios benéficos de los probióticos algunos de ellos se pueden observar en la Figura 3.

2.3.5. *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* son un género de bacteria de la familia *Lactobacillaceae*, Gram-positiva, anaerobias. Crecen en medios ligeramente ácidos, pH de 6.4 hasta 4.5, y con un óptimo desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa a valores de pH de 3.6 a 4.0 (dependiendo de la especie y la cepa), disminuyendo de manera notable en medios neutros o ligeramente alcalinos. Mediante la formación de ácido láctico, reducen el crecimiento de otros microorganismos, excepto el de otras BAL y levaduras (Avila-Reyes *et al.*, 2014).

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento en la concentración de CO₂ (entre el 5 y el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del desarrollo superficial sobre medios sólidos. La mayor parte de los *Lactobacillus* son mesófilos (30-40°C), con un límite superior de 40 °C. Los *Lactobacillus* homofermentativos transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares en ácido láctico, y los heterofermentativos pueden generar otros productos finales, adicionales al ácido láctico como: peróxido de hidrógeno, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico (Chandramouli *et al.*, 2004).

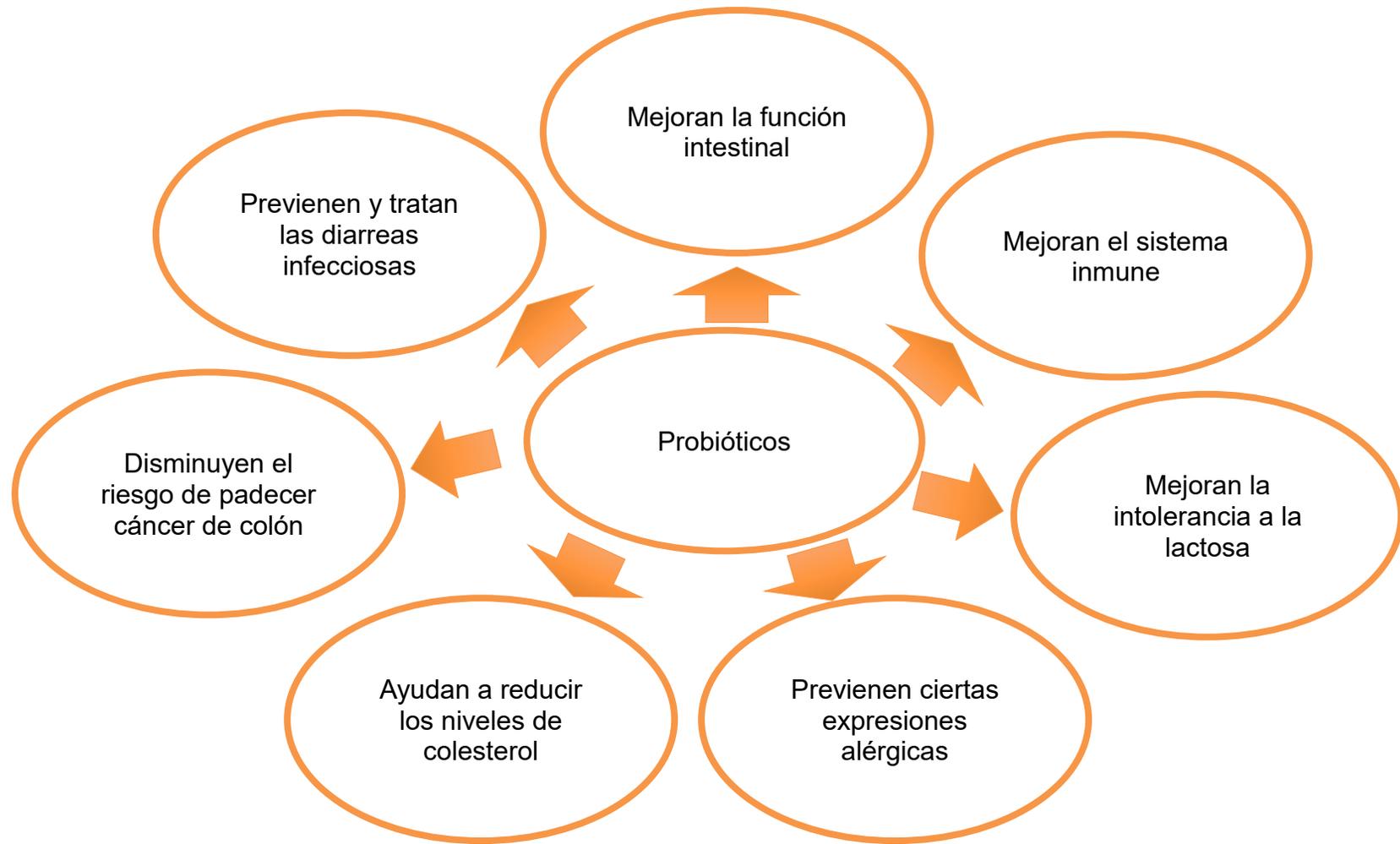


Figura 3. Efectos benéficos de los probióticos

(Avila-Reyes et al., 2014)

2.3.5.1. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

También conocida como *Lactobacillus casei*, es una bacteria ácido- láctica que posee el estatus GRAS, además de catalogarse como probiótico, corresponde al cultivo de microorganismos vivos (bacterias, hongos y levaduras) que actúan directa o indirectamente sobre bacterias patógenas Gram-negativas en el tubo digestivo, actuando por competición física o de nutrientes, por secreción de bacteriocinas, producción de ácidos o por inmunidad cruzada (Jurado-Gómez *et al.*, 2014). Por otra parte es Gram-positiva, facultativa anaerobia, homofermentativa y conocida por producir ácido láctico en forma L (+), y esto es importante ya que es el que se encuentra de forma natural en el metabolismo humano (Altiok *et al.*, 2006).

2.4. Materiales pared

La correcta elección del material pared es muy importante ya que este influye en la eficiencia de encapsulación y estabilidad de la microcápsula. El material pared ideal debe tener las siguientes características: no ser reactivo con el ingrediente a encapsular; capacidad para recubrir y mantener el ingrediente dentro de la cápsula; habilidad para proveer protección máxima al núcleo contra diversas condiciones; ausencia de sabores no placenteros en el caso de aplicación en alimentos y la viabilidad económica (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

De acuerdo Favaro-Trindade *et al.* (2008), la mayoría de los materiales pared no tienen todas las propiedades deseadas; por lo cual una práctica común involucra mezclar dos o más de ellos. Estos materiales pared pueden ser seleccionados de una amplia variedad de polímeros tanto naturales como sintéticos entre los que se

encuentran los lípidos: ceras, parafinas, monoglicéridos y diglicéridos, aceites hidrogenados y grasas; materiales inorgánicos: sulfato de calcio y silicatos; proteínas: gluten, caseína, gelatina y albúmina, gomas: arábica, alginato y carragenina, así como algunos carbohidratos: celulosa, quitosano y almidón.

2.4.1. Prebióticos

Actualmente existe mucho interés en mejorar la salud del huésped mediante el manejo de la microbiota del colón, tradicionalmente se han utilizado probióticos. Una alternativa es el consumo de ingredientes conocidos como prebióticos (Rycroft *et al.*, 2001). El término “prebiótico” se utilizó por primera vez por Gibson and Roberfroid (1995) y está definido como "ingrediente alimentario no digerible que benéficamente afecta al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y / o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, que pueden mejorar la salud del huésped." La función de los prebióticos es básicamente estimular el metabolismo existente en el colon (Coussement, 1996). Los prebióticos son carbohidratos de cadena larga (Cummings *et al.*, 2001), así como, carbohidratos que no han sido digeridos en el tracto gastrointestinal superior y forman los substratos predominantes para el crecimiento bacteriano en el colon (Roberfroid, 2000).

En el intestino grueso, los prebióticos en adición a sus efectos selectivos sobre *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*, influyen en muchos aspectos de las funciones del intestino a través de la fermentación (Campbell *et al.*, 1996). Los ácidos grasos de cadena corta son un producto importante de la degradación prebiótica. A través de la

estimulación del crecimiento bacteriano y su fermentación, los prebióticos afectan el hábitat del intestino y generalmente actúan como laxantes (Cummings *et al.*, 2001).

Para ser considerado como prebiótico deben de cumplirse algunas características tales como: resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas y la absorción gastrointestinal; ser fermentado por la microbiota del intestino grueso, así como estimular selectivamente el crecimiento y / o la actividad de las bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar. Los prebióticos tienen muchas ventajas sobre los probióticos. Esto está principalmente relacionado a los problemas de supervivencia de los microorganismos, tales como el mantener la viabilidad en el producto, acidez gástrica, sales biliares, enzimas pancreáticas y proteínas, competitividad para la colonización y nutrientes (Cummings *et al.*, 2001).

2.4.2. Almidón

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en plantas y es uno de los biopolímeros más utilizados en diversas aplicaciones industriales (Wang *et al.*, 2007). Este polisacárido se encuentra de manera natural en forma de gránulos, localizados en el tejido de las plantas, ya sea en los cloroplastos de las hojas verdes o en los amiloplastos de semillas (cereales), leguminosas y tubérculos (Sajilata *et al.*, 2006). Los gránulos de almidón son diferentes entre las diversas especies botánicas que lo sintetizan. Estas diferencias se ven reflejadas en la morfología del gránulo (forma y tamaño), grado de cristalinidad, organización cristalina interna, contenido de amilosa y amilopectina, así como en la estructura de la amilopectina (Palma-Rodríguez, 2012)

Sus principales constituyentes son la amilosa, un polímero lineal de D-glucosa unidas por enlaces α -1-4 y amilopectina, un polímero ramificado de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1-4 y α -1-6 en sus puntos de ramificación (Sajilata *et al.*, 2006). El almidón resistente no es digerible en el intestino delgado por las enzimas pancreáticas como amilasas. Este tipo de almidón puede llegar al colon donde es fermentado (Anal & Singh, 2007; Sajilata *et al.*, 2006).

2.4.2.1. Almidón de arroz y de malanga

El arroz contiene un 70-80% de almidón, el cual presenta gránulos pequeños con un diámetro entre 3 –10 μ m y forma poligonal, mientras que en el almidón de malanga son de 1.0- 2.2 μ m de diámetro y forma ovalada. La proporción amilosa-amilopectina en el almidón de arroz es de 17.5 - 82.5% respectivamente, mientras que el almidón de malanga contiene un 39% de amilosa y 61% de amilopectina (Tari *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1993) Zhao & Whistler (1994a) observaron la habilidad de los gránulos de tamaño pequeño del almidón de arroz para formar agregados esféricos porosos con potencial para encapsulación. Los agregados parecían esferas con apariencia de palomitas de maíz, las cuales pueden transportar el ingrediente a encapsular en los espacios abiertos de la estructura porosa. En este mismo sentido, algunos trabajos que se han realizado empleando almidón o alguno de sus derivados como material pared se muestran en el Cuadro 3

Cuadro 3. Trabajos previos que se han realizado utilizando almidón como material pared.

Autores	Ingrediente encapsulado	Material pared	Método de encapsulación	Resultados
Tari <i>et al.</i> , 2003	Vainillina	Almidones nativos de arroz y de malanga	Secado por aspersión	Muestran mayor eficiencia de encapsulación con 1% de goma arábica
Ying <i>et al.</i> , 2010	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Proteínas del suero leche y almidón resistente	Secado por aspersión y liofilización	Durante el almacenamiento a temperatura ambiente, las cápsulas obtenidas por secado por aspersión muestran mayor estabilidad
Semyonov <i>et al.</i> , 2010	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Maltodextrina y Trehalosa	Liofilización	Esta técnica de encapsulación es útil para encapsular probióticos
Gonzalez-Soto <i>et al.</i> , 2011	Preparación de agregados esféricos	Almidón nativo de malanga	Secado por aspersión	Almidón de taro es capaz de formar agregados esféricos
Anekella & Orsat, 2013	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> NRRL B-442	Jugo de frambuesa y maltodextrina	Secado por aspersión	La maltodextrina es eficiente como agente encapsulante en secado por aspersión
Avila-Reyes <i>et al.</i> , 2014	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Inulina y almidón nativo de arroz	Secado por aspersión	Se ofrece una doble protección al microorganismo ya que se encuentra dentro del aglomerado, así como en periferia del almidón
Li <i>et al.</i> , 2016	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Almidón modificado de maíz	Liofilización	La modificación enzimática mejoró notablemente la eficiencia de encapsulación en un ciclo logarítmico
Pankasemsuk <i>et al.</i> , 2016	<i>Lactobacillus casei 01</i>	Almidón de maíz alto en amilosa con alginato	Emulsificación	La adición de alginato al 1% mejora viabilidad de los microorganismos

III. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento de los desórdenes en el régimen alimenticio, como el consumo excesivo de productos industrializados con una alta densidad energética, infecciones estomacales o cáncer de colon, atribuidos al actual estilo de vida, se ha incrementado el consumo de productos alimenticios que contienen microorganismos probióticos, que por su función generan beneficios a la salud del sistema digestivo. Sin embargo el problema se presenta a la hora de cualquier formulación a la cual se quiera incorporar dichos microorganismos, como es la escasa resistencia durante el procesamiento y a las condiciones ambientales como pH, oxígeno o temperatura, debido a los factores mencionados anteriormente es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos a través de una barrera física que evite el contacto con el ambiente, para poder realizarlo se recurren a las técnicas de microencapsulación donde se recubre al microorganismo con un material protector generalmente un polímero, como lo son el almidón arroz y malanga, ambos se pueden ocupar como fuente de prebióticos, además de ser material pared, ayudan a que el microorganismo llegue al tracto digestivo y cumpla su función causando un efecto simbiótico entre prebiótico y probiótico.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el almidón de arroz y de malanga como material encapsulante, en la viabilidad del *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* mediante secado por aspersión.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Microencapsular a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* con almidón de arroz y de malanga mediante secado por aspersión.
- ✓ Caracterizar morfológica y fisicoquímicamente las microcápsulas obtenidas.
- ✓ Evaluar la eficiencia de encapsulación del *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, así como su estabilidad durante el almacenamiento.
- ✓ Determinar la supervivencia del probiótico encapsulado en almidón de arroz y malanga a través de una digestión *in vitro*

V. HIPÓTESIS

Los almidones de arroz y de malanga brindarán protección al microorganismo, de tal manera que supere una digestión *in vitro* y presente los requerimientos para cumplir la función probiótica y junto con material pared crear un efecto sinérgico.

VI. METODOLOGÍA

La estrategia de trabajo se detalla en la Figura 4 y 5 donde se puede observar que el estudio se divide en tres partes comenzando por la obtención del almidón (Figura 4A), posteriormente la caracterización del probiótico (Figura 4B) y finalmente la encapsulación a través de secado por aspersion (Figura 5).

6.1. Materiales

Para la obtención del almidón de arroz se utilizó la variedad A-98, la cual fue adquirida en la Arrocería Buenavista de Cuautla, Morelos. El almidón de malanga se adquirió de en la región del Valle Nacional, Tuxtepec, Oaxaca, México. El probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 81 LYO 10 D) se adquirió a través de DANISCO México.

6.2. Métodos

6.2.1. Obtención de los almidones

6.2.1.1. Almidón de arroz

El almidón de arroz (AA) se aisló de acuerdo a la metodología empleada por Patindol *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Los granos de arroz se dejaron reposar durante toda la noche en una solución de NaOH (0.1%) en una relación 1:4. Posteriormente, se molió en una licuadora Osterizer durante 4 minutos a velocidad 6, la mezcla se tamizó empleando mallas 40 US (425 µm) y 100 US (250

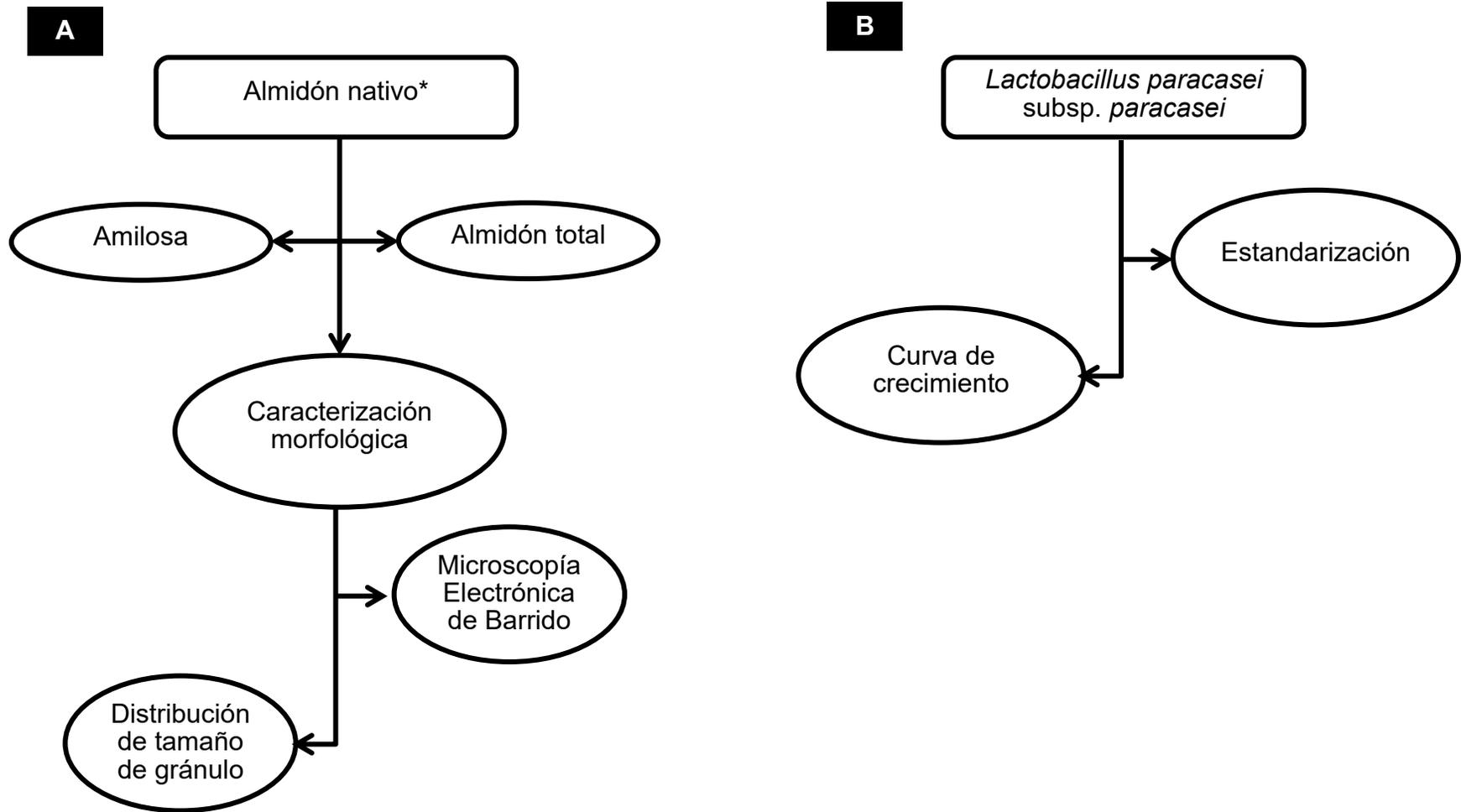


Figura 4. Diagrama del planeamiento experimental.

*Arroz o malanga

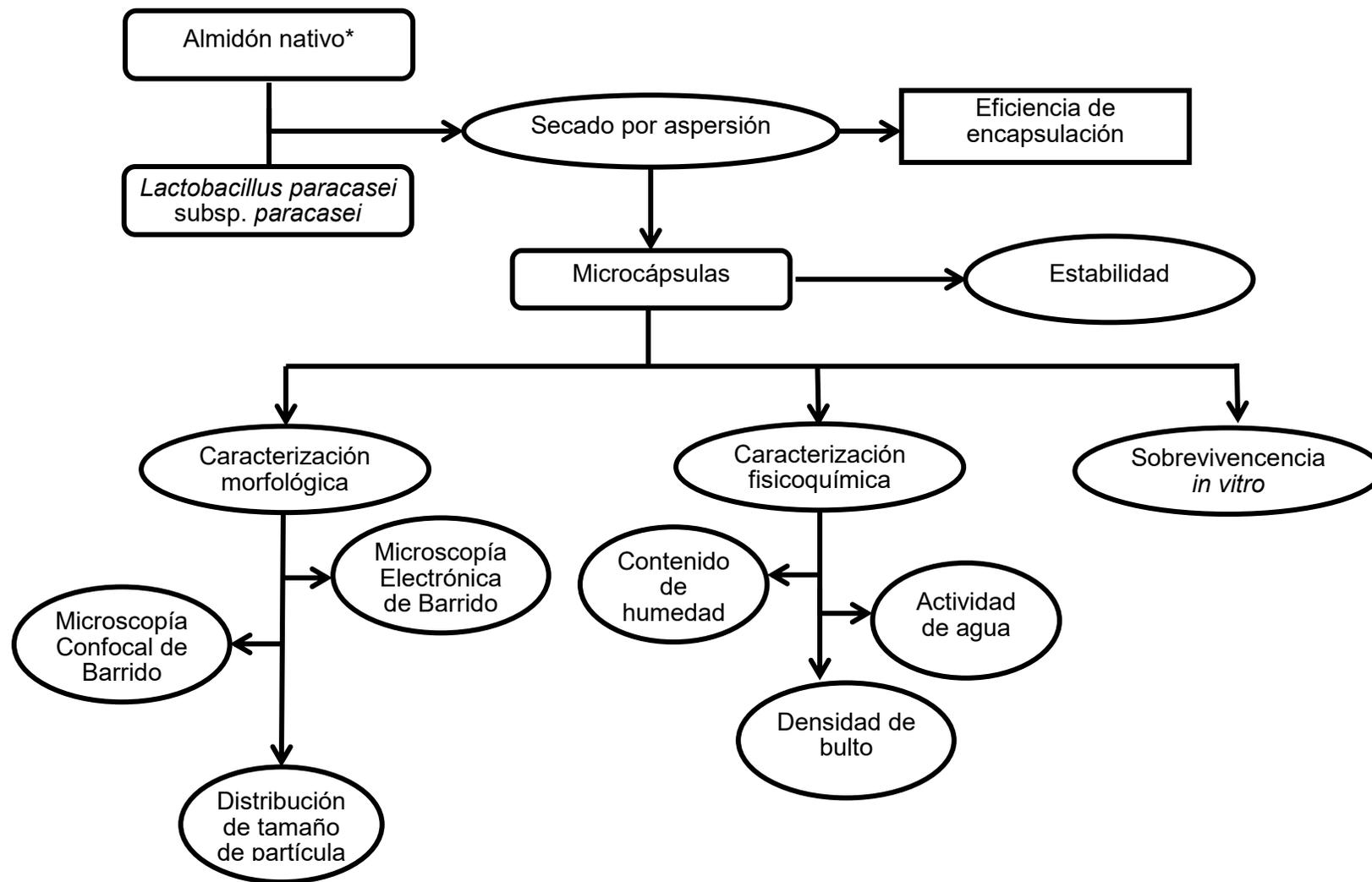


Figura 5. Continúa diagrama del planeamiento experimental.

*Arroz o malanga

μm), en cada malla el residuo fue lavado con NaOH (0.1%), la capa superior amarilla del residuo se eliminó. Se ajustó el pH a 6,5 con HCl 0.2 M y la solución sucesivamente se tamizó en mallas del No. 200 (75 μm) y No. 325 (45 μm) se realizaron lavados con 40 mL de agua desionizada en cada malla, por tres ocasiones. Se dejó reposar la mezcla, se eliminó el sobrenadante y los sólidos fueron secados en un horno de convección a 40 °C durante 24 h.

6.2.1.2. Almidón de malanga

Para la obtención del almidón nativo de malanga (AM) se empleó la metodología propuesta por Flores-Gorosquera *et al.* (2004). El tubérculo fue lavado y pelado para eliminar la cáscara, se cortaron en trozos de 5 a 6 cm^3 . Posteriormente fue molido en una licuadora tipo industrial (International, Mod. LI – 12A, México), a velocidad baja durante 2 min. El homogenizado se tamizó consecutivamente en mallas de malla 40 U.S. (425 μm) y 100 U.S. (250 μm) hasta que el agua del lavado fue clara. Posteriormente los sedimentos de la malla 100 se centrifugaron a 2,800 rpm (Rotina 420 Hettich, Germany) por 8 min. Los sólidos fueron secados en un horno de convección (APEX modelo SSE 17 M) a 40°C por 24h. Finalmente, el almidón obtenido se pasó a través de una malla No. 100 y se almacenó a temperatura ambiente para su posterior uso.

6.2.2. Contenido de almidón total

Para evaluar la pureza de los almidones se determinó el contenido de almidón total por el método enzimático de Megazyme (Total Starch (100A) KIT, Lot 170104-6, Ireland). Se pesaron 100 mg del almidón en tubos de ensayo (15x125 mm) y se humectaron con 0.2 mL de etanol al 80%. Posteriormente se mezclaron con 2 mL de KOH 2M y se mantuvo en agitación durante 20 min. Se añadieron 8 mL de regulador de acetato de sodio (pH 3.8) e inmediatamente se mezclaron con 0.1 mL de α amilasa y 0.1 mL de amiloglucosidasa y se incubaron en un baño maría a 50 °C, durante 30 min. El líquido fue transferido a un matraz de 100 mL y se aforó con agua destilada, se tomó una alícuota y se centrifugó a 1,800 g durante 10 minutos.

Del sobrenadante 0.1 mL fueron transferidos a un tubo de ensayo (15x125 mm) y se añadieron 3 mL de GOPOD se incubaron a 50 °C por 20 minutos y finalizado el tiempo se leyó absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro (Thermoscientific Genesys 10S Vis, USA).

6.2.3. Contenido de amilosa aparente

El contenido de amilosa de los almidones se determinó por una modificación Hoover & Ratnayake (2001). Se disolvieron 50 mg de almidón (base seca) en 8 mL de hidróxido de potasio, agitando vigorosamente por 12 h, y posteriormente se ajustó a un pH de 7. Se tomó una alícuota de 1 mL de esta solución y se transfirió a un matraz aforado de 50 mL, se adicionaron 40 mL de agua destilada y 5 mL de

una solución de yodo/yoduro, se aforó y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente antes de leer la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Thermoscientific Genesys 10S Vis, USA).

6.2.4. Caracterización morfológica de los almidones

6.2.4.1. Distribución de tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula de las microcápsulas se determinó por análisis de difracción de rayos láser, utilizando un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Las muestras fueron analizadas usando el módulo Scirocco 2000 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado a temperatura ambiente. El tamaño de partícula se expresó como diámetro mediano $D [v, 0.5]$, el cual es el diámetro volumen equivalente a un valor de la frecuencia acumulada de 50%. y distribución de volumen (Palma-Rodríguez *et al.*, 2013)

6.2.4.2. Microscopía Electrónica de Barrido

Para determinar la morfología de los gránulos del almidón se utilizó el método de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en Ingles) reportado por Paredes-López *et al.* (1989). La muestra de almidón se espolvoreo sobre una cinta conductora de cobre de doble adhesión, la cual se fijó previamente en un soporte de aluminio del microscopio electrónico de barrido LEO 1525 (LEO

Electron Microscopy, Oberkochen, Germany). La muestra se cubrió con una capa de carbón de 30 nm. Las muestras se colocaron en el ionizador de metales JEOL y se recubrió con una capa de oro.

6.2.5. Caracterización del probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp.

paracasei

6.2.5.1. Estandarización

La estandarización del microorganismo se llevó a cabo tomando 2 asadas directas del microorganismo probiótico liofilizado y se resuspendió en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, DIBICO, Lote 12185037, México), se incubaron a 30 °C por 24 h y se mezclaron con glicerol (30% del volumen total) y se distribuyeron en microtubos (2 mL) los cuales se mantuvieron en congelación (20 h) para finalmente llevarlos a ultracongelación y así mantener constante la concentración del microorganismo en cada vial.

Posteriormente se llevó a cabo una activación del microorganismo ultracongelado en caldo MRS iniciando con una recuperación de la bacteria en agar en agar Man Rogosa Sharpe (MRS, DIBICO, Lote 12566117, México), se realizó su tinción de Gram y la prueba de catalasa. Este procedimiento se llevó a cabo durante 4 semanas tomando muestra cada 8 días.

6.2.5.2. Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó tomando como referencia lo descrito por Jurado-Gómez *et al.* (2014) con algunas modificaciones, esto para corroborar la fase en la que se encontraba el microorganismo al momento de iniciar el análisis y estimar el tiempo de crecimiento de la población óptima para realizar la encapsulación. El microorganismo se inoculó tomando una muestra directa del microtubo y se colocó en 100 mL de medio líquido (caldo MRS) incubándose a 30 °C durante 25 h. La población microbiana se determinó tomando los tiempos 0, 5, 10, 15, 20 y 25 h. La siembra del microorganismo. para su recuento se realizó en superficie de agar MRS.

6.2.6. Microencapsulación de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

6.2.6.1. Estandarización del inóculo

Previo a la encapsulación se llevó a cabo la preparación del microorganismo, para lo cual primero fue incubado con 5 mL de caldo MRS a 30 °C por 24 h, transcurrido el tiempo se tomó un inóculo de 50 µL y se colocaron en caldo MRS bajo las mismas condiciones. Transcurridas 14 h (previo al máximo de su fase exponencial) el *Lactobacillus* fue cosechado por centrifugación a 6,500 rpm por 15 min a 4°C y antes de ser añadido a la dispersión con el material pared se realizaron dos lavados con agua destilada estéril y finalmente se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril.

6.2.6.2. Preparación de las dispersiones del material pared

Las soluciones del material pared se prepararon realizando una dispersión del AA y AM en agua destilada estéril a temperatura ambiente (10% p/p), bajo agitación constante para mantener homogénea la dispersión.

6.2.6.3. Secado por aspersión

Previo a la microencapsulación, los sólidos obtenidos en la estandarización del inóculo fueron resuspendidos en las dispersiones del material pared (sección 6.2.6.2). De estas dispersiones se tomó 1 mL y se mezclaron con 9 mL de agua peptonada, se les realizaron las diluciones para la siembra en placa con agar MRS y así obtener un crecimiento entre 30 y 300 colonias.

El proceso de precalentamiento del secador por aspersión (Mod. B-290, Büchi, Suiza) se realizó con agua destilada estéril, con el fin de mantener la estabilidad de las temperaturas de entrada y salida, esto de acuerdo a lo descrito por Rodríguez (2009).

La microencapsulación se llevó a cabo con la técnica de Guevara (2009), utilizando las condiciones descritas en el Cuadro 4 y con un flujo de aire equivalente a 450-565 L/hora. Al finalizar se tomó una muestra de polvo obtenido y se determinó su humedad para seleccionar aquel que cumpliera con los requerimientos necesarios de calidad sin comprometer la viabilidad del microorganismo. El resto del polvo se colocó en bolsas estériles y herméticas para su uso posterior.

Cuadro 4. Condiciones de secado por aspersión.

Temperatura entrada al secador (°C)	Flujo de alimentación (mL/min)
135	10
135	20
125	10
125	20
115	10
115	20
90	10
90	20
80	10
80	20
70	10
70	20

6.2.7. Eficiencia de encapsulación

Se determinó siguiendo la metodología propuesta por Avila-Reyes *et al.* (2014) a través de la liberación del microorganismo microencapsulado, con modificaciones. Se disolvieron 100 mg del polvo en 10 mL de una solución de agua peptonada al 1%. La solución se mantuvo en agitación constante por 15 min a 500 rpm y finalmente se realizó el conteo de la viabilidad en agar MRS después de 48 h de incubación a 30 °C.

$$\% \text{Eficiencia de Encapsulación} = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100$$

$$\text{Reducción logarítmica} = \frac{\text{Log } N}{\text{Log } N_0}$$

Dónde:

N= UFC salientes

No = UFC entrantes

6.2.8. Caracterización fisicoquímica de microcápsulas

6.2.8.1. Actividad de agua (a_w)

Para realizar esta determinación se utilizó un higrómetro Aqua LAB V 2.2 (Mod. 3TE, Decagon Devices, Inc., EE. UU.). Se calibro el equipo con carbón activado ($a_w < 0.5$) y agua destilada ($a_w = 1.000 \pm 0.003$); posteriormente se introdujo 1 gramo de muestra a la cámara y se registró la lectura (Rodríguez, 2009).

6.2.8.2. Contenido de humedad

Se utilizaron 2 g de muestra, se colocaron en charolas de aluminio y se dejaron en horno de convección (Shel-Lab, Mod 1380FX) a una temperatura de $130 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1 h. Por diferencia de pesos se calculó el porcentaje de humedad (método 44-16, AACC, 2000).

6.2.8.3. Densidad de bulto

La densidad de bulto toma en cuenta a todos los poros, dentro y fuera de las partículas individuales y puede calcularse colocando una masa de las partículas dentro de un contenedor de volumen conocido. Para la determinación de la densidad de bulto se utilizó una probeta de 10 mL, pesándola antes y después de incorporar el polvo (Jimenez, 2007). La ecuación utilizada fue:

$$\rho_b = \frac{m}{V}$$

Dónde:

ρ_b = densidad de bulto (g/mL)

m = masa del encapsulado (g)

V = volumen ocupado en la probeta (mL)

6.2.9. Caracterización morfológica de microcápsulas

6.2.9.1. Distribución de tamaño de partícula

Para la determinación de tamaño de partícula se siguió la metodología descrita anteriormente en el punto 6.2.4.1.

6.2.9.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de las microcápsulas se determinó mediante SEM con el método descrito en el apartado 6.2.4.2

6.2.9.3. Microscopía Confocal de Barrido Láser

El estudio se realizó en un microscopio confocal de barrido láser, (CLSM, por sus siglas en inglés, Carl Zeiss, modelo LSM 800, Germany) a 400x. Las longitudes de onda de excitación fueron de 488 y 561 nm. Las muestras fueron cubiertas con una solución de naranja de acridina (fluorescencia verde) a una concentración de 0.005%, posteriormente se agregó yoduro de propidio (fluorescencia roja) a la misma concentración y se dejaron reposar durante 25 min en un ambiente oscuro. Las medidas de la intensidad de fluorescencia se llevaron a cabo utilizando el software ZEN 2.3 BLUE edition. La intensidad característica del pico de emisión de fluorescencia fue capturada en un intervalo de 410 a 590 nm para el naranja de acridina y de 595 a 700 nm para el yoduro de propidio.

6.2.10. Viabilidad de las bacterias encapsuladas durante el almacenamiento

Los probióticos encapsulados fueron almacenados en bolsas herméticas durante 30 días a 25 y 4°C, dentro de contenedores con silica para evitar su humectación. La viabilidad de los probióticos se evaluó cada 7 días siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.2.7.

$$\text{Reducción logarítmica} = \frac{\text{Log } N}{\text{Log } N_0}$$

Dónde:

N= UFC salientes

No = UFC entrantes

6.2.11. Sobrevivencia de bacterias encapsuladas bajo condiciones gastrointestinales simuladas

Se simularon el jugo gástrico (JG) e intestinal (JI) de acuerdo al método descrito por Valero-Cases & Frutos (2015) con algunas modificaciones. Los JG se prepararon en caldo MRS 3 gL⁻¹ de pepsina. El pH se ajustó a 2 con HCl 0.1 N. El JI se preparó con 1 g/L de pancreatina (Sigma Aldrich, Toluca, Edo. de México, México) y 4.5 g/L de sales de bilis. El pH del caldo MRS se ajustó a 7 con NaOH 0.1 N. Ambas soluciones estériles fueron filtradas a través de una membrana (0.45

mm, Millipore, España). Las microcápsulas (1 g) se homogeneizaron por 2 min en un vortex con 9 mL de JG y se incubaron durante 60 min a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo por neutralización con NaOH 1N. El JI (9 mL) y el caldo MRS fueron añadidos a la suspensión hasta alcanzar un volumen de 20 mL y se incubaron por 60 min a 37 °C. El conteo viable en JG y JI se determinó por conteo en placa en agar MRS.

$$\text{Reducción logarítmica} = \frac{\text{Log } N}{\text{Log } N_0}$$

Dónde:

N= UFC salientes

No = UFC entrantes

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Contenido de almidón total

El contenido de almidón total de malanga (AM) fue del 86.68%, presentando una mayor pureza en comparación con el almidón de arroz (AA) (82.60%). Posterior al proceso de extracción no se obtiene un 100% de almidón debido a la eficiencia de aislamiento, así como también a la fuente botánica de la cual se obtiene, ya que algunas fuentes tienen mayor contenido de proteína, como son los cereales y resulta más complicada su purificación, obteniendo un almidón como menos pureza durante su aislamiento (Palma-Rodríguez, 2012).

7.2. Contenido de amilosa aparente

El contenido de amilosa varía con la fuente botánica y nos permite clasificar el almidón en base a dicho contenido en tres tipos, como almidón de tipo normal con un contenido de amilosa entre 15 – 35 %, almidón ceroso o “waxy” (> 15%) y almidón alto en amilosa cuando presente un contenido mayor al 35% (Tester *et al.*, 2004). Para AM se determinó un contenido de amilosa del 9.44%, de acuerdo con lo anterior se puede clasificar como almidón ceroso. Se han reportado diferentes contenidos de amilosa en AM cultivado en diversos países: 2.5% (Agama-Acevedo *et al.*, 2011); 9.06% (Gaosong *et al.*, 1997); 18.8–20.0 % (Tattiyakul *et al.*, 2007); 21.4% (Goñi *et al.*, 1997). En este mismo sentido, diversos procedimientos para determinar el contenido de amilosa del almidón se han utilizado (Lindeboom *et al.*, 2004), sin embargo, estos métodos tienen sus limitaciones particulares, lo que ha

resultado en discrepancias en los contenidos de amilosa reportados. Por otra parte, la variación en la estructura molecular de la amilosa y la amilopectina parece explicar muchas de las contradicciones aparentes en la literatura. (Fitzgerald *et al.*, 2009), lo que podría explicar la diferencia en el contenido de amilosa. Ting-Jang *et al.* (2008) caracterizó el almidón de tres variedades de malanga, mencionando que las diferencias en el contenido de amilosa se deben a la temporada de siembra y la temperatura ambiente y establecen una relación, donde a menor temperatura atmosférica menor contenido de amilosa.

Los resultados mostraron que AA contiene un 16.24%, considerado como bajo en amilosa de acuerdo a la propuesta de Juliano (1992), donde este clasifica al almidón de arroz como waxy (0-2%), muy bajo (5-12%), bajo (12-20%), intermedio (20-25%) y alto en amilosa (25-33%). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Palma-Rodríguez *et al.* (2013) y Patindol *et al.* (2007) quienes obtuvieron valores de ~13 y 22-30 % respectivamente, en el contenido de amilosa.

7.3. Caracterización morfológica de los almidones

7.3.1. Distribución de tamaño de partícula

La Figura 6 presenta la distribución de tamaño de gránulo de ambos almidones. AA presentó un $D[v, 0.5]$ de 6.99 μm , resultados similares a los reportados en la literatura (Palma-Rodríguez *et al.*, 2013; Tester & Karkalas, 2002), mientras que el AM mostró valores menores con un $D[v, 0.5]$, de 5.165 μm .

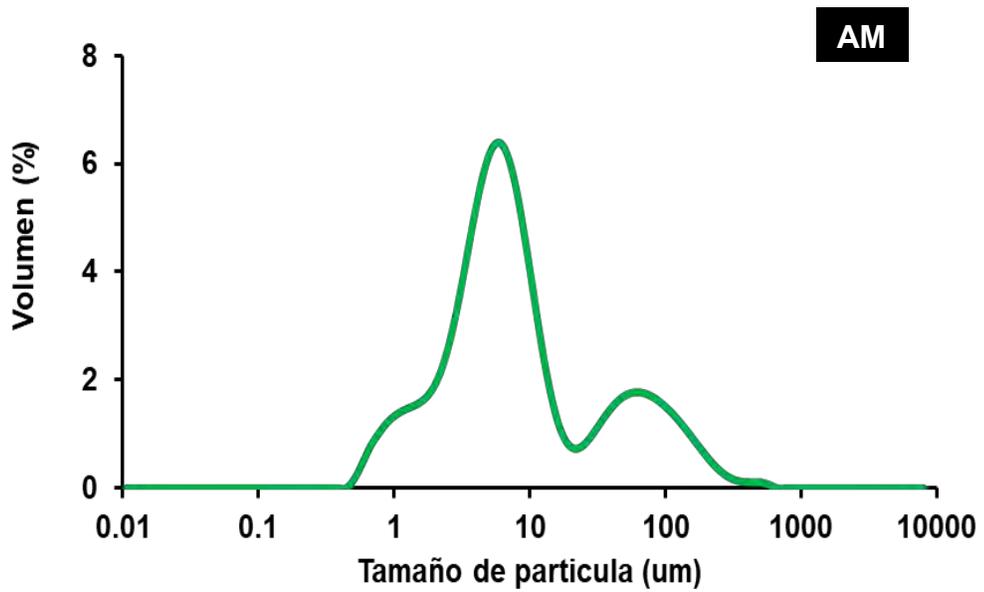
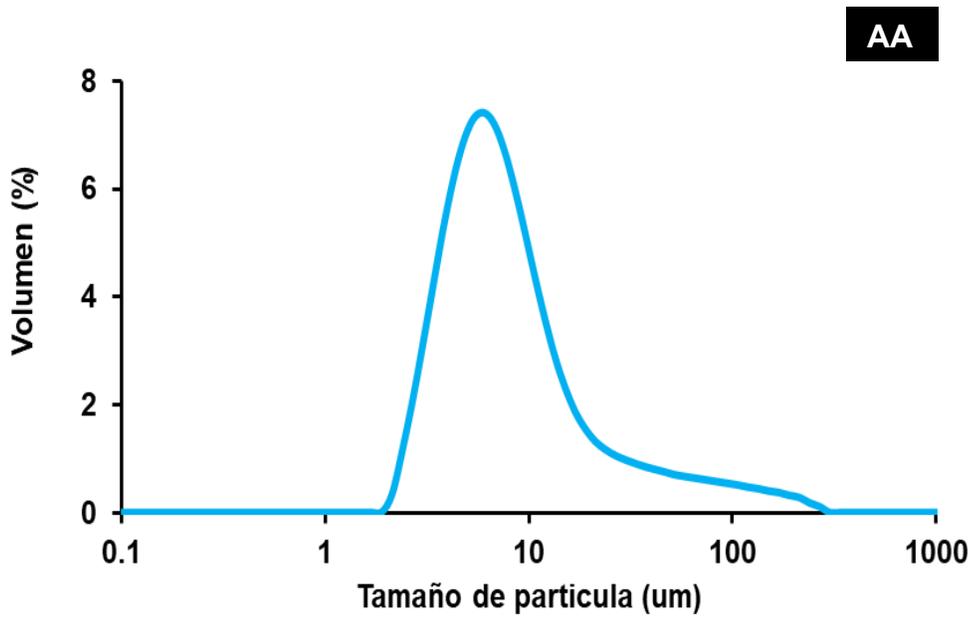


Figura 6. Tamaño de partícula de almidón de arroz (AA) y almidón de malanga (AM).

Tari *et al.* (2003), al encapsular vainillina ocuparon como material pared el almidón de arroz y de malanga obteniendo tamaños de gránulo de 3-10 μm y de 1.0-2.2 μm respectivamente, sin embargo Lindeboom *et al.* (2004), menciona para que un gránulo sea considerado pequeño debe medir entre 5 y 10 μm además de que presentan forma irregular y poliédrica.

7.3.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La SEM es una técnica que ayuda a dar una amplia perspectiva de la superficie del gránulo, así como de la morfología de los almidones. El AA y AM (Figura 7), se observaron con un aumento de 1000x.

Los resultados mostraron que ambos almidones tienen una forma poliédrica y una superficie lisa. Esto concuerda con lo descrito por Tari *et al.* (2003) y Wang *et al.* (2007), quienes obtuvieron resultados similares al observar mediante SEM gránulos de AA. De igual forma, Gonzalez-Soto *et al.* (2011) y Pachua *et al.* (2018), mencionan que la forma del almidón de malanga es irregular y poliédrica. Lindeboom *et al.* (2004) reportan que la forma del gránulo del almidón está relacionada a la fuente botánica así mismo menciona que los almidones con gránulo pequeño presentan una forma poliédrica similar a la obtenida en el presente trabajo.

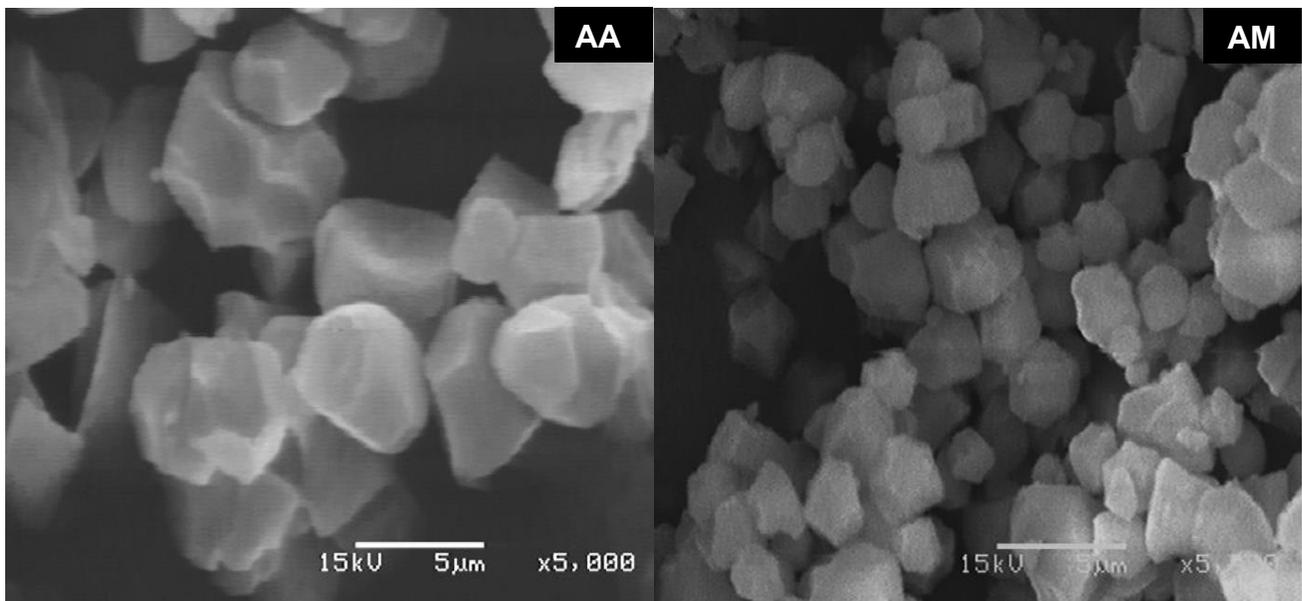


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido del almidón de arroz (AA) y del almidón de malanga (AM).

7.4. Caracterización del probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

7.4.1. Estandarización

Para clasificar las cepas de las bacterias ácido lácticas se toman en cuenta algunas características como: morfología, fuente de carbono, afinidad hacia el oxígeno, entre otras, esto para poder asegurar la viabilidad y confirmación de la cepa *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. La estandarización del microorganismo probiótico se monitoreó durante un mes, corroborándose lo mencionado por Desai (2008), que las colonias producidas por *Lactobacillus casei* son de color blanco cremoso redondas, bacilos Gram positivo y catalasa positivo (Figura 8).

7.4.2. Curva de crecimiento

La cinética de crecimiento de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* la podemos observar en la Figura 9. De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que el pico de la fase exponencial se encontraba a las 15 h con una población de $\sim 2.43 \times 10^9$ UFC/mL, estos resultados son similares con los reportados por Jurado-Gómez *et al.* (2014) quienes realizaron la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*, obteniéndose la fase exponencial a las 16.8 h, con una población de $\sim 7.3 \times 10^8$ UFC/mL. En este mismo sentido, Pankasemsuk *et al.* (2016) realizó una curva de crecimiento para la bacteria antes mencionada y encontró que la fase exponencial está cerca de las 16 h en el mismo orden de

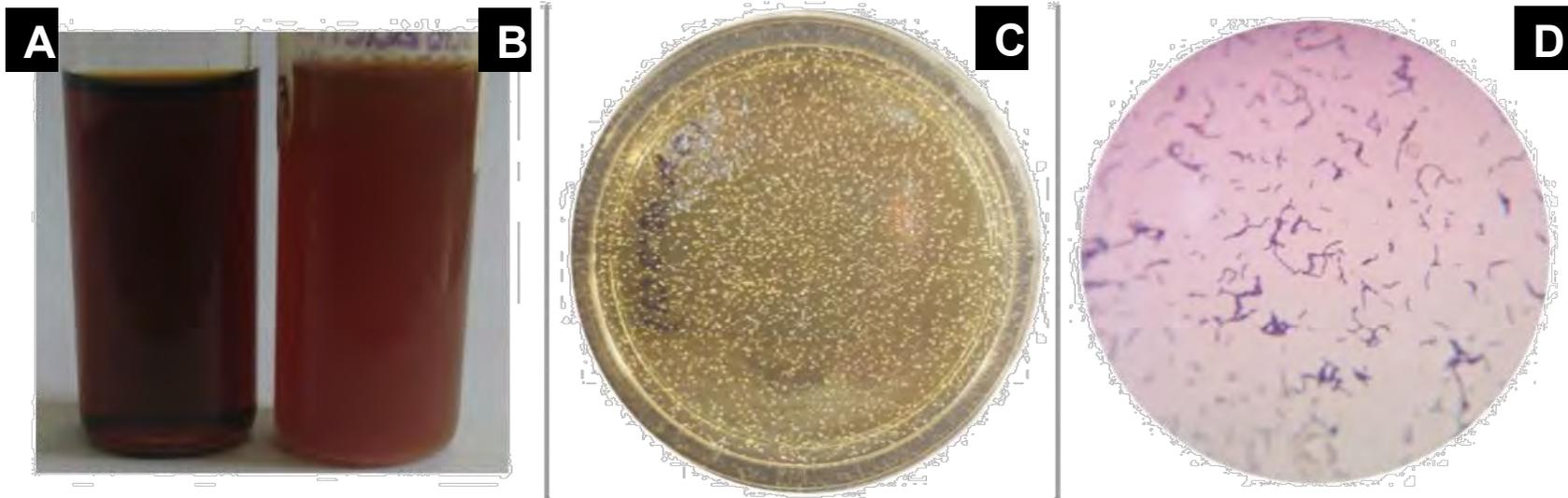


Figura 8. Estandarización de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* por etapas.

A) control, B) inoculación, C) siembra y D) Tinción de Gram

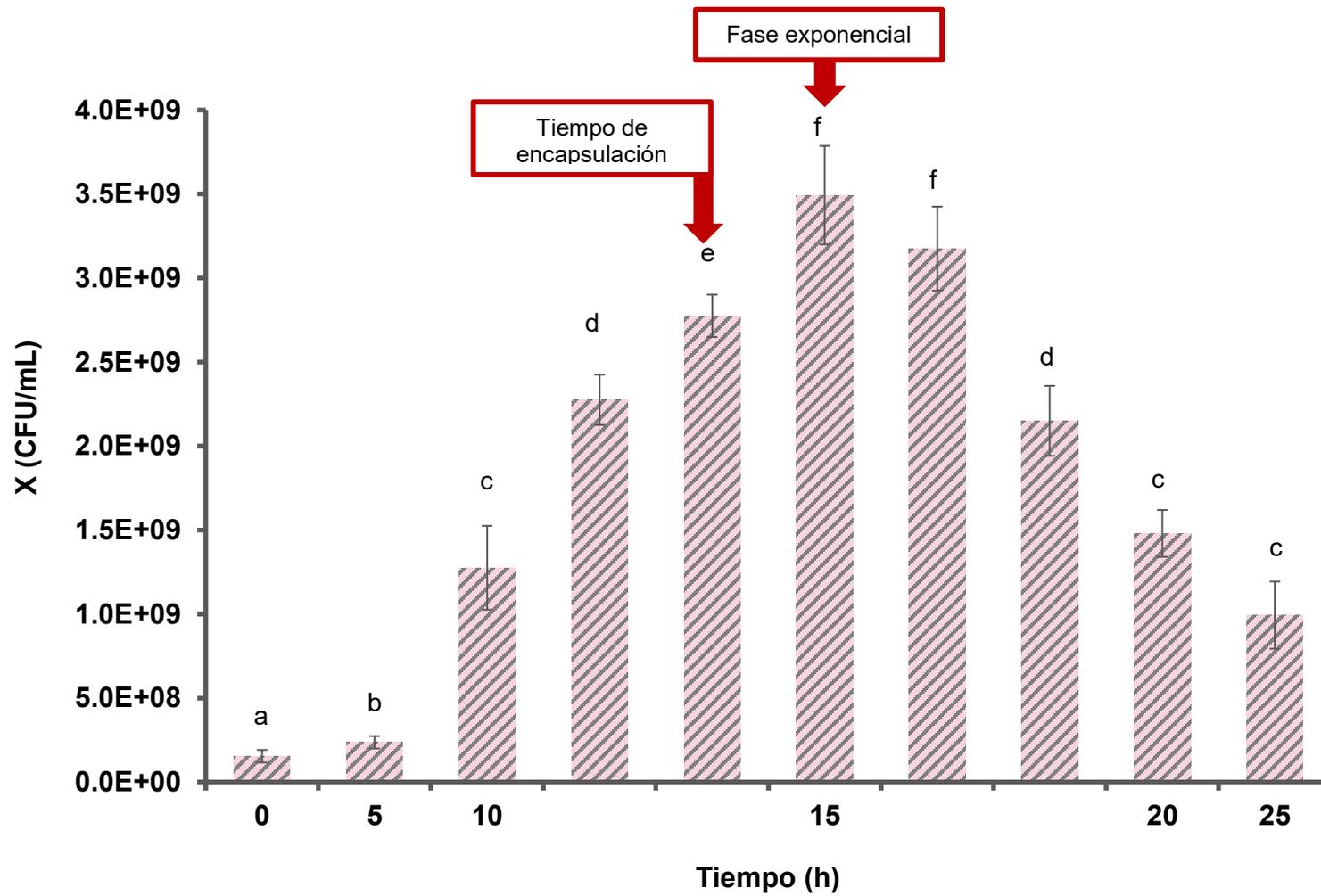


Figura 9. Curva de crecimiento de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

magnitud al que se obtuvo en la presente investigación (10^{09}). Así mismo, resultados similares son los obtenidos por Alvarez *et al.* (2010), quienes realizaron la cinética de crecimiento basada en la biomasa producida por *Lactobacillus casei* donde menciona que la fase logarítmica finaliza a las 20 h.

Por otra parte, para que el *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* se adicionará en óptimas condiciones al secado por aspersión, se buscó que los microorganismos se encontraran en una etapa previa al pico de la fase exponencial, los resultados mostraron una población óptima a las 14 h manteniéndose en el mismo orden de magnitud que a las 15 h (10^{09} UFC/mL) por lo que es a este tiempo al cual se cosecho el *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* para preparar los inóculos para la encapsulación.

7.5. Secado por aspersión

Para determinar las condiciones óptimas de encapsulación se evaluaron diferentes temperaturas y flujos de alimentación, basados en lo reportado por Guevara (2009). Se comenzó con una temperatura de entrada elevada y se fue disminuyendo paulatinamente, con la finalidad de controlar la temperatura de salida y de esta manera disminuir el posible daño del microorganismo, manteniendo al máximo su viabilidad. Así mismo, que la humedad no sea mayor al 7% en el polvo obtenido, para que de esta manera se pueda considerar un producto seco y que su vida de anaquel no se vea afectada (Ananta *et al.*, 2005).

En el Cuadro 5 se muestran las condiciones del secado por aspersión, para el AA y AM respectivamente. Se puede observar que en ambos almidones existen diferencias significativas ($p < 0.05$), dependiendo de la temperatura de entrada al secador. En ambos casos se observa que a mayor temperatura de entrada menor humedad. Sin embargo, al relacionar el flujo de alimentación se observa un comportamiento proporcional, esto es, a mayor velocidad de flujo, la humedad incrementa, lo cual podría ser debido a que la dispersión pasa demasiado rápido no dando oportunidad a que el tiempo de contacto con el aire caliente sea suficiente para que la muestra se seque.

Las diferencias de humedad entre AA y AM podrían ser debido a que el AA presenta mayor disponibilidad de grupos OH-, lo cual permite que más grupos H+ pertenecientes al agua se unan en mayor proporción.

Por otra parte, cabe destacar que tanto AA y AM a una temperatura de entrada de 70 °C presentan una humedad de 6.64 y 6.55%, respectivamente, por lo cual pueden ser considerados como productos secos (Ananta et al., 2005).

De acuerdo con Gardiner *et al.* (2000) el porcentaje de sobrevivencia de los microorganismos probióticos encapsulados se relaciona con el porcentaje de humedad y la temperatura de salida del secador, encontrando que mientras esta última disminuía, el contenido de humedad de los productos aumentaba, al igual que la viabilidad de *L. paracasei*.

Cuadro 5. Condiciones del secador por aspersión para el almidón de arroz (AA) y de malanga (AM).

Temperatura entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	Flujo de alimentación (mL/min)	Humedad (%)	
			AA	AM
135	77	10	5.43 ± 0.16 ^a	5.18 ± 0.16 ^a
135	74	20	5.52 ± 0.23 ^{ab}	5.28 ± 0.28 ^{ab}
125	72	10	5.48 ± 0.26 ^{ab}	5.27 ± 0.26 ^{ab}
125	73	20	5.57 ± 0.29 ^{abc}	5.36 ± 0.21 ^{abc}
115	66	10	5.62 ± 0.16 ^{abc}	5.34 ± 0.13 ^a
115	68	20	5.77 ± 0.18 ^{abc}	5.42 ± 0.26 ^{abc}
90	64	10	5.86 ± 0.25 ^{bc}	5.57 ± 0.28 ^{cd}
90	65	20	6.51 ± 0.24 ^d	5.79 ± 0.29 ^{bc}
80	54	10	5.93 ± 0.17 ^c	5.78 ± 0.25 ^{bc}
80	58	20	6.63 ± 0.16 ^d	5.88 ± 0.14 ^d
 70	39	10	6.60 ± 0.21 ^d	6.27 ± 0.16 ^e
70	42	20	6.64 ± 0.23 ^d	6.55 ± 0.11 ^e

Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

Valores en la columna y con la misma letra son significativamente diferentes (p<0.05).

Basándonos en esto último se consideró para ambos almidones utilizar la temperatura de entrada del secador de 70 °C con un flujo de 10 mL/min con la finalidad incrementar la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

7.6. Viabilidad y eficiencia de encapsulación

Para obtener un balance general de la cantidad de microorganismos que sobreviven a un proceso drástico y determinar si cumplen con la viabilidad mínima requerida para cumplir la función probiótica, se determinó la eficiencia de encapsulación (Cuadro 6). Se puede observar que la viabilidad de los microorganismos tras el secado por aspersion en el encapsulado de malanga (EM) es de 2.44×10^9 UFC, la cual es mayor que la del encapsulado de arroz (EA), ya que se obtiene una menor reducción logarítmica con EM. Esto podría ser debido a que el gránulo de AM es considerado muy pequeño, facilitando la formación de agregados esféricos más uniformes, lo cual brinda una mayor protección a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* en comparación con el gránulo de AA que es considerado pequeño (Lindeboom et al., 2004).

En este mismo sentido, la eficiencia de encapsulación del EM fue del 22% mientras que el EA fue menor (12%). Avila-Reyes *et al.* (2014) encapsuló *Lactobacillus rhamnosus* obteniendo cerca del 95% de eficiencia de encapsulación al almidón de arroz como material pared y una temperatura de entrada al secador por aspersion de 135 °C.

Cuadro 6. Eficiencia de encapsulación en las microcápsulas obtenidas a través de secado por aspersión (Temperatura de entrada: 70 °C y flujo de alimentación: 10 mL/min)

Almidón	Microorganismos en la dispersión antes del secado (UFC)	Microorganismos en las microcápsulas (UFC)	Reducción logarítmica de la población (Log N₀/ Log N)	Eficiencia de encapsulación (%)
Arroz	1.14×10 ¹⁰	1.33×10 ⁰⁹	0.93 ± 0.02 ^a	12
Malanga	1.14×10 ¹⁰	2.44×10 ⁰⁹	0.67 ± 0.03 ^b	22

Promedio de tres repeticiones ± error estándar.
Valores en la columna y con la misma letra son significativamente diferentes (p<0.05).

Las diferencias con el presente trabajo pueden ser debidas a que el microorganismo *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* tiene una menor termoresistencia (~ 60 °C) y es sometido a una temperatura de 70 °C, ocasionando un mayor daño (Desai, 2008).

Por otra parte, Peredo *et al.* (2016) al encapsular *Lactobacillus casei shirota* mediante emulsificación y utilizando almidón nativo de papa como material pared reportaron una eficiencia de encapsulación del $22.53 \pm 3.18\%$, resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Ellos encontraron que el microorganismo tiene menos afinidad a este prebiótico y al mismo tiempo tiene una baja capacidad para soportar condiciones adversas. Guevara (2009), al encapsular *Lactobacillus casei* utilizando el método de secado por aspersión y una mezcla de sacarosa-gelatina (30% de sólidos) obtuvo una eficiencia de encapsulación cercana al 40%, corroborando así la baja termorresistencia de este microorganismo.

De acuerdo a Peredo *et al.* (2016), para que un microorganismo pueda cumplir la función probiótica debe presentar entre 10^{06} - 10^{07} UFC/g. El EA tuvo una viabilidad de 4.73×10^{08} y el EM de 9.40×10^{09} UFC/g, quedando 2 órdenes de magnitud por arriba del mínimo por lo cual podemos deducir que mientras se encuentren encapsulados tendrán mayor estabilidad y viabilidad que un microorganismo sin encapsular.

7.7. Caracterización fisicoquímica de microcápsulas

La actividad de agua ayuda a conocer la cantidad de agua disponible para reacciones bioquímicas, mientras que el contenido de humedad es un factor crítico ya que influye en la estabilidad de la bacteria durante el almacenamiento y se ha demostrado que estos últimos sobreviven mejor a bajos niveles de actividad de agua y ambos parámetros son importantes en la calidad de todos los alimentos e influyen en la vida de anaquel (Ávila-Reyes *et al.*, 2014)

En el Cuadro 7 se muestran las propiedades fisicoquímicas de los agregados esféricos. El EA tiene una a_w de 0.308 mientras que el EM presenta una a_w 0.290. La humedad de EM es menor (6.27%) que la de EA (6.60%), sin embargo, no presentan diferencias significativas. La a_w y la humedad se encuentran relacionadas, esto es a menor humedad menor a_w y para que un polvo se considere de calidad, los valores de a_w deben encontrarse entre 0.15 y 0.3 y por debajo del 7% para la humedad, ya que valores más altos podrían facilitar el crecimiento de microorganismos patógenos (pérdida de estabilidad microbiológica), “apelmazamiento” o recristalización del material (Ananta *et al.*, 2005).

Avila-Reyes *et al.* (2014) al encapsular *Lactobacillus rhamnosus* obtienen valores menores a_w y humedad, 0.12 - 0.22 y 1.8 – 3.9 % respectivamente, en el producto encapsulado, esto puede ser debido a que la temperatura de entrada al secador por aspersión fue del doble que la utilizada en el presente trabajo (135 °C). Peredo *et al.* (2016) encapsularon *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus*

Cuadro 7. Propiedades fisicoquímicas de encapsulado de almidón de arroz (EA) y de malanga (EM).

	EA	EM
a_w	0.308 ± 0.023 ^a	0.290 ± 0.011 ^a
Humedad (%)	6.60 ± 0.210 ^a	6.27 ± 0.160 ^a
Densidad de bulto (g/cm³)	0.365 ± 0.004 ^a	0.352 ± 0.005 ^b

Las pruebas se realizaron por triplicado.

Valores en la fila y con diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05)

casei shirota a través de emulsificación, obteniendo valores para a_w de 0.180 - 0.230 y humedades menores al 4%, sin embargo, menciona que las diferencias en estos parámetros se deben a que los prebióticos utilizados como material pared (inulina, *Plantago psyllium*, almidón de papa) presentan diferentes capacidades de atrapar agua.

Por otra parte, ya que el agua contribuye a la estabilidad de la diversidad biológica, también la eliminación de agua puede causar daños irreversibles, como cambios en la integridad estructural y funcional de las membranas bacterianas y las proteínas, sin embargo, Avila-Reyes *et al.* (2014) menciona que el contenido óptimo de humedad, la capacidad de fermentar y la sobrevivencia de los microorganismos, varía con la composición del fluido en el que los microorganismos se han secado, con la atmósfera de almacenamiento, y con la especie o cepa que se ha utilizado.

Los resultados obtenidos para densidad de bulto fueron de ~ 0.365 y ~ 0.352 g/cm³, para el EA y EM, respectivamente. Fusch *et al.* (2006) mencionan que la densidad de bulto se encuentra relacionada con la morfología de la partícula, por lo tanto, el valor de densidad será menor mientras más homogéneo sea el tamaño de partícula. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos ya que el AM presenta mayor uniformidad en el tamaño de partícula lo cual influye en la densidad del bulto del encapsulado.

7.8. Caracterización morfológica de microcápsulas

7.8.1. Distribución de tamaño de partícula

Los resultados de tamaño de partícula se presentan en la Figura 10, EA presentó un $D[v, 0.5]$ de 7.056 μm , mientras que en EM el $D[v, 0.5]$ fue de 5.731 μm , estas diferencias se relacionan con el tamaño de partícula de los almidones nativos, debido al AA presenta un tamaño mayor que el AM (6.99 y 5.165 μm respectivamente), los cuales son similares a los reportados por Trindade & Grosso (2000), Palma-Rodríguez *et al* (2013) y Avila-Reyes *et al.* (2014).

El tamaño de partícula puede jugar un papel importante en la actividad y aplicación de los probióticos encapsulados, ya que también afecta a las propiedades de textura, rehidratación y sensoriales al aplicarlo en algún modelo alimenticio (Burgain *et al.*, 2011). La sensación en la boca del polvo se ve afectada y puede mejorarse si las microcápsulas son pequeñas. Falfán *et al.* (2014) al encapsular probióticos utilizando almidón modificado de amaranto (gránulo pequeño) obtuvo un tamaño promedio para las microcápsulas de 20 μm y menciona que con este tamaño puede ser imperceptible al ser aplicado en alimentos. Por otra parte, Etchepare *et al.* (2016) al encapsular *Lactobacillus acidophilus* con alginato de sodio y almidón resistente de maíz (alto en amilosa) obtiene tamaños de microcápsulas de hasta 78 μm tras someterlas a un proceso de liofilización, los cuales son mayores a los obtenidos mediante secado por aspersión, por lo cual una ventaja de este último método es que se obtienen microcápsulas de menor tamaño.

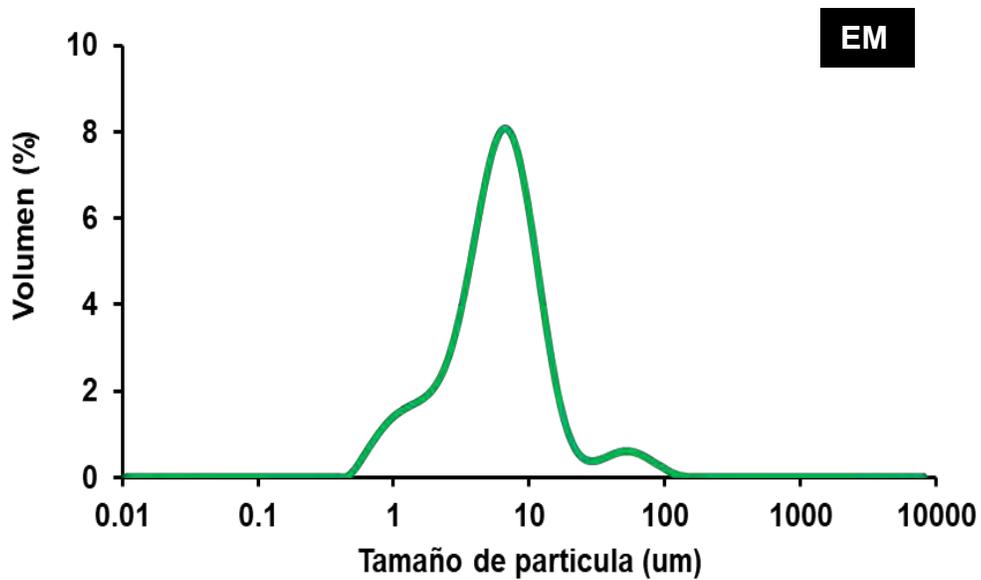
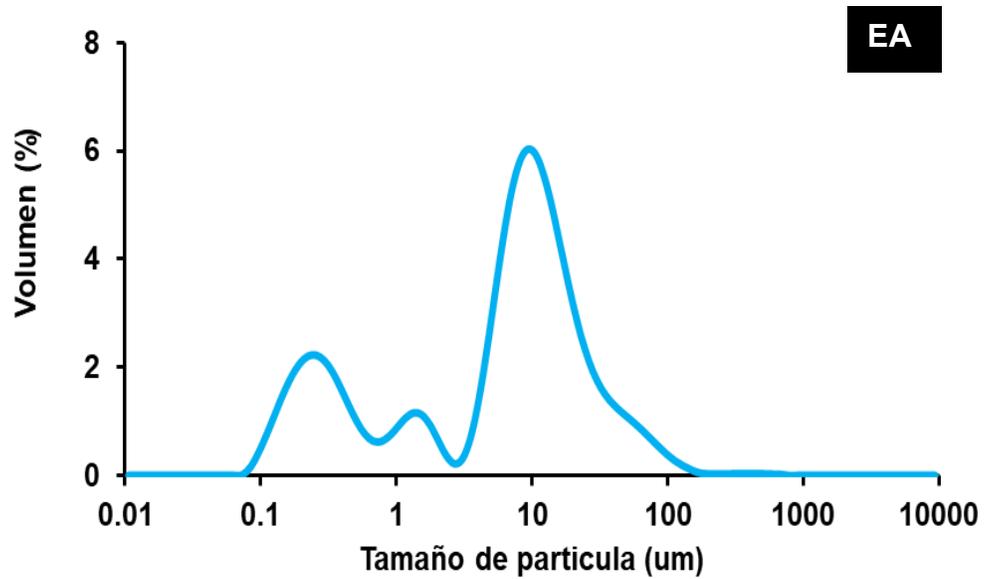


Figura 10. Tamaño de partícula encapsulado de arroz (EA) y encapsulado de malanga (EM).

7.8.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para evaluar la forma, apariencia de la superficie, así como la integridad de las cápsulas y cualquier evidencia de daño o ruptura, los encapsulados fueron observados mediante SEM, las micrografías se ilustran en la Figura 11.

Para ambos almidones se observó la formación de agregados esféricos, algunos presentaron una forma ligeramente irregular, esto puede ser debido a la forma poliédrica de los gránulos de almidón. Zhao y Whistler (1994b) observaron la capacidad de los gránulos de tamaño pequeño del almidón de amaranto para formar agregados esféricos porosos parecidos a “palomitas de maíz” con potencial para encapsulación, los cuales se pueden usar para transportar una amplia variedad de ingredientes alimenticios como sabores, aceites esenciales, vitaminas, probióticos, etc. y liberarlos durante un período de tiempo definido. En este mismo sentido otros estudios han reportado la formación de agregados esféricos con almidones de gránulo pequeño aislados de diversas fuentes botánicas, por ejemplo, arroz, malanga, quinoa, okenia, etc. (Tari *et al.*, 2003, Gonzales-Soto *et al.*, 2011; Palma-Rodriguez *et al.*, 2013, Hoyos-Leyva *et al.*, 2018).

Zhao & Whistler (1994a) reportaron que la adición de agentes aglutinantes es necesaria para la formación de agregados esféricos. Sin embargo, Beirão-Da-Costa *et al.* (2011) observaron la formación de agregados esféricos con almidón de arroz, cuando el contenido de proteína no era superior al 1%. Así mismo, González-Soto. *et al.* (2011) reportaron la formación de agregados esféricos con almidón de malanga con un contenido relativamente alto de proteínas de alrededor del 4.5%.

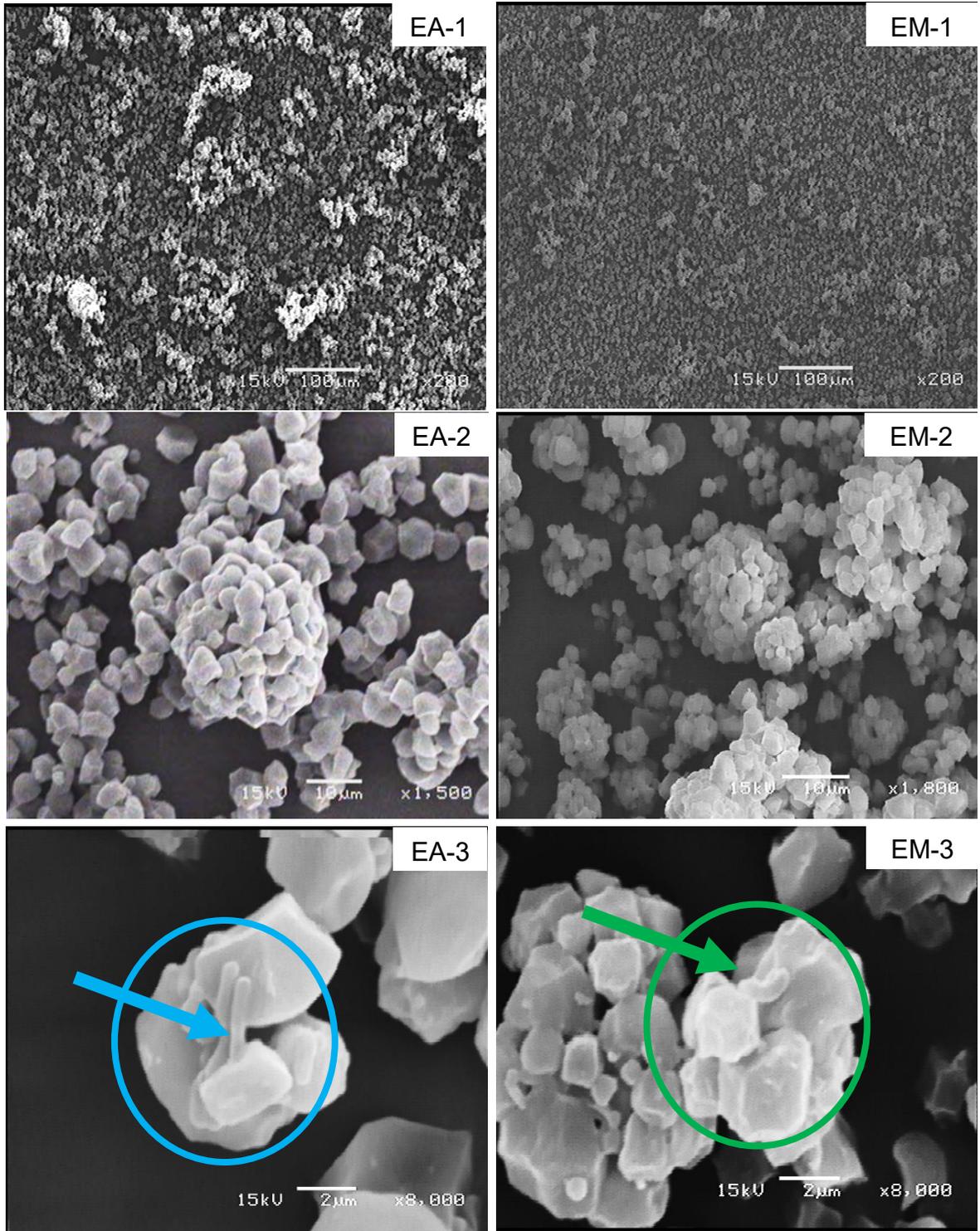


Figura 11. Micrografías de las microcápsulas obtenidas con almidón de arroz y almidón de malanga.

Panorámica EA-1 y EM-1; microcápsulas EA-2 y EM-2; microcápsulas con microorganismos EA-3 y EM-3.

7.8.3. Microscopía Confocal de Barrido Láser (MCBL)

La microscopía confocal de barrido láser es una técnica no destructiva y da la posibilidad de obtener "secciones ópticas" de la muestra, permitiendo su estudio tridimensional. Lo anterior se logra utilizando cromóforos para dar fluorescencia, en este estudio se utilizaron el naranja de acridina, para evaluar la viabilidad de las bacterias debido a que este interacciona con el ADN por atracción electrostática mientras que el yoduro de propidio, es impermeable a membranas celulares intactas, pero cuando la célula está muerta o en proceso de muerte, penetra sin dificultad y se une a los ácidos nucleicos, por lo que se intercala con el ADN o ARN, observándose rojo fluorescente (Bank, 1987). Las imágenes obtenidas fueron tomadas de diferentes cortes y se muestran en la Figura 12. Las micrografías 12A y 12D muestran la parte superficial de las microcápsulas de almidón de malanga y arroz, respectivamente, mientras que en las micrografías 12B-C y 12E-F se observa la parte interna de las microcápsulas.

En la superficie del EA (12D) se observa una fluorescencia color verde, la cual es imperceptible en el EM (12A), esto podría ser debido a un mejor efecto protector de las microcápsulas de almidón de malanga. En las micrografías de las microcápsulas (a diferente profundidad), tanto en el EM (12 B-C) como en el EA (12 E-F), se observa una mayor cantidad de microorganismos en la superficie de los agregados (fluorescencia color verde). Esto es indicativo de que *L. paracasei* subsp. *paracasei* tiene una mayor supervivencia dentro de los agregados esféricos.

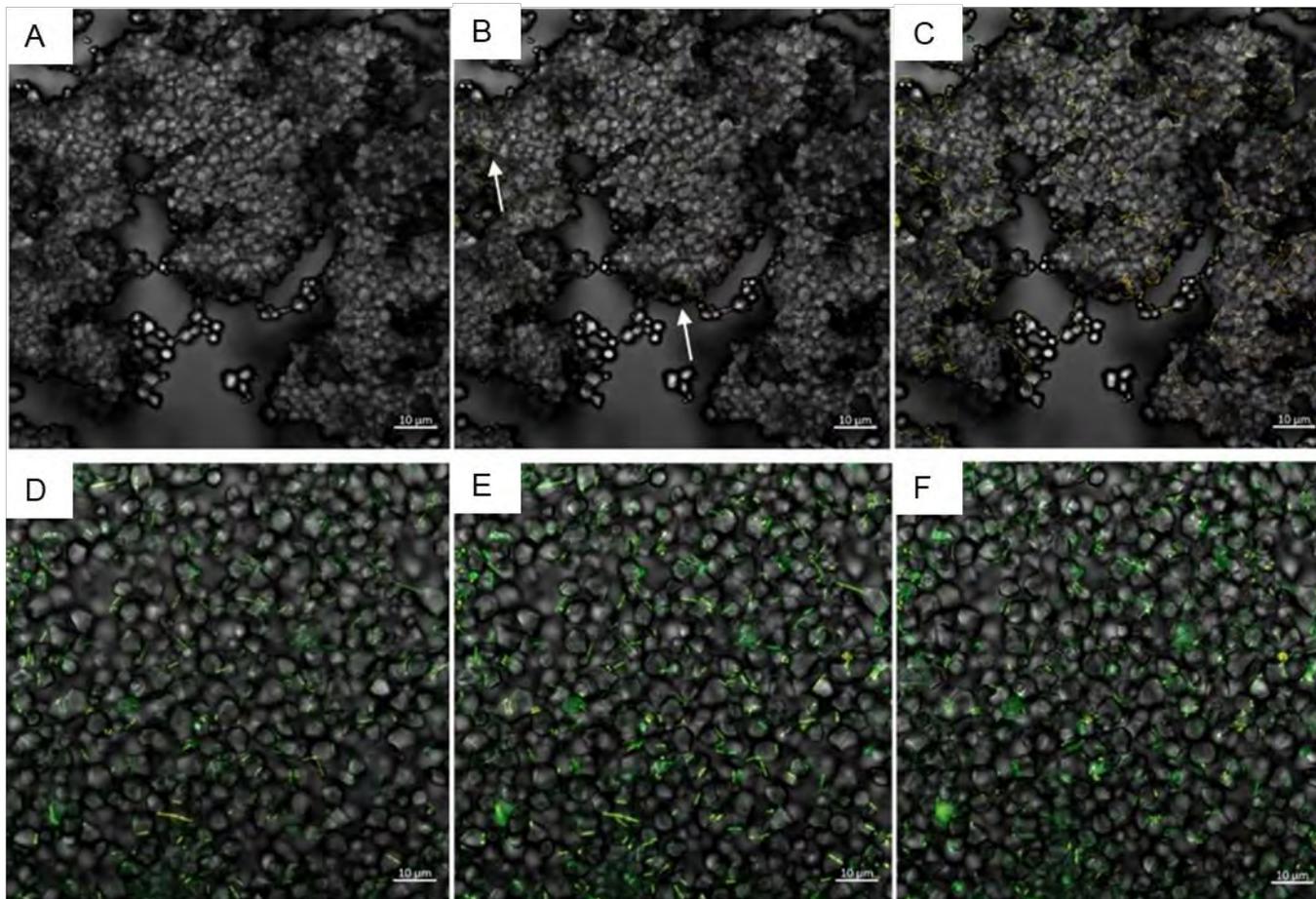


Figura 12. Microscopía confocal de barrido láser de los encapsulados de malanga (A-C) y de arroz (D-F).

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos para la eficiencia de encapsulación, en la cual podemos observar que el EM tiene el doble de eficiencia que el EA, por lo cual podemos inferir que la mayoría de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* se encuentra dentro de los agregados mientras que para el EA se observan en su mayoría en la superficie. Avila-Reyes *et al.* (2014) al utilizar esta misma técnica, al encapsular *Lactobacillus rhamnosus* con almidón de arroz, reportan que el microorganismo se localiza en la periferia y en los intersticios (poros) del aglomerado

7.9. Viabilidad de bacterias encapsuladas durante el almacenamiento

En los Cuadros 8 y 9 se observa la población microbiana durante el almacenamiento para EA y EM, la cual se evaluó a las temperaturas de 4 y 25 °C. ambos agregados presentaron una disminución conforme transcurre el tiempo, sin embargo, la concentración microbiana puede ser considerada como adecuada, ya que se encuentra por arriba del valor mínimo requerido para ser considerado como funcional ($10^{06} - 10^{07}$) de acuerdo con lo reportado por Peredo *et al.* (2016).

En el almacenamiento en refrigeración (TF, 4 °C) transcurridos 15 días el EA presentó una reducción logarítmica de 0.43 mientras que en el EM esta reducción fue menor (0.008) manteniéndose más estable durante este tiempo, lo anterior equivale a tener una población microbiana de 2.53×10^{08} y 9.85×10^{08} UFC/g respectivamente. Al finalizar almacenamiento (30 días) el EM presentó una reducción logarítmica de 0.45 mientras que en el EA fue de 0.55, lo cual nos indica un comportamiento inverso

Cuadro 8. Población microbiana durante almacenamiento a 4 °C.

Tiempo (días)	Población microbiana Log N ₀ (UFC/g) (4 °C)		Reducción logarítmica (Log N ₀ /N)	
	EA	EM	EA	EM
0	8.83	9.00	NA	NA
15	8.40	8.99	0.43±0.01 ^a	0.008±0.003 ^b
30	8.27	8.54	0.55±0.03 ^a	0.45±0.02 ^b

NA: No Aplica

Las pruebas se realizaron por triplicado.

Valores en la fila y con diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05)

Cuadro 9. Población microbiana durante almacenamiento a 25 °C.

Tiempo (días)	Población microbiana Log N ₀ (UFC/g) (25 °C)		Reducción logarítmica (Log N ₀ /N)	
	EA	EM	EA	EM
0	8.83	9.00	NA	NA
15	8.40	8.99	0.60±0.18 ^a	0.17±0.01 ^b
30	8.27	8.54	1.63±0.02 ^a	0.87±0.07 ^b

NA: No Aplica

Las pruebas se realizaron por triplicado.

Valores en la fila y con diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05)

al observado durante los primeros 15 días, ya que, al comparar esta disminución entre los 15 y 30 días, es el EM el cual presenta una mayor diferencia en este tiempo. Lo anterior se puede apreciar visualmente en la Figura 13.

En el almacenamiento a temperatura ambiente (TA, 25 °C) el EM brindó una mayor protección en comparación con el EA, ya que se obtuvieron reducciones logarítmicas de 0.87 y 1.63, respectivamente, a los 30 días.

De lo anterior podemos inferir que la viabilidad durante el almacenamiento podría estar asociada con los microorganismos que se encuentran en la periferia de los agregados. En términos generales, cuanto mayor es el número de *L. paracasei* subsp. *paracasei* en los alrededores mayor es la reducción logarítmica, de igual manera esto se puede corroborar con los resultados obtenidos en las micrografías de confocal, en las cuales se observó que el EA, tiene más microorganismos fuera de los agregados.

Los resultados obtenidos son menores a los reportados por Etchepare *et al.* (2016), al encapsular *Lactobacillus acidophilus* utilizando gelación/liofilización, reportaron reducciones logarítmicas de 6.21 después de 30 días de almacenamiento. Así mismo, los resultados son similares a los presentados por Avila–Reyes *et al.* (2014) ellos encapsularon *Lactobacillus rhamnosus* con almidón nativo de arroz a través de secado por aspersion, reportando una disminución entre 0.15 - 0.80 ciclos logarítmicos (CL) y 0.17 – 0.62 CL; a 4 y 25 °C, respectivamente, después de 32 días de almacenamiento. O'Riordan *et al.* (2001) reportó la disminución de 4 CL al día 22 con almidón de maíz ceroso modificado almacenado a temperatura ambiente.

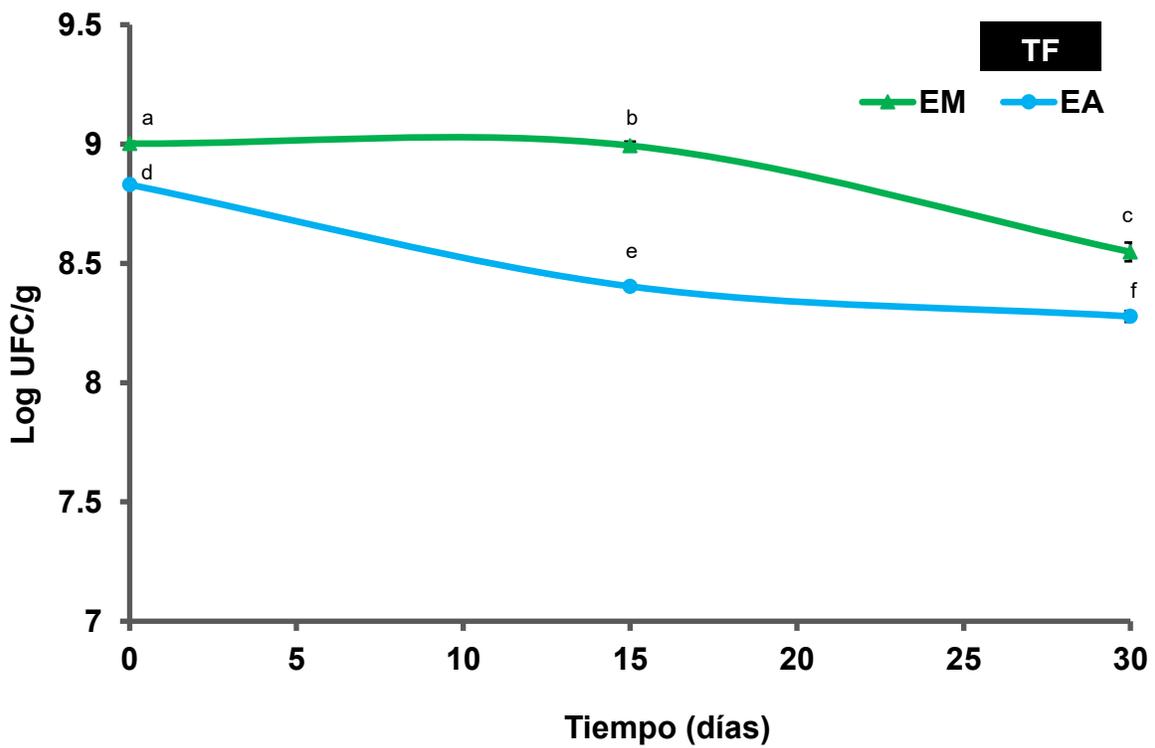
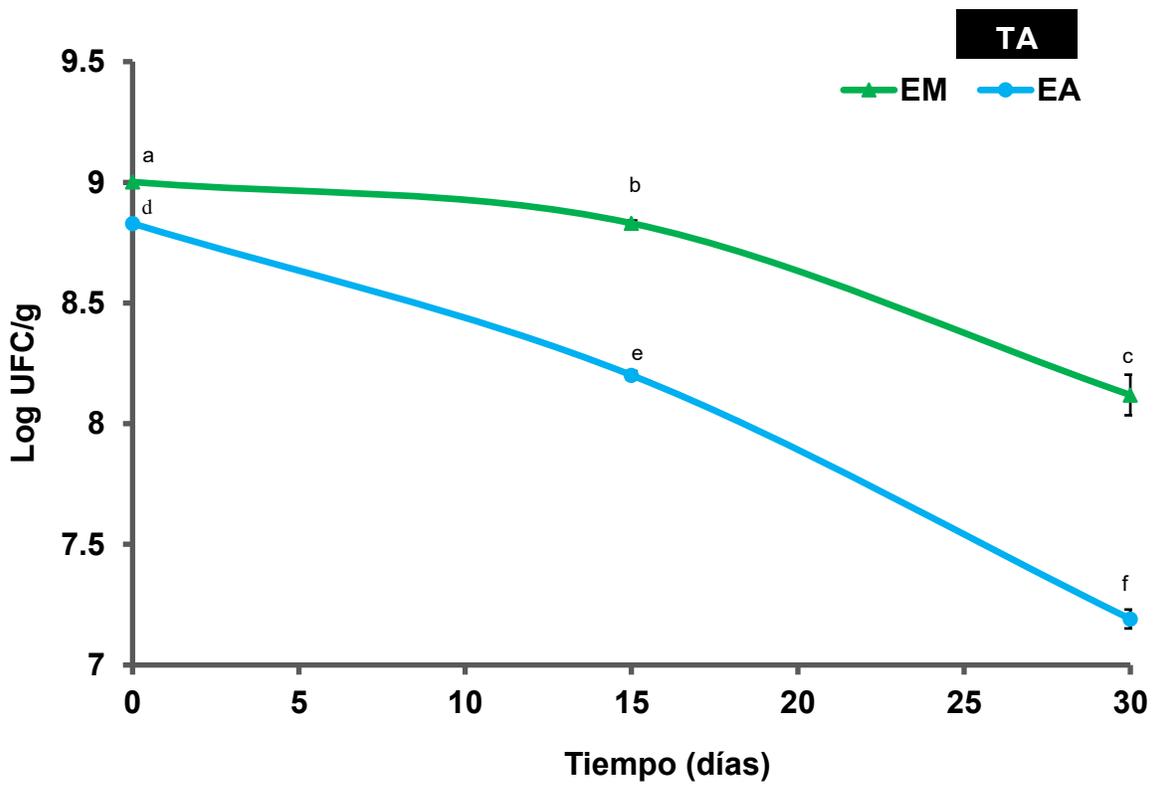


Figura 13. Estabilidad a temperatura ambiente (TA) y de refrigeración (TF) de las microcápsulas de almidón de arroz (EA) y almidón de malanga (EM)

Durante el almacenamiento también se evaluó la viabilidad del *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* sin encapsular a las dos temperaturas, sin embargo, transcurridos los primeros 15 días solamente se observaron 6 UFC/mL (para la menor dilución) a 4°C, por lo cual esto no es estadísticamente significativo, ya que lo recomendable es que sea una población microbiana de 30 a 300 colonias.

7.10. Supervivencia de bacterias encapsuladas bajo condiciones gastrointestinales simuladas

En base a los resultados de estabilidad, que se determinaron anteriormente, ambos encapsulados almacenados a 4 °C, mostraron mayor viabilidad durante los 30 días por lo cual se decidió utilizar estas muestras para realizar la digestión *in vitro* al día 0, 20 y 30 de almacenamiento.

En los Cuadros 10 y 11 se muestran los resultados de la digestión *in vitro* para ambos encapsulados EA y EM respectivamente, la supervivencia de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* encapsulado fue mayor que para los no encapsulados (datos no reportados).

Al término de la última digestión *in vitro* el EA mostró una reducción mayor en la supervivencia del *Lactobacillus* de 1.71 ± 0.07 Log UFC/g (19.81% del conteo inicial), mientras que el EM presentó una reducción logarítmica menor en la supervivencia del microorganismo de 1.47 ± 0.31 Log UFC/g (15.23% del conteo inicial); ofreciendo mayor resistencia a las condiciones evaluadas (Figura 14) esto

Cuadro 10. Digestión in vitro del encapsulado obtenido con almidón de arroz

Tiempo de almacenamiento (días)	Log N₀ (UFC/g)	Reducción logarítmica (Log N₀/N)
0	8.68	NA
15	7.57	1.10±0.28 ^a
30	6.96	1.71±0.07 ^b

NA. No Aplica

Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

Valores en la columna y con la misma letra son significativamente diferentes (p<0.05).

Cuadro 11. Digestión in vitro del encapsulado obtenido con almidón de malanga

Tiempo de almacenamiento (días)	Log N₀ (UFC/g)	Reducción logarítmica (Log N₀/N)
0	9.65	NA
15	9.18	0.47±0.03 ^a
30	8.18	1.47±0.01 ^b

NA. No Aplica

Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

Valores en la columna y con la misma letra son significativamente diferentes (p<0.05).

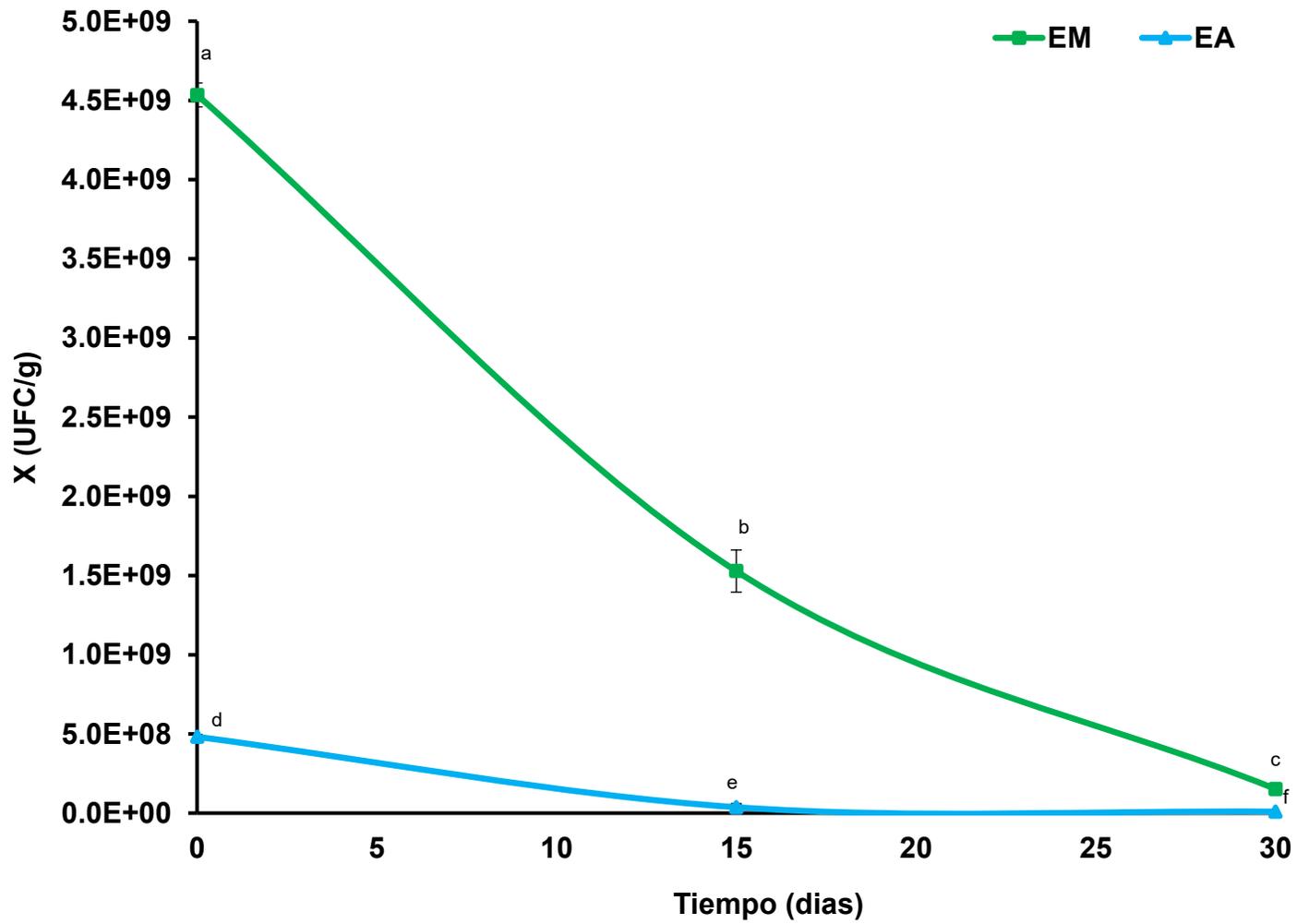


Figura 14. Digestión *in vitro* del encapsulado de malanga (EM-DV) y del encapsulado de arroz (EA-DV).

se puede relacionar con la microscopía confocal donde se observa que los microorganismos quedan mejor recubiertos en el EM. Sin embargo; con ambos encapsulados después de 30 días de almacenamiento y haberles realizado una digestión *in vitro*, se demostró que los materiales pared empleados (AA y AM) ofrecen protección suficiente para el *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* dado que su viabilidad fue igual o mayor a la mínima requerida para cumplir con la función probiótica ($6 \log \text{CFU g}^{-1}$) (Peredo *et al.*, 2016) adicionalmente el AA y el AM tienen la ventaja de poderse ocupar como fibra la cual puede ser metabolizada en el intestino grueso por microorganismos como Bifidobacteria y *Lactobacilli* y la combinación de probióticos y prebióticos se le conoce como sinergia, mejorando la estabilidad de los microorganismos encapsulados durante simulación gastrointestinal

Sultana *et al.* (2000) microencapsularon células de *Lactobacillus* con alginato de calcio-almidón y reportaron una disminución en la sobrevivencia de 2 ciclos logarítmicos para *Lactobacillus* en comparación con el recuento celular inicial bajo condiciones *in vitro* con. Petreska *et al.* (2012) obtuvieron micropartículas que se mantuvieron estables durante la exposición a jugos gástricos e intestinales simulados, permitiendo la liberación de células viables por encima del valor terapéutico en el pH colónico simulado.

VIII. CONCLUSIONES

- ✓ Las características fisicoquímicas del encapsulado de malanga le confieren mayor calidad de polvo.
- ✓ Los encapsulados obtenidos con almidones de diferente tamaño de gránulo presentaron diferencias en la eficiencia de encapsulación.
- ✓ La distribución de tamaño y la morfología de los encapsulados fue diferente y estuvo en función del tamaño de gránulo del almidón.
- ✓ La MCBL se observa que en EA los microorganismos se localizan principalmente en la periferia del aglomerado
- ✓ El encapsulado de malanga presenta una mayor estabilidad durante el almacenamiento.
- ✓ La digestión *in vitro* demostró que el encapsulado de arroz es más susceptible.
- ✓ En ambos encapsulados la cantidad de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* fue igual o mayor a la que se requiere, para cumplir con el requisito para considerarse probiótico.

IX. BIBLIOGRAFÍA

AACC, 2000. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists.

Tenth Edition. Vol. I y II

Agama-Acevedo, E., Garcia-Suarez, F. J., Gutierrez-Meraz, F., Sanchez-Rivera,

M. M., San Martin, E., & Bello-Pérez, L. A. (2011). Isolation and partial characterization of Mexican taro (*Colocasia esculenta* L.) starch.

Starch/Stärke, 63(3), 139-146. doi: 10.1002/star.201000113

Altıok, D., Tokatlı, F., & Harsa, Ş. (2006). Kinetic modelling of lactic acid production

from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical*

Technology & Biotechnology, 81(7), 1190-1197. doi: 10.1002/jctb.1512

Alvarez, M. M., Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Ramírez-Medrano, & Rodríguez-

Sánchez, A. (2010). Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk

whey. *American Dairy Science Association*, 93, 5552-5560. doi: 10.3168/jds.2010-3116

Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of

probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251. doi: 10.1016/j.tifs.2007.01.004

Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of

spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15(4), 399-409. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.004

- Anekella, K., & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 17-24. doi: 10.1016/j.lwt.2012.08.003
- Avila-Reyes, S. V., Garcia-Suarez, F. J., Jimenez, M. T., San Martin-Gonzalez, M. F., & Bello-Perez, L. A. (2014). Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*, 102, 423-430. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.11.033
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 143-182. doi: 10.1111/1541-4337.12179
- Bank, H. L. (1987). Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia*, 30(10), 812-816. doi: 10.1007/BF00275748
- Beirao-da-Costa S., Duarte C., Moldao-Martins M. and Beirao-da-Costa M. L. 2011. Physical characterization of rice starch spherical aggregates produced by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 104 , 36-42.
- Bird, A. R., Brown, I. L., & Topping, D. L. (2000). Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(1), 25-37.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial application. *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031

- Campbell, J. M., Fahey, G. C., & Wolf, B. (1996). Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats. *The Journal of Nutrition*, 130-136.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27-35. doi: 10.1016/j.mimet.2003.09.002
- Chen, K.-N., Chen, M.-J., Liu, J.-R., Lin, C.-W., & Chiu, H.-Y. (2005). Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70(5), M260-M266. doi: doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb09981.x
- Coussement, P. (1996). Pre-and synbiotics with inulin and oligofructose: promising developments in functional foods. *Food Tech Europe* (United Kingdom).
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., & Englyst, H. N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 415S-420S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.415s
- Desai, K. (2008). Strain identification, viability and probiotics properties of *Lactobacillus casei*. (Tesis de doctorado), School of Biomedical and Health Sciences Victoria University, Werribee Campus Victoria, Australia

- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9), M446-450. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00565.x
- Etchepare, M., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Flores, É. M. M., Barin, J. S., Queiroz, Z. L., de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Journal of Functional Foods*, 21, 321-329. doi: 10.1016/j.jff.2015.12.025
- Falfán, R. N., Gaytán, M., Verdalet, I., Amaya, S. L., Ferreira, C. R., & Martínez, F. (2014). Evaluation of Modified Amaranth Starch as Shell Material for Encapsulation of Probiotics. *Cereal Chemistry*, 91, 300-308. doi: 10.1094/CCHEM-06-13-0112-R
- FAO/WHO. (2002). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Cordoba, Argentina.
- Favaro-Trindade, C., Pinho, S., & Aguiar Rocha, G. (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11, 103-112.
- Fernandes, C. F., Shahani, K. M., & Amer, M. A. (1987). Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiology Letters*, 46(3), 343-356. doi: 10.1016/0378-1097(87)90118-2

- Fitzgerald, M. A., Bergman, C. J., Resurreccion, A. P., Möller, J., Jimenez, R., Reinke, R. F., & Mestres, C. (2009). Addressing the Dilemmas of Measuring Amylose in Rice. *Cereal Chemistry Journal*, 86(5), 492-498. doi: 10.1094/cchem-86-5-0492.
- Flores-Gorosquera, E., García-Suárez, F., Núñez-Santiago, M., González, R., Arturo Bello-Pérez, L., & Huicochea, E. (2004). Rendimiento del proceso de extracción de almidón de frutos de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana* 55, 86-90.
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., & Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75(1), 27-35. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.047
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Gaosong, J., Ramsden, L., & Corke, H. (1997). Effect of Water-soluble Non-Starch Polysaccharides from Taro on Pasting Properties of Starch. *Starch/Stärke* 49, 259–261
- Gardiner, G. E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., & Stanton, C. (2000). Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2605-2612. doi: 10.1128/aem.66.6.2605-2612.2000

- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121. doi: 10.1016/j.foodres.2007.07.004
- Gibson G..R & Roberfroid M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 1995 125(6):1401-12. doi: 10.1093/jn/125.6.1401
- Goñi, I., Garcia-Alonso, A., & Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17(3), 427-437. doi: 10.1016/S0271-5317(97)00010-9
- Gonzalez-Soto, R. A., de la Vega, B., García-Suarez, F. J., Agama-Acevedo, E., & Bello-Pérez, L. A. (2011). Preparation of spherical aggregates of taro starch granules. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2064-2069. doi: 10.1016/j.lwt.2011.06.018
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347. doi: 10.1016/j.tifs.2003.10.005
- Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *The International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 237-238.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., & Morelli, L. (2007). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93(06), 783. doi: 10.1079/bjn20051428

- Guevara, N. A. (2009). Optimización de las condiciones de secado por atomización para encapsular *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei* y mejorar su viabilidad. (Tesis de Maestría), Universidad de las Américas Puebla, Cholula, Puebla
- Harish, K., & Thomas, V. (2006). Probiotics in human—evidence based review. *Calicut Medical Journal*, 4, 1-11.
- Hickey, D. K., Kilcawley, K. N., Beresford, T. P., & Wilkinson, M. G. (2007). Lipolysis in Cheddar Cheese Made from Raw, Thermized, and Pasteurized Milks. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 47-56. doi:3168/jds.S0022-0302(07)72607-3
- Homayouni, A.; Azizi, A.; Ehsani, M.R.; Yarmand, M.S.; Razavi, S.H. (2007). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Journal Food Chemistry*. 111: 50-55.
- Hoover, R., Ratnayake, W. S., in: Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Deker, E. A., Penner, M. A., Deir, D. S., Schwartz, S. J., & Shoemaker, C. F., Sporns, P. (Eds.), *Current protocols in food analytical chemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York 2001, Section E, Unit 2.3.1–2.3.5.
- Hoyos-Leyva, J. D., Bello-Perez, L. A., Agama-Acevedo, E., & Alvarez-Ramirez, J. (2018). Thermodynamic analysis for assessing the physical stability of core materials microencapsulated in taro starch spherical aggregates. *Carbohydrate Polymers*, 197, 431-441. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.012

- Jiménez, M.T. (2007). Agglomération de particules par voie humide en lit fluidisé. (Tesis Doctorado). École Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires. Francia
- Juliano, B. O. (1992). Structure, Chemistry, and Function of the Rice Grain and Its Fractions. *Cereal Foods World*, 37, 772-779.
- Jurado-Gámez, H., Calpa-Yamá, F., & Chaspuengal-Tulcán, A. (2014). Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), 15-35. doi: 10.17151/vetzo.2014.8.2.2
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, 39(10), 1221-1227. doi: 10.1016/j.lwt.2005.07.013
- Kashappa, G. H., Desai, H. J., & Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394. doi: 10.1081/drt-200063478
- Kaur, L., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 344-371. doi: 10.1080/10408398.2014.887055
- Kaur, N., & Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *The Journal of Biosciences*, 27(7), 703-714.

- Li, H., Ho, V. T., Turner, M. S., & Dhital, S. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* in porous maize starch. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 542-549. doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.019
- Lindeboom, N., Chang, P. R., & Tyler, R. T. (2004). Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch/Stärke*, 56(34), 89-99. doi: 10.1002/star.200300218
- Lorente, B. F., & Serra, J. D. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediátrica Española*, 59, 49-54.
- Minocha, A. (2009). Probiotics for preventive health. *Nutrition in Clinical Practice*, 24(2), 227-241. doi: 10.1177/0884533608331177
- Morelli, L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(2), 59-67.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S. (2007). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24(7), 673-681. doi: 10.1080/02652040701532908
- O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., & Conway, P. (2002). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1059-1066. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01472.

- Ouwehand, A.C., Salminen, S. & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 279. doi: 10.1023/A:1020620607611
- Pachau, L., Dutta, R. S., Devi, T. B., Deka, D., & Hauzel, L. (2018). Taro starch (*Colocasia esculenta*) and citric acid modified taro starch as tablet disintegrating agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 397 - 405
- Palma-Rodriguez, H. M., Agama-Acevedo, E., Gonzalez-Soto, R. A., Vernon-Carter, E. J., Alvarez-Ramirez, J., & Bello-Perez, L. A. (2013). Ascorbic acid microencapsulation by spray-drying in native and acid-modified starches from different botanical sources. *Starch/Stärke*, 65(7-8), 584-592. doi: 10.1002/star.201200200
- Palma-Rodriguez, H.M. (2012). Caracterización de almidones de diferentes fuentes tratados con ácido para la encapsulación de vitamina C. (Tesis de Doctorado), Yautepec, Morelos.
- Pankasemsuk, T., Apichartsrangkoom, A., Worametrachanom, S., & Techarang, J. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* 01 by alginate along with hi-maize starch for exposure to a simulated gut model. *Food Bioscience*, 16, 32-36. doi: 10.1016/j.fbio.2016.07.001
- Paredes-López, O., Schevenin, M. L., Hernández-López, D. & Cárabez-Trejo, A. (1989), Amaranth Starch - Isolation and Partial Characterization. *Starch/Stärke*, 41: 205-207. doi:10.1002/star.19890410602

- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171-1185. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x
- Patindol, J. A., Gonzalez, B. C., Wang, Y.-J., & McClung, A. M. (2007). Starch fine structure and physicochemical properties of specialty rice for canning. *Journal of Cereal Science*, 45(2), 209-218. doi: 10.1016/j.jcs.2006.08.004
- Peredo, A. G., Beristain, C. I., A., P. L., Azuara, E., & Jimenez, M. T. (2016). The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. *Food Science and technology*, 73, 191-196. doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.021
- Petreska, I. T., Petruševska-Tozi, L., Dabevska, K. M., Geškovski, N., Grozdanov, A., Stain, C., Stafilov, T., and Mladenovska, K. (2012). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in chitosan-Ca-alginate microparticles using spray-drying method. *The Journal European. Food Research and Technology*. 231:1-12.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.009
- Roberfroid, M. (2000). Prebiotics and probiotics: Are they functional foods ?. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1682s-1687s

- Roberfroid, M. B., & Slavin, J. (2000). Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(6), 461-480. doi: 10.1080/10408690091189239
- Rodríguez, V. (2009). Encapsulación de vitamina A y vitamina C. (Tesis de Maestría), Universidad de las Américas Cholula, Puebla
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal Applied Microbiology*, 91(5), 878-887.
- Sajilata, M. , Singhal, R. S. & Kulkarni, P. R. (2006), Resistant Starch—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 1-17. doi:10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x
- Salminen, M. K., Tynkkynen, S., Rautelin, H., Saxelin, M., Vaara, M., Ruutu, P., & Järvinen, A. (2002). Lactobacillus Bacteremia during a Rapid Increase in Probiotic Use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland. *Oxford Journals*, 35, 1155-1160.
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze drying. *Food Research International*, 43(1), 193-202. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.028
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze

- drying. *Food Research International*, 43(1), 193-202. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.028
- Shahidi, F., & Han, X.-Q. (1993). Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science And Nutrition*, 33, 501-547. doi: 10.1080/10408399309527645
- Shanahan, F. (2002). Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fantasy to facts and future. *British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1, S5-9. doi: 10.1079/BJN2002624
- Suave, J., Dall, Agnol, Pezzin, A., Silva, Meier, M., & Soldi (2006). Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal*, 7(2), 12-20.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., and Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Microbiology*. 62:47-55.
- Tari, T. A., Annapure, U. S., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2003). Starch-based spherical aggregates: screening of small granule sized starches for entrapment of a model flavouring compound, vanillin. *Carbohydrate Polymers*, 53(1), 45-51. doi: 10.1016/S0144-8617(02)00293-X
- Tattiyakul, J. , Pradipasena, P. & Asavasaksakul, S. (2007), Taro *Colocasia esculenta* (L.) Schott Amylopectin Structure and Its Effect on Starch

Functional Properties. Starch/Stärke, 59: 342-347.
doi:10.1002/star.200700620

Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165. doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.001

Tester, R.F., & Karkalas, J., 2002. Starch. In: Steinbuchel, A. (Series Ed.) Vandamme, E.J., De Baets, S., Steinbuchel, A. (vol. Eds.), *Biopolymers*, vol. 6. Polysaccharides. II. Polysaccharides from Eukaryotes, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 381–438.

Ting-Jang Lu, Jheng-Hua Lin, Jia-Ci Chen., & Yung-Ho Chang. (2008). Characteristics of taro (*Colocasia esculenta*) Starches Planted in Different Seasons and their Relations to the Molecular Structure of Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008 56 (6), 2208-2215. doi: 10.1021/jf072789

Toldrá, F., & Reig, M. (2011). Innovations for healthier processed meats. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 517-522. doi: 10.1016/j.tifs.2011.08.007

Trindade, M., & Grosso, C. (2000). The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of starch and in gum Arabic. *Journal of Microencapsulation*, 17: 169-176

Valero-Cases, E., & Frutos, M. J. (2015). Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in

vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 824-828. doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.049

Villena, M., Hernández, M., Lara V, G., & Martínez Ma, R. (2009). Técnicas de microencapsulación: Una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, 50, 43-50.

Wang, Y. J., White, P. J., Pollak, L. M., & Jane, J. (1993). Characterization of Starch Structures of 17 Maize Endosperm Mutan Genotypes with Oh43 Inbred Line Background. *Cereal Chemistry*, 70, 171-179.

Wang, Y.-J., Kuo, M.-I., Wang, L., & Patindol, J. (2007). Chemical Composition and Structure of Granule Periphery and Envelope Remnant of Rice Starches as Revealed by Chemical Surface Gelatinization. *Starch /Stärke*, 59(9), 445-453. doi: 10.1002/star.200700613

Wong, S. W., Yu, B., Curran, P., & Zhou, W. (2009). Characterising the release of flavour compounds from chewing gum through HS-SPME analysis and mathematical modelling. *Food Chemistry*, 114(3), 852-858. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.030

Ying, D. Y., Phoon, M. C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I., & Augustin, M. A. (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, 75(9), E588-595. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x

Zhao, J. & Whistler, R.L. 1994b. Spherical aggregates of starch granules as flavor carriers. *Food Technology*, 48, 104-105.

Zhao, J. & Whistler, R.L. 1994a. Isolation and characterization of starch amaranth flour. *Cereal Chemistry*, 71, 392-393.