



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Optimización del proceso de microencapsulación de *Lactobacillus pentosus*
utilizando una mezcla de almidón – pulque como material de pared y
evaluación de su vida de anaquel.

TESIS

QUE PRESENTA:

L.Q.A. ZENIA HERNÁNDEZ LÓPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JAVIER CASTRO ROSAS

DRA. R. NALLELY FALFÁN CORTÉS

ASESORES:

DRA. ESMERALDA RANGEL VARGAS

DR. CARLOS ALBERTO GOMEZ ALDAPA





Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Coordinación de Investigación y Posgrado del ICAP



Acta de la reunión del comité de Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances del trabajo de tesis; "Optimización del proceso de microencapsulación de *Lactobacillus pentosus* utilizando una mezcla de almidón – pulque como material de pared y evaluación de su vida de anaquel" que desarrollo la estudiante: Lic. en Química de Alimentos **Zenia Hernández López**.

Asistentes:

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
Dr. Javier Castro Rosas
Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés
Dra. Esmeralda Rangel Vargas

A. Revisión del trabajo de tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicándole oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo de investigación y poder continuar con el proceso de titulación para obtener el grado de Maestro en Ciencia de los Alimentos. El 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 el 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 10 de noviembre del 2016

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Dr. Javier Castro Rosas

Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés

Dra. Esmeralda Rangel Vargas



Av. Universidad km.1, Rancho Universitario
C.P. 43600. Tulancingo, Hidalgo, México
Tel. +52 771 7172000 Ext. 2421



El presente trabajo de investigación, fue realizado en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Área Académica de Química (AAQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Javier Castro Rosas y la Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés y la asesoría del Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa y la Dra. Esmeralda Rangel Vargas.

A Dios.

A Alexa, por ser la motivación y el motor que da sentido a mi vida, gracias por tu apoyo y comprensión para que pudiera ser posible esta meta.te amo hija.

A mis padres Germán y Trini, por ser un gran ejemplo de esfuerzo, tenacidad y dedicación para lograr las cosas, mil gracias por su amor y gran apoyo en todas las decisiones que he tomado y nunca dejarme sola. No existen palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, solo puedo decirles que el amor y la admiración que siento por ustedes es invaluable....Los quiero muchísimo.

A mis hermanos, Zeila, Edgar y especialmente a Yuri por el gran apoyo con Alexa, ya que sin tu gran ayuda con ella, simplemente no hubiera podido continuar con mis estudios. Los quiero.

Con Amor y cariño

Zenia

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado mediante la beca de maestría correspondiente a la convocatoria de becas nacionales 2014. Número de becario 620244.

Al Dr. Javier Castro Rosas por compartir sus conocimientos, su asesoría y su apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa, por su apoyo, paciencia, confianza y conocimientos compartidos. Muchas gracias por su amistad a lo largo de estos años y motivarme a continuar estudiando.

A la Dra. Nallely Falfán Cortés por su ayuda, cooperación y disponibilidad para compartirme sus conocimientos. Gracias por su cariño y amistad que logramos durante este tiempo.

A la Dra. Esmeralda Rangel Vargas por su apoyo y las facilidades brindadas para poder realizar este proyecto de investigación.

A la Dra. Fabiola Guzmán Ortiz, muchas gracias por tus consejos, ser mi confidente y todos los momentos únicos que hemos pasado juntas. Gracias por estar siempre conmigo y ser mi gran amiga. TQM.

A mis compañeras de cubículo, Brenda, Monse e Ivonne por su apoyo, amistad, compañía y cada uno de los momentos que compartimos.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos de toda la vida Marlene, Artemio y a toda mi toda mi familia, por siempre estar conmigo y alentarme para seguir superándome.

A mis compañeros de generación, Miguel, Laura, Brenda, Monse, Ivonne, Perla, Lorena, Edgar, Edher, Karla, Areli, Geral, Macario y Cobos, por la amistad y compañerismo a lo largo de estos dos años. Cada uno de ustedes dejó una enseñanza en mí. Éxito compañeros.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, especialmente a los catedráticos e investigadores que me brindaron sus conocimientos y contribuyeron a mi formación.

INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEORICO	2
2.1 Alimentos Funcionales.	2
2.2 Probióticos	3
2.2.1 Tipos de microorganismos probióticos.	5
2.2.2 Selección de cepas probióticas.	5
2.2.3 Pruebas de capacidad probiótica in vitro.....	7
2.2.3.1 Sobrevivencia de la cepa cuando se expone a bajo pH, sales biliares y jugos gástricos.	7
2.2.3.2 Adhesividad a la mucosa intestinal.	8
2.2.3.3 Actividad antagonica contra bacterias patógenas.....	8
2.2.4 Propiedades funcionales de los probióticos.....	8
2.2.5 Microencapsulación: vía de protección para probióticos.	9
2.3 Microencapsulación.	10
2.3.1 Microencapsulación de probióticos.....	13
2.3.1.1 Ventajas de la encapsulación de probióticos.....	14
2.3.2 Material de encapsulación para probióticos.	14
2.3.2.1 Kappa-carragenina.	15
2.3.2.2 Alginato de sodio.	16
2.3.2.3 Almidón.....	16
2.3.2.4 Goma arábica.	17

2.3.2.5	Goma gelana y goma xantana.	17
2.3.2.6	Quitosano.	17
2.3.2.7	Gelatina.	18
2.3.2.8	Proteína de suero de leche.	18
2.3.3	Características del almidón modificado N-lok.	18
2.3.4	Metodologías de microencapsulación de probióticos.	19
2.3.4.1	Proceso de encapsulación.	20
2.3.4.2	Proceso de secado.	21
2.4	Pulque.	24
2.5	<i>Lactobacillus pentosus</i>	26
3	JUSTIFICACION.	28
4	OBJETIVOS.	30
4.1	Objetivo general.	30
4.2	Objetivos específicos.	30
5	MATERIALES Y METODOS.	31
5.1	Materiales.	31
5.1.1	Equipo de laboratorio.	31
5.1.2	Material biológico.	31
5.1.3	Materiales.	31
5.2	Metodología.	32
5.2.1	Cuantificación de proteína en pulque.	32
5.2.2	Determinación de pH en pulque.	32
5.2.3	Determinación de coliformes totales en pulque.	32
5.2.4	Determinación de grado alcohólico en pulque.	32
5.2.5	Preparación de la cepa para su microencapsulación.	33

5.2.6	Microencapsulación de <i>Lactobacillus pentosus</i>	33
5.2.6.1	Preparación del material de pared y mezcla con la bacteria.	33
5.2.6.2	Secado por aspersión.	34
5.2.7	Sobrevivencia después del secado por aspersión.	34
5.2.8	Tinción de Gram.	34
5.2.9	Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión.	35
5.2.9.1	Contenido de humedad.	35
5.2.9.2	Actividad de agua.	35
5.2.9.3	Higroscopicidad.	35
5.2.9.4	Caracterización morfológica de las microcápsulas por SEM.	35
5.2.10	Almacenamiento de <i>Lactobacillus pentosus</i> a 25 y 4 °C.	36
5.2.11	Resistencia de <i>Lactobacillus pentosus</i> a pH.	36
5.2.12	Resistencia de <i>Lactobacillus pentosus</i> a sales biliares.	36
5.2.13	Diseño experimental y análisis estadístico.	37
5.2.14	Optimización.	38
6	RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
6.1	Caracterización del pulque.	39
6.2	Activación de la cepa de <i>Lactobacillus pentosus</i>	39
6.3	Microencapsulación de <i>Lactobacillus pentosus</i>	40
6.3.1	Evaluación de la homogenización.	40
6.3.2	Sobrevivencia después del secado por aspersión.	40
6.4	Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión.	44
6.4.1	Contenido de humedad y actividad de agua.	44
6.4.2	Higroscopicidad.	47
6.5	Optimización del proceso de secado.	47

6.6	Morfología macroscópica de colonias y Tinción de Gram.....	48
6.7	Caracterización morfológica de las microcápsulas (SEM).....	51
6.8	Tolerancia de <i>Lactobacillus pentosus</i> encápsulado a pH ácido.....	52
6.9	Tolerancia de <i>Lactobacillus pentosus</i> encapsulado a sales biliares.....	53
6.10	Estabilidad de las microcápsulas con <i>Lactobacillus pentosus</i> a 4 °C y 30 °C.	53
7	CONCLUSIONES.....	57
8	BIBLIOGRAFIA.....	58
9	ANEXOS.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aplicaciones importantes de la microencapsulación en la industria de alimentos. 12

Figura 2. Tipos de microcápsulas. En blanco se indica el material activo, en gris el material de pared o cubierta..... 12

Figura 3. Tecnología de secado por aspersión..... 22

Figura 4. Efecto de la temperatura y del porcentaje de sólidos sobre la viabilidad de *Lactobacillus Pentosus*. 44

Figura 5. Efecto de la temperatura y del porcentaje de sólidos sobre el porcentaje de humedad. 46

Figura 6. Efecto de la temperatura y del porcentaje de sólidos sobre la actividad de agua. 46

Figura 7. . Efecto de la temperatura y del porcentaje de sólidos sobre la higroscopicidad. 47

Figura 8. Condiciones óptimas de secado para obtener la mayor viabilidad de *Lactobacillus pentosus* microencapsulado. 49

Figura 9. Región óptima del proceso de secado por aspersión para la microencapsulación de *Lactobacillus Pentosus*, donde la respuesta seleccionada fue la viabilidad (%). 49

Figura 10. Morfología macroscópica de colonias de *Lactobacillus pentosus*. 50

Figura 11. Tinción de Gram de las células desarrolladas en las colonias con la bacteria *Lactobacillus pentosus* microencapsulada. 50

Figura 12. Microfotografías de microcápsulas con *Lactobacillus pentosus* después del secado por aspersión (condiciones óptimas). 51

Figura 13. Supervivencia de *Lactobacillus pentosus* almacenado a 4 y 30 °C 55

Figura 14. Microfotografías de *Lactobacillus pentosus* encapsulado y almacenado a 4 °C. (A) semana 0, (B) semana 4, (C) semana 8 y (D) semana 12. 56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de alimentos funcionales.	4
Tabla 2. Ejemplos de microorganismos usados como probióticos.....	6
Tabla 3. Polisacáridos empleados en la encapsulación de probióticos.....	15
Tabla 4. Tecnologías de encapsulación de probióticos: intervalo de tamaño de partícula para cada técnica.....	19
Tabla 5. Ventajas y desventajas de la técnica de extrusión.	20
Tabla 6. Ventajas y desventajas del método de secado por aspersión.....	23
Tabla 7. Composición química del pulque.	26
Tabla 8. Diseño experimental central compuesto rotatable con dos variables independientes.	38
Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del pulque.	39
Tabla 10. Evaluación de la sobrevivencia de la bacteria <i>Lactobacillus pentosus</i> a 24 y 48 h.	40
Tabla 11. Viabilidad de <i>Lactobacillus pentosus</i> , evaluando la homogenización.	40
Tabla 12. Viabilidad de <i>Lactobacillus pentosus</i> obtenida para el diseño experimental.	41
Tabla 13. Análisis de varianza para las respuestas de viabilidad, higroscopicidad, actividad de agua y humedad en las microcápsulas.	43
Tabla 14. Coeficientes estimados del modelo ajustado y nivel de significancia para las respuestas de porcentaje de viabilidad, higroscopicidad, actividad de agua y humedad.	43
Tabla 15. Contenido de humedad, higroscopicidad y actividad en las microcápsulas obtenidas después del secado por aspersión.	45
Tabla 16. Tolerancia de <i>Lactobacillus pentosus</i> encapsulada a diferentes valores de pH. .	52
Tabla 17. Tolerancia de <i>Lactobacillus pentosus</i> encápsulado a diferentes concentraciones de sales biliares.....	53
Tabla 18. Sobrevivencia de <i>Lactobacillus pentosus</i> durante el almacenamiento.....	54

RESUMEN

Actualmente, existen en el mercado algunos productos probióticos, que se comercializan liofilizados o bien adicionados a productos lácteos. No obstante, independientemente de su presentación comercial, tales probióticos presentan problemas de estabilidad relacionados, con su viabilidad. En este sentido, se buscan materiales o metodologías, mediante las cuales se logre mayor estabilidad de éstos microorganismos. En diferentes estudios se ha utilizado a la microencapsulación como estrategia, para mejorar la viabilidad de los probióticos en los productos y durante su paso por el tracto gastrointestinal.

En estudios previos se han aislado en el laboratorio diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) con potencial probiótico, no obstante, se ha determinado que la sobrevivencia de estas BAL liofilizadas o en un producto o durante su paso por el sistema gastrointestinal (SGI) es pobre; por lo que es de interés conocer si la microencapsulación podría conferir mayor sobrevivencia a estas BAL en un producto o durante su paso por el SGI.

El objetivo de éste trabajo fue optimizar la microencapsulación de *Lactobacillus pentosus* mediante secado por aspersion utilizando una mezcla de almidón-pulque como material de pared, así mismo evaluar la vida de anaquel de la bacteria encapsulada durante 3 meses para ver la viabilidad de la bacteria.

ABSTRACT

Currently, there are on the market some probiotic products, which are marketed lyophilized or added to dairy products. However, regardless of their commercial presentation, such probiotics present related stability problems with their viability. In this sense, we look for materials or methodologies, by which they achieve greater stability of these microorganisms. In different studies, microencapsulation has been used as a strategy to improve the viability of probiotics in products and during their passage through the gastrointestinal tract.

In previous studies different lactic acid bacteria (BAL) with probiotic potential have been isolated in the laboratory, however, it has been determined that the survival of these lyophilized BALs either in a product or during its passage through the gastrointestinal system (SGI) is poor ; So it is of interest to know if microencapsulation could confer greater survival to these BALs in a product or during its passage through the SGI.

The objective of this work was to optimize the microencapsulation of *Lactobacillus pentosus* by spray drying using a mixture of starch-pulque as wall material, as well as to evaluate the shelf life of encapsulated bacteria for 3 months to see the viability of the bacteria.

1 INTRODUCCIÓN

La Federación Internacional de Lácteos (IDF) ha sugerido que un mínimo de 10^6 - 10^7 UFC/g de células probióticas bacterianas deberán estar vivas en el tiempo de consumo de un alimento adicionado de microorganismos probióticos, para producir beneficios terapéuticos (FAO/WHO 2002).

Estudios realizados indican que las bacterias probióticas no sobreviven en cantidades lo suficientemente altas cuando son incorporadas en productos alimenticios (Shah, 2000); (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). La pérdida de viabilidad puede ocurrir antes de su consumo, durante el procesamiento por estrés de oxígeno, durante el almacenamiento o durante la congelación o secado o también, debido a la acción severa de las condiciones del tracto gastrointestinal (GI) (Akhiar, 2010). La microencapsulación tiene como objetivo crear un micro ambiente en donde la bacteria pueda sobrevivir, durante el procesamiento, almacenamiento y ser liberada en sitios apropiados del tracto digestivo (Weinbreck y col. 2010).

La microencapsulación por secado por aspersión es un proceso que produce grandes cantidades de material, es económico y efectivo. Además de que puede ser operado de manera continua. La desventaja es que las altas temperaturas utilizadas en el proceso podrían no ser adecuadas para encapsular células bacterianas probióticas. Sin embargo, el propio ajuste y control de las condiciones de procesamiento, como la temperatura de entrada, el porcentaje de sólidos y la velocidad de homogenización pueden alcanzar buenas viabilidades de los microorganismos y tamaños de partícula deseados (Kailasapathy, 2002). Diversos materiales de pared han sido utilizados para encapsular probióticos para la protección del pH del estómago y de concentraciones de bilis e incrementar la viabilidad y estabilidad física durante el procesamiento de estos. Los principales agentes encapsulantes de estos organismos son sistemas constituidos principalmente por: carragenina, alginato, almidón y sus derivados, gelatina, quitosano (Anal y Singh, 2007).

2 MARCO TEORICO

2.1 Alimentos Funcionales.

En la actualidad, el concepto de nutrición ha evolucionado notablemente, gracias a la investigación constante en ciertas áreas de interés. Las prioridades ya no se encuentran centradas en las carencias nutricionales, ahora radica en la relación entre alimentación y enfermedades crónicas no trasmisibles. Los consumidores, conscientes de sus necesidades, buscan en el mercado, aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar. Siguiendo esta tendencia, reciben abundante información sobre las propiedades saludables de los alimentos, en especial, de aquellos alimentos que ejercen una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad (Olagnero y col, 2007). Estos alimentos que promueven la salud han sido denominados Alimentos Funcionales y las empresas que los producen, presentan una rápida expansión mundial (Araya y Lutz, 2003).

En el 2013, el 56% de los consumidores, adquirieron alimentos o bebidas funcionales que se destinan a una condición específica, siendo los que reducen el colesterol, los más comprados (www.ift.org, 2014).

Existe una gran variedad de definiciones para el término “alimentos funcionales”, él que fue introducido por primera vez en Japón, a mediados de los años ochenta. En ese momento, se refería a los alimentos procesados que contenían ingredientes que influían de manera beneficiosa en funciones corporales específicas, además de ser nutritivos (Subirade, 2007). Actualmente no hay una definición universal, aceptada para los alimentos funcionales, hay algunas muy simples “Alimentos o componentes alimentarios que proporcionan beneficios a la salud y reducen el riesgo de una enfermedad en específico (Nutrition, 2000), y otras son mucho más complejas.

La Acción Concertada de la Comisión Europea sobre Ciencias de los Alimentos Funcionales en Europa (Functional Food Science in Europe, FuFoSE) coordinada por el International Life Sciences Institute (ILSI), describió los alimentos funcionales de la siguiente manera: un alimento puede considerarse como “funcional” si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de una manera relevante para

mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas. Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos y deben demostrar sus efectos en las cantidades en que normalmente se consumen en la dieta: no se trata de comprimidos o cápsulas, sino de alimentos que forman parte de un régimen normal (Diplock y col., 1999).

Los alimentos funcionales han sido desarrollados en todas las categorías de alimentos. Desde un punto de vista del producto, la propiedad funcional puede ser incluida de muchas maneras diferentes como se muestra en la Tabla 1 (Kotilainen y col., 2006); (Spence, 2006).

Las tres principales categorías de productos globales de alimentos funcionales, basados en la definición de éstos, como los productos que hacen afirmaciones para la salud son: panadería y cereales, los segmentos del mercado de bebidas y los lácteos, (www.ift.org, 2014), dentro de ésta última categoría, los probióticos constituyen un grupo importante dentro de los alimentos funcionales, por los beneficios potenciales en la salud, por lo que se ha incrementado la investigación en el desarrollo de estos productos.

2.2 Probióticos

El término probiótico significa “a favor de la vida”, y se consideran como componentes microbianos con efectos beneficiosos a la salud, su significado se ha modificado con el tiempo. Definido según la FAO/OMS (2002) “son microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped”. Los probióticos se consideran como ingredientes alimentarios y no farmacéuticos, con un alto potencial terapéutico para prevenir el desarrollo o prevalencia de algunas enfermedades.

La disponibilidad e ingestión de probióticos se consigue mediante el consumo de alimentos en los cuales han sido adicionados o en alimentos fermentados en los que diferentes microorganismos o grupos microbianos originan modificaciones controladas de sus componentes, lo que mejora sus características organolépticas, tecnológicas e higiénicas. En los alimentos fermentados, las bacterias lácticas hidrolizan numerosos sustratos, lo que permite la generación de ácido láctico y otros productos finales del metabolismo microbiano, aminoácidos libres, ácidos grasos de cadena corta, compuestos

volátiles y bacteriocinas, considerados como péptidos antimicrobianos (Dave y Shah, 1997).

Tabla 1. Tipos de alimentos funcionales.

Tipo de alimento funcional	Definición	Ejemplo
Productos fortificados	Un alimento fortificado con nutrientes adicionales	Jugo de frutas fortificados con vitamina C
Productos enriquecidos	Un producto con nuevos nutrientes o componentes adicionados que normalmente no se encuentran en un alimento en particular	Margarina con ésteres de esteroles vegetales, probióticos , prebióticos.
Productos alterados	Un alimento con un componente perjudicial que ha sido removido, reducido o reemplazado con otra sustancia con efectos benéficos.	Fibras como liberadores de grasa en la carne o los productos de helado.
Productos mejorados	Un alimento en el cual uno de los componentes ha sido naturalmente mejorado a través de condiciones especiales de crecimiento, nueva composición de la alimentación, manipulación genética o de otro modo.	Huevos con un incremento en el contenido de omega-3 alcanzado por alterar la alimentación de los pollos.

(Kotilainen y col., 2006); (Spence, 2006).

Durante los últimos años, se ha desarrollado una gran diversidad de productos elaborados con probióticos, la oferta incluye principalmente derivados lácteos como leches fermentadas, yogurt, quesos, helados, además de suplementos alimenticios en diferentes presentaciones. De acuerdo a lo reportado por algunos autores, es necesaria una ingesta mínima diaria de 10^7 - 10^9 microorganismos vivos por cada gramo o mililitro de producto, para que puedan ser observados los beneficios en la salud de los consumidores, además de que permanezcan viables a altas concentraciones durante el tiempo de vida de anaquel (González y col., 2006).

2.2.1 *Tipos de microorganismos probióticos.*

Los microorganismos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son los más utilizados como probióticos, sin embargo; algunos géneros como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Sacharomyces*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Propionibacterium* y *Lactococcus*, han sido estudiados y se les ha atribuido potencial probiótico. Las bacterias ácido lácticas son ácido tolerantes y fermentativas y han sido utilizadas como cultivos iniciadores en la mayoría de los productos fermentados. Las bacterias ácido lácticas en general tienen la capacidad intrínseca para tolerar bajos valores de pH y altas concentraciones de sales biliares, así como la capacidad de adherirse al intestino. Las *Bifidobacterium spp.* son ampliamente utilizadas en la formulación de productos y aplicaciones probióticas, porque comparten muchas características fenotípicas con los *Lactobacillus*, pero son una población dominante del colon, mientras que éstas últimas lo son del intestino (Kumar y Salminen, 2016). En la Tabla 2, se dan ejemplos de microorganismos usados como probióticos (Holzapfel y Schillinger, 2002); (Playne y col., 2003); (Shah, 2007); (Saxelin y col., 2005).

2.2.2 *Selección de cepas probióticas.*

Los probióticos son seleccionados por su habilidad para sobrevivir durante su paso por el tracto gastrointestinal, colonizar el epitelio intestinal y expresar su actividad antimicrobiana contra patógenos. Algunas de las directrices que ha establecido la OMS para evaluar una cepa con capacidad probiótica son (Kumar y Salminen, 2016):

- a) Identificación de la cepa: la caracterización bioquímica debe ser reforzada con la genotípica, usando herramientas moleculares para la identificación y la diferenciación.
- b) Historia de su uso seguro: en general, las cepas probióticas aisladas de comidas o bebidas tradicionales, son consideradas como seguras por el uso de éstos alimentos en la dieta humana a través de la historia de su consumo.
- c) Tolerancia a condiciones del tracto gastrointestinal: para que una cepa probiótica pueda ejercer algún beneficio en el huésped, es necesario que resista un bajo pH y altas concentraciones de sales biliares. La adherencia al epitelio intestinal puede ser determinado por pruebas *in vitro* o *in vivo* usando diferentes modelos animales.
- d) Estudios de intervención humana: basados en estudios previos con animales, es necesario validar los beneficios a la salud en humanos. Las diferentes fases de un

estudio clínico incluye, seguridad, eficacia, efectividad y vigilancia de los potenciales efectos secundarios

Tabla 2. Ejemplos de microorganismos usados como probióticos.

Especie	Cepa
<i>Lactobacillus.</i>	
<i>L. acidophilus</i>	La-1 /La-5, NCFM, La 1, DDS-1
<i>L. bulgaricus</i>	LAFTI, L10
<i>L. casei</i>	Lb12
<i>L. fermentum</i>	Immunitals, Defensis DN 114 001, Shirota
<i>L. helveticus</i>	(Yakult)
<i>L. johnsonii</i>	RC-14, KLD
<i>L. reuteri</i>	BO2, L89
<i>L. rhamnosus</i>	LA1
<i>L. paracasei</i>	ING1
<i>L. plantarum</i>	GG, HN001
<i>L. reuteri</i>	33,CRL 431
<i>L. rhamnosus</i>	Lp01, ATTC 8014
<i>L. salivarius</i>	SD112, 271, GR-1, LB21, UCC118
<i>Bifidobacterium</i>	
<i>B. adolescentis</i>	ATTC 15703, 94-BIM
<i>B. animals (lactis)</i>	Bb-12, Lafti, B94, DR 10/HOWARU
<i>B. bifidus</i>	HN019
<i>B. breve</i>	Bb-11
<i>B. essensis</i>	Yakult
<i>B. infantis</i>	Bioactivia (Danone)
<i>B. longum</i>	Shirota, Immunitass, 744, 01, Ucc 35624
Otras bacterias ácido lácticas	
<i>Carnobacterium divergens</i>	V41, AS7
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cepa no especificada
<i>Enterococcus faecium</i>	SF68, M-74
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Cepa no especificada
<i>Streptococcus intetmedicus</i>	Cepa no especificada
Bacterias no lácticas	
<i>Bacillus subtilis</i>	Cepa no especificada
<i>Propionibacterium</i>	SJ
Levadura	
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Cepa no especificada

(Holzapfel y Schillinger, 2002); (Playne y col., 2003); (Shah, 2007); (Saxelin y col.,2005).

2.2.3 Pruebas de capacidad probiótica *in vitro*

Cuando el microorganismo ya se ha obtenido, aislado y se han realizado procesos de caracterización para obtener su identificación, el siguiente paso es realizar pruebas de capacidad probiótica *in vitro* (Sip y Grajek, 2010).

2.2.3.1 Sobrevivencia de la cepa cuando se expone a bajo pH, sales biliares y jugos gástricos.

- pH: Más de dos litros de jugo gástrico con un pH de 1.5 a 2.5 son secretados a través de las células del estómago todos los días, proporcionando una efectiva barrera ácida contra los microorganismos que ingresen al tracto gastrointestinal. Por lo consiguiente, cualquier microorganismo que se desee considerar como probiótico, debe tener resistencia al pH del estómago; se debe evaluar en ensayos típicos de resistencia al pH la viabilidad del candidato como microorganismo probiótico, mediante la exposición en un medio de cultivo o solución amortiguadora con niveles de pH bajos por un periodo de tiempo, durante el cual se determina el número de microorganismos viables (Evans y col., 1988).
- Sales biliares: La bilis es una solución verde acuosa, que está compuesta principalmente por ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos, se sintetiza en los hepatocitos del hígado y se almacena en la vesícula biliar; posteriormente se libera al duodeno después de la ingesta de comida. La bilis es un detergente biológico que solubiliza los ácidos grasos de cadena larga y los mono y diacilglicéridos resultantes de la acción de las lipasas intestinales, formando micelas y por lo tanto juegan un rol importante en la digestión de los lípidos (Begley y col., 2006). Una concentración de 0.15-0.3% de sales biliares, ha sido recomendada para la selección de probióticos en uso humano, debido a que son las concentraciones a las cuales son sometidos los alimentos en el tracto gastrointestinal en el ser humano (Goldin y Gorbach, 1992). Para evaluar la tolerancia a sales biliares, se suplementa el medio de cultivo, según el tipo de microorganismo a evaluar, con diferentes concentraciones de sales biliares y se incuba por periodos de 24 h, realizando determinaciones de viabilidad mediante turbidez o recuento de colonias.

- Jugos gástricos: El jugo gástrico es producido en el estómago, es una sustancia muy ácida, cuya función es degradar el alimento, se compone principalmente por agua, sales, ácido clorhídrico, mucoproteínas, enzimas proteolíticas, secreciones endocrinas e inmunoglobulinas. Contiene enzimas como pepsina, que en medio ácido induce la digestión de proteínas, la evaluación *in vitro* se realiza elaborando un jugo gástrico artificial, en donde los microorganismos a evaluar se incuban por periodos determinados, para determinar su viabilidad mediante el recuento de colonias o la turbidez (Guo y col., 2010).

2.2.3.2 *Adhesividad a la mucosa intestinal.*

Estudios sobre cultivos celulares son esenciales para la selección de nuevas cepas con potencial probiótico. La importancia de la adhesión del microorganismo que se pretende usar como probiótico a las células epiteliales del intestino, ha sido demostrada en estudios clínicos, ya que el microorganismo debe hacerlo para lograr su establecimiento en el ecosistema del tracto gastrointestinal (Champs y col., 2003).

2.2.3.3 *Actividad antagónica contra bacterias patógenas.*

La producción de sustancias antimicrobianas, se considera uno de los mecanismos de acción, por lo que los microorganismos probióticos suministran protección frente a los patógenos, esta antibiosis puede ser ejercida a través de mecanismos metabólicos generales, como la producción de ácidos orgánicos o radicales oxidantes o bacteriocinas (Nagpal y col., 2012).

2.2.4 ***Propiedades funcionales de los probióticos.***

Algunos de los principales beneficios que se obtienen al consumir alimentos, a los cuales se les han adicionado microorganismos probióticos, se enlistan a continuación (Nagpal y col., 2012; Reid y col., 2003; Shah, 2007).

1. Disminuye el colesterol sérico: aunque los ácidos biliares transformados son promotores tumorales y pueden dañar la mucosa intestinal.
2. Facilita la disponibilidad de vitaminas y minerales: en este contexto, el descenso del pH del colón puede incrementar la biodisponibilidad del calcio, mientras que algunos probióticos producen vitaminas del grupo D, otros son consumidores natos.

3. Capacidad anticancerígena: absorbiendo o reteniendo mutágenos, reduciendo la actividad metabólica enzimática fecal y estimulando la actividad de las enzimas del metabolismo de los xenobióticos.
4. Estimula el sistema inmune: incrementan la respuesta inmune a la inflamación y reduciendo las alergias.
5. Activa la motilidad intestinal: reduce la sintomatología y duración/incidencia de las diarreas.
6. Metaboliza la lactosa: sintetizando y secretando importantes enzimas digestivas como la β -galactosidasa.
7. Reduce la adherencia de patógenos: sintetizando péptidos antimicrobianos eficaces que inactivan la proliferación de éstos.

2.2.5 Microencapsulación: vía de protección para probióticos.

Los probióticos constituyen una interesante alternativa en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades; pero para producir estos efectos benéficos en la salud, los probióticos deben sobrevivir y multiplicarse en el hospedador, así como estar metabólicamente estables y activos en el producto, y sobrevivir durante su paso por el estómago y el intestino (Sanz, 2007). En este sentido, también es importante considerar la concentración de microorganismos probióticos.

Normalmente los productos que contienen probióticos, deben tener una concentración de 10^6 a 10^8 UFC de bacterias probióticas viables por gramo de producto, en el momento de su consumo, para que pueda ejercer un efecto benéfico a la salud humana (FAO/OMS, 2002). La concentración mínima en productos lácteos debe ser de 10^6 UFC/g, aunque lo más deseable es una concentración de 10^8 UFC/g, con el objetivo de compensar la posible reducción en el número de microorganismos probióticos durante su paso por el intestino (Shah, 2007).

A pesar de los efectos benéficos de los probióticos, existe el problema de su estabilidad en productos alimenticios. Se ha demostrado que la viabilidad, la estabilidad y la supervivencia de los microorganismos probióticos, decrece rápidamente en el alimento con valores de concentración por debajo de los necesarios para ejercer su efecto en el sitio

de acción (Kailasapathy, 2006). La viabilidad de los microorganismos probióticos, dentro de un producto alimenticio, es afectada por factores como (Iravani y col., 2015):

- Sensibilidad de la cepa probiótica.
- Interacciones entre las especies de microorganismos presentes.
- El pH del alimento.
- Producción de ácidos orgánicos y compuestos volátiles (ácido láctico, acético, succínico, úrico, cítrico, etanol, acetaldehído, diacetilo y acetoína).
- Productos metabólicos y ácidos producidos durante el almacenamiento en refrigeración.
- Concentración de cloruro de sodio en el medio, nivel de inoculación, temperatura y tiempo de incubación, promotores de crecimiento (nutrientes disponibles) en productos fermentados.
- Temperatura de almacenamiento, tratamiento térmico, homogenización, materiales y condiciones de empaquetamiento.

Las estrategias propuestas para incrementar la resistencia de cepas probióticas contra el medio ambiente adverso son: selección de cepas resistentes a ácidos y bilis, empaquetamiento en materiales protegidos de oxígeno, fermentaciones en doble etapa, pre-adaptación a varias condiciones de estrés, adición de micronutrientes en forma de aminoácidos y péptidos y la microencapsulación (Sarkar, 2010).

En este sentido se ha propuesto la microencapsulación con el objetivo de proporcionar una protección adecuada a las cepas probióticas contra los diversos ambientes adversos. La aplicación de esta técnica evita su degradación en el estómago, la liberación controlada en el intestino, la estabilidad en el almacenamiento y el mejoramiento de sus cualidades funcionales (Pérez Leonard y col., 2013).

2.3 Microencapsulación.

La microencapsulación es definida como la tecnología de empaquetamiento de sólidos, líquidos y gases con materiales de recubrimiento de distinta naturaleza, para dar lugar a capsulas de tamaño micrométrico que pueden liberar su contenido de manera controlada bajo la influencia de condiciones específicas (Champagne y Fustier, 2007).

Algunas aplicaciones importantes de la microencapsulación en la industria de los alimentos se muestran en la Figura 1 (Anal y Singh, 2007).

Las microcápsulas formadas en el proceso de microencapsulación son pequeñas partículas que contienen un agente activo, rodeado por un material de pared o cubierta. La misma está formada por una membrana fuerte, delgada, esférica y semipermeable que envuelve a un núcleo sólido o líquido, con un diámetro desde unas pocas micras a varios milímetros. El tamaño y forma de la microcápsula, depende de los materiales y métodos usados para prepararlas (Rokka y Rantamaki, 2010). Existen diferentes tipos de microcápsulas, las cuales según su estructura las podemos clasificar (Zuidam y Shimoni, 2009) como:

- Sistema reservorio o capsular: el material activo se encuentra incluido en una especie de reservorio, que puede ser de naturaleza líquida o sólida, el cual se haya envuelto por una fina película del material de recubrimiento.
- Sistema matricial: el material activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica. En la Figura 2, se muestra solo el encapsulado de tipo esférico, pero puede ser cilíndrico, oval o de forma irregular.

Dependiendo de las características fisicoquímicas del material activo, de la composición de la pared y de la técnica de microencapsulación usada, se podrán obtener los diversos tipos de partículas.

El propósito general de la microencapsulación es producir partículas que controlen el transporte de masa, siendo la pared de la microcápsula la encargada de controlar la difusión del componente activo. En la industria alimentaria, las microcápsulas se emplean para mantener la calidad de sustancias grasas, aceites, colorantes, saborizantes y aromatizantes. Estas liberan el material que contienen durante la preparación de las comidas o tras la ingestión.



Figura 1. Aplicaciones importantes de la microencapsulación en la industria de alimentos.

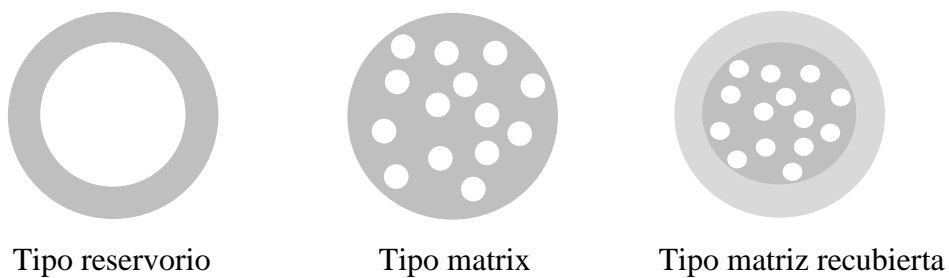


Figura 2. Tipos de microcápsulas. En blanco se indica el material activo, en gris el material de pared o cubierta.

Las microcápsulas deben ser caracterizadas y controladas de acuerdo con ensayos que aseguren su calidad y homogeneidad, así como su comportamiento en la liberación del material activo. Estos ensayos característicos que se realizan a las microcápsulas (Pérez Leonard y col., 2013) son:

- a) Características morfológicas, tamaño de partícula, estructura interna, densidad.
- b) Rendimiento de producción.
- c) Eficacia de la encapsulación y contenido en material activo.
- d) Estudio de liberación del material activo.
- e) Estado físico e interacciones polímero-material activo.

Las ventajas de la encapsulación de aditivos en la industria de alimentos (Aldana y col., 2011) son:

- Disminuir la velocidad de evaporación o de transferencia del material central hacia el medio ambiente externo.
- Controlar la liberación del material central a condiciones predeterminadas, como el cambio de pH o humedad, aplicación del calor o estímulos físicos.
- Reducir la interacción entre el material central y el ambiente externo: algunos ingredientes son sensibles al calor, la luz y la humedad y otros son altamente reactivos y tienden a oxidarse y volatilizarse.
- Facilitar la manipulación del material central: la encapsulación convierte un líquido a estado sólido, además previene la agregación, favorece el proceso de mezclado y asegura que el material central se encuentre uniforme en la mezcla.
- Enmascarar el sabor del material central.

2.3.1 *Microencapsulación de probióticos.*

La microencapsulación es una tecnología disponible que permite encapsular probióticos para ser formulados en sistemas alimentarios y ayudar a preservar su viabilidad durante su paso por el tracto gastrointestinal (Kosin y Rakshit, 2006); con ésta técnica, las células bacterianas quedan atrapadas dentro de los recubrimientos de materiales hidrocoloidales, proporcionando protección contra condiciones adversas como una alta acidez y bajo pH, sales biliares, choque frío (inducida por las condiciones de proceso tales como congelación y secado por congelación), el oxígeno molecular (en el caso de

microorganismos anaerobios), choque térmico (causada por el proceso de condiciones tales como secado por aspersión), y agentes químicos antimicrobianos que se aplican con el fin de inhibir o reducir lesiones en la célula y aumento de la viabilidad (Heidebach y col., 2012; Korbekandi y col., 2009).

Actualmente hay una gran cantidad de tecnologías de encapsulación. Antes de elegir alguna de ellas, se deben tener en cuenta los siguientes puntos (Zuidam y Shimoni, 2010):

- i. Las condiciones que afectan la viabilidad de los probióticos.
- ii. Cuáles condiciones de procesamiento serán usadas durante la producción del alimento.
- iii. Cuáles serán las condiciones de almacenamiento del producto alimenticio que contiene el encapsulado antes de ser consumido.
- iv. El tamaño y densidad necesarios para incorporar adecuadamente en el producto alimenticio.
- v. Los factores desencadenantes y el mecanismo de liberación.
- vi. El costo de la cepa.

2.3.1.1 *Ventajas de la encapsulación de probióticos.*

Algunas de las principales ventajas que se observa cuando se encapsulan probióticos se enlistan a continuación (Solanki y col., 2013).

- a) Protege y aumenta la supervivencia de las bacterias en los alimentos.
- b) Permite que los microorganismos probióticos sean atrapados e incorporados en los productos lácteos como yogurt, queso y productos lácteos congelados.
- c) Un 40% de los *Lactobacillus* sobreviven en los helados cuando son encapsulados en esferas de alginato de calcio que cuando están las células libres (Sheu y Marshall, 1993).
- d) La forma encapsulada de *B. pseudologum* exhibe mejor supervivencia en un entorno gástrico simulado en comparación con los microorganismos viables libres (Krasaekoopt y col., 2003).

2.3.2 *Material de encapsulación para probióticos.*

La selección del material de recubrimiento, es el paso más importante para obtener un producto encapsulado, porque dependiendo de sus propiedades, se pueden cumplir con los requerimientos de protección. El material protector debe reunir ciertas propiedades que

dependen de las características químicas del material encapsulado, la aplicación, las condiciones de almacenamiento y del proceso al cual será expuesto. Las características de un recubrimiento ideal para encapsular (Nag, 2011) son:

- Baja viscosidad a altas concentraciones.
- Baja higroscopicidad, para facilitar su manipulación y evitar la aglomeración.
- Capacidad de emulsificar y estabilizar el material central.
- Insoluble y no reactivo con el material central.
- Soluble en solventes alimenticios comunes o en el producto alimenticio final.
- Ofrecer máxima protección al material central contra condiciones adversas (luz, pH, oxígeno, humedad y otros ingredientes reactivos).
- Liberación completa de solventes y otros materiales usados durante el proceso de encapsulación.
- Sabor insípido.

En la Tabla 3, se muestran polisacáridos de diferente origen, utilizados comúnmente como material de pared, para llevar a cabo la encapsulación de microorganismos probióticos (Pérez Leonard y col., 2013). A continuación se describen algunos de ellos.

Tabla 3. Polisacáridos empleados en la encapsulación de probióticos.

Origen	Polisacáridos
Algas marinas	Kappa-carragenina, alginato
Plantas	Almidón y sus derivados, goma arábiga
Bacterias	Gelano, xantano
Animales	Quitosano
Proteínas animales	Leche, gelatina

(Pérez Leonard y col., 2013)

2.3.2.1 *Kappa-carragenina.*

Es un polímero natural, extraído de microalgas marinas, que es usado comúnmente en la industria de alimentos, como aditivo o agente espesante. Es un polímero que tiene una

estructura lineal que consiste en unidades de D-galactosa, unidos alternativamente por enlaces α -(1-3) y β -(1-4). Los tipos de carragenina son kappa (κ), iota (ι), y lambda (λ) (Gaaloul y col., 2009). La gelificación es inducida por la temperatura (60-80 °C), se requiere disolverla y la gelificación, se produce por enfriamiento a temperatura ambiente; para la formación de las cápsulas se necesita de cloruro de potasio o cloruro de calcio, como soluciones de endurecimiento o para insolubilizar el polímero (Gouin, 2004). Usualmente es usada una concentración de 2 – 5 % (Mortazavian y col., 2007). La carragenina es un polímero rico en hierro y compuestos de azufre. Ha sido utilizada para encapsular bacterias ácido lácticas como: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Lakkis, 2007).

2.3.2.2 Alginato de sodio.

El alginato, es un biopolímero natural, extraído de varias especies de algas, es comúnmente usado en la industria farmacéutica y en biotecnología como agente espesante, gelificante y estabilizador coloidal (Lakkis, 2007). Está compuesto por dos unidades de monosacáridos: ácido α -L-gulurónico y el ácido β -D-manurónico, unidos por enlaces glicosídicos β -(1-4) (Dong y col., 2006). La relación entre estos monosacáridos, determina la funcionalidad tecnológica del alginato. Se necesita una alta temperatura (60- 80 °C) para disolverlo en agua. Los geles de alginato, son insolubles en medios ácidos (Harnsilawat y col., 2006). Se utiliza en una concentración de 1-3% (Muthukumarasamy y col., 2006). La encapsulación con alginato se ha aplicado para bacterias ácido lácticas, principalmente para observar su viabilidad en medios ácidos. Y presenta algunas ventajas como son: fácil formación de gel en las matrices de las células bacterianas, no es toxica para el ser humano, es económica y fácil de preparar y apropiada para células bacterianas con tamaño de 1-3 μ m; sin embargo, tiene algunos inconvenientes, como por ejemplo: pérdida de la estabilidad mecánica, susceptible a la acidez del ambiente que la rodea y la presencia de iones causa deterioro en el alginato (Mortazavian y col., 2007).

2.3.2.3 Almidón.

El almidón se compone de unidades de D-glucosa, unidas por enlaces glicosídicos. Se ha utilizado como material para el recubrimiento de cápsulas de alginato. El almidón resistente no se degrada por la amilasa pancreática (Haralampu, 2000). El almidón de maíz

nativo contiene aproximadamente 25 % de amilosa y 75 % de amilopectina. La amilosa forma una cubierta que es resistente a los ácidos gástricos y a las enzimas pancreáticas. Los almidones con alto contenido de amilosa, forman películas fuertes, resistentes y más flexibles, pero es difícil de dispersar en agua y puede gelificar muy rápidamente (Kailasapathy, 2002). Su empleo en técnicas de encapsulación se dio para asegurar la viabilidad de las poblaciones de probióticos en los alimentos por su paso en el intestino grueso, ofreciendo una superficie ideal para la adherencia de los probióticos al gránulo de almidón durante el procesamiento, almacenamiento y el tránsito a través del tracto gastrointestinal (Mortazavian y col., 2007; Anal y Singh, 2007).

2.3.2.4 Goma arábica.

Es una mezcla de diversos polisacáridos muy relacionados, formados por una cadena principal de restos β -D-galactopiranosilo (Varum y Smidsrod, 2006). Es muy soluble en agua y la viscosidad de las soluciones varía fuertemente con el tipo de goma arábica, pH y la fuerza iónica, pero se alcanza una viscosidad máxima a pH entre 6 y 7. Actúa como coloide protector y es un excelente emulsificador, lo cual es un aspecto importante cuando se emplea el secado por aspersión (Verbeken y col., 2003).

2.3.2.5 Goma gelana y goma xantana.

La goma gelana, es un polisacárido aniónico, derivado de *Sphingomonas elodea*, la cual está constituida por la repetición de 4 unidades de monómeros: glucosa, ácido glucorónico, glucosa y ramnosa (Chen y Chen, 2007). La goma xantana es un exopolisacárido derivado de *Xanthomonas campestris*. La proporción óptima para la mezcla xantana-gelana es 1:0.75. A diferencia del alginato, ésta mezcla es resistente a condiciones ácidas (Sun y Griffiths, 2000).

2.3.2.6 Quitosano.

Es un polisacárido lineal con carga negativa, que se obtiene mediante desacetilación alcalina de la quitina. Puede ser aislado de la cubierta de los crustáceos, cutículas de insectos y membranas de hongos (Krasaekoopt y col., 2003). Se disuelve fácilmente a pH ácido, por lo que con frecuencia se emplea en combinación con otros polímeros que soporten el pH del estómago. Una vez que alcanza el intestino delgado, es degradado por la microbiota endógena (De Vos y col., 2010). Es usado para cubrir cápsulas de gelatina y

para incrementar la viabilidad de los probióticos; es más frecuentemente utilizado como cubierta, no como cápsula (Solanki y col., 2013).

2.3.2.7 *Gelatina.*

Es una sustancia derivada por la hidrólisis parcial del colágeno de origen animal y es muy usada en la formulación de alimentos e igualmente ha sido utilizada para encapsulación de probióticos. Es utilizada para incorporarse con otros polisacáridos como la goma gelana (Solanki y col., 2013). Los microorganismos que se han probado con esta técnica, incluyen al *Lactobacillus lactis* y su viabilidad ha sido evaluada en aceite de soya, no se conocen reportes en productos lácteos, pero no se descarta su aplicación (Anal y Singh, 2007).

2.3.2.8 *Proteína de suero de leche.*

Es una mezcla de proteínas como la β -lactoglobulina, la α -lactalbumina y la seroalbumina. Es fácilmente desnaturalizada con calor, lo cual afecta la agregación y reduce la estabilidad de la emulsión. La proteína de suero de leche, es un candidato potencial como agente de recubrimiento, ya que es biodegradable y frecuentemente usada en muchos tipos de productos (Anal y Singh, 2007). En cuanto a la viabilidad, se comprobó que las bacterias de *Lactobacillus rhamnosus*, encapsuladas en una matriz de proteína de suero de leche, fueron protegidas en comparación con bacterias no encapsuladas (Reid y col., 2006).

2.3.3 *Características del almidón modificado N-lok.*

El almidón N-lok, es un producto de baja viscosidad, diseñado para la encapsulación de sabores, grasas, aceites y vitaminas; se caracteriza por su excelente resistencia a la oxidación. Éste tiene una porción soluble en agua (correspondiente a la amilopectina) y una porción octenil, que interactúa con la fase oleosa o con los componentes liposolubles y la fracción de la amilopectina se orienta alrededor de las gotas de aceite en la emulsión, para protegerlas de la oxidación y re-asociación con otras gotas de aceite (Anónimo, 2005).

La baja viscosidad del N-Lok, es apropiada para la preparación de emulsiones con alto contenido de sólidos, para ser secados. Los productos muestran ciertas propiedades como la formación de una emulsión estable y la formación de una buena película que cubre al producto. Estas propiedades se pierden por lo regular durante el secado con otros

almidones encapsulantes. Cuando se emplea para obtener microcápsulas mediante secado por aspersión, se obtienen polvos con mejores propiedades de barrera ante la oxidación y la pérdida de los componentes volátiles es minimizada (Velázquez, 2008).

2.3.4 Metodologías de microencapsulación de probióticos.

Para la preparación de las microcápsulas, existen numerosos métodos y la selección del adecuado para encapsular, depende de los costos, el tamaño de la cápsula, las propiedades físicas y químicas de los materiales, la aplicación y el mecanismo de liberación deseado. En la Tabla 4, se muestran los diferentes tipos de partículas obtenidas (matriz o tipo reservorio), por cada uno de los métodos.

Tabla 4. Tecnologías de encapsulación de probióticos: intervalo de tamaño de partícula para cada técnica.

Emulsificación								Tipo matriz
Extrusión								
Secado por aspersión								
Recubrimiento por pulverización								Tipo reservorio
Coextrusión								
0.01 0.1 1 10 100 1000 10000								

(Solanki y col., 2013)

Los microorganismos probióticos son comúnmente encapsulados por las técnicas de extrusión, emulsión y secado por aspersión. En éstos métodos, los probióticos son atrapados en una matriz de gel, usando diferentes mecanismos de formación de mismo (Champagne y Fustier, 2007). La tecnología de microencapsulación de probióticos puede ser dividida en dos partes (Solanki y col., 2013):

- El proceso de microencapsulación del probiótico en las soluciones de encapsulación.

- El proceso de secado de la solución de encapsulación, para alcanzar gránulos o polvos de células encapsuladas.

2.3.4.1 *Proceso de encapsulación.*

Son básicamente dos técnicas de microencapsulación que se utilizan para probióticos, estos encapsulados son usados para la producción de biomasa y también como ingredientes en alimentos funcionales. Los métodos son extrusión o método de goteo y el de emulsión o sistema de dos fases.

2.3.4.1.1 *Extrusión o método de goteo.*

Esta técnica, es muy más utilizada por su simplicidad, bajo costo y condiciones suaves de formulación, que garantizan una alta viabilidad celular (Krasaekoopt y col., 2003). Consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado, forzando el paso de una solución a través de una aguja o jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo (Solankiy col., 2013). Los microorganismos son adicionados a una solución hidrocoloide, cuya suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual va a variar dependiendo del material empleado, el tamaño de las cápsulas obtenidas depende del diámetro de salida de la aguja (De Vos y col., 2010). A pesar de ser una técnica ampliamente utilizada por sus ventajas, que presenta, también tiene sus desventajas, las cuales se muestran en la Tabla 5 (Krasaekoopty col., 2003; Gouin, 2004; Solanki y col., 2013).

2.3.4.1.2 *Emulsión o sistema de dos fases.*

En esta técnica, se tiene una fase continua y una fase dispersa para formar la emulsión, y posteriormente sigue una etapa de separación, donde la fase dispersa encapsula la bacteria probiótica, como material activo (De Vos y col., 2010; Krasaekoopt y col., 2003). En este método, se añade un pequeño volumen de una solución polimérica con células probióticas en suspensión (fase dispersa) a un gran volumen de aceite vegetal (fase continua) como aceite de soya, girasol o maíz, ésta mezcla se homogeniza hasta desarrollar una emulsión de agua en aceite.

Tabla 5. Ventajas y desventajas de la técnica de extrusión.

Ventajas	Desventajas
Simple, barato y de fácil operación	Difícil de producir a gran escala por lenta formación de microcápsulas
No daña las células probióticas	Microcápsulas pobremente cargadas (8 %)
Alta viabilidad de microorganismos	Forma diámetros de partículas de larga distribución (2-5 mm)
No emplea disolventes perjudiciales para las bacterias.	Susceptibilidad de los carbohidratos hacia los daños y defectos estructurales
Se hace bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas	Limitada la selección del material de pared

(Krasaekoopty col., 2003; Gouin, 2004; Solanki y col., 2013).

Después de la formación de la emulsión, se requiere del entrecruzamiento (polímero hidrosoluble se hace insoluble), para formar las cápsulas dentro de la fase oleosa, cuyo agente de entrecruzamiento a utilizar depende del tipo de polímero. Finalmente, las cápsulas se colectan mediante filtración o centrifugación (Heidebach y col., 2012). Este método presenta como ventajas, la formación de cápsulas mas pequeñas que las que se obtienen por extrusión, lo cual es una característica deseable, es un proceso fácil de escalar a nivel industrial y la distribución del tamaño de partícula puede ser controlada por la velocidad de agitación y de homogenización. Una de las principales desventajas, cuando se utiliza en la industria alimentaria, es que el aceite residual, presente en las cápsulas, perjudica la textura y las propiedades organolépticas del alimento y además, el aceite residual, los emulsionantes y surfactantes utilizados pueden ser tóxicos para determinadas células (Jiménez , 2010).

2.3.4.2 *Proceso de secado.*

El secado mejora la estabilidad de las bacterias encapsuladas durante un almacenamiento prolongado. Pero también este proceso provoca algunas lesiones en las microcápsulas en cuanto a la liberación y reducción de la viabilidad de las bacterias probióticas. El secado por aspersión, liofilización y el secado por lecho fluidizado, son las

tecnologías de secado, más empleadas para probióticos, que se utilizan en la industria (Dimantov y col., 2003).

2.3.4.2.1 *Secado por aspersión.*

Es el método más comúnmente usado en la industria para microencapsular, ya que es económico y flexible. El consumo de energía del secado por aspersión es de 6 a 10 veces menor, comparado con el secado por congelación y se tiene una buena producción, de buena calidad. El método consiste en atomizar aire caliente en una suspensión o emulsión homogenizada de probióticos en la matriz del material encapsulante, para lograr una rápida evaporación del solvente (agua) y obtener los probióticos encapsulados en forma de partículas de polvo (Martín y col., 2015).

El proceso implica: a) inicialmente que el líquido se introduzca en el equipo por medio de una bomba y se atomice, b) a continuación se elimina el disolvente por medio de una corriente de aire caliente, c) la atomización de la mezcla se realiza dentro de la cámara de secado (Figura 3). El proceso de atomización es controlado mediante la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura de secado (Anekella y Orsat, 2013). Se emplean generalmente polisacáridos como materiales encapsulantes (Rokka y Rantamaki, 2010).

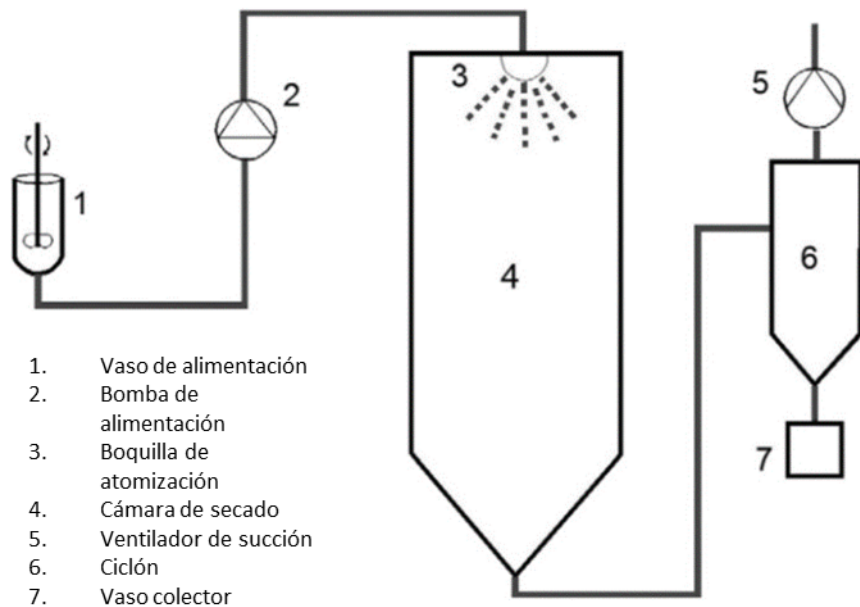


Figura 3. Tecnología de secado por aspersión.

Existe un gran número de investigaciones basadas en este método que reportan resultados satisfactorios con mínimas pérdidas de viabilidad, lo cual indica que hay dos factores claves y determinantes, para obtener buenos resultados: el tipo de materiales utilizados para encapsular y proteger a los microorganismos probióticos, que involucran sus propiedades físico-químicas y la optimización de los parámetros utilizados en el secado. En la Tabla 6, se muestran las ventajas y desventajas del método (Kailasapathy, 2002; Santivarangkna y col., 2007; De Vos y col., 2010).

Tabla 6. Ventajas y desventajas del método de secado por aspersión.

Ventajas	Desventajas
Fácil de llevar a gran escala	Altas temperaturas empleadas en el proceso para evaporar el solvente
Bajo costo de operación	
Es de operación continua	La baja viabilidad depende del tipo de material de pared utilizado, por ejemplo, se tiene mayor reducción de viabilidad con un almidón soluble, en comparación con goma arábica o alginato.
Fácil de adaptar a la mayoría de equipo industrial general.	

(Kailasapathy, 2002; Santivarangkna y col., 2007; De Vos y col., 2010).

2.3.4.2.2 Liofilización

La liofilización se ha utilizado para la fabricación de polvos probióticos durante décadas, pero la combinación de la liofilización y la encapsulación es un concepto relativamente nuevo. El proceso se basa en la sublimación, que ocurre en tres fases; congelación, secado primario y secado secundario. Típicamente, las células se congelan primero y luego se seca por sublimación en alto vacío (Santivarangkna y col., 2007). Como las condiciones de procesamiento asociados con la liofilización son más suaves que el secado por aspersión, se consigue mayor supervivencia de los probióticos. En esta técnica, el disolvente se congela y se retira a través de la sublimación (Solanki y col., 2013). Sin embargo, la congelación causa daño a la membrana celular, debido a la formación de

crisales y también imparte condición de estrés por la alta osmolaridad. Una variedad de protectores se han añadido a los medios de secado, antes de la liofilización, para proteger la viabilidad de los probióticos durante la deshidratación, tales como polvo de leche desnatada, proteína de suero, glucosa, maltodextrina, entre otros. Los crioprotectores también se pueden añadir a los medios, antes de la fermentación, para ayudar en la adaptación de los probióticos al medio ambiente (Basholli-Saliu y col., 2014).

2.3.4.2.3 *Secado por lecho fluidizado.*

En este proceso, la suspensión de células se pulveriza y se seca en vehículos inertes, utilizando un sistema de lecho fluidizado base Wurster. La ventaja de este proceso, es el control total de la temperatura. Las desventajas son que esta tecnología es difícil de dominar y es de duración relativamente más larga. Antes del secado, se necesita que el cultivo probiótico se encapsule en un material de soporte tal como leche desnatada, alginato de calcio o grasas (Buch y col., 2009).

2.4 **Pulque.**

El pulque es una bebida alcohólica tradicional, no destilada, producida por la fermentación de la savia, conocida como aguamiel, que es extraída de varias especies de maguey (*Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*). Esta bebida se produce actualmente y es consumida, principalmente por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente, en las áreas de la meseta central. El pulque, se caracteriza por ser una bebida alcohólica, blanca, con olor fuerte y viscosa (Peña Alvarez y col., 2004). Para su producción, el aguamiel recién recogida se transporta a grandes barriles abiertos, donde tiene lugar la fermentación. El proceso se acelera por la adición de una porción de pulque previamente producido y el tiempo de fermentación varía de unas horas a toda la noche, dependiendo de si el aguamiel se recoge al amanecer o al atardecer. El desarrollo de la viscosidad (debido a la síntesis de exopolisacáridos) y el contenido de alcohol, son los principales parámetros utilizados para determinar el grado de fermentación. El proceso es estático y realizado en condiciones no asépticas; Por lo tanto, las poblaciones de microorganismos que intervienen en la fermentación, son los que se producen de forma natural, durante la acumulación del aguamiel en el maguey y los

incorporados durante la recolección, el transporte y la manipulación (Escalante y col., 2004).

Varios estudios se han realizado para caracterizar la diversidad microbiana de muestras de aguamiel y de pulque, utilizando métodos de identificación de cultivo tradicional. Se han aislado importantes microorganismos industriales a partir de varias muestras de pulque como, *Saccharomyces cerevisiae*, productora de etanol y especies de *Kluyveromyces* productores de inulinasa.

La regulación mexicana NMX-V-037 (Banco de Normas Mexicanas 2010) reconoce dos tipos de pulque: Tipo I, incluye pulque de semilla o arranque y tipo II, se refiere a los pulques comerciales. El pulque semilla, se prepara para aumentar la microbiota natural, que determina la fermentación correcta, en la elaboración de la bebida, en un tanque dedicado exclusivamente a este fin. En el Tipo I, el aguamiel se inocular con pulque semilla y se utiliza para establecer el equilibrio bioquímico, óptimo entre los sustratos fermentables y los microorganismos implicados en la fermentación (Lappe-Oliveras y col., 2008).

A través de estudios, se ha demostrado, que el pulque contiene sustancias nutritivas útiles al ser humano como hierro, altos niveles de triptófano, azúcares, proteínas y vitaminas, principalmente hidrosolubles, en la Tabla 7, se muestra la composición reportada por algunos autores.

El pulque puede actuar como probiótico, de manera semejante a ciertos productos industrializados, que contienen lactobacilos o levaduras activas, que permiten interactuar con la microbiota del intestino. Diversas bacterias ácido lácteas, homofermentativas, se han encontrado en el pulque como: *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus kimchi*, *Lactobacillus acidophilus*, siendo esta última reportada con capacidad probiótica y utilizada para la elaboración de productos comerciales. En la actualidad no existen un reporte acerca de la identificación completa de los microorganismos del pulque, por lo que especies que no han sido identificadas, pueden conferirle al pulque el carácter de bebida con capacidad probiótica (Escalante y col., 2004).

Varias evidencias arqueológicas, sugieren que el pulque se ha utilizado desde tiempos prehispánicos como enema. Recientemente, se ha demostrado que esta práctica

puede haber tenido efectos beneficiosos sobre la salud de los seres humanos, debido al enriquecimiento del tracto digestivo con bacterias probióticas potenciales (Lemus, 2006). Además, en informes experimentales recientes, se ha demostrado la actividad prebiótica de la inulina que contiene el aguamiel, ya que aumenta el crecimiento de las BAL (Mancilla-Margalli y López, 2006; Ramírez-Higuera, 2012).

Tabla 7. Composición química del pulque.

	Brena Cervantes y col. (2010)	Escalante (2004)	Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez (2007)	Méndez y col. (2012)
Calcio	10			
Fosforo	10			
Hierro	0.70	15 %		
Vit. B1 (tiamina)	0.02 (mg)	7 %		
Vit. B2 (riboflavina)	0.02 (mg)	6 %		
Niacina	0.30 (mg)	10 %		
Piridoxina	14 – 33 (mg %)			
Ac. Ascórbico	6.2 (mg)	45 %		
Proteínas	0.44 (grs)		1 g/L	0.31 g/100 ml
Carbohidratos totales			4.76 g/L	3.5 gr/100 ml

2.5 *Lactobacillus pentosus*.

El género *Lactobacillus*, es uno de los géneros más importantes de bacterias de ácido lácticas (BAL) e incluye más de 174 especies de bacterias (Dsmz, 2008). Los *Lactobacillus* son catalasa negativos, Gram positivos y por lo general, en forma alargada. Se encuentran en una gran variedad de hábitats, incluyendo vegetales y el tracto

gastrointestinal de los animales (Tannock, 2004) y se emplean en la fabricación de alimentos fermentados, tales como productos de soya, productos de pescado, productos vegetales, pan, bebidas alcohólicas, productos lácteos y fabricación de queso (Rhee y col., 2011).

Los lactobacilos se han asociado en gran medida con la fermentación de alimentos y más recientemente, se han utilizado como probióticos, ya que pueden promover la salud en los seres humanos y los animales (Lebeer y col., 2008).

Los *Lactobacillus pentosus* tienen forma alargada (1-1.2 μm por 2-5 μm), se pueden encontrar individualmente, en parejas o en cadenas cortas, son Gram positivo, inmóviles, crecen a 10 y 40 °C, pero no a 45 °C; anaerobios facultativos, heterofermentativos, producen ácido láctico, Voges-Proskauer positivo (Zanoni y col., 1987).

Se ha demostrado que ciertas cepas de *Lactobacillus pentosus* ejercen efectos probióticos, mejorando la inmunidad de la mucosa intestinal y la resistencia a las infecciones bacterianas (Izumo y col., 2011; Kotani y col., 2010). La secuencia del genoma IG1 de *Lactobacillus pentosus*, es una cepa bilis-resistente y presenta una bacteriocina con actividad frente a una amplia gama de bacterias patógenas, por lo que es importante explorar sus propiedades biotecnológicas y probióticas (Maldonado y col., 2011). En un estudio reciente, se evaluó que *Lactobacillus pentosus* aislado de la miel del estómago de abeja *A. dorsata*, tiene carácter antimicrobiano y podría considerarse como conservante natural, para su posible uso en la industria alimentaria (Tajabadi y col., 2013).

En la presente investigación, se trabajó con una cepa de *Lactobacillus pentosus*, aislada de queso tenate, cuyo género fue confirmado mediante análisis bioquímico y molecular; la cual mostró un efecto antagónico significativo contra *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. aureus* en queso fresco, almacenado en refrigeración. Esta cepa también fue capaz de adaptarse y resistir las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, aunque se observó una disminución del 80% de bacterias viables. Por lo que se considera que tiene gran potencial para considerarse probiótico, además de que podría ser utilizada en los alimentos como conservador o antimicrobiano natural.

3 JUSTIFICACION

El cambio continuo en el estilo de vida de hoy en día, sumado a los efectos secundarios de las terapias con antibióticos, el incremento de enfermedades gastrointestinales por factores como una mala alimentación y estrés, ha generado interés a profundizar en el estudio de medios y procesos que permitan mejorar la calidad de vida del ser humano. Por ello ha aumentado considerablemente la demanda de nuevos alimentos funcionales, destacando dentro de estos, los probióticos, los cuales están definidos como microorganismos vivos, que al ser administrados en cantidades adecuadas, proporcionan un efecto benéfico a la salud del huésped.

El consumo de probióticos genera beneficios como son: mantenimiento de la flora intestinal normal, ayuda al control en la intolerancia a la lactosa, reducen el colesterol, restablecen la microbiota intestinal, cuando ha sido alterada por el consumo excesivo de antibióticos y previenen la colonización de bacterias patógenas.

Para que se puedan ejercer dichos beneficios, cuando se consume un alimento con bacterias probióticas, éstos deben ser estables y activos dentro del alimento y sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal; sin embargo, algunos factores como el pH y la temperatura de almacenamiento del alimento, alteran la viabilidad de los probióticos. Para ello, se ha recurrido a la microencapsulación, con la finalidad de ofrecer una barrera de protección contra los agentes externos, siendo la técnica de secado por aspersión, la más utilizada para la encapsulación de bacterias probióticas.

Por otro lado, tenemos al pulque, una bebida tradicional mexicana que se obtiene de la fermentación de la savia del maguey, el cual esta compuesto por algunos minerales, vitaminas, principalmente del complejo B y proteína.

JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo se propone microencapsular la bacteria *Lactobacillus pentosus*, que ha demostrado tener un gran potencial probiótico, usando la técnica de secado por aspersión, utilizando pulque como solvente, con lo cual se pretende obtener un producto en polvo, el cual pueda ser consumido por el ser humano y que además de contener a la bacteria encapsulada, presente los beneficios nutrimentales que le pueda conferir el pulque, sin la presencia del alcohol.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Optimizar el proceso de encapsulación de *Lactobacillus pentosus* mediante secado por aspersión usando una mezcla de almidón-pulque, así como evaluar la sobrevivencia y estabilidad de la bacteria encapsulada.

4.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar fisicoquímicamente el pulque, para identificar su contenido nutrimental.
- Optimizar por metodología de superficie de respuesta el proceso de encapsulación, con una mezcla de almidón – pulque, de *Lactobacillus pentosus*, utilizando secado por aspersión.
- Evaluar la actividad de agua, el contenido de humedad, el contenido de proteína y la morfología de las microcápsulas.
- Evaluar la sobrevivencia de *Lactobacillus pentosus* encapsulado en función del pH y la presencia de sales biliares.
- Evaluar la sobrevivencia de *Lactobacillus pentosus* encapsulado, a temperatura ambiente y 4 °C, durante 3 meses.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales.

5.1.1 *Equipo de laboratorio.*

- Autoclave Felisa Mod. FE-399
- Autoclave Yamato Scientific Sterilizer SM 200
- AquaLab Lite Decagon Devices.
- Balanza Analítica Adam Equipment Mod. AQT 1500
- Cuenta colonias DARKFIELD QUEBEC Mod. 3325 American Optical
- Dispensador Dispensette III Var. 1-10 mL Brand
- Homogenizador Ultra Turrax IKA
- Incubadora LAB-LINE AMBI-HI-LOW
- Incubadora bacteriológica blue M Electric Company Mod 100 A
- Incubadora precisión 3BGm Serie 30307629
- Micropipeta BRAND 100-1000 mL
- Microscopio Motic Mod. SFC-28 Instrumentos Ópticos de Precisión
- Parrilla de calentamiento. BARNSTEAD Thermolyne. Cimarec
- Potenciómetro Thermo Electron Corporation. Orión Star Series
- Refrigerador Lab-LINE Environners REB800/804
- Secador BUCHI Mini Spray Dryer B – 191
- Vortex 2 Genie Mod. G-560 Scientific Industries

5.1.2 *Material biológico.*

La cepa de *Lactobacillus pentosus* resistente a rifampicina fue proporcionada por el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Área Académica de Química, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

5.1.3 *Materiales*

- El almidón N-lok fue proporcionado por la empresa Ingredion, México.
- Se utilizó un lote de 15 litros de pulque, elaborado en el rancho Nexpa, de Epazoyucan, Hidalgo.

5.2 Metodología.

5.2.1 Cuantificación de proteína en pulque.

Para la determinación de proteína, se utilizó el método Kjeldahl siguiendo la técnica 930.29 de la AOAC (1990). La muestra (0.5 mL) se sometió a una digestión con 0.1 g de sulfato de cobre y 20 mL de ácido sulfúrico en un digestor Kjeldhal 8U marca ESEVE, modelo DIK-08, con lo cual se convirtió el nitrógeno orgánico en nitrógeno amoniacal.

Después de 4 horas de digestión, se procedió con la destilación que se llevó a cabo en un destilador marca Gerhardt utilizando NaOH al 30% para que el amoniaco se liberara. Se destiló la muestra utilizando 50 mL de solución de ácido bórico para recibir el destilado. El programa de destilación utilizado fue el siguiente: tiempo de entrada de sosa 8 s (10 mL/s), 5 s de mezclado y 360 s de destilación a 60 °C. Finalmente se tituló con H₂SO₄ 0.2 M que en forma indirecta es proporcional al contenido de nitrógeno. El factor de conversión utilizado fue 6.25 para obtener el contenido de proteína.

5.2.2 Determinación de pH en pulque.

El pH se midió directamente con un potenciómetro, de acuerdo a lo reportado en la norma mexicana NMX-V-041-1972.

5.2.3 Determinación de coliformes totales en pulque.

Se realizó siguiendo la metodología descrita por Camacho y col. (2009). Para ello, se colocaron 10 mL de pulque con 90 mL de agua de peptona y se homogenizó la muestra. Se realizaron 4 diluciones decimales consecutivas, transfiriendo 1 mL de muestra a tubos con 9 mL de agua de peptona. Se depositó 1 mL de cada dilución en cajas Petri estériles, por triplicado y se adicionaron 20 mL, aproximadamente de agar bilis rojo violeta, fundido y enfriado a 45 °C, en cada caja. Se homogenizó la muestra con el agar, haciendo movimientos rotatorios y se incubaron las cajas en posición invertida durante 24 h a 37 °C.

5.2.4 Determinación de grado alcohólico en pulque.

Se realizó la determinación por destilación de acuerdo a la NOM-142-SSA1-1995. Para ello se midieron en un matraz volumétrico 250 mL de pulque y 10 mL de agua destilada; se conectó el matraz de destilación que contenía perlas de vidrio, al refrigerante mediante el adaptador. Se colocó 25 mL de agua destilada en el matraz de recepción, el

cual se mantuvo sumergido en un baño de agua-hielo durante el curso de la destilación. Cuando la cantidad de destilado contenida en el matraz, se acercó a la marca (unos 0,5 cm abajo de la marca de aforo), se suspendió la destilación y retiró el matraz de recepción.

Se llevó a la marca con agua destilada, homogenizó y transfirió el destilado a una probeta. Después de vaciar el destilado hasta unos 10 cm abajo del nivel total. Se introdujo el alcoholímetro cuidadosamente y se mantuvo separado de las paredes de la probeta.

5.2.5 Preparación de la cepa para su microencapsulación.

La activación de la cepa de *Lactobacillus pentosus*, se hizo mediante doble transferencia en tubos, conteniendo 9 mL de caldo Lactobacilli (MRS), para ello se inocularon con 100, 200 y 300 μ L del concentrado celular de la cepa y se incubaron a 37 °C por 24 y 48 h. Transcurridos estos tiempos, se realizó el conteo de bacterias por triplicado, por el método de vaciado en placa. Para ello, se hicieron 9 diluciones decimales, transfiriendo consecutivamente 1 mL de la muestra a tubos con 9 mL de agua de peptona. Se depositó 1 mL de cada dilución en cajas Petri estériles y se adicionaron 25 mL, aproximadamente, de agar MRS atemperado a 45 °C, en cada caja. Se homogenizó la muestra con el agar, haciendo movimientos rotatorios y se incubaron las cajas en posición invertida durante 48 h a 37 °C.

5.2.6 Microencapsulación de *Lactobacillus pentosus*.

5.2.6.1 Preparación del material de pared y mezcla con la bacteria.

Las células de la bacteria se obtuvieron después de la activación por doble transferencia en caldo MRS a 37 °C por 24 h. El concentrado celular (aproximadamente 10^9 UFC/ mL), fue obtenido por centrifugación a 3500 rpm por 20 min; el precipitado celular se lavó con 20 mL de agua de peptona y se centrifugó nuevamente. A la par, se preparó la mezcla de almidón – pulque (previamente ajustado a pH 7 con NaOH al 10 %). Se homogenizó la mezcla almidón – pulque de acuerdo al diseño experimental planteado. La viabilidad de las bacterias fue determinada en la suspensión de almidón – pulque, obteniendo las UFC antes de secar, utilizando el método de vaciado en placa descrito en la sección 5.2.4.

5.2.6.2 *Secado por aspersión.*

La microencapsulación de la bacteria se realizó en un secador por aspersión a escala laboratorio, de acuerdo al diseño experimental (Tabla 8); en un equipo BUCHI Mini Spray Dryer B – 191, equipado con una boquilla con un diámetro de 0.5 mm. La solución de alimentación se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente, y se introdujo en la cámara de aspersión a través de una bomba peristáltica, con una tasa de flujo de alimentación de 4 mL/min. El flujo de aire se mantuvo a 400 mL/h. Después del secado por aspersión las microcápsulas secas se colectaron en frascos de vidrio y se almacenaron para los posteriores análisis.

5.2.7 *Sobrevivencia después del secado por aspersión.*

El recuento bacteriano después del secado por aspersión se realizó por triplicado por el método de vaciado en placa. Se tomó 1 g de microcápsulas y se colocaron en 9.0 mL de diluyente de citrato de sodio al 2% (dilución 1), con la ayuda de un vortex, estas se solubilizaron. Se realizaron 8 diluciones más de la muestra en tubos con 9 mL de agua de peptona. Se tomó una alícuota de 1 mL de las diluciones 10^{-5} a 10^{-9} y se colocaron en cajas Petri, para luego agregarles agar MRS y homogenizarlas. A continuación las cajas fueron incubadas en posición invertida a 37 °C durante 48 h y se realizó el recuento de colonias, este procedimiento se realizó el mismo día en que fueron obtenidas las microcápsulas.

El rendimiento de microencapsulación es decir, el porcentaje de viabilidad de las bacterias encapsuladas, fue calculado empleando la siguiente fórmula (Behboudi-Jobbehdar y col., 2013):

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde N representa el número de bacterias viables en las cápsulas después del secado por aspersión y N_0 es el logaritmo de células viables antes del secado.

5.2.8 *Tinción de Gram.*

Se colocó una gota de agua en un portaobjetos, se tomó con la ayuda de un asa bacteriológica, una fracción de una colonia y se extendió en el portaobjetos, se mezcló uniformemente con el agua. La muestra se fijó a la flama, se adicionaron unas gotas de

cristal violeta, hasta cubrir la muestra, se dejó 1 min, el exceso del colorante se eliminó con agua corriente, después se le adiciono lugol y se dejó reposar por 1 min, se lavó con agua y después con una solución de alcohol por 20 s para decolorar, se enjuago con agua para eliminar el alcohol – cetona y se agregó safranina por 1 min; por último, se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire. Las tinciones se observaron al microscopio a 100 X para buscar características típicas de las bacterias ácido lácticas.

5.2.9 Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión.

5.2.9.1 Contenido de humedad.

El contenido de humedad de las microcápsulas fue determinado acorde al método 44-15.02 (AACC, 2000), donde 2 g de muestra fueron colocados en charolas de aluminio y se secaron en una estufa a 105 °C, durante 24 h. El contenido de humedad fue calculado por diferencia de peso antes y después de secar la muestra, de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

5.2.9.2 Actividad de agua.

Para determinar la actividad de agua de las microcápsulas, se empleó un equipo Aqua Lab. Las muestras fueron colocadas en contenedores propios del equipo y la medición se realizó a temperatura ambiente (± 25 °C).

5.2.9.3 Higroscopicidad.

Se siguió la metodología de Sulieman y col. (2014), con algunas modificaciones. Para ello se pesó 1 g de muestra en charolas de aluminio y se colocaron en frascos herméticos, conteniendo una solución saturada de NaCl (75.3 % HR), después de 7 días, las muestras fueron pesadas y la higroscopicidad fue expresada como g de humedad absorbida en 100 g de muestra. El cálculo se realizó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Higroscopicidad (g /100 g)} = \frac{(\text{peso final} - \text{peso inicial}) \times 100}{\text{peso inicial} \times (100 - \text{humedad}/100)} \quad (\text{Ec. 3})$$

5.2.9.4 Caracterización morfológica de las microcápsulas por SEM.

Se determinó usando un equipo de microscopía electrónica de barrido marca Jeol, modelo JSM-6300, se usó un detector de electrones secundarios y bombardeo de electrones

a 15 kV, se colocaron las muestras en alto vacío (9.75×10^{-5} Torr) (Rajam y Anandharamakrishnan, 2015). Las muestras se montaron sobre un porta muestra de aluminio de 12 mm de diámetro, tipo PIN, previamente preparado con cinta adhesiva de carbón de doble cara. Con el fin de hacer que la superficie reflejara el haz de electrones, las muestras fueron recubiertas con partículas de oro.

5.2.10 Almacenamiento de *Lactobacillus pentosus* a 25 y 4 °C.

Para ello se colocaron 3 gramos de células microencapsuladas en 12 cajas Petri. Se taparon y colocaron en bolsas re-sellables de plástico, fueron almacenadas a 4 °C y 25 °C. Posteriormente se determinó la sobrevivencia de las bacterias, utilizando la metodología de vaciado en placa antes mencionada realizando un muestreo semanal durante 3 meses.

5.2.11 Resistencia de *Lactobacillus pentosus* a pH.

La cepa se cultivó en caldo MRS a pH 6.5 y se incubó a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL, con una concentración aproximada de 10^9 UFC / mL y se inoculó en un tubo con caldo MRS y pH ajustado a 2 y 3 con HCl 0.1 N (Conway y col., 1987). La muestra se incubó a 37 °C por 3 h (1, 2 y 3 h). Se conformó un control, al cultivar la cepa en caldo MRS a pH 6.5 bajo las mismas condiciones.

Se efectuó el conteo de bacterias sobrevivientes por la técnica de vaciado en placa a los tiempos de 0, 1, 2 y 3 h. Se evaluó bajo este mismo procedimiento la bacteria encapsulada. El porcentaje de resistencia a pH ácido fue calculado por la siguiente ecuación (Kociubinski y col., 1999):

$$\% R_{pH} = [(UFC/mL)_{MRS_{pH\ 2-3}} \times 100] / (UFC/mL)_{MRS_{pH\ 6.5}}$$

5.2.12 Resistencia de *Lactobacillus pentosus* a sales biliares.

Para la evaluación de la resistencia de la cepa a sales biliares, primero se reactivaron las células en caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 h. 1 mL del cultivo fue inoculado en tubos con 9 mL de caldo MRS con 0.0, 0.15, 0.3, 0.5, y 1% de bilis deshidratada de buey. Al caldo MRS, se le adicionaron previamente 1,38 mL de ácido acético. La incubación se realizó durante 3, 12 y 24 h a 37 °C, en condiciones estáticas (Gilliland y Walker, 1990; United State Patent No. 5,032,399, 1991). De igual forma, se

determinó el porcentaje de sobrevivencia con respecto al control: % R sales biliares (Kociubinski y col., 1999):

$$[(\text{UFC/mL})_{\text{MRS} + \text{sales}} \times 100] / (\text{UFC/mL})_{\text{MRS}}$$

5.2.13 *Diseño experimental y análisis estadístico.*

5.2.12.1. Estudios preliminares

Al inicio de los experimentos se planeaba trabajar con tres factores: velocidad de homogenización (7000-14000 rpm durante 3 min), porcentaje de sólidos (25 – 30 %) y temperatura de entrada en el secador (100-140 °C), sin embargo, al comenzar a trabajar bajo las condiciones de este diseño, no se obtuvo sobrevivencia de las bacterias, por lo que se evaluó el efecto de la homogenización de forma independiente, ya que la temperatura había sido evaluada en ensayos preliminares. Por lo cual se plantearon dos tratamientos: uno sin homogenizar y otro con homogenización, manejando las condiciones de 3000 rpm durante 20 s en la mezcla almidón-pulque, una vez agregado el concentrado celular en la mezcla a 3000 rpm por 5 s. Los resultados obtenidos sirvieron para plantear el diseño de experimentos para llevar a cabo el proceso de optimización de la encapsulación.

5.2.12.2. Diseño central compuesto

Se utilizó un diseño experimental central compuesto, rotatable, con 6 puntos centrales, se consideraron dos variables independientes: temperatura de entrada de secado (100 °C - 140 °C) y porcentaje de sólidos en la mezcla (25 % - 30 %), el diseño consto de 14 tratamientos, con un $\alpha = 1.41421$ (Tabla 8). Los datos fueron analizados empleando la metodología de superficie de respuesta, usando el software Design Expert versión 7.0.0.

Los datos experimentales fueron ajustados con un modelo cuadrático de segundo orden:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 \quad (\text{Ec } 6)$$

Donde Y_i , son las respuestas, X_1 es la temperatura de entrada de secado (°C) y X_2 es la cantidad de sólidos totales (%) y b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} y b_{12} son los coeficientes de regresión.

Tabla 8. Diseño experimental central compuesto rotable con dos variables independientes.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Sólidos (%)
1	120	27.5
2	120	27.5
3	120	27.5
4	120	27.5
5	120	27.5
6	100	25
7	92	27.5
8	140	25
9	120	31
10	100	30
11	148	28
12	120	27.5
13	140	30
14	120	24.0

5.2.14 Optimización.

La optimización se realizó mediante metodología de superposición de superficies, empleando el software Design Expert versión 7.0.0. La respuesta seleccionada para realizar la optimización fue el porcentaje de inmovilización de bacteria.

6 RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Caracterización del pulque.

En la Tabla 9, se muestran los resultados de pH, humedad, contenido de etanol y proteína; el pH fue de 4.1, valor ácido, característico de un pulque tradicional, debido a la fermentación que llevan a cabo las bacterias ácido lácticas, una humedad de 91.8 % y un contenido de alcohol de 5.8 %; lo cual concuerda con lo reportado por León y col. (2012), que reportaron un contenido de humedad de 98% y un contenido de etanol de 6%. Así mismo, Trejo-Estrada (2012), reportó un 97 % de humedad y Escalante y col. (2008), un contenido de etanol entre 5 y 10 %. En cuanto a la determinación de coliformes totales, éstas no fueron detectadas en la muestra. Para la concentración de proteína se tuvo un 2.71 %, lo cual no corresponde con lo reportado previamente por Cervantes y Pedroza (2007), quienes reportaron una concentración de 1 g/L de proteína en pulque, fermentado por 48 h.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del pulque.

pH	4.1 ± 0.2
Humedad	91.8 ± 0.01
Proteína (%)	2.71 ± 0.05
% etanol (v/v)	5.8 ± 0.4
Coliformes totales	No detectado

Medias de tres replicas ± desviación estándar.

6.2 Activación de la cepa de *Lactobacillus pentosus*.

La activación de la bacteria se realizó con la finalidad de obtener una máxima concentración de células viables (10^9 UFC/mL) en su fase estacionaria, para lo cual se incubaron las bacterias durante 24 y 48 h y se probaron las concentraciones de 100, 200 y 300 μ L, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10, donde se observó que independientemente de la concentración inicial del inóculo, se obtuvo una concentración de 9.0 – 9.5 log UFC/mL a las 24 h; mientras que a las 48 h, se observó una disminución de 1 log en la concentración, ya que solo se obtuvieron 8.0 – 8.5 log UFC/mL.

Tabla 10. Evaluación de la sobrevivencia de la bacteria *Lactobacillus pentosus* a 24 y 48 h.

Tratamiento	Conteo a las 24 h (Log UFC/mL)	Conteo a las 48 h (Log UFC/mL)
Con 100 µL de bacteria	9.3 ± 0.2 ^a	8.2 ± 0.2 ^a
Con 200 µL de bacteria	9.2 ± 0.4 ^a	8.4 ± 0.1 ^a
Con 300 µL de bacteria	9.0 ± 0.5 ^a	8.1 ± 0.4 ^a

Medias de tres replicas ± desviación estándar.

6.3 Microencapsulación de *Lactobacillus pentosus*.

6.3.1 Evaluación de la homogenización.

Los resultados se muestran en la Tabla 11, donde se observó que el mejor porcentaje de viabilidad de la bacteria se obtuvo en el tratamiento donde se aplicó la homogenización con un 97.9 %, no encontrándose diferencia en el tratamiento sin homogenización, donde se obtuvo un 93.6%, esto puede ser debido a que al homogenizar la mezcla con el concentrado celular al ser un tiempo muy corto no se ve afectada su viabilidad pero si es el tiempo suficiente para tener una mayor interacción entre los componentes.

Con los resultados obtenidos anteriormente se procedió a obtener un nuevo diseño central compuesto rotatable con 6 puntos centrales (Tabla 8), considerando solo las variables de porcentaje de sólidos (25 – 30 %) y temperatura de entrada en el secador (100-140 °C), obteniéndose un total de 14 tratamientos para realizar posteriormente la optimización.

Tabla 11. Viabilidad de *Lactobacillus pentosus*, evaluando la homogenización.

Tratamiento	Antes del secado (Log UFC/ml)	Después del secado (Log UFC/ml)	Viabilidad (%)
Con homogenización	9.5 ± 0.08	9.3 ± 0.07	97.9
Sin homogenización	9.1 ± 0.10	8.7 ± 0.08	91.6

Medias de tres replicas ± desviación estándar.

6.3.2 Sobrevivencia después del secado por aspersión.

La sobrevivencia de las bacterias, después del proceso de secado, fue expresada como porcentaje de viabilidad. En la Tabla 12, se presentan los resultados obtenidos de la viabilidad de las bacterias, en donde se observó que el mayor porcentaje se tuvo cuando se

emplearon las temperaturas de secado de 92 y 100 °C, dando un porcentaje de viabilidad de 98 ± 0.4 %, el resultado más bajo se obtuvo cuando se empleó la temperatura de secado de 148 °C con un 79.24 % de viabilidad.

Estos resultados fueron analizados mediante la metodología de superficie de respuesta y el análisis de varianza (Tabla 13), arrojó que el modelo de regresión cuadrático utilizado fue significativo, con un valor de R^2 ajustada de 0.8517, un coeficiente de variación de 2.69, p de F del modelo < 0.0001 , y la falta de ajuste no fue significativa.

Tabla 12. Viabilidad de *Lactobacillus pentosus* obtenida para el diseño experimental.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Sólidos (%)	Viabilidad (%)
1	120	27.5	94.02
2	120	27.5	96.14
3	120	27.5	91.24
4	120	27.5	96.61
5	120	27.5	95.95
6	100	25	98.41
7	92	27.5	98.05
8	140	25	85.50
9	120	31	97.14
10	100	30	98.39
11	148	28	79.24
12	120	27.5	91.47
13	140	30	84.68
14	120	24.0	97.76

Los coeficientes estimados, del modelo cuadrático, ajustado para la viabilidad (Tabla 14), muestran que la variable de temperatura, en sus términos lineal y cuadrático, presentó efectos estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

La influencia de la temperatura y del contenido de sólidos, sobre la viabilidad de las bacterias, se ilustra en la Figura 4, donde se observó que a mayor temperatura de secado, la viabilidad de las bacterias disminuye, en cuanto al porcentaje de sólidos no se observó ningún efecto, obteniendo un 98.9 % de viabilidad de las bacterias a una temperatura de 100 °C (porcentaje más alto).

Se ha reportado que durante el secado por aspersión, la temperatura de salida, tiene un efecto más dominante en el secado de las partículas, que la temperatura del aire de entrada (Anandharamakrishnan y col., 2008). Tras la atomización de las gotitas dentro del secador, entran en contacto con el aire caliente y como resultado se tiene la evaporación del agua, y las partículas se enfrían rápidamente a la temperatura de bulbo húmedo, que es alrededor de 40 – 50 °C (Oldfield y col., 2005). Sin embargo, como las partículas se mueven cerca de la parte inferior de la cámara de secado, la temperatura de las partículas se aproxima a la temperatura del aire de salida (Anandharamakrishnan y col., 2008). La temperatura de salida más alta y un secado rápido, influyen en la supervivencia de las células después de secado, así como durante el almacenamiento (Rajam y col., 2012).

El equipo de secado por aspersión utilizado en esta investigación no permite un control de la temperatura de salida, por lo que solo se tuvo control sobre la temperatura de entrada pero, al tener control sobre ella, la temperatura de salida si se ve modificada.

Rajam y Anandharamakrishnan (2015), encapsularon *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) mediante secado por aspersión, con un fructooligosacárido, manejando una temperatura de entrada de 110 ± 2 °C y de 55 ± 3 °C en la salida del secador, obteniendo un 72.82% de viabilidad de la bacteria. Las condiciones de secado de temperatura empleadas por estos autores fueron parecidas a las usadas en este estudio, ya que cuando se manejó una temperatura de entrada en el secador de 100 °C, la temperatura de salida fue de 56 °C, sin embargo se obtuvo una mayor viabilidad de bacterias (98.9 %), lo cual puede estar relacionado con el tipo de materiales empleados para la encapsulación.

Tabla 13. Análisis de varianza para las respuestas de viabilidad, higroscopicidad, actividad de agua y humedad en las microcápsulas.

Respuesta	R^2 ajustada	C.V. (%)	Valor F	p de F (modelo)	Falta de ajuste
Viabilidad	0.8517	2.69	40.04	< 0.0001	0.7051
Higroscopicidad	-0.0575	4.60	0.65	0.6623	0.1128
Aw	0.1201	13.79	1.98	0.1091	0.0234
Humedad	0.7538	11.96	24.88	< 0.0001	0.0265

Tabla 14. Coeficientes estimados del modelo ajustado y nivel de significancia para las respuestas de porcentaje de viabilidad, higroscopicidad, actividad de agua y humedad.

Respuesta	Intercepto	Lineales		Interacción	Cuadráticos	
	b_0	b_1	b_2	b_{12}	b_{11}	b_{22}
Viabilidad	93.34	-6.64 (< 0.0001)	-0.18 (0.7259)	-0.26 (0.7343)	-2.70 (< 0.0001)	1.76 0.0041
Higroscopicidad	7.87	-0.045 (0.5877)	-0.075 (0.4542)	0.029 (0.8230)	0.12 (0.1505)	-7.773E-003 (0.9375)
Aw	0.25	-0.022 (0.0045)	-1.932E-003 (0.7791)	2.417E-003 (0.8040)	1.018E-003 (0.8967)	-5.343E-003 (0.4788)
Humedad	2.58	-0.69 (< 0.0001)	7.200E-003 (0.9165)	0.31 (0.0030)	0.24 (0.0022)	0.12 (0.1206)

Modelo en el cual b_1 = temperatura de entrada en el secador ($^{\circ}$ C), b_2 = sólidos totales (%) para la ecuación 6.

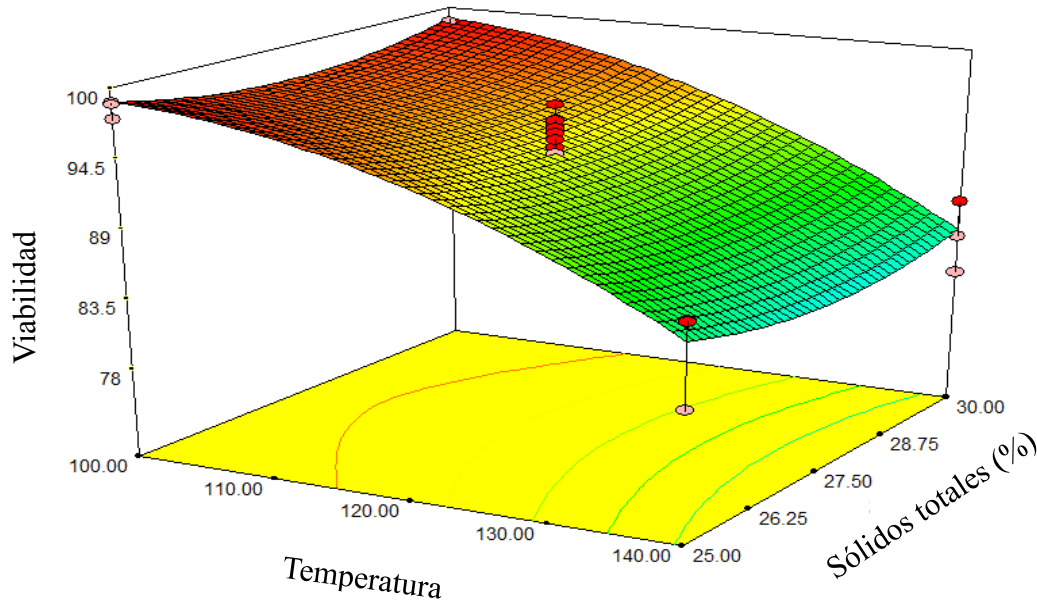


Figura 4. Efecto de la temperatura y del porcentaje de sólidos sobre la viabilidad de *Lactobacillus Pentosus*.

6.4 Caracterización de las microcápsulas después del secado por aspersión.

6.4.1 Contenido de humedad y actividad de agua.

En la Tabla 15, se presentan los resultados del contenido de humedad y de actividad de agua, para los diferentes tratamientos, en las microcápsulas obtenidas después del secado por aspersión, donde se puede observar que el contenido de humedad estuvo entre 2.03 – 3.73 %, mientras que los valores de actividad de agua fueron de 0.183 – 0.300. Una vez realizado el análisis de varianza, siguiendo la metodología de superficies de respuesta para la humedad, se observó que el modelo de regresión cuadrático fue significativo, con un valor de R^2 ajustada de 0.7538, un coeficiente de variación de 11.96, p de F del modelo < 0.0001, la falta de ajuste fue significativa (0.0265), lo que indica que solo existe un 2.65% de probabilidad de que la falta de ajuste podría haber ocurrido debido al error. Los coeficientes estimados del modelo cuadrático ajustado para el contenido de humedad muestran que la variable de temperatura, en sus términos lineal, cuadrático y la interacción presentaron efectos estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

Tabla 15. Contenido de humedad, higroscopicidad y actividad en las microcápsulas obtenidas después del secado por aspersión.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Sólidos (%)	Higroscopicidad (g 100g ⁻¹)	a _w	Humedad (%)
1	120	27.5	8.30	0.263	2.72
2	120	27.5	7.82	0.243	2.23
3	120	27.5	7.92	0.221	2.33
4	120	27.5	7.95	0.244	2.97
5	120	27.5	7.63	0.274	3.33
6	100	25	8.22	0.300	3.27
7	92	27.5	8.21	0.240	3.73
8	140	25	8.78	0.239	2.03
9	120	31	8.70	0.244	2.83
10	100	30	7.76	0.261	3.47
11	148	28	8.08	0.216	2.13
12	120	27.5	8.18	0.183	2.50
13	140	30	8.08	0.209	2.47
14	120	24.0	8.03	0.206	2.53

Para los valores de actividad de agua, el modelo propuesto no se ajustó, por lo que no fue significativo, obteniéndose una p de F de 0.1091, R² ajustada 0.1201, un coeficiente de variación de 13.79. y la falta de ajuste fue igualmente significativa (0.0234) Los coeficientes estimados del modelo cuadrático ajustado, demostraron que solo la variable de temperatura, en su término lineal, tuvo efecto estadísticamente significativo (p<0.01).

De acuerdo a los resultados experimentales, el menor contenido de humedad y de actividad de agua, en las microcápsulas, después del secado, se obtiene a una temperatura de entrada de 140 °C, siendo estas de 1.4% y 0.186, respectivamente. A 100 °C se tuvo un 4.4 % de humedad y una actividad de agua de 0.321 (Figuras 5 y 6).

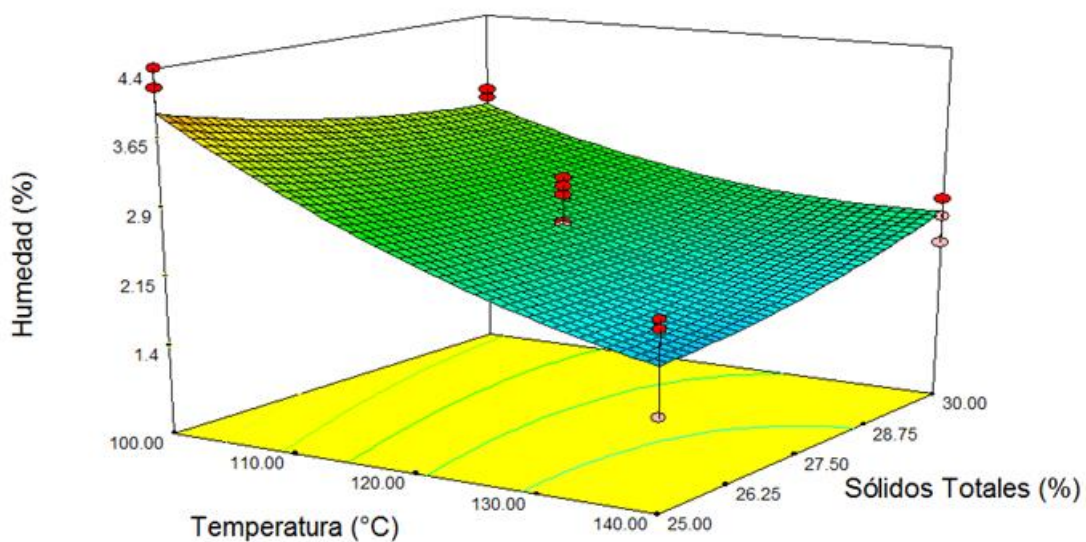


Figura 5. Efecto de la temperatura y del porcentaje de sólidos sobre el porcentaje de humedad.

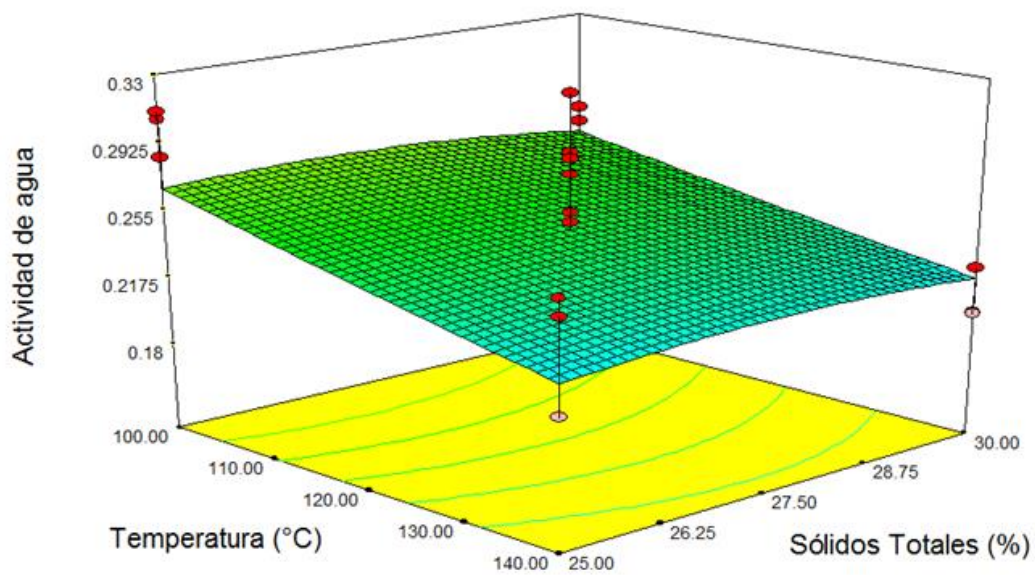


Figura 6. Efecto de la temperatura y del porcentaje de sólidos sobre la actividad de agua.

6.4.2 Higroscopicidad.

Los resultados de higroscopicidad obtenidos en las microcápsulas oscilaron entre 7.63 y 8.78 g 100 g⁻¹ (Tabla 15). El análisis de varianza mostró que el modelo de regresión cuadrático planteado no fue significativo, con un valor de R² ajustada -0.0575, un coeficiente de variación de 4.60, p de F del modelo 0.6623, y la falta de ajuste no fue significativa (Tabla 13). Los coeficientes estimados del modelo cuadrático ajustado (Tabla 14) muestran que ninguna de las dos variables presentó efectos estadísticamente significativos (p<0.01). La influencia de la temperatura y del contenido de sólidos sobre la higroscopicidad en las microcápsulas se ilustra en la Figura 7.

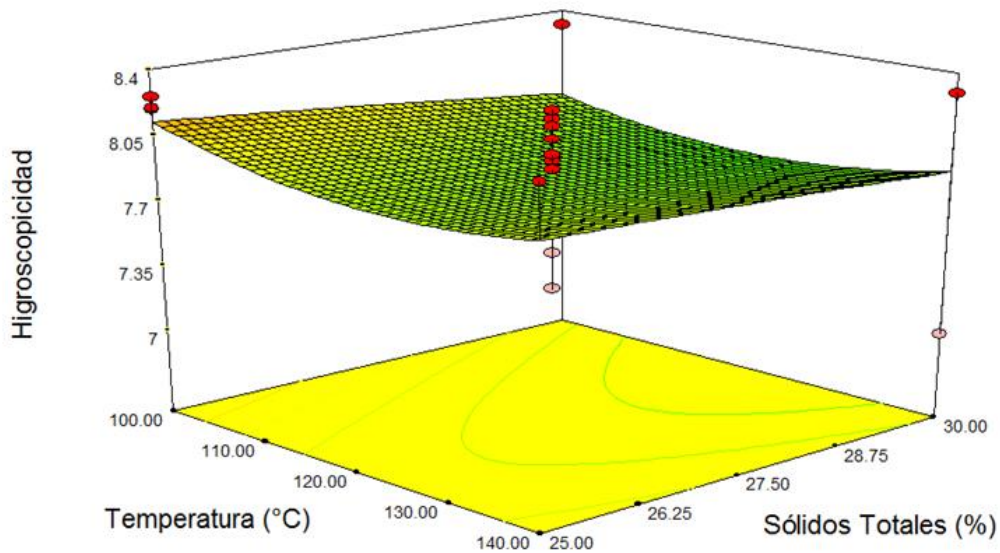


Figura 7. . Efecto de la temperatura y del porcentaje de sólidos sobre la higroscopicidad.

6.5 Optimización del proceso de secado.

La optimización del proceso de secado por aspersión, para microencapsular la bacteria *Lactobacillus pentosus*, se realizó mediante la metodología de sobreposición de superficie de respuestas. La respuesta seleccionada para realizar la optimización fue el porcentaje de viabilidad de la bacteria, ya que los resultados de humedad, actividad de agua e higroscopicidad, no fueron significativos y no se ajustaron al modelo propuesto. El

principal criterio establecido para determinar el área óptima para llevar a cabo la microencapsulación, fue encontrar el mayor porcentaje de viabilidad de bacterias encapsuladas. Las condiciones óptimas de secado (Figura 8) se establecieron como una temperatura de entrada en el secador de 100 °C y con 30 % de sólidos, para tener una viabilidad de 99.1 % de bacteria. En un trabajo realizado por Cortés y col. (2014), donde encapsularon la bacteria *Lactobacillus casei* ATCC 334, mediante secado por aspersión, utilizando el almidón N-lok, a una temperatura de secado de 100-110 °C, obtuvieron una inmovilización de 89.7 %, menor viabilidad a la que mostro *Lactobacillus pentosus* a condiciones similares. La Figura 9 muestra el área que corresponde a las mejores condiciones de secado.

Las microcápsulas obtenidas bajo estas condiciones de secado, presentaron una humedad de 3.3 %, actividad de agua de 0.259 e higroscopicidad de 7.9 g 100g⁻¹. De acuerdo a Tonon y col. (2009), una actividad por debajo de 0.3 en las microcápsulas es positiva, ya que se tiene una mayor estabilidad de éstas durante el almacenamiento. En cuanto al contenido de humedad residual, el tener valores menores a 4-5 %, es un requisito para la producción comercial de polvos, obtenidos mediante secado por aspersión, para tener buenas características de manejo, tales como la capacidad de alto flujo, baja pegajosidad y aglomeración, así como una máxima viabilidad de probióticos (Barbosa-Canovas y col., 2005).

El bajo contenido de humedad y actividad de agua encontrados en las microcápsulas podría favorecer la sobrevivencia de los microorganismos encapsulados, pero es necesario determinar las mejores condiciones en las que estos puedan mantener su viabilidad durante el almacenamiento con el tiempo.

6.6 Morfología macroscópica de colonias y Tinción de Gram.

En la Figura 10, se muestran las colonias desarrolladas en medio MRS (medio de cultivo para aislamiento y recuento de lactobacilos a partir de alimentos, productos lácteos y flora intestinal) de *Lactobacillus pentosus* encapsulado, donde se observó una morfología en sus colonias con una superficie ovalada, de un color blanco cremoso, con un tamaño mediano a grande.

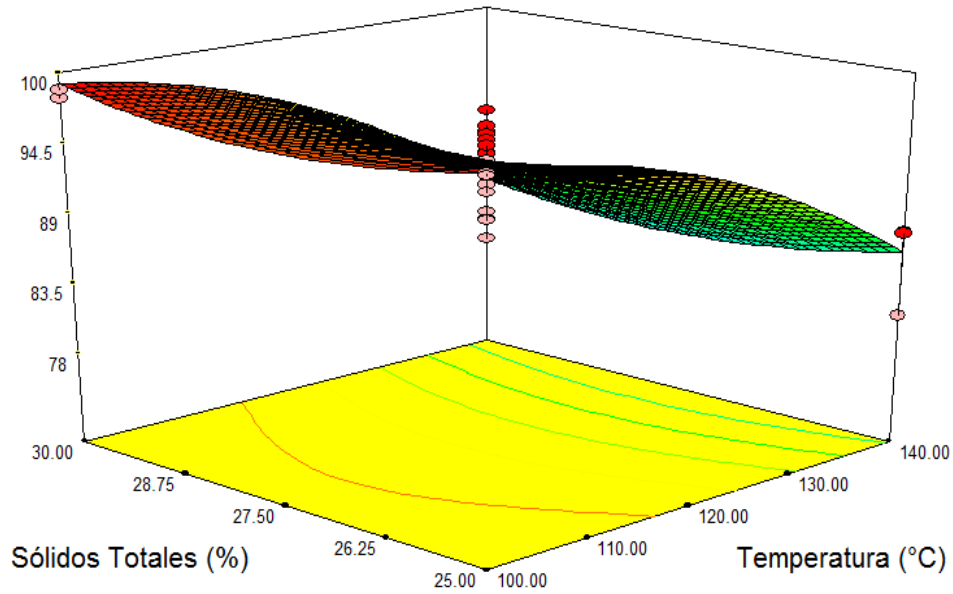


Figura 8. Condiciones óptimas de secado para obtener la mayor viabilidad de *Lactobacillus pentosus* microencapsulado.

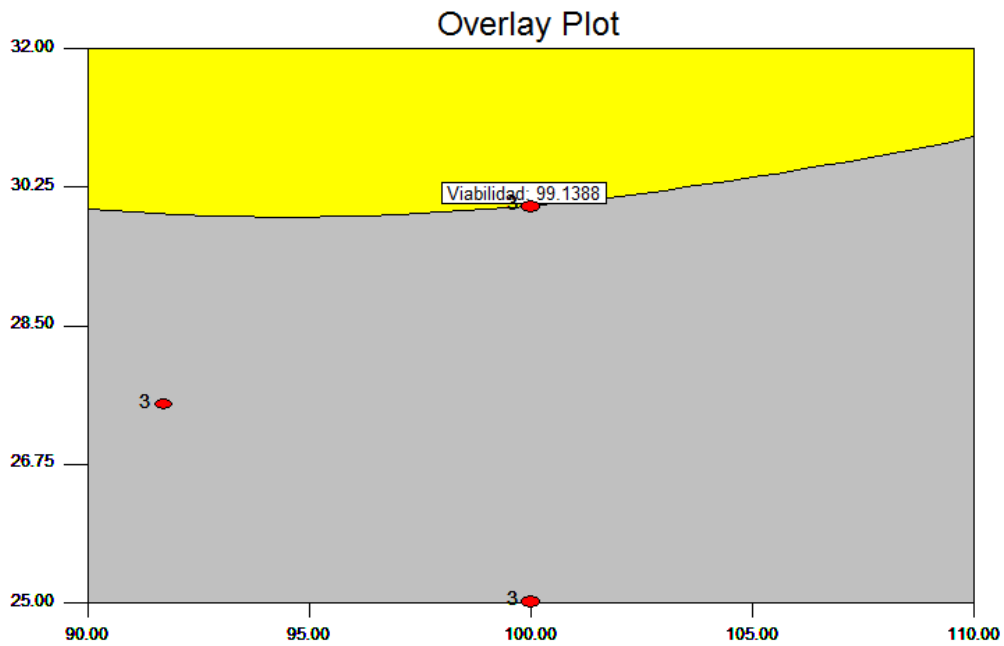


Figura 9. Región óptima del proceso de secado por aspersión para la microencapsulación de *Lactobacillus Pentosus*, donde la respuesta seleccionada fue la viabilidad (%).

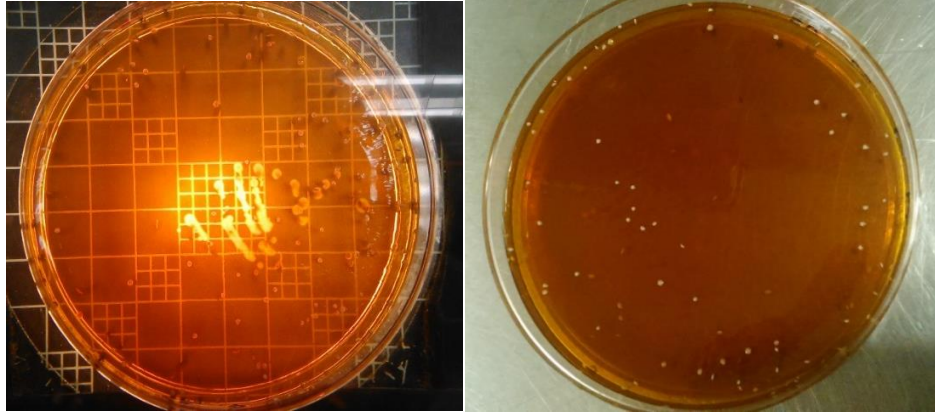


Figura 10. Morfología macroscópica de colonias de *Lactobacillus pentosus*.

En las colonias obtenidas, se realizó una tinción de Gram, con el objetivo de verificar que las células desarrolladas fueran Gram positivo. La tinción de Gram es una técnica de laboratorio que permite identificar distintos tipos de bacterias, según se colorea su superficie. Se utiliza para poder referirse a la morfología celular bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas, las que se visualizan de color morado, y Gram negativas, a las que se visualizan de color rosa o rojo.

La tinción de Gram de las células muestreadas (Figura 11) después del proceso de secado por aspersión, revelo una coloración morada – azul y una morfología de bacilos aislados o en cadenas cortas, lo cual coincide con las características reportadas para *Lactobacillus pentosus*.

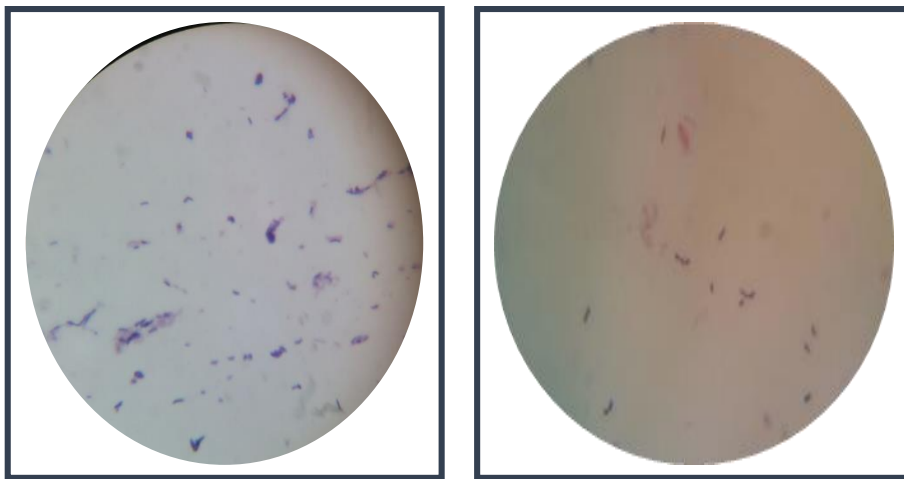


Figura 11. Tinción de Gram de las células desarrolladas en las colonias con la bacteria *Lactobacillus pentosus* microencapsulada.

6.7 Caracterización morfológica de las microcápsulas (SEM).

La morfología de la superficie de las cápsulas pueden ser lisa (regular y esférica) o irregular (desigual) con o sin presencia de poros, los cuales son los responsables de reducir la eficiencia de encapsulación (Mortazavian y col., 2007).

Las microcápsulas obtenidas después del secado por aspersión (Figura 12) obtenidas a las condiciones de optimización presentaron la morfología característica de microcápsulas producidas por secado por aspersión, con la formación de poros en la superficie, como resultado de la evaporación rápida del agua, de forma ovalada y con un tamaño menor a 50 μm ; lo cual es deseable, ya que de acuerdo a lo reportado por Pérez-Leonard y col. (2013), las microcápsulas redondas u ovaladas, tienen una buena dispersabilidad y pueden ser distribuidas homogéneamente en el producto al cual se quieren incorporar.

En cuanto al tamaño, las cápsulas con un tamaño mayor a 100 μm , pueden ser detectadas en la boca, cuando se incorporan a un sistema alimenticio y menores a 10 μm , brindan poca protección contra agentes externos; por lo que el tamaño de partícula deseado oscila entre 15 – 100 μm .

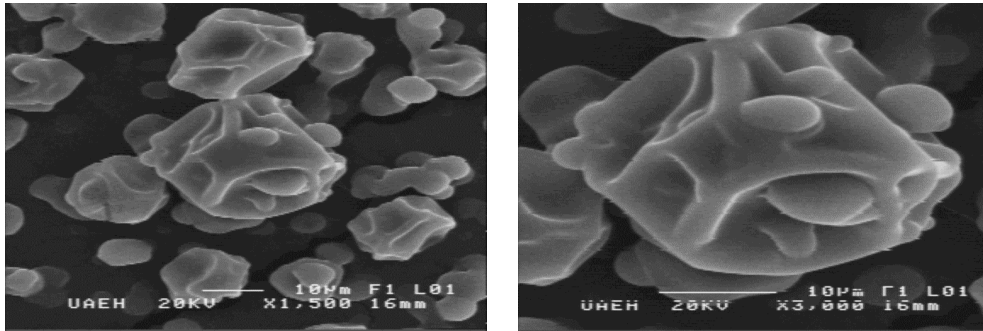


Figura 12. Microfotografías de microcápsulas con *Lactobacillus pentosus* después del secado por aspersión (condiciones óptimas).

Presentaron una cobertura uniforme de las células y no se observó evidencia de células de la bacteria en el exterior de las microcápsulas. La morfología de las microcápsulas obtenidas en este trabajo son similares a las reportadas por Crittenden y col. (2006), Rodríguez-Hueso y col. (2007) y Ying y col. (2010).

La presencia de hendiduras en la superficie de las microcápsulas, afecta negativamente el libre flujo de los polvos, debido a que conduce a la formación de agregados, el utilizar una mayor temperatura durante el secado por aspersión, la formación de hendiduras en la superficie, disminuye por un efecto de expansión rápida de las partículas (Rosenberg y Young, 1993), sin embargo, este caso en particular puede afectar la viabilidad de las células bacterianas.

6.8 Tolerancia de *Lactobacillus pentosus* encápsulado a pH ácido.

Se evaluó la tolerancia de la bacteria libre y encapsulada a pH 2, 3 y 6.5. Los resultados son presentados en la Tabla 16. En forma general, se tiene que para la bacteria libre, tanto a pH 2 y pH 3, existió una pérdida de viabilidad de las bacterias de 1 Log UFC/mL, después de 3 h exposición de la bacteria a éstos valores de pH, sin embargo; a pH 6.5 (usado como control), la viabilidad de la bacteria se mantuvo con 9 Log UFC/mL, tanto al inicio como después de las 3 h de exposición.

Tabla 16. Tolerancia de *Lactobacillus pentosus* encapsulada a diferentes valores de pH.

	pH	Tiempo 0 (inicio)	Tiempo 1 (1 h)	Tiempo 2 (2 h)	Tiempo 3 (3 h)
Bacteria libre	2	9.18 ± 0.06	9.07 ± 0.04	8.55 ± 0.06	7.8 ± 0.03
	3	9.17 ± 0.03	9.10 ± 0.02	8.64 ± 0.03	7.06 ± 0.04
	6.5	9.14 ± 0.03	9.12 ± 0.05	9.0 ± 0.04	7.69 ± 0.03
Bacteria encapsulada	2	9.22 ± 0.02	9.17 ± 0.06	9.1 ± 0.05	8.5 ± 0.03
	3	9.24 ± 0.03	9.22 ± 0.03	9.12 ± 0.04	8.3 ± 0.09
	6.5	9.2 ± 0.03	9.29 ± 0.03	9.2 ± 0.05	8.18 ± 0.04

Para la bacteria encapsulada, tanto a pH 2 como a 3, se mantiene un valor de 9 Log UFC/mL, valor similar al que se presentó en el control (pH 6.5), observándose que el proceso de encapsulación protege a las bacterias contra el medio ácido, aun transcurridas las 3 h de exposición de la bacteria encapsulada, tanto a pH 2 y 3, ya que se obtuvo una disminución menor a 1 Log UFC/mL. Favaro-Trinidad y Grosso (2001) reportaron una disminución de solo 1 Log UFC/mL para *L. Acidophilus* encapsulado en una matriz de celulosa mediante secado por aspersión después de 2 h de exponer la bacteria a pH ácido.

6.9 Tolerancia de *Lactobacillus pentosus* encapsulado a sales biliares.

Los resultados para la tolerancia a sales biliares de *Lactobacillus pentosus* son presentados en la Tabla 17. Para ello se evaluaron 2 concentraciones de sales biliares 0.5 y 1.5 % durante 24 h; realizando una cuenta de bacterias viables a 0, 6, 12 y 24 h de expuestas las bacterias libres y encapsuladas. Para la bacteria libre, a una concentración de 1.5 %, después de las 24 h de evaluación, se tuvo una disminución de 1.27 Log UFC/mL, sin embargo; con la bacteria encapsulada, a la misma concentración y tiempo, se mantuvo una concentración de bacterias de 9 Log UFC/mL, demostrando así, que la encapsulación le brinda una mayor protección a la bacteria. Resultados similares presentaron Favaro-Trinidad y Grosso (2001), quienes reportaron que *L. acidophilus* demostró tener una buena tolerancia, después de exponer la bacteria encapsulada usando celulosa como material de pared a una concentración de 2 % de sales biliares, durante 12 h de exposición.

Tabla 17. Tolerancia de *Lactobacillus pentosus* encapsulado a diferentes concentraciones de sales biliares

	Sales biliares (%)	Tiempo 0 (inicio)	Tiempo 1 (6 h)	Tiempo 2 (12 h)	Tiempo 3 (24 h)
Bacteria libre	0	9.02 ± 0.02	9.17 ± 0.04	9.12 ± 0.09	9.1 ± 0.2
	0.5	9.10 ± 0.05	9.1 ± 0.03	9.08 ± 0.04	8.1 ± 0.4
	1.5	9.07 ± 0.04	9.13 ± 0.04	9.09 ± 0.05	7.8 ± 0.3
Bacteria encapsulada	0	9.15 ± 0.05	9.11 ± 0.08	9.07 ± 0.10	9.21 ± 0.03
	0.5	9.18 ± 0.03	9.17 ± 0.04	9.0 ± 0.14	9.10 ± 0.07
	1.5	9.13 ± 0.05	9.03 ± 0.05	9.01 ± 0.08	9.09 ± 0.10

6.10 Estabilidad de las microcápsulas con *Lactobacillus pentosus* a 4 °C y 30 °C.

La sobrevivencia de *Lactobacillus pentosus* encapsulada a 30 °C, se evaluó durante 12 semanas, a 4 °C, iniciando con una concentración de bacterias de 9.14 Log UFC/g y por 9 semanas a 30 °C, con 9.22 Log UFC/g de concentración inicial.

A 30 °C, solo se evaluó durante 9 semanas, ya que se observó una gran disminución de la concentración de bacterias viables con respecto a la concentración inicial, ya que a este tiempo se alcanzó una concentración de 3.5 Log UFC/g; mientras que a 4 °C, se mantuvo más estable y por ello, se pudo realizar la evaluación durante las 12 semanas

establecidas inicialmente. En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos durante todo el almacenamiento.

Tabla 18. Sobrevivencia de *Lactobacillus pentosus* durante el almacenamiento.

Semana	4 °C	30 °C
0	9.14 ± 0.19	9.22 ± 0.15
1	9.04 ± 0.23	8.55 ± 0.2
2	9.03 ± 0.27	8.12 ± 0.19
3	9.03 ± 0.22	7.58 ± 0.22
4	9.02 ± 0.28	7.28 ± 0.21
5	9.02 ± 0.17	6.63 ± 0.18
6	9.04 ± 0.13	5.71 ± 0.26
7	9.07 ± 0.15	4.81 ± 0.27
8	9.05 ± 0.18	4.6 ± 0.23
9	9.02 ± 0.15	3.5 ± 0.16
10	8.99 ± 0.14	
11	8.91 ± 0.15	
12	8.86 ± 0.14	

En la Figura 13, se muestra la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas a 30 y 4 °C, en la cual se observa que a 30 °C, se presenta una disminución gradual de la sobrevivencia de la bacteria, conforme avanza el tiempo de almacenamiento, ya que de una concentración inicial de 9.22 Log UFC/mL, solo se mantiene 3.5 Log UFC/mL después de las 9 semanas en almacenamiento. Cortés y col. (2014), reportaron una disminución de 1.1 Log UFC/mL para *L. casei* ATCC 334 encapsulada en una matriz de almidón N-lok, después de 21 días de almacenamiento a 25 °C. A la temperatura de 4 °C, la viabilidad de la bacteria encapsulada se mantuvo constante, ya que de una concentración inicial de 9.14 Log UFC/mL, al final de las 12 semanas de almacenamiento, se tuvo una concentración de 8.86 Log UFC/mL.

El material de pared utilizado en este estudio presento una buena protección para la bacteria de *Lactobacillus pentosus* encapsulada mediante secado por aspersión y almacenada a 4 °C durante 3 meses, ya que mantuvo una concentración de bacterias superior a 10⁶ – 10⁷ UFC/g, concentración recomendada y necesaria para aplicaciones prácticas. Contrario a estos resultados, algunos autores Texeira y col. (1997) y Anal y

Singh (2007), quienes reportaron que la microencapsulación, utilizando el secado por aspersión, es poco recomendada, debido a la alta mortalidad de los microorganismos por efectos simultáneos de la deshidratación.

Mientras que Cortés y col. (2014) reportaron resultados favorables para *L. casei* ATCC 334, encapsulado mediante secado por aspersión con almidón N-lok durante un periodo de almacenamiento a 4 °C durante 35 días, mostrando una sobrevivencia de 8.54 Log UFC/g.

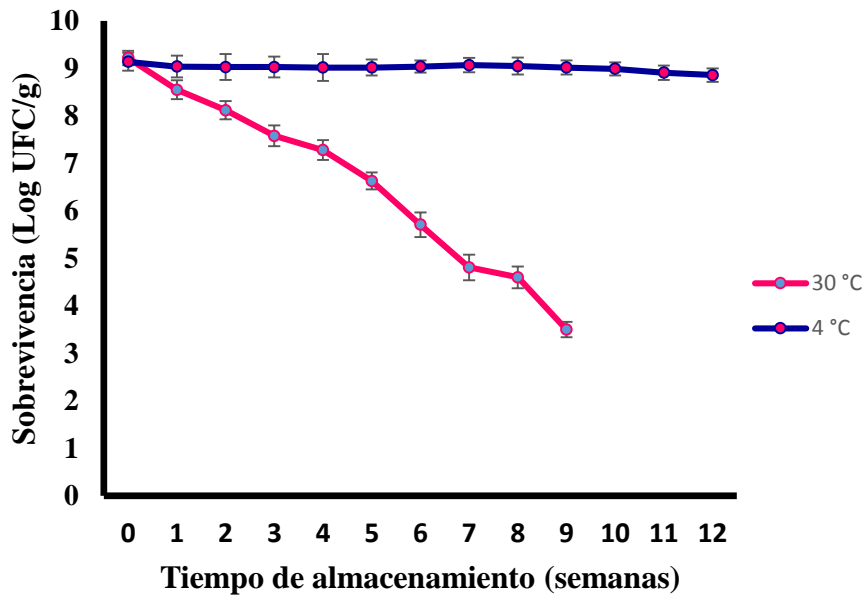


Figura 13. Sobrevivencia de *Lactobacillus pentosus* almacenado a 4 y 30 °C

En la Figura 14, se muestran las microfotografías de las microcápsulas obtenidas con *Lactobacillus pentosus* almacenadas a 4 °C, se observó que desde del inicio, hasta después de las 12 semanas de almacenamiento, la integridad de las mismas en función del tiempo de almacenamiento (semana 4, 8 y 12), lo cual ayuda a que la sobrevivencia de la bacteria dentro de las cápsulas se conserve a una buena concentración (± 9 Log UFC/mL)

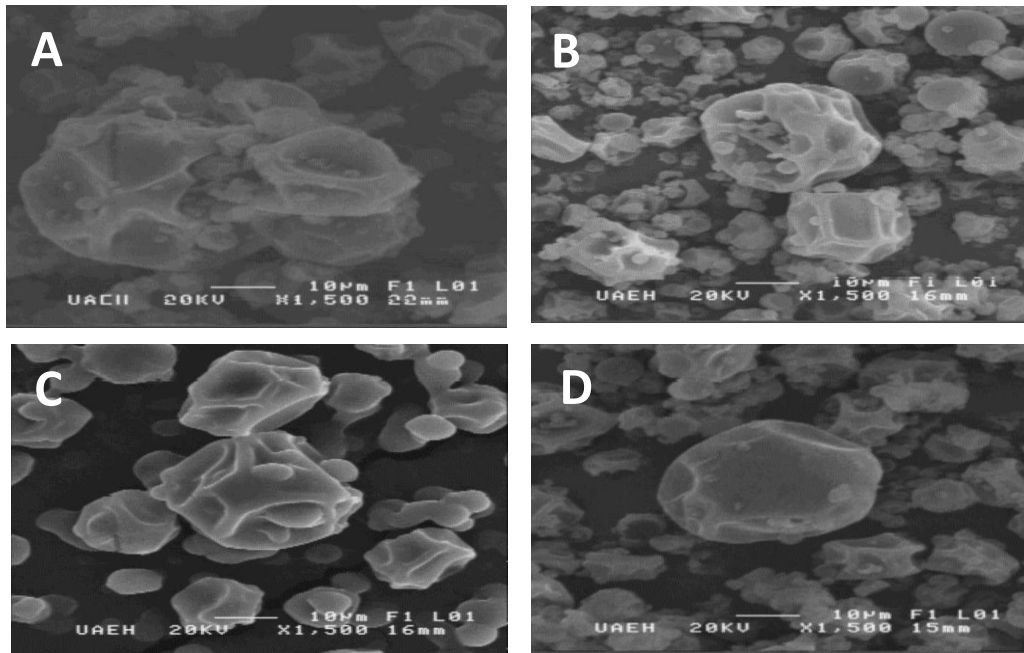


Figura 14. Microfotografías de *Lactobacillus pentosus* encapsulado y almacenado a 4 °C.
(A) semana 0, (B) semana 4, (C) semana 8 y (D) semana 12.

7 CONCLUSIONES

- El proceso de homogenización de la mezcla, previo al secado por aspersion, permitió obtener una mejor encapsulación de las bacterias, esto puede ser debido a que el tiempo de homogenización es corto, por lo tanto no afecta la viabilidad de la bacteria y al mismo tiempo se logra una mayor interacción de la mezcla con la bacteria. La homogenización para la mezcla almidón – pulque fue a 3000 rpm durante 20 s y cuando se hace la incorporación de la bacteria a la mezcla a 3000 rpm pero solo durante 5 s.
- Una vez realizado el proceso de optimización mediante el secado por aspersion, las condiciones óptimas encontradas fueron 100 °C y con un 30 % de sólidos, obteniendo un 98.9 % de inmovilización de bacteria.
- Con la observación de las microcápsulas usando SEM, se comprueba que se tiene la formación de la cápsula y con la tinción de Gram, la presencia de la bacteria encapsulada.
- Los datos de higroscopicidad (7.9 g/100 g), humedad (3.3 %) y actividad de agua (0.259); al ser bajos en las microcápsulas obtenidas a las condiciones de optimización resultan favorables, ya que pueden aumentar la estabilidad de las cápsulas durante el almacenamiento.
- La temperatura de almacenamiento, es un factor importante para la viabilidad de los microorganismos encapsulados, ya que, en las microcápsulas almacenadas durante 12 semanas a 4 °C, se ha mantenido una sobrevivencia de bacteria de 9 Log (UFC/g) y una buena integridad de la cápsula.

8 BIBLIOGRAFIA

- AACC, (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10 th Ed., Vol II, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Aldana, A. S., Sandoval, E. R., & Aponte, A. A. (2011). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *Revista Ingeniería y Competitividad*, 5(2), 73-83.
- Amin, T., Thakur, M., & Jain , S. C. (2013). Microencapsulation the future of probiotic cultures. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 35-43.
- 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.
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D., & Stapley, A. (2008). Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 41(2), 270-277.
- 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.
- Kartheek, A., & Valérie, O. (2012). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *Food Science and Technology*, 17-24.
- Anónimo. (2005). Empleo de almidones modificados como encapsulantes para sabores. *Bebidas Mexicanas*.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. EUA.
- Akhiar, M. (2010). Enhancement of Probiotics Survival by Microencapsulation with Alginate and Prebiotics. *Basic Biotechnology Journal*. (6)13-18.
- Araya, L., & Lutz, R. (2003). Alimentos Funcionales y Saludables. *Revista Chilena de Nutrición*, 8-14.

- Banasaz, M., Norin, E., Holma, R., & Midtvedt, T. (2002). Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), 3031-3034.
- Barbosa-Canovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, H. (2005). *Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Basholli-Salih, M., Mueller, M., Salar-Behzadi, S., Unger, F. M., & Viernstein, H. (2014). Effect of lyoprotectants on β -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. *Food Science and Technology*, 276-282.
- Bech-Larsen, T., & Scholderer, J. (2007). Functional foods in Europe: Consumer research market experiences and regulatory aspect. *Trends in Food Science and Technology*, 18(4), 231-234.
- Begley N, Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. (2006). Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and environmental microbiology*. 68(6), 29-38.
- Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., & Fisk, I. (2013). Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*, 31(11), 1274-1283.
- Brena Cervantes, L. E., Dominguez Duran, O. A., Gonzalez Medez, A., Esquivel Cid, O. & Lucio Morales, H. (2010). Estrategia de exportacion del pulque enlatado (Doctoral dissertation).
- Buch, K., Penning, M., Wächtersbach, E., Maskos, E., & Lagguth, P. (2009). Investigation of various shellac grades: Additional analysis for identity. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(6), 694-703.

- Camacho, A., Giles , M., Ortega , A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México, 25(23), 10-3.
- Conway, P. L.; Gorbach, S. L.; Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesión to intestinal cell. *Journal of Dairy Science* (70), 1-12
- Cervantes-Contreras, M., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA*, 5(8).
- Champagne, C. P. (2012). Microencapsulation of probiotics in food: challenges and future prospects. *Therapeutic delivery*, 3(11), 1249-1251.
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for delivery of probiotics and other ingredients in functional dairy products. *Functional Dairy Products*, 2, 404-426.
- Champs, C., Maroncle, N., Balestino, D., Rich, C., & Forestier, C. (2003). Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Journal of clinical microbiology*, 41(3), 270-273.
- Chen, M. J., & Chen, K. N. (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 83-112.
- Cortés, R. N. F., Martínez, M. G., Guzmán, I. V., Llano, S. L. A., Grosso, C. R. F., & Bustos, F. M. (2014). Evaluation of modified amaranth starch as shell material for encapsulation of probiotics. *Cereal Chemistry*, 91(3), 300-308.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. y Augustin, M. (2006). Symbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:2280–2282.
- Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(1), 31-41.

- de Montellano, B. O. (1990). *Aztec medicine, health, and nutrition*. Rutgers University Press.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G., Allesina, S., Barba, M., & Deidda, F. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*. 38, S248-S255.
- Dimantov, A., Greenberg, M., Kesselman, E., & Shimoni, E. (2003). Study of high amylose corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(1), 93-100.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 74(2), M100-M107.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Borner, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(1).
- Dong, Z., Wang, Q., & Du, Y. (2006). Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, 280(1), 37-44.
- Dsmz. (2008). Bacterial nomenclature up to dat. Obtenido de (http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature). [Consulta: 26 Noviembre 2015].
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International journal of food microbiology*, 124(2), 126-134.
- Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS microbiology letters*, 235(2), 273-279.

- Evans, D. F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A. G., Dyson, T. J., & Hardcastle, J. D. (1988). Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*, 29(8), 1035-1041.
- FAO/OMS. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization.
- Gaaloul, S., Turgeon, S. L., & Corredig, M. (2009). Influence of shearing on the physical characteristics and rheological behaviour of an aqueous whey protein isolate–kappa-carrageenan mixture. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1243-1252.
- Goldin, B. R., & Gorbach, S. L. (1992). Probiotics, the Scientific Basis. Chapman - Hall.
- González, R. F., & Gonzalez-Martínez, B. E. (2006). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. *Revista Salud Publica y Nutrición*, 7(1).
- González-Martínez, B. E., Jiménez-Salas, Z., Heredia-Rojas, N. L., Villarreal-Treviño, L., García-Díaz, G., & Gómez-Treviño, M. (2006). Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de salmonella enteritidis var. Typhimurium. *Ciencia UANL*, 9(4).
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7), 330-347.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., & Kim, J. M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.
- Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Calcium alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19(1), 35-45.
- Haralampu, S. G. (2000). Resistant starch—a review of the physical properties and biological impact of RS 3. *Carbohydrate polymers*, 41(3), 285-292.

- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 577-585.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(4), 291-311.
- Holzappel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International*, 35(2), 109-116.
- Iravani, S., Korbekandi, H., & Mirmohammadi, S. V. (2015). Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *Journal of food science and technology*, 52(8), 4679-4696.
- Izumo, T., Izumi, F., Nakagawa, I., Kitagawa, Y., Shibata, H., & Kiso, Y. (2011). Influence of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 ingestion on the mucosal immunity of healthy and *Salmonella* Typhimurium-infected mice. *Bioscience and microflora*, 30(2), 27.
- Jiménez, M. L. (2010). Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral. Tesis para grado a doctor. Universidad de Granada, España.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(2), 39-48.
- 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.
- Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., & Salminen, S. J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), 185-189.
- Korbekandi, H., Jahadi, M., Maracy, M., Abedi, D., & Jalali, M. (2009). Production and evaluation of a probiotic yogurt using *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *International Journal of Dairy Technology*, 62(1), 75-79.

- Kosin, B., & Rakshit, S. K. (2006). Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 371-379.
- Kotani, Y., Shinkai, S., Okamatsu, H., Toba, M., Ogawa, K., Yoshida, H., Fukaya, T., Fujiwara, Y., Chaves, P. H. M., Kakumoto, K., & Kohda, N. (2010). Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Immunity & ageing*, 7(1), 1.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., & Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. Agriculture and Rural Development Discussion Paper 30.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.
- Kumar, H., & Salminen, S. (2016). Probiotics. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier , 510-515.
- Lakkis, J. M. (2007). Encapsulation and controlled release technologies in food systems. Blackwell Publishing.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS yeast research*, 8(7), 1037-1052.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.
- Lee, D. J., Drongowski, R. A., Coran, A. G., & Harmon, C. M. (2000). Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. *Pediatric surgery international*, 16(4), 237-242.
- Lemus-Fuentes, E. (2006). Los Enemas prehispánico como instrumentos para Aplicar probióticos. *Temas de Ciencias y Tecnología*, 10, 17-26.

- León-de la O, D. I., Méndez-Colín, D. S., Rodríguez-Padilla, D. P., Puente-Hurle, L., García-Sorrondegui, F. I., y Salgado-Brito, R. (2012). Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, (11), 115-122.
- Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. (2000). Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47(5), 646-652.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. (2001). Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*. 34:791–796.
- Mack, D. R., Ahrné, S., Hyde, L., Wei, S., & Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut*, 52(6), 827-833.
- Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Padrós, H., & Ruiz-Barba, J. L. (2011). Genome sequence of Lactobacillus pentosus IG1, a strain isolated from Spanish-style green olive fermentations. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5605-5605.
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832-7839.
- Marteau, P., & Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 725-740.
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15-25.

- Massi M, Ioan P, Budriesi R, Chiarini A, Vitali B, Lammers KM, Gionchetti P, Campieri M, Lembo A, Brigidi P. (2006). Effects of probiotic bacteria on gastrointestinal motility in guinea-pig isolated tissue. *World Journal of Gastroenterology*, 12(37), 5987-5994.
- Morrison, D. J., Mackay, W. G., Edwards, C. A., Preston, T., Dodson, B., & Weaver, L. T. (2006). Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate?. *British Journal of Nutrition*, 96(03), 570-577.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian journal of biotechnology*, 5(1), 1-18.
- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., & Holley, R. A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1), M20-M24.
- Nag, A. (2011). Development of a microencapsulation technique for probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 431 using a protein-polysaccharide complex: a thesis presented in partial fulfillment of the requirements of the degree of Masters of Technology in Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand (Doctoral dissertation).
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiology letters*, 334 (1), 1-15.
- Nutrition, N. I. (2000). Consumer awareness of and attitudes towards functional foods, highlights and implications for informing consumer. 4-10.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20-33.

- Oldfield, D. J., Taylor, M. W., & Singh, H. (2005). Effect of preheating and other process parameters on whey protein reactions during skim milk powder manufacture. *International Dairy Journal*, 15(5), 501-511.
- Pedroza-Islas, R., Cruz, L., Ricque-Marie, D., Tapia, M., Gaxiola, M., & Simoes, N. (2002). Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3.
- Peña-Alvarez, A., Díaz, L., Medina, A., Labastida, C., Capella, S., & Vera, L. E. (2004). Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1027(1), 131-136.
- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., & Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 14-25.
- Playne, M. J., Bennett, L. E., & Smithers, G. W. (2003). Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(3), 242.
- Quigley, E. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological research*, 61(3), 213-218.
- Rajam , R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein-alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4 (4),891-898.
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 773-780.

- Ramírez-Higuera, A. (2012). Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel del maguey (Agave salmiana) en *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. Tesis Dotoral, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), México, D.F.
- Reid, A. A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P., & Vuilleumard, J. C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science*, 72(1), M031-M037.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., & McCormick, J. K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (4), 658-672.
- Rhee, S. J., Lee, J. E., & Lee, C. H. (2011). Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented food. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 1.
- Rodriguez-Hueso, M. E., Duran-Lugo, R., Prado-Barragan, L., A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J. y Vernon-Carter, E. J., (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotics. *Food Research International*. 40:1299-1306.
- Rokka, S., & Rantamaki , P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulación: challenges for industrial applications. *European Food Research Technology*, 231(1), 1-12.
- Rosenberg, M. Y Young, S. L. (1993). Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat – structure evaluation. *Food Structure*. 12:31-41.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2007). “Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, 23(2), 302-315.
- Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(11), 1284-1289.

- Sarkar, S. (2010). Approaches for enhancing the viability of probiotics: A review. *British Food Journal*, 112 (4), 329-349.
- Saxelin , M., Tynkkynen, S., Mattila-Sanholm, T., & de Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes; from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (2), 204-211.
- 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.
- Shah, N. P. (2000). Probiotics bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 83: 894-907.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* , 17(11), 1262-1277.
- Sheu , T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science* , 54(3), 73-77.
- Shida, K., Takahashi, R., Iwadate, E., Takamizawa, K., Yasui, H., Sato, T., & Kaminogawa, S. (2002). *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clinical & Experimental Allergy*, 32(4), 563-570.
- Sip, A., & Grajek, W. (2010). Probiotics and prebiotics. *Functional food product development*, 2, 146.
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed research international*, 2013.
- Spence, J.T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, (19), 54-56.

- Spencer, J.F. y Ragout, A.L. (2001). Métodos microbiológicos. Totowa New Jersey (Estados Unidos): *Humana Press Inc*, 173-181.
- Subirade, M. (2007). Report on Functional Foods. *Food Quality and Standars Service Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome*
- Suliman, A. M. E., Elamin, O. M., Elkhalfa, E. A., & Laleye, L. (2014). Comparison of Physicochemical Properties of Spray-dried Camel's Milk and Cow's Milk Powder. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 4(1), 15-19.
- Sun, W., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan - xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 17-25.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R., & Manap, M. Y. A. (2013). Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 717-722.
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3189-3194.
- Teixeira, P., Castro, H. Mohacsi-Farkas, C. y Kirby, R. (1997). Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaris* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology*. 83:219-226.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International journal of food science & technology*, 44(10), 1950-1958.
- Trejo-Estrada, S. R. (2012). "Consortio de bacterias lácticas para la producción de una bebida fermentada a base de jugos de agave". *En Revista chilena de nutrición*. 5, 8-12.
- Varum, K. M., & Smidsrod, O. (2006). Food polysaccharides and their applications (2nd ed.). Boca Raton, Florida: Stephen AM, Phillips GO, Williams PA. 479-520.

- Velázquez, C. (2008). Encapsulación de aceite esencial de naranja en un secador de lecho por fuente fluidizado con spolidos inertes. Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional, Ingeniería Bioquímica, México, D.F.
- Verbeken, D., Dierckx, S., & Dewttlinck, K. (2003). Exuante gums: occurrence, production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(1), 10-21.
- Weinbreck, F., Bodnár, I. y Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products?. *International Journal Food Microbiology*. 136:364-367.
- Weinbreck, F., Bodnár, I. y Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products?. *International Journal Food Microbiology*. (136), 364-367.
- www.ift.org. (abril de 2014). Obtenido de food-technology: <http://www.ift.org/food-technology/past-issues/2014/april/features/toptentrends.aspx>.
- Ying, D.Y., Phoon, M. Ch., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I. y 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):588-595.
- Zanoni, P., Farrow, J. A., Phillips, B. A., & Collins, M. D. (1987). *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 339-341.
- Zuidam, N. J., & Heinrich, E. (2010). Encapsulation of aroma (pp. 127-160). Springer New York.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. *In Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer New York.

9 ANEXOS

XVII Congreso Internacional
Inocuidad de Alimentos

XXXII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos
5, 6 y 7 de noviembre 2015, Nuevo Vallarta, Nayarit, México

La Universidad de Guadalajara otorga la presente
CONSTANCIA

A: Hernández López, Z. Falfán Cortes, R. N., Castro Rosas, J., y Gómez Aldapa, C. A.

por su participación como:

Autores del trabajo libre presentado en modalidad oral
“Microencapsulación de *Lactobacillus pentosus* utilizando como material de pared una mezcla de pulque-almidón”

[Signature]
Dra. Ma. Refugio Torres Vitela
Coordinadora General del Evento

[Signature]
Dr. César Octavio Manzon
Rector del Centro Universitario de
Ciencias Exactas e Ingenierías

[Signature]
Dr. Arturo Chávez Chávez
Director de la División de Ciencias Exactas del Centro
Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías