



---

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Biología

Tesis

Evaluación de zeína como encapsulante de  
microorganismos probióticos

Que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Alejandra Montes Sandoval

ASESORA DE TESIS

Dra. Eva María Santos López



Mineral de la Reforma, Hidalgo.

Noviembre 2015



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
**Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería**  
*Institute of Basic Sciences and Engineering*  
**Área Académica de Biología**  
*Biology Department*

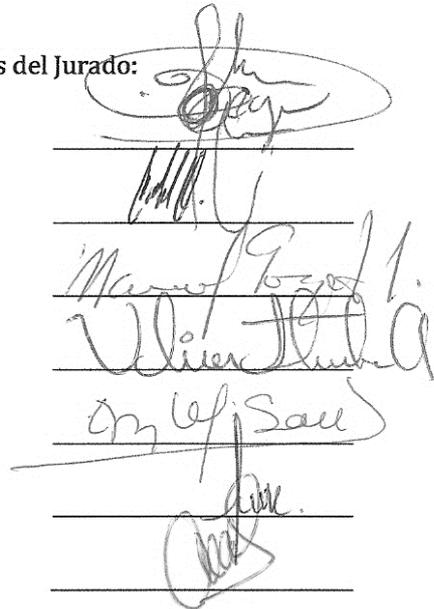
**M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH**

**PRESENTE**

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología **Alejandra Montes Sandoval**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **“Evaluación de zeína como encapsulante de microorganismos probióticos”**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

- PRESIDENTE:** M. en C. Mario Segura Almaraz
- PRIMER VOCAL:** Dra. Claudia Coronel Olivares
- SEGUNDO VOCAL:** M. en C. Manuel González Ledesma
- TERCER VOCAL:** Biol. Ulises Iturbe Acosta
- SECRETARIO:** Dra. Eva María Santos López
- PRIMER SUPLENTE:** Biol. Lidia María Reyes Gómez
- SEGUNDO SUPLENTE:** Dra. Maritza López Herrera



Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

**ATENTAMENTE**  
**“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”**  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo a 28 de Octubre de 2013

Responsable de Titulaciones de la Licenciatura en Biología



Ciudad del Conocimiento  
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5  
 Colonia Carboneras  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C  
 Tel. +52 771 7172000 exts. 6640 y 6642,  
[aab\\_icbi@uaeh.edu.mx](mailto:aab_icbi@uaeh.edu.mx)

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos, del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la asesoría de la Dra. Eva María Santos López y con el apoyo del Programa de Estímulo a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación del CONACYT, 2014, en la modalidad INNOVATEC, Proyecto número 212046, de la Empresa FRITOS TOTIS, S. A. de C. V. Gracias.



Parte de los resultados se presentaron en el marco de las celebraciones del XV aniversario de la Licenciatura en Química de Alimentos y VI Sexto Foro de Alimentos Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, y en el 1er Congreso Nacional de Nutrición y Seguridad Alimentaria Hidalgo 2015.

## Agradecimientos

### ש לאל תודה

Con solo decir **gracias** no es suficiente... no es una palabra que contenga todo el sentimiento que quiero expresar a las personas que han estado justo en el momento indicado de la vida para ayudarme. Aun así, lo más adecuado es agradecer con toda sinceridad.

Primero y antes que nada a la mamá Sari... gracias por el hecho de darme la vida, por sembrar en mi la idea de crecer y no desistir, por escucharme, por apoyarme. Alguien me prometió estar ahora aquí, pero se fue y tal vez no lo vemos pero nos acompaña, gracias Sr. Francisco (†) por traerme al examen de admisión incluso cuando ni usted, ni mamá y ni yo teníamos idea de dónde estaba la UAEH, gracias por apoyarnos siempre a mi mamá y a mí.

Mamá Juanita, gracias por cuidarme tantos años y ayudarme a crecer, por sufrir conmigo la lejanía, gracias por ser la mejor abuelita del mundo...

Hermanos míos, Andrés y Román gracias por su apoyo, por cuidarme, por las llamadas de atención y por todo. Cuenten conmigo siempre. Hermanito bebé que llegaste inesperadamente y cambiaste la vida de todos, gracias por inspirarme en los últimos días de correcciones de este trabajo.

A mí tía y más que eso, a ti mi hermanita Lucerito mil gracias por escucharme, apoyarme, asistirme en cada momento que te he necesitado.

Papá, gracias por el apoyo y por lo que has podido brindarme. Aunque ha habido mucha distancia... te quiero.

Señores John y Frances Bruton, mi gratitud hacia ustedes por el apoyo hacia la familia durante tantos años.

Familia Montes y familia Sandoval... mi familia, gracias por estar conmigo.

Familia de biólogos generación 2010-2014, siempre agradeceré el apoyo brindado. Recordare con alegría las salidas al campo, a aquella primera aventura como biólogos en Huatulco. A quienes en definitiva no olvidaré nunca y estaré más que agradecida siempre es a ustedes: Melisa, tú mi amiga, prima, hermana y compañera de aventuras, y que recorrimos no sólo caminos de Atotonilco sino hasta los de Epazoyucan; a ti Yazmín (muégano) gracias por la gran amistad y por el apoyo durante la carrera.

Compañeras y hermanas académicas del laboratorio de Microbiología de los Alimentos, gracias por todo el apoyo brindado, cuando llegue prácticamente desconocía todo y ustedes me apoyaron demasiado. Marisol gracias por la amistad, la paciencia y ayuda en la extracción de proteína y las largas jornadas de trabajo que compartimos más de una vez. Gaby gracias por el apoyo que me brindaste, por las explicaciones que pacientemente me diste cuando algo no entendía. Maricela y Magali ha sido un placer trabajar con ustedes, nunca olvidaré que mi primer viaje en avión fue con ustedes, muchas gracias por todo chicas. Andy gracias por la bonita amistad y por el apoyo brindado. Mara, por la compañía en las largas horas de trabajo y la bonita amistad muchas gracias.

Dra. Eva no tengo como agradecer el hecho de recibirme y confiarme el trabajo, gracias por el apoyo y las facilidades que me ha brindado. Es un placer trabajar con usted y para usted.

Catedráticos de la Lic. En Biología de la UAEH que tuve la oportunidad de conocer, muchas gracias por los conocimientos que nos transmitieron, por hacerme pensar como una persona preparada profesionalmente y por enseñarme a comprometerme. Dra. Claudia Coronel le agradezco la recomendación que me hizo porque fue así como llegue con la Dra. Eva, porque gracias a usted me interese en los microorganismos, estoy justo donde ahora por la curiosidad que un día sembró en mí; Maestro Mario,

gracias por las pláticas que realmente me han servido mucho, por su apoyo con la microscopía y por ser buen amigo.

Odín, gracias por darme la oportunidad de conocerte, por apoyarme, por hacerme sonreír cuando estoy más que enojada; los momentos contigo son increíbles y resulta toda una aventura estar a tu lado, siempre te recordaré. Gracias a ti mi primo hermano y amigo José Rodolfo por escucharme, por la confianza y por toda la paciencia. Mi experiencia en Protección Civil y Bomberos Epazoyucan ha sido de las mejores que he tenido en la vida☺.

Sinodales, gracias por aceptar ser evaluadores de éste trabajo, por darse a la tarea de leer la tesis y señalar las correcciones que le hacían falta... ustedes son parte de este trabajo☺.

Con seguridad, se me están escapando nombres de personas importantes que han colaborado con este trabajo, a ustedes también les agradezco todo el apoyo brindado.

*AGRADEZCO A LA SELECCIÓN NATURAL POR ELEGIRME Y PERMITIRME  
ESTAR JUSTO AQUÍ...*

## Dedicatoria

*Pensando en la vida siempre...*

*En memoria de Francisco García Moreno (†)*

*A Sarina Sandoval y Juana Martínez...*

# ÍNDICE

|   |             |
|---|-------------|
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....   | <b>xi</b>   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....  | <b>xii</b>  |
| <b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....   | <b>xiii</b> |
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>xv</b>   |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>    |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> .....  | <b>3</b>    |
| 2.1 Bacterias ácido lácticas .....  | 3           |
| 2.2 Fermentación láctica homofermentativa obligada.....                         | 4           |
| 2.3 Fermentación láctica heterofermentativa obligada .....                      | 6           |
| 2.4 Fermentación láctica heterofermentativa facultativa .....                   | 8           |
| 2.5 Género <i>Lactobacillus</i> .....   | 8           |
| 2.6 <i>Lactobacillus casei</i> Shirota .....                                    | 10          |
| 2.7 Probióticos.....  | 11          |
| 2.8 Encapsulación .....   | 12          |
| 2.9 Métodos para encapsular .....   | 13          |
| 2.10 Matrices de encapsulamiento .....  | 17          |
| 2.11 El maíz .....  | 19          |
| 2.12 Zeína.....   | 21          |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....   | <b>23</b>   |
| <b>4. OBJETIVOS</b> .....   | <b>24</b>   |
| 4.1 Objetivo general.....   | 24          |
| 4.2 Objetivos específicos.....  | 24          |
| <b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....  | <b>25</b>   |
| 5.1 Aislamiento, purificación y conservación del microorganismo probiótico..... | 25          |
| 5.1.1 Tinción de Gram .....   | 25          |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 5.1.2     | Prueba de la catalasa.....   | 26        |
| 5.1.3     | Prueba de la oxidasa.....  | 26        |
| 5.2       | Acondicionamiento y modificación del subproducto .....                                       | 26        |
| 5.2.1     | Determinación de humedad .....   | 27        |
| 5.2.2     | Determinación de grasa .....   | 27        |
| 5.2.3     | Determinación de proteína .....  | 27        |
| 5.3       | Extracción y cuantificación de zeína.....  | 28        |
| 5.3.1     | Diálisis y secado de zeína .....   | 31        |
| 5.4       | Microencapsulación del probiótico por el método de emulsificación/gelificación externa ..... | 31        |
| 5.4.1     | Microencapsulación con alginato de sodio (A) .....   | 31        |
| 5.4.2     | Microencapsulación con alginato de sodio y zeína (AZ).....                                   | 32        |
| 5.5       | Evaluación de la eficiencia de encapsulamiento.....  | 33        |
| 5.6       | Análisis estadístico .....   | 34        |
| <b>6.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....  | <b>35</b> |
| 6.1       | Verificación de pureza del cultivo de BAL.....   | 35        |
| 6.2       | Caracterización del subproducto de harinas.....  | 36        |
| 6.3       | Microencapsulación .....   | 38        |
| 6.4       | Morfología de las cápsulas .....   | 41        |
| <b>7.</b> | <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>8.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>46</b> |
| <b>9.</b> | <b>ANEXOS</b> .....  | <b>57</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Secuencia de la extracción de fracciones proteicas hasta las zeínas.   | 29 |
| Tabla 2. Porcentaje de humedad, grasa y proteína total presente en el subproducto de harinas.   | 36 |
| Tabla 3. Composición química aproximada de las principales partes de los granos de maíz.  | 37 |
| Tabla 4. Valores promedio (N=3) de eficiencia de encapsulamiento expresado en %.  | 38 |
| Tabla 5. Eficiencia de encapsulamiento con diferentes cepas probióticas reportada por Ding y Shah (2009a) a 4000 rpm por 5 min empleando alginato de sodio. | 39 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa por BAL.  | 5  |
| Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa de BAL heterofermentativas.   | 7  |
| Figura 3. Presentación esquemática del procedimiento secado por aspersion.   | 14 |
| Figura 4. Diagrama de las técnicas de encapsulación extrusión y emulsión.  | 16 |
| Figura 5. Fraccionamiento de las proteínas de maíz (Badui, 1990) de acuerdo a su solubilidad, se observa hasta la extracción de zeína. | 30 |
| Figura 6. Tinción de Gram de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota. 4250X   | 35 |
| Figura 7. Fotografía de microcápsulas con alginato realizadas a 2800 rpm. 170X   | 41 |
| Figura 8. Fotografía de microcápsulas con alginato realizadas a 2800 rpm. 1700x  | 41 |
| Figura 9. Fotografía de microcápsulas con alginato realizadas a 4000 rpm. 170X   | 42 |
| Figura 10. Fotografía de microcápsulas con alginato realizadas a 4000 rpm. 1700X   | 42 |
| Figura 11. Fotografía de microcápsulas con alginato-zeína realizadas a 2800 rpm. 170X  | 42 |
| Figura 12. Fotografía de microcápsulas con alginato-zeína realizadas a 2800 rpm. 1700X   | 42 |
| Figura 13. Fotografía de microcápsulas con alginato-zeína realizadas a 4000 rpm. 170X  | 43 |
| Figura 14. Fotografía de microcápsulas con alginato-zeína realizadas a 4000 rpm. 1700X   | 43 |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| ADP                            | Adenosin difosfato  |
| AOAC                           | Asociación de Químicos Analíticos Oficiales                               |
| ATP                            | Adenosin trifosfato   |
| BAL                            | Bacterias ácido lácticas  |
| CO <sub>2</sub>                | Dióxido de Carbono  |
| DHPA                           | Dihidroxiacetona fosfato  |
| EMP                            | Ruta Embden-Meyerhof-Parnas   |
| FAO                            | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| FDA                            | Administración de alimentos y medicamentos                                |
| GAP                            | Gliceraldehído 3 fosfato  |
| GRAS                           | Generalmente reconocido como seguro                                       |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | Ácido fosfórico   |
| LDH                            | Lactato deshidrogenasa  |
| MAP                            | Envasado en atmósfera protegida   |
| ME                             | Microencapsulación  |
| MRS                            | De Mann Rogosa Sharp  |
| NAD <sup>+</sup>               | Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada                           |
| NADH                           | Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida                          |
| OMGE                           | Organización Mundial de Gastroenterología                                 |
| PG                             | Poligalacturonasa   |

|     |                                     |
|-----|-------------------------------------|
| PK  | Piruvatocinasa                      |
| PRC | Película o recubrimiento comestible |
| W/O | Agua/aceite                         |
| WHO | Organización Mundial de la Salud    |

## RESUMEN

La microencapsulación se ha desarrollado como una forma de proteger a las bacterias, compuestos químicos y alimentos de los factores ambientales adversos, utilizando diversos materiales (matrices). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de la zeína extraída a partir de un subproducto de la molienda del maíz, para ser utilizado como encapsulante en microorganismos probióticos. Se realizó la extracción secuencial de proteínas a partir de un subproducto de molienda del maíz para obtener prolamina (zeína). Posteriormente, se formaron dos tipos de microcápsulas por el método de emulsión/gelificación externa. El primer tipo de cápsulas se realizó con una mezcla de alginato y probióticos (*Lactobacillus casei* Shirota), el segundo tipo de microcápsulas se realizó con la mezcla de alginato de sodio-zeína más los probióticos, usando alginato de sodio (1.5 % (p/v)) y Cloruro de Calcio (0.05 M). Para el proceso de emulsión/gelificación externa de las microcápsulas se emplearon distintas velocidades, 2800 rpm y 4000 rpm en un homogeneizador. La eficiencia de microencapsulamiento se evaluó mediante recuento en agar MRS con incubación a 30 °C por 48-72 h. Se realizó un análisis de varianza para verificar si hay diferencias entre la eficiencia de encapsulamiento con y sin zeína a distintas velocidades durante la formación de la emulsión. No existen diferencias significativas entre la eficiencia de encapsulamiento al emplear alginato o la combinación alginato y zeína a 2800 rpm o 4000 rpm.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas pertenecen al grupo de las bacterias Gram positivas, comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Todas las BAL fermentan diversos azúcares, produciendo ácido láctico en cantidades suficientemente elevadas como para inhibir a otros microorganismos. Son inocuas para la especie humana y, además, sus productos metabólicos tienen un sabor agradable. Estas propiedades permiten utilizar las BAL para preparar y conservar alimentos (Ingraham e Ingraham, 1998), y es por ello que son de importancia económica en la industria alimentaria (Stiles y Holzapfel, 1997). Algunas BAL son además consideradas probióticos por la amplia variedad de beneficios que proporcionan gracias a que contribuyen en la reducción de pH en el intestino y producen algunas enzimas digestivas y vitaminas. También producen sustancias antibacterianas como ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, diacetilo, diacetaldehído y otras sustancias (Parra, 2010).

Por lo anterior, los efectos beneficiosos de los probióticos en la salud y la nutrición humanas son cada vez más reconocidos por los profesionales de la salud. En la última década, recientes investigaciones científicas sobre las propiedades y funcionalidad de microorganismos vivos en los alimentos han sugerido que los probióticos juegan un papel importante en el sistema inmunitario, digestión y respiración, y que podrían tener un efecto significativo en el alivio de enfermedades infecciosas en los niños y otros grupos de alto riesgo (FAO /WHO, 2006).

La Organización Mundial de Gastroenterología (OMGE) (2008) señala que los probióticos están destinados a ayudar a la microbiota intestinal que se aloja en el organismo naturalmente, y que para que los probióticos ejerzan su acción deben llegar vivos al intestino. Así, cobra relevancia la encapsulación como método de protección y mantenimiento de los microorganismos probióticos.

La encapsulación se ha desarrollado como una forma de proteger a las bacterias contra factores ambientales adversos (Anal y Singh, 2007; Champagne y Fustier, 2007; Weinbreck *et al.*, 2010). El objetivo de la encapsulación es crear un micro-

entorno en el que las bacterias sobrevivan durante el procesamiento, almacenamiento y puedan ser liberadas en el sitio apropiado en el tracto digestivo (Anal y Singh, 2007; Weinbreck *et al.*, 2010).

Se han utilizado diversos materiales (matrices) para microencapsular, los más empleados suelen ser alginato de sodio, almidón, mezcla de gelatinas, gomas como xantana, algarrobo, k-carragenina, proteínas de suero de leche, maltodextrinas o mezclas.

La zeína ofrece varias ventajas potenciales como ser materia prima para películas, recubrimientos y aplicaciones de plástico. Es biodegradable, y es una de las pocas proteínas de cereales extraídas en una forma relativamente pura (Lawton, 2002). Por las características que presenta, la zeína puede ser empleada como encapsulante de microorganismos probióticos ya que es resistente a ataques microbianos, es insoluble en agua, tiene propiedades antioxidantes y gran capacidad de adhesión.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Bacterias ácido lácticas

El concepto de BAL como un grupo de microorganismos se desarrolló a principios de 1990, precedido por científicos pioneros y técnicas desarrolladas en la segunda mitad del siglo XIX. Las interacciones de las BAL despertó el interés de científicos y resultó en la significativa contribución de la fermentación ácido láctica de Pasteur en 1857, seguido del primer aislamiento de *Bifidobacterium lactis* de un cultivo puro por Lister en 1873 (Währen, 1990; Stiles, y Holzapfel, 1997). Las BAL son bacterias Gram positivas. Tienen una pared celular muy gruesa, son inmóviles y no producen endosporas (Mestres, 2004), además son microaerófilas (Perry *et al.*, 2002).

Las BAL generalmente se restringen a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Vandamme *et al.*, 1996).

En general, las BAL son apreciadas como microorganismos responsables de la elaboración de productos fermentados como bebidas alcohólicas, ensilados, levaduras para la producción de cerveza, vinos (Parra, 2010; Almanza y Barrera, 1991), queso, mantequilla, yogurt y embutidos (Parra, 2010; Hugenholtz, 2008; Arribas y Polo, 2008), porque contribuyen en el sabor y textura e inhiben el crecimiento de otras bacterias por la producción de bacteriocinas y ácido láctico (Vandamme *et al.*, 1996). Sin embargo, también pueden convertirse en flora de deterioro principalmente en productos envasados al vacío y envasado en atmósfera protegida (MAP) debido a su carácter psicrótrofo.

Las BAL necesitan fermentar carbohidratos para crecer, convierten la glucosa fundamentalmente a ácido láctico (homofermentativas); o ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol o cuerpos cetónicos (heterofermentativas) (Vandamme *et al.*, 1996). En general, las BAL tienen ambos mecanismos de transporte, pero la importancia relativa de cada uno de ellos es muy variable, la característica esencial del metabolismo es la

eficiente fermentación de hidratos de carbono y compuestos relacionados, acoplado al nivel de fosforilación de sustrato (Axelsson, 1998).

Dependiendo del tipo de metabolismo, las BAL se han subdividido en: homofermentativas obligadas, heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas (Vandamme *et al.*, 1996), para cada una de las rutas catalizadas existen distintas enzimas. La energía liberada durante la transformación de moléculas más complejas en otras más sencillas de ATP es empleada por las bacterias para su desarrollo (Mestres, 2004), y en general se utiliza para los propósitos biosintéticos subsecuentes (Axelsson, 1998).

## 2.2 Fermentación láctica homofermentativa obligada

La glicólisis o ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Figura 1) es usada por las BAL (con excepción de *Leuconostoc*, el grupo de *Lactobacillus* III, *Oenococcus* y *Weissella*) es caracterizada por la formación de fructosa-1,6-difosfato (FDP), que es dividida por FDP aldolasa en dihidroxiacetona-fosfato (DHPA) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP). GAP y DHPA (vía GAP) entonces es convertida a piruvato en una secuencia metabólica incluyendo el nivel de fosforilación en dos sitios. Bajo condiciones normales, donde hay exceso de glucosa y el nivel de oxígeno es limitado, el piruvato es reducido a ácido láctico por NAD<sup>+</sup> que depende de lactato deshidrogenasa (nLDH), de este modo se lleva a cabo la reoxidación de NADH durante las primeras etapas de la glicólisis. El balance redox es obtenido de este modo, el ácido láctico es virtualmente el único producto terminal (Axelsson, 1998).

No pueden usar pentosas o gluconato (Vandamme *et al.*, 1996) y las enzimas clave que regulan este proceso son:

- Aldolasas responsables del paso de las hexosas difosfato a gliceraldehído-3P.
- Piruvatocinasa (PK), esencial para la formación del piruvato.

- Lactato deshidrogenasa (LDH), que cataliza el paso de piruvato a ácido láctico.

El metabolismo homofermentativo se puede resumir en la siguiente reacción:  
 $Lactosa + 4H_3PO_4 + 4 ADP \rightarrow 4 \text{ Ácido láctico} + 4 ATP + 3H_2O$

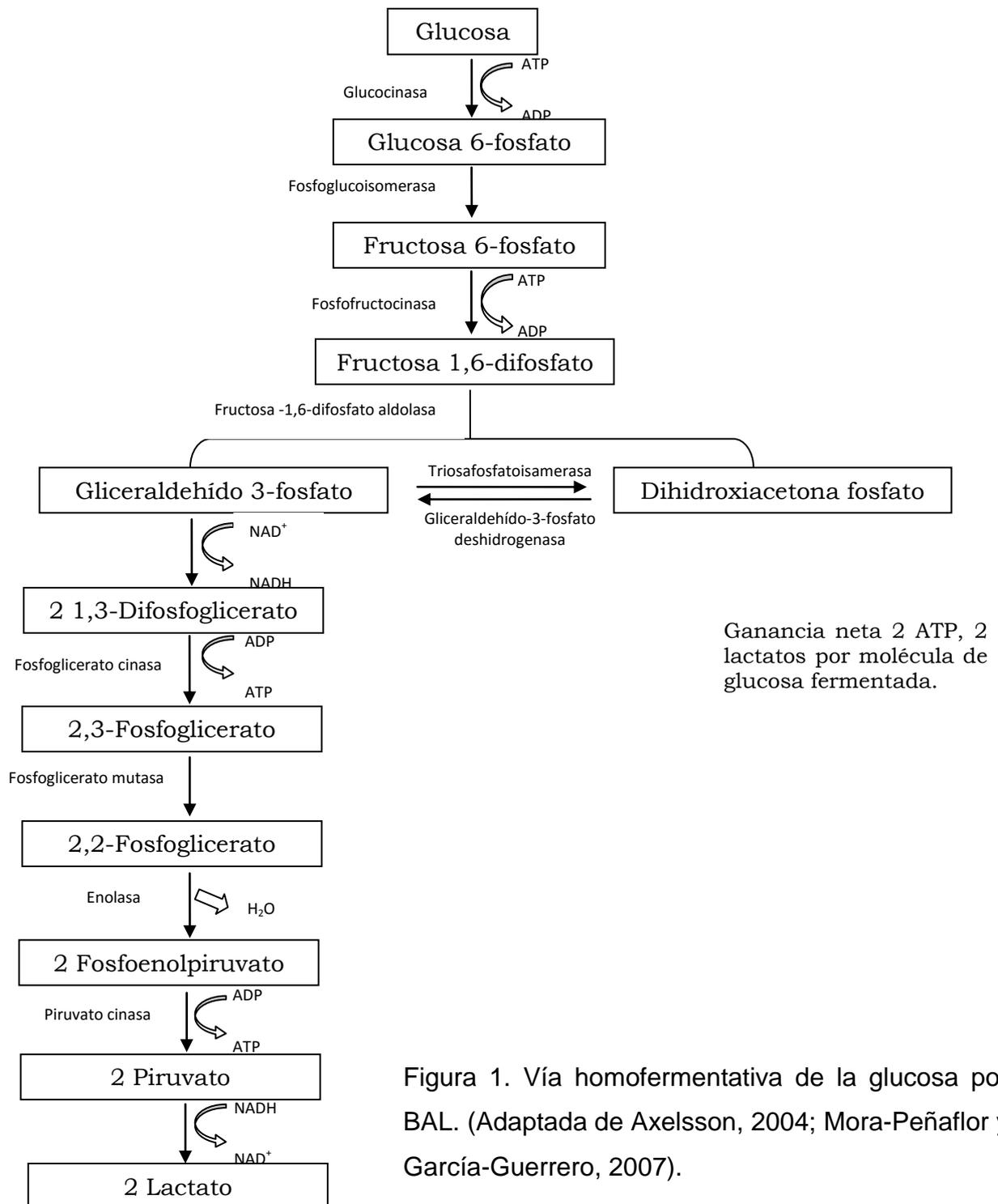


Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa por BAL. (Adaptada de Axelsson, 2004; Mora-Peñaflor y García-Guerrero, 2007).

### 2.3 Fermentación láctica heterofermentativa obligada

Las BAL heterofermentativas obligadas fermentan hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub> por la vía del fosfogluconato (Figura 2). Las pentosas son fermentadas a ácido láctico y ácido acético. En general, la pentosa fosfocetolasa involucra ambas vías (Vía EMP y de las pentosa fosfato) (Vandamme *et al.*, 1996). De acuerdo a Hammes y Vogel en 1995, un total de 22 especies de *Lactobacillus* se distribuyen en dos ramas filogenéticas: 16 especies han sido asignados al grupo (BAL heterofermentativas obligadas de la rama *Leuconostoc*), 5 de las cuales han sido recientemente transferidas al género *Weissella* (Collins *et al.*, 1993, Vandamme *et al.*, 1996, Axelsson, 1998) incluye a *Leuconostoc*, *Lactobacillus* grupo III, *Oenococcus* y *Weissella*.

Las BAL homofermentativas poseen las enzimas aldolasa y hexaisomerasa, pero carecen de fosfocetolasa; por lo que solo pueden fermentar azúcares mediante la vía EMP. Por otra parte, las BAL heterofermentativas, tienen fosfocetolasa pero no poseen ni aldolasa ni hexaisomerasa y, en lugar de degradar la glucosa por vía EMP, utilizan la vía 6-fosfogluconato o vía de las pentosas (Axelsson, 2004).

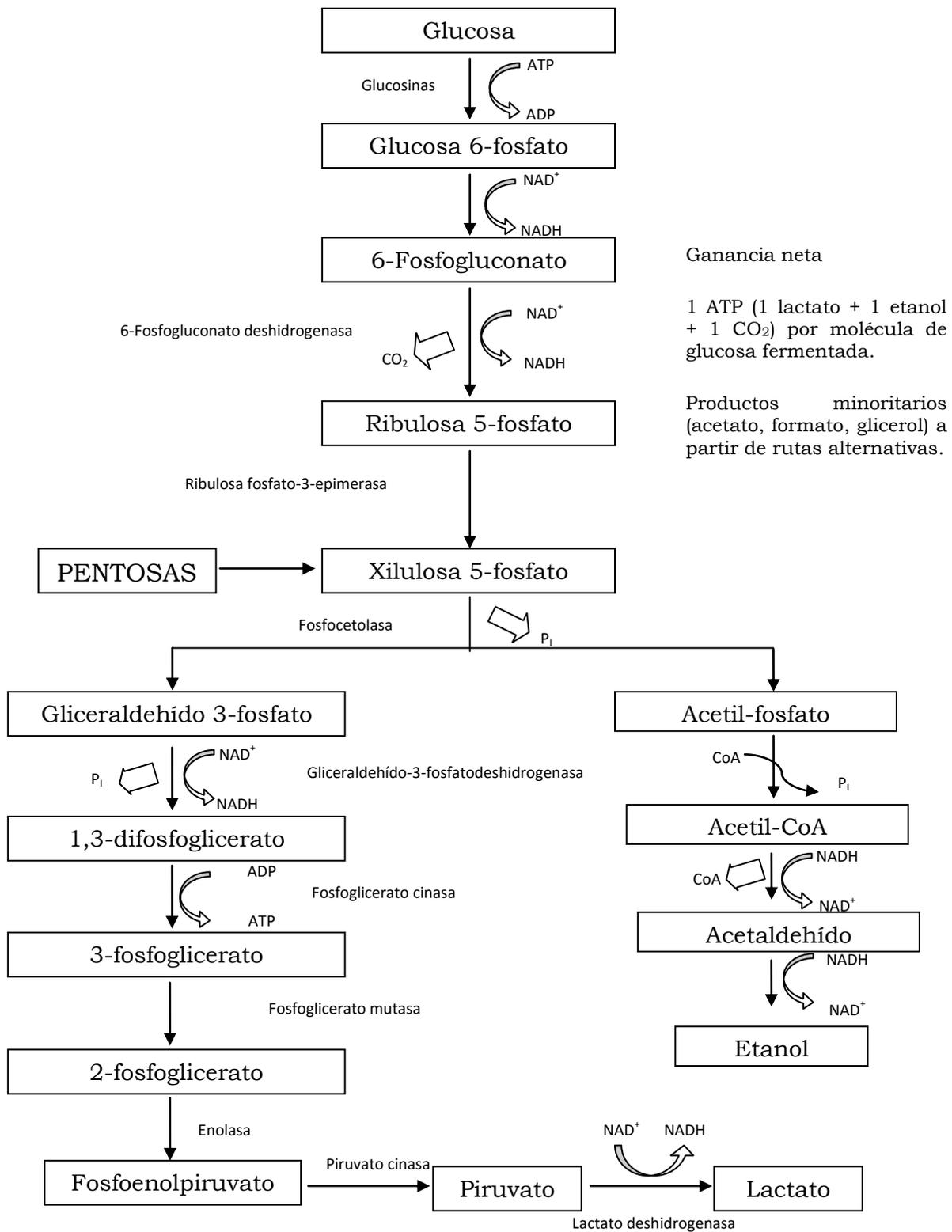


Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa de BAL heterofermentativas. (Adaptada de Axelsson, 2004; Mora-Peñaflor y García-Guerrero, 2007).

## 2.4 Fermentación láctica heterofermentativa facultativa

Axelsson (1998) señala que el grupo II de *Lactobacillus*, y varias especies de *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vaganococcus* son BAL heterofermentativas facultativas. La fermentación de hexosas es casi exclusivamente a ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas o bien a ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico en bajas concentraciones de glucosa (Vandamme *et al.*, 1996). Poseen una FDP aldolasa constitutiva, resultado de la glicólisis por la fermentación de hexosas (Axelsson, 1998).

Las bacterias lácticas heterofermentativas facultativas no pueden fermentar la lactosa por la vía glicolítica. La presencia de glucosa -6-P deshidrogenasa y de fosfocetalasa, permite el metabolismo por la ruta del 6-P gluconato. La fosfocetolasa hidroliza el 6-P- gluconato a CO<sub>2</sub> y pentosa-5-P, que a su vez se convierte en gliceraldehído-3-P y acetil-3-P.

El gliceraldehído-3-P se incorpora entonces a la vía glicolítica y el acetil-3-P es hidrolizado a etanol, si no existen otros aceptores de hidrógeno.

El metabolismo heterofermentativo se puede resumir en la siguiente reacción:



## 2.5 Género *Lactobacillus*

Phylum XIII: Firmicutes

Clase I: Bacilli

Orden II: Lactobacillales

Familia I: Lactobacillaceae.

## Género I: *Lactobacillus*

Clasificación del género *Lactobacillus* (Vos *et al.*, 2011).

En recientes revisiones a la filogenia de las bacterias ácido lácticas, se construyeron tres árboles filogenéticos usando matriz de distancia, parsimonia y análisis de máxima probabilidad. Los lactobacilos pueden ser divididos en tres grupos importantes: grupo de *Lactobacillus delbrueckii*, el grupo de *Lactobacillus casei-Pediococcus* y grupo de *Leuconostoc* (Vandamme *et al.*, 1996).

El porcentaje de similitud de 16S rRNA dentro de los dos grupos más importantes de lactobacilos varía desde 90.8% a 99.3% (grupo de *L. delbrueckii*) y 90.3 a 99.0% (grupo de *L. casei – Pediococcus*), mientras que el grupo de *Leuconostoc* registró una variación de 85.9 a 91.5% y 85.9 a 86.8% (Vandamme *et al.*, 1996).

El género *Lactobacillus* comprende 56 especies, cinco de las cuales contienen menos de dos subespecies. Las especies del género son bacilos Gram positivos que forman parte de la flora normal de la vagina, el tubo digestivo y la orofaringe de humanos y animales. Están ampliamente distribuidos en diversos ámbitos y en distintos alimentos, comprenden parte de la flora normal de muchas otras especies animales (Koneman y Allen, 2008).

Las células individuales de especies de *Lactobacillus* a menudo son largas y delgadas, algunas pueden observarse como coreniformes o cocobacilos más pequeños. Algunas especies pueden formar cadenas largas de células. La mayor parte de las especies son inmóviles. Más del 50% de los productos terminales de la fermentación de la glucosa es ácido láctico, algunas especies producen ácido acético, ácido fórmico y ácido succínico, junto con CO<sub>2</sub>. Son uniformemente catalasa negativos y oxidasa negativos, no reducen nitrato, no producen indol ni H<sub>2</sub>S y no licúan la gelatina. La pared celular contiene peptidoglucano grueso y ácidos teicoicos ligados a membrana (Koneman y Allen, 2008).

Son bacterias de morfología bacilar variando en su longitud y grosor (Madigan *et al.*, 2003). La mayoría de especies son homofermentadoras pero algunas son heterofermentadoras. Son comunes en todo tipo de derivados lácteos. Generalmente son más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta pH de 4. Por ello, son fácilmente aislables de una gran cantidad de hábitat por selección directa de medios, conteniendo azúcares y ácidos. La resistencia al pH les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aun cuando el pH haya caído tanto que otras bacterias lácticas ya no pueden crecer (Madigan *et al.*, 2003).

## **2.6 *Lactobacillus casei* Shirota**

Es una bacteria láctica, Gram positiva, no formadora de endosporas, anaerobia facultativa (crece de manera óptima en condiciones anóxicas), pero puede presentar crecimiento si la concentración de oxígeno es baja, debido a que posee enzimas como NADH oxidasa, NADH peroxidasa que minimizan la toxicidad de compuestos activados por el oxígeno (González *et al.*, 2004; Lozano, 2011).

El metabolismo de *L. casei* Shirota es heterofermentativo gracias a que posee una enzima llamada fosfocetolasa, que permite seguir la vía de las pentosas convirtiendo hexosas (principalmente glucosa) en pentosas y teniendo como productos finales una variedad de compuestos reducidos además de lactato, como ácido acético, etanol, bióxido de carbono y además, a partir de piruvato produce peróxido de hidrógeno (Boone y Castenholz, 2001).

Se considera una bacteria GRAS (generalmente reconocida como segura) y un microorganismo probiótico (Boone y Castenholz, 2001). Se le han comprobado beneficios como inhibir microorganismos patógenos (*Salmonella*, *Shigella* y *Helicobacter*), además de que previene los malestares intestinales, mantiene el balance de la microflora intestinal y disminuye la actividad enzimática fecal (Magariños *et al.*, 2008).

Algunos efectos clínicos que han reportado para *Lactobacillus casei* Shirota en el humano son: modulación de la flora intestinal (Aso y Akazan, 1992; Saarela *et al.*, 2000), efectos positivos en el cáncer superficial de vejiga y cáncer de cuello uterino (Tanaka y Ohwaki 1994; Saarela *et al.*, 2000), además no tiene ninguna influencia sobre el sistema inmunológico de personas sanas (Spanhaak *et al.*, 1998; Saarela *et al.*, 2000).

## 2.7 Probióticos

La palabra probiótico proviene de dos palabras griegas “προ” y “βίος” que significa “pro-vida o de por vida” y fue introducida como antónimo de la palabra “antibiótico”. La definición más aceptada en la actualidad es la dada por la FAO/WHO (2006), que considera los probióticos como microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedador.

Las características más importantes de un probiótico (Sanders, 2003; García-Ibarra, 2007) son:

- Debe pertenecer a la microflora de un tracto digestivo sano.
- Deber sobrevivir la vía digestiva superior.
- Ser capaz de sobrevivir y desarrollarse en el intestino.
- Producir efectos benéficos una vez adherido al intestino.
- Presentar resistencia a secreciones en el tracto digestivo (ácidos y bilis).
- Debe ser seguro para el consumo humano o en su caso del animal.
- Es necesario además contar con una la evaluación taxonómica, que identifique la especie, el fenotipo y la morfología de las BAL probióticas.

Varios factores como la acidez, contenido de oxígeno, concentraciones de ácido láctico y ácido acético afectan la sobrevivencia de los probióticos en los alimentos y en el tracto intestinal del huésped. Varios métodos han sido usados para mejorar la

viabilidad de los probióticos, incluyendo la adaptación al estrés, la incorporación de nutrientes y la microencapsulación (Rokka y Rantamäki, 2010).

Si los probióticos se añaden a los alimentos para estimular la inmunoregulación, es obligatorio que para facilitar su liberación en cierta área se produzca la señalización inmunológica. En la mayoría de los casos, esto se produce en el íleon donde se encuentran las placas de Peyer (Hartmann y Meisel, 2007; Vos *et al.*, 2010).

Las bases teóricas para la selección de microorganismos probióticos incluye la seguridad, aspectos funcionales y tecnológicos. La funcionalidad incluye la sobrevivencia, adherencia, colonización, producción de antimicrobianos, estimulación del sistema inmune, actividad antígenotóxica y prevención de patógenos, aspectos tecnológicos como crecimiento en lácteos, propiedades sensoriales, estabilidad, resistencia a fagos y viabilidad en el proceso (Saarela *et al.*, 2000).

## **2.8 Encapsulación**

Una microcápsula consiste en una membrana delgada y esférica semipermeable, que rodea a un núcleo sólido o líquido, con un diámetro variable (Rokka y Rantamäki, 2010).

La encapsulación es una tecnología en la que se aplica una barrera física para proteger los componentes bioactivos o microorganismos frente al ambiente y condiciones adversas (Vos *et al.*, 2010). La microencapsulación fue introducida originalmente en el área de la biotecnología como una matriz alrededor de las células, esto permite una rápida y eficiente separación de las células y los metabolitos producidos (Kailasapathy, 2002).

La microencapsulación (ME) ha sido definida por Champagne y Fustier (2007) como la tecnología de envolver materiales sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas cápsulas que liberen su contenido a una velocidad controlada durante períodos de

tiempo prolongados. Permite envolver físicamente ingredientes o materiales para proteger el material básico de reacciones adversas, pérdida por volatilidad o deterioro de los nutrientes (Hogan *et al.*, 2001). Promueve no sólo la viabilidad, sino también la funcionalidad (Vos *et al.*, 2010). La importancia del encapsulado radica en la capacidad protectora que puede brindarle al material que se encuentra en su interior ya sean moléculas aromáticas, enzimas o los microorganismos.

## **2.9 Métodos para encapsular**

Rokka y Rantamäki (2010) señalan a la emulsión, extrusión y secado por aspersión como las técnicas comúnmente más utilizadas en la microencapsulación de los probióticos.

Se han reportado varios métodos de microencapsulación de probióticos con alginato, se incluyen el secado por aspersión, extrusión, emulsificación y coacervación (Champagne y Fustier, 2007).

El método conocido como secado por aspersión (Figura 3), es un proceso físico que implica la atomización de una emulsión o suspensión del material a encapsular, da como resultado una rápida evaporación de agua. Las cápsulas se obtienen en forma de polvo (Rokka y Rantamäki, 2010), ha sido aplicado en moléculas bioactivas y en probióticos (Vos *et al.*, 2010). Es la técnica de microencapsulación más comúnmente empleada en la industria alimentaria (Gibbs, *et al.*, 1999; Hogan *et al.*, 2001). El principio se basa en la dispersión de una solución de la matriz elegida sobre el núcleo. La dispersión se realiza atomizando con aire caliente, esto último promueve la eliminación rápida del disolvente (agua). Posteriormente, las partículas se separan en el aire de secado. Sin embargo, tiene algunas desventajas importantes, las altas temperaturas que se requieren durante el proceso no son favorables para la supervivencia de todos los tipos de probióticos (Vos *et al.*, 2010).

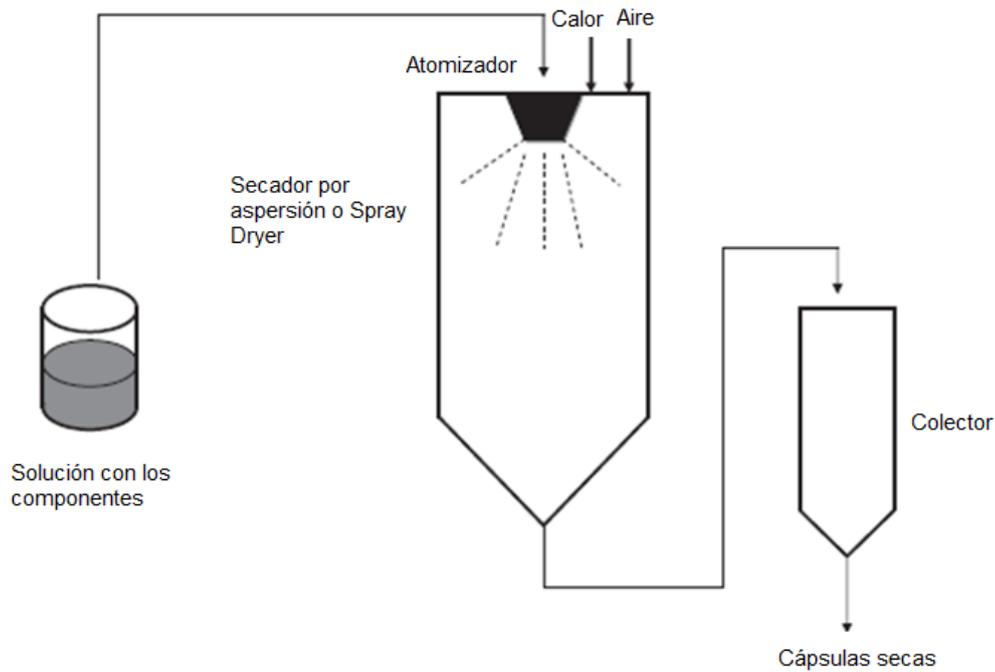


Figura 3. Presentación esquemática del procedimiento secado por aspersión. Tomado de Vos *et al.*, 2010.

La aspersión por enfriamiento o liofilización aplica un principio opuesto al secado por aspersión. En este método también se realiza la dispersión de una matriz y el producto. Hasta ahora sólo se ha aplicado para productos secos con la finalidad de conservar enzimas, aromas, minerales y proteínas. La liofilización en combinación con moléculas de la matriz ha sido propuesta como una alternativa para el secado por pulverización (Augustin y Hemar, 2009).

La extrusión (Figura 4) es el enfoque más antiguo y más común para hacer cápsulas con hidrocoloides (King, 1995). Consiste en preparar una solución del hidrocoloide con los microorganismos, la extrusión se realiza dejando gotear la solución a través de una jeringa en una solución endurecedora. El tamaño y forma de las perlas dependen del diámetro de la aguja y la distancia de caída. Es el método más popular debido a su facilidad, simplicidad, bajo costo y condiciones de formulación suaves que garantizan una alta retención de la viabilidad celular (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

El método de emulsificación (Figura 4) se define como el proceso de dispersión de un líquido en un segundo líquido inmiscible, se puede encapsular el componente incluyendo el núcleo del material en el primer líquido. Dependiendo del tipo de moléculas para formar la emulsión, podemos producir una emulsión simple o muy compleja (Vos *et al.*, 2010). Esta técnica tiene un potencial para la producción a gran escala de cápsulas en corto tiempo (Takei *et al.*, 2009).

Para la técnica de emulsificación/gelificación externa, un polímero en solución acuosa se dispersa en la fase de aceite para formar la emulsión W/O, después se adiciona la solución de cloruro de calcio para la gelificación y encapsulación (Homayouni *et al.*, 2008; Mokarram *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2013). El tamaño de la partícula no puede ser bien controlado y las partículas tienden a coagular en grandes masas antes de adquirir la consistencia apropiada. Además, el tamaño de la partícula que se obtiene es grande (entre 400  $\mu\text{m}$  y 1 mm) (Villena *et al.*, 2009)

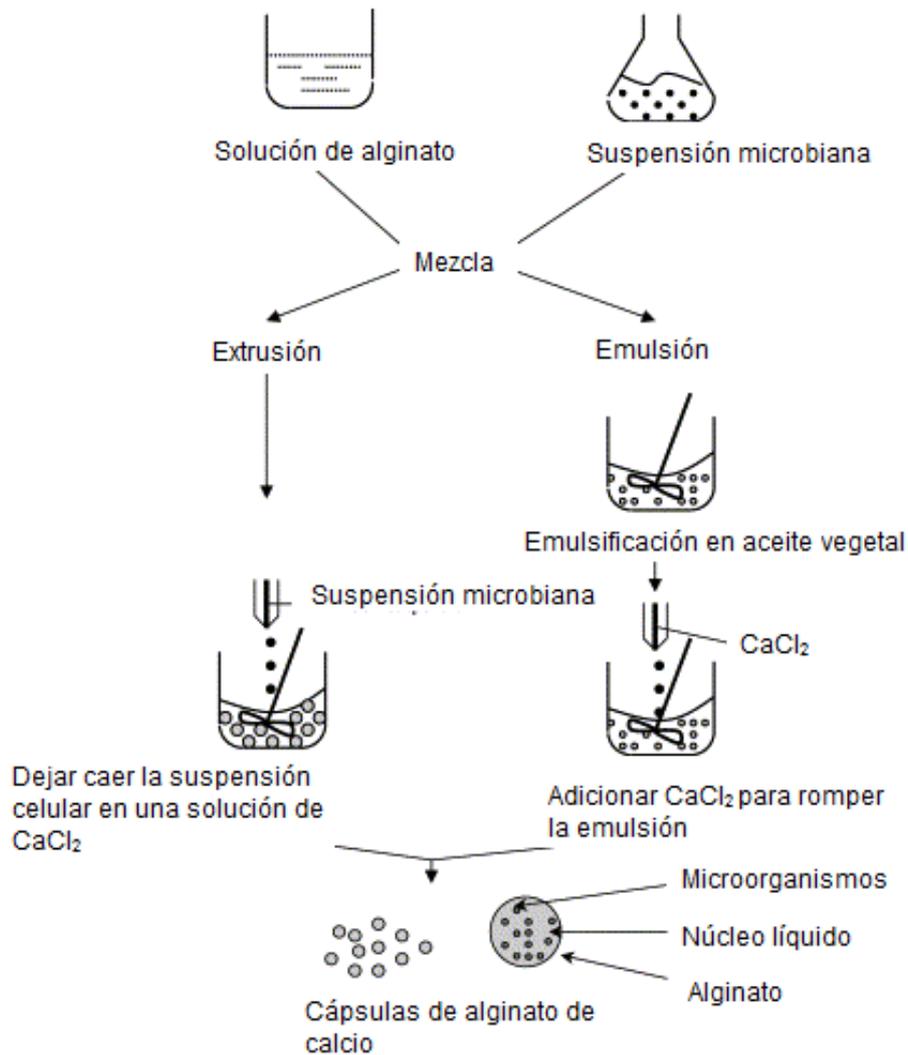


Figura 4. Diagrama de las técnicas de encapsulación extrusión y emulsión. Tomado de Krasaekoopt *et al.*, 2003.

Para la técnica de emulsificación/gelificación interna, la sal insoluble de calcio se adiciona a la solución de alginato y se mezclan, se agrega aceite para formar la emulsión. Posteriormente se acidifica para la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  para el entrecruzamiento con alginato (Poncelet *et al.*, 1992)

Por otra parte, la coacervación es una técnica modificada de la emulsificación que consiste en la separación de fases fluido-fluido de una solución polimérica acuosa. En el proceso, los cambios en el pH resultarán en la formación del recubrimiento por

un polímero complejo (Rokka y Rantamäki, 2010). Cuando una solución de componentes bioactivos se mezcla con una matriz de moléculas con carga opuesta, se forma un complejo, el cual se debe principalmente a la interacción electrostática y también a las interacciones hidrofóbicas involucradas (Augustin y Hemar, 2009, Girard *et al.*, 2004; Laneuville *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2010). El tamaño de las cápsulas obtenidas y las características de las mismas pueden variar, ya sea cambiando el pH, la concentración de iones, la relación de las moléculas de la matriz y el componente bioactivo. Es propuesto y aplicado a moléculas bioactivas de los alimentos, saborizantes y aceites (Vos *et al.*, 2010).

En los últimos estudios, la microencapsulación ha demostrado ser uno de los métodos más potentes para mantener alta viabilidad y estabilidad de las bacterias probióticas, ya que protege probióticos tanto durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos como así como en las condiciones gástricas (Rokka y Rantamäki, 2010).

## **2.10 Matrices de encapsulamiento**

A un grupo de tecnologías de encapsulación se denomina matriz de encapsulación porque las microcápsulas carecen de un núcleo, pero posee una serie de partículas en la superficie, sin embargo, las propiedades obtenidas a menudo son suficientes para lograr la liberación retardada del ingrediente. Los materiales utilizados para la microencapsulación de probióticos incluye polisacáridos procedentes de algas marinas (carragenina, alginato), de plantas (almidón y sus derivados, goma arábica), de bacterias (gelano, xantana) y proteína animal (leche o gelatina) (Rokka y Rantamäki, 2010). Los carbohidratos usados ampliamente para la encapsulación son la maltodextrina, almidón, jarabes sólidos de maíz (Jackson y Lee, 1991; Shahidi y Han, 1993; Higan *et al.*, 2001).

Los cereales pueden ser utilizados como sustratos fermentables para el crecimiento de microorganismos probióticos. Los componentes de los cereales, como el

almidón, pueden ser utilizados como materiales de encapsulación de probióticos con el fin de mejorar su estabilidad durante el almacenamiento y mejorar su viabilidad durante su paso por el tracto gastrointestinal (Charalampopoulos *et al.*, 2002)

Una mezcla de gelatinas y goma xantana fue empleada por McMaster *et al.* (2005) para *Bifidobacterium lactis*. En el trabajo optaron por utilizar gelatina (0,75%) y xantana (1%) para la inmovilización del probiótico.

Las proteínas del suero de la leche son vehículos naturales para prebióticos y probióticos. Muchas de sus propiedades estructurales y fisicoquímicas facilitan su funcionalidad en los sistemas de entrega. Estas propiedades incluyen la unión de iones y moléculas pequeñas, excelentes propiedades de la superficie y el auto-ensamblaje, excelentes propiedades de gelificación, pH sensible, comportamiento de hinchamiento del gel, útil para la liberación programable, las interacciones con otras macromoléculas para formar complejos y conjugados con combinaciones sinérgicas de propiedades, además de las diferentes capacidades de protección. En un estudio con *Lactobacillus plantarum*, se mostró que el recubrimiento de suero de leche mejora de manera significativa la supervivencia bacteriana en perlas de alginato (Komenan *et al.*, 2009).

El alginato es un polisacárido natural derivado o extraído de algas pardas, para la formación de microcápsulas, se pueden producir geles de alginato por gelificación externa (Cook *et al.*, 2011). Se ha utilizado ampliamente para la inmovilización de las BAL debido a su facilidad de manejo, su naturaleza no tóxica y su bajo costo; se ha empleado para la microencapsulación de *Bifidobacterium* sp. y su incorporación en productos (Sultana *et al.*, 2000), y también en la microencapsulación de *Lactobacillus acidophilus* (Laelorspoen *et al.*, 2014).

## 2.11 El maíz

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia Poaceae (Gramíneas), es la única especie cultivada del género (FAO, 2001).

La familia Poaceae (comprende más de 600 géneros); incluye cinco especies de México y Centroamérica: *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis* y *Zea mays* L., ésta última es la especie a la que corresponde el maíz y se agrupa en cuatro subespecies: *Zea mays* (Kato *et al.*, 2009).

La planta de maíz es alta, con abundantes hojas y un sistema radical fibroso, normalmente con un solo tallo que tiene hasta 30 hojas. Algunas veces se desarrollan una o dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta; estas terminan en una inflorescencia femenina la cual se desarrolla en una mazorca cubierta por hojas que la envuelven; es la parte de la planta que almacena reservas. La parte superior de la planta termina en una inflorescencia masculina o panoja; esta tiene una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas, todas las que producen abundantes granos de polen (Paliwal, 2001). Es una especie que se reproduce por polinización cruzada. (Burge y Duesing, 1989).

El grano o fruto del maíz es una cariósida. La pared del ovario o pericarpio está fundida con la cubierta de la semilla o testa y ambas están combinadas conjuntamente para formar la pared del fruto (Paliwal, 2001).

Es una planta C4 con una alta tasa de actividad fotosintética (Aldrich *et al.*, 1975; FAO, 2011).

El maíz presenta una gran variabilidad en el color del grano, textura, composición y apariencia. Puede ser clasificado en distintos tipos según: a) la constitución del endospermo y del grano; b) el color del grano; c) el ambiente en que es cultivado; la madurez, y e) su uso (FAO, 2011).

Este grano es de gran importancia económica para la elaboración de productos nixtamalizados (tortillas y botanas), así como de materia prima de un gran número de productos industriales (Olguin-Arteaga, 2014). El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2013) estima que existen más de 800 productos derivados del maíz y también se utiliza como alimento para animales.

La industria molinera del maíz tiene como objetivo producir endospermo quebrado, sémolas y harinas de diferentes granulometrías (Quintanar *et al.*, 2009).

Entre los diversos tratamientos que se realizan al grano de maíz se incluyen molienda seca, molienda en húmedo y nixtamalización.

El grano de maíz duro o cariósido se divide en tres partes fundamentales: pericarpio, endospermo y germen.

La composición química entre las principales partes del grano de maíz difiere considerablemente. Así el pericarpio se caracteriza por su alto contenido en fibra (86%), la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa, celulosa y lignina. El endospermo contiene un nivel elevado de almidón (87%) y aproximadamente un 8% de proteínas, con un contenido relativamente bajo en lípidos. Por último, el germen se caracteriza por su elevado contenido de lípidos (33%), un nivel de proteínas 20% y 10.5% de minerales (Watson 1987; Burge y Duensing, 1989; Tovar-Benítez, 2008). El endospermo es de dos tipos: vítreo y harinoso. El endospermo harinoso rodea el germen y es opaco, la matriz proteica es delgada a su alrededor, mientras que en el endospermo vítreo la matriz es más gruesa. Los cuerpos proteicos constituyen el 8% del endospermo, son redondos y están compuestos casi en su mayoría por zeína (Serna-Saldivar *et al.*, 1988; Watson, 1987, Pérez-Xochipa, 2009).

Las proteínas no se encuentran de manera uniforme dentro del maíz, aproximadamente el 80% son de almacenamiento y de reserva. Estas pueden extraerse en una sucesión de disolventes según sus propiedades de solubilidad, de acuerdo a lo propuesto por Osborne en 1909 (Bemiller *et al.*, 1984, Tovar-Benítez,

2008). Dentro de estas proteínas se encuentran las prolaminas, esta fracción proteica adquiere distintos nombres según el cereal, en el maíz se llama zeína (Bemillier *et al.*, 1894; Serna, 2001; Tovar-Benítez, 2008). Osborne reconoció que las proteínas de cereales solubles en alcohol constituyen un grupo distinto, y les dio el nombre de prolaminas, el cual refleja sus altos contenidos de prolina y glutamina. Las prolaminas se encuentran empaquetadas en pequeños cuerpos proteínicos en el endospermo amiláceo y no se les conoce otra función además de la de almacenamiento (Pérez-Xochipa, 2009).

## 2.12 Zeína

La zeína es una prolamina del maíz, comprende a un grupo de proteínas solubles en alcohol que presentan la característica de ser insolubles en agua (Shukla y Cheryan, 2001; Gómez-Estaca *et al.*, 2012). Es una de las biomacromoléculas más estudiadas y está clasificada como GRAS (Generalmente Reconocida como Segura) por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos) (Chen *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012).

Las zeínas se encuentran en el endospermo del maíz, localizados en cuerpos proteicos dentro del retículo endoplásmico rugoso (Hurkman *et al.*, 1981; Larkins y Hurkman, 1978; Pérez-Xochipa, 2009), comprenden el 50% de las proteínas del endospermo y cerca del 60% de las proteínas totales del grano entero. Son altamente hidrofóbicas, ya que presentan una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos como leucina, prolina, alanina y fenilalanina (Gianazza *et al.*, 1977; Pérez-Xochipa, 2009). Por lo tanto, la zeína tiene propiedades de barrera de humedad, lo que le permite su uso como protector de alimentos (dulces, nueces y frutas secas) y como cubierta para tabletas farmacéuticas (Larkins *et al.*, 1984; Coleman y Larkins, 1999; Pérez-Xochipa, 2009) y recientemente se ha empleado para encapsular hidrocortisona y mesalazina (Esther *et al.*, 2013), oleorresina (Xue *et al.*, 2013), aceite de pescado (Zhong *et al.*, 2009),  $\alpha$ -tocopherol (Luo, *et al.*, 2011),

aceites esenciales (Wu *et al.*, 2012), aceite de linaza (Quispe-Condori, Saldaña y Temelli, 2011).

Esen (1986) extrajo fracciones de zeína de la harina del endospermo del maíz. En la primera extracción se utilizó una solución (v/v) de 60% de 2-propanol con 1% de 2-mercaptoetanol, seguida de una extracción con 90% de 2-propanol (v/v).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La zeína es una proteína que se encuentra mayoritariamente en el endospermo del maíz, y recientemente se ha empleado como película o recubrimiento comestible (PRC) con la intención de mejorar la calidad y aumentar la vida útil del alimento. En este trabajo se plantea el uso de zeína extraída de un subproducto de molienda del maíz como encapsulante de microorganismos probióticos combinado con alginato. La encapsulación es una tecnología en la que se aplica una barrera física para proteger los microorganismos. La finalidad es encapsular microorganismos probióticos en una matriz que les asegure viabilidad durante el proceso de encapsulado, y posteriormente les permita llegar en cantidades adecuadas al intestino para proporcionar beneficios en la salud del hospedero. A pesar de que la zeína ha sido utilizada como encapsulante de alimentos y moléculas de interés farmacéutico y alimentario, su solubilidad en alcohol e insolubilidad en agua hace que sea difícil de utilizar para el encapsulamiento de microorganismos. Sin embargo las características de impermeabilidad al agua, resultan de interés para utilizarlo en combinación con otros compuestos como el alginato y así mejorar la viabilidad de las microcápsulas de probióticos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad de la zeína extraída a partir de un subproducto de la molienda del maíz, para ser utilizado como encapsulante en microorganismos probióticos.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Aislar, purificar y conservar el probiótico a encapsular.
- Caracterizar y acondicionar el subproducto.
- Extraer y cuantificar la zeína a partir del subproducto.
- Elaborar microcápsulas con alginato y alginato más zeína por el método de emulsificación/gelificación externa considerando dos velocidades de homogeneización.
- Evaluar la eficiencia del tratamiento en la viabilidad de los microorganismos.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Aislamiento, purificación y conservación del microorganismo probiótico

El probiótico a encapsular fue *Lactobacillus casei* Shirota el cual se aisló a partir de un producto comercial.

Para el aislamiento se tomaron asadas del producto comercial y se sembraron por estría en placas de agar MRS (Oxoid) incubando a 30 °C por 48-72 h. Posteriormente, se realizaron dos resiembras por estría en placas con medio de cultivo MRS e incubaron a 30 °C por 48-72 h. A partir de colonias aisladas se realizaron inóculos en tubos con caldo MRS (Difco). Tras comprobar que las colonias presentaban características homogéneas se verificó que eran BAL mediante Tinción de Gram (5.1.1), prueba catalasa (5.1.2) y prueba de la oxidasa (5.1.3).

Para asegurar su pureza, se realizaron dos siembras por estría en placas con medio de cultivo MRS. De nuevo, las placas se incubaron a 30 °C por 48-72 h. A partir de colonias aisladas en las placas con medio MRS se realizaron inóculos en tubos con caldo MRS por 24 h a 30 °C para tener una población aproximada de  $1 \times 10^9$  UFC/mL. La bacteria se conservaba en caldo MRS en condiciones de refrigeración (menor a 8 °C) realizando resiembras en caldo MRS cada 15 días y verificando su pureza.

#### 5.1.1 Tinción de Gram

Para verificar la pureza del cultivo se realizó una tinción de Gram. Se realizó un frotis colocando una gota del caldo MRS donde se cultivó la cepa en un portaobjetos y se fijó a la flama. La muestra fijada se cubrió con cristal violeta, se dejó reaccionar por un min, se retiró el exceso del colorante y se lavó con agua corriente. En seguida se

aplicó la solución de yodo, se dejó reaccionar por un min y se lavó con agua corriente. Se agregó una mezcla de alcohol-acetona (70:30) gota a gota sobre el portaobjetos inclinado con la muestra, se dejó reaccionar por un min.

Se agregó safranina a la muestra sobre el portaobjetos y se dejó reaccionar por 10-20 s, se lavó el exceso de colorante y se dejó secar. La muestra se observó al microscopio óptico. La muestra presentó color azul confirmando que se trata de bacterias Gram Positivas (INCB, 1993).

### **5.1.2 Prueba de la catalasa**

Para realizar la prueba, se tomó con el asa estéril una colonia de BAL, se colocó la colonia directamente sobre un portaobjetos y se le agregó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se observó para ver alguna reacción.

### **5.1.3 Prueba de la oxidasa**

Con el reactivo para oxidasa: clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% se impregno un cuadro de 3 x 3 cm de papel filtro. Se tomó con el asa de siembra estéril una colonia de la placa de agar, se colocó sobre el sustrato de papel y se extendió cuidadosamente. Se dejó reaccionar 1 min para observar algún cambio de coloración.

## **5.2 Acondicionamiento y modificación del subproducto**

La zeína se extrajo de un subproducto de la molienda del maíz proporcionado por la empresa Agroindustrial Queretana. Se recibieron 2 Kg de subproducto que proviene de la primera etapa de producción de molienda húmeda del maíz. Antes de extraer

la zeína se caracterizó la composición del subproducto, para ello se determinó humedad (5.2.1), grasa (5.2.2) y proteína (5.2.3).

### **5.2.1 Determinación de humedad**

La prueba se basó en cuantificar la pérdida de agua por el método 930.15 de la AOAC (1995). Para la determinación del porcentaje de humedad se usaron charolas de aluminio a peso contante. Se pesaron con precisión 5 g de harina, se llevaron a la estufa de secado a  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 h. Posteriormente, las charolas con la muestra se enfriaron en un desecador hasta peso constante. Por diferencia de peso se obtuvo el porcentaje de humedad. La muestra se analizó por triplicado.

### **5.2.2 Determinación de grasa**

El porcentaje de grasa en la harina se determinó por gravimetría con Soxhlet de acuerdo al método 963.15 de la AOAC (1995) utilizando éter de petróleo. En primer lugar, se pesaron 2.5 g de harina en matraces de fondo redondo y se dejaron por seis horas en el equipo Soxhlet. Tras la extracción de la grasa, se llevaron los matraces a la estufa de secado para evaporar los restos del solvente. Los matraces con grasa se enfriaron, por diferencia de peso se obtuvo el porcentaje de grasa en la harina, la muestra se analizó por triplicado.

### **5.2.3 Determinación de proteína**

El contenido de proteína se determinó por el método de Dumas ( $\text{N} \times 6.25$ ), en el equipo autoanalizador LECO FP-528 (LECO, Corporation, St Joseph, USA). En este caso, primero se pesaron muestras de 0.1 g de subproducto desengrasado sobre una cápsula especial y se incorporaron a la cámara de combustión a  $850\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La liberación de Nitrógeno se lleva a cabo en la cámara y éste es transportado por Helio

hacia una celda de termconductividad y un microprocesador donde se realizan los cálculos y control de parámetros operativos.

El tiempo de análisis de una muestra es de aproximadamente 3-4 minutos. Los resultados se expresaron como % de proteína. La muestra se midió por triplicado.

Tras la caracterización se procedió al desengrasado de la muestra. Para ello, un total de 300 g del subproducto se desengrasaron con hexano en una relación (1:10) en lotes 100 g. Así pues, muestras de 100 g de subproducto se adicionaron a 900 ml de hexano y se mantuvieron con agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min para recuperar la harina desengrasada, este paso se realizó por triplicado para cada muestra. El subproducto de molienda de maíz desengrasado se secó durante toda la noche a 40 °C para evaporar los residuos de hexano.

Además, se redujo el tamaño de partícula al subproducto desengrasado con un molino para café (Hamilton Beach Brands, Inc., USA), pasando las muestras por un tamiz FIC. malla número 100, que presenta un diámetro de 150 µm.

### **5.3 Extracción y cuantificación de zeína**

Tras la caracterización del subproducto, se procedió a extracción de zeína a partir de 300 g del subproducto desengrasado y tamizado, siguiendo la metodología descrita por Rojas-Molina *et al.* (2008) (Tabla 1). Previo a la extracción de prolaminas (zeína), es necesario retirar las fracciones de proteínas solubles en agua y en solución salina.

Tabla 2. Secuencia de la extracción de fracciones proteicas hasta las Prolaminas (zeína).

| Proteína                              | Solución         | Proporción de subproducto: solución | Tiempo de agitación (min) |
|---------------------------------------|------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Globulinas                            | NaCl 0.05 M      | 1:10                                | 30                        |
|                                       |                  | 1:5                                 | 30                        |
| Albúminas solubles en solución salina |                  |                                     |                           |
| Albúminas                             | H <sub>2</sub> O | 1:10                                | 15                        |
|                                       |                  | 1:5                                 | 15                        |
| Prolaminas (Zeína)                    | 2-Propanol 55%   | 1:10                                | 30                        |
|                                       |                  | 1:5                                 | 15                        |
|                                       |                  | 1:5                                 | 15                        |

La extracción de las proteínas (Figura 5) se realizó secuencialmente en lotes de 50 g, por lo que se realizaron 6 extracciones. Primero se extrajeron globulinas (proteínas solubles en solución salina) y albúminas solubles en solución salina, para lo cual se empleó una solución de NaCl 0.5 M en una proporción de 1:10 (peso harina/ volumen de solución salina), se agitó constantemente en una parrilla de agitación magnética a 4 °C durante 30 min.

La mezcla se ultracentrifugó en el equipo Optima XL-100 K Ultracentifuge (Beckman Coulters, USA) a 15000 rpm durante 5 min.

Posteriormente, se recuperaba el sobrenadante y se almacenaba en contenedores de plástico. Con el precipitado se procedió a una segunda extracción de globulinas 1:5 (peso del precipitado/ volumen solución salina), el sobrenadante se recuperó en el contenedor de plástico.

Al precipitado se le realizó la extracción de la siguiente fracción proteica correspondiente a albúminas (proteínas solubles en agua), a una proporción 1:10 con agua desionizada, se mantuvo en agitación constante a 4 °C durante 15 min, después se ultracentrifugó a 15000 rpm por 5 min, la segunda extracción de albúminas se realizó a una proporción de 1:5 a 4 °C durante 15 min en agitación constante, se ultracentrifugó a 15000 rpm durante 5 min, de manera similar que con las globulinas, la fase líquida se almacenó en contenedores de plástico.

Para la extracción de esta fracción proteica se utilizó una solución de 2-propanol al 55% (p/p) sin el 0.6% (v/v) de 2-ME, en tres tiempos: la primera extracción se realizó en una proporción 1:10 (peso harina/ volumen solución de 2-propanol) durante 30 min de agitación a temperatura ambiente. La segunda y tercera extracción de zeína se hizo en una proporción de 1:5 durante 30 min de agitación a temperatura ambiente. La fase líquida se recuperó y se llevó a la campana de extracción de vapores, y se procedió a dializar.

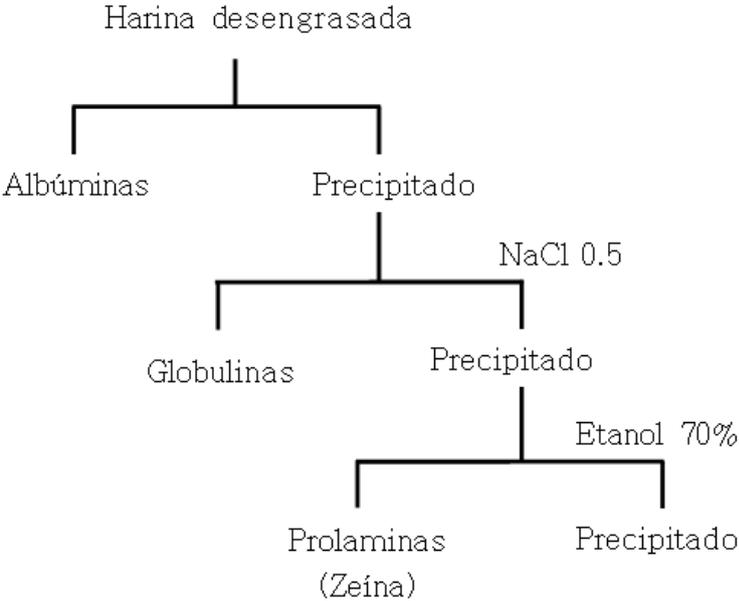


Figura 5. Fraccionamiento de las proteínas de maíz (Badui, 1990) de acuerdo a su solubilidad, se observa hasta la extracción de zeína.

### **5.3.1 Diálisis y secado de zeína**

La diálisis se realizó utilizando membrana porosa Spectra/pore (Spectrum Medical Industries, Inc., Canadá) con tamaño de poro de 3500 Da, empleando agua desionizada como solución de concentración menor. El cambio de agua se realizó hasta que la conductividad permaneció constante. Una vez que el extracto de zeína estuvo dializado se congeló y almacenó a -80 °C para liofilizar posteriormente. La liofilización se llevó a cabo en el equipo Labconco Freeze dry system/fireezone 4. (Labconco, USA).

## **5.4 Microencapsulación del probiótico por el método de emulsificación/gelificación externa**

Se realizaron dos tipos de microencapsulaciones: la primera con alginato (A) y la segunda con una mezcla de alginato y zeína (AZ).

### **5.4.1 Microencapsulación con alginato de sodio (A)**

Se elaboraron microcápsulas de alginato por el método de emulsión/gelificación externa (Song *et al.*, 2013). La microencapsulación en alginato se realizó utilizando una solución acuosa de alginato de sodio (Sigma Aldrich) 1.5% (p/v) y una solución de CaCl<sub>2</sub> (J. T. Baker) 0.05 M.

Para ello un cultivo de 24 h de BAL se centrifugó y lavó una vez con una solución salina estéril al 0.85%, el pellet se resuspendió en 5 ml de peptona (Bioxon) 0.1% (Rodklongtan *et al.*, 2014).

Para desarrollar el sistema de emulsión se usaron 20 ml de aceite vegetal conteniendo 0.5% de Tween 80 (Sigma Aldrich), y la mezcla se agitó por 30 min a 500 rpm. En una proporción de 4:1 se mezclaron 4 ml de la solución de alginato de sodio (1.5 % p/v) con 1 ml del cultivo de probióticos anteriormente descrito, y se

agitó durante 20 min a 500 rpm. La mezcla alginato-probióticos se dejó gotear lentamente sobre el aceite sometido a homogeneización en IKA ULTRA TURRAX T18 digital (IKA, USA). Se probaron dos velocidades de homogeneización 2800 rpm y 4000 rpm por 5 min (Ding y Shah, 2009ab). Posteriormente, la emulsión se pasó a agitación magnética (Benchmark Scientific, USA) para romper dicha emulsión con  $\text{CaCl}_2$  a 500 rpm por 30 min. Las microcápsulas se recuperaron por centrifugación a 1000 rpm por 5 min. La fase aceitosa fue retirada, las microcápsulas se lavaron con una solución de peptona (0.1%(p/v)) y Tween 0.3% (p/v), se filtraron en papel Whatman No. 1 (GE Healthcare) y se pesaron. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

#### **5.4.2 Microencapsulación con alginato de sodio y zeína (AZ)**

Las microcápsulas se formaron con alginato y 1% de zeína.

El cultivo de BAL se centrifugó y lavó una vez con una solución salina estéril al 0.85%, el pellet se resuspendió en 5 ml de peptona (Bioxon) 0.1% (Rodklongtan *et al.*, 2014).

Para desarrollar el sistema de emulsión se usaron 20 ml de aceite vegetal conteniendo 0.5% de Tween 80 (Sigma Aldrich), y la mezcla se agitó a 500 rpm por 30 min. En una proporción de 4:1 se mezclaron 4 ml de la solución acuosa de alginato de sodio con 1% de zeína más 1 ml del cultivo de probióticos, se agitó durante 20 min a 500 rpm. La mezcla alginato-zeína y probióticos se dejó gotear lentamente sobre el aceite sometido a homogeneización en IKA ULTRA TURRAX T18 digital (IKA, USA). Se probaron de nuevo dos velocidades de homogeneización 2800 rpm y 4000 rpm por 5 min. Posteriormente, la emulsión se pasó a agitación magnética a 500 rpm (Benchmark Scientific, USA) para romper dicha emulsión con  $\text{CaCl}_2$  por 30 min. Las microcápsulas se recuperaron por centrifuga a 1000 rpm por 5 min. La fase aceitosa fue retirada, las microcápsulas se lavaron con una solución de peptona (0.1%) y Tween 0.3%, se filtraron en papel Whatman No. 1 (GE Healthcare) y se pesaron. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

## 5.5 Evaluación de la eficiencia de encapsulamiento

La evaluación de la eficiencia de encapsulamiento se realizó por cultivo de los microorganismos atrapados en las microcápsulas frente a la población microbiana inicial considerada. Para romper las microcápsulas y liberar las bacterias lácticas atrapadas en ellas se utilizó una solución Buffer Fosfato 0.1 M pH 7 de un peso conocido de microcápsulas. Posteriormente, se realizaron las diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-6}$  UFC) para el sembrado en placas con agar MRS (Sheu y Marshall, 1993) e incubando a 30 °C por 48-72 h.

La eficiencia de la microencapsulación (ME), que es un indicador tanto de la eficacia de la encapsulación como de la sobrevivencia de las bacterias durante el proceso de encapsulación, se calculó con la siguiente fórmula:

$$ME (\%) = N/N_i \times 100$$

Donde N es el número de bacterias liberadas desde las cápsulas (log UFC/gramo de cápsulas) y  $N_i$  es el número inicial de bacterias adicionado a la solución encapsulante (log CFU) (Rodklongtan, 2014).

La morfología de las cápsulas de alginato y de alginato-zeína se observó a través de un microscopio óptico Olympus Modelo CH 30 (Olympus, Japón). Se obtuvieron fotografías con los objetivos 4X y 40X por medio de una cámara Olympus (Olympus Europa, Japón) acoplada al sistema.

## 5.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos se expresaron en como media y desviación estándar. Para analizar los resultados obtenidos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.1, con el fin de determinar si existían diferencias entre los distintos tratamientos de microencapsulación.

Para identificar las muestras significativamente diferentes, se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Verificación de pureza del cultivo de BAL

Al realizar la tinción de Gram a las bacterias aisladas se presentó coloración azul a violeta (Figura 6), confirmando que se trata de bacterias Gram positivas. La diferencia de tinción entre Gram positivas y Gram negativas radica en la resistencia de la bacteria a la decoloración y refleja las diferencias de estructura de pared bacteriana, al tratar a las bacterias así teñidas con alcohol, las Gram positivas no se decoloran porque su pared de peptidoglicano es gruesa, contiene pocos lípidos y dificulta la penetración de alcohol que pudiera extraer el colorante. Por el contrario, las Gram negativas, tienen una pared de peptidoglicano más delgada, recubierta por una envoltura de composición fundamentalmente lipídica (Macarulla y Goñi, 1994).

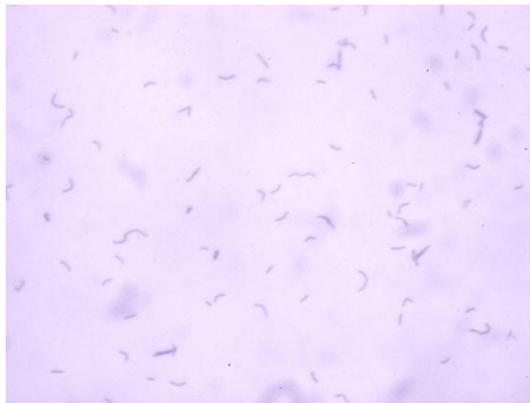


Figura 6. Tinción de Gram de *Lactobacillus casei* Shirota.  
La tinción fue positiva. 4250X

Tras la realización de la prueba de la catalasa, resultó en catalasa negativa al no formarse burbujas. Está es una característica de las BAL debido a que carecen de la enzima catalasa (Parra, 2010).

Finalmente, la prueba de la oxidasa resultó negativa porque no ocurrió cambio, Deibel y Evans (1960) demostraron que las especies de *Lactobacillus* carecen de la actividad oxidasa negativa debido a que carecen de citocromo oxidasa.

## 6.2 Caracterización del subproducto de harinas

En la tabla 2 se muestran los datos obtenidos del análisis proximal del subproducto.

El valor promedio del porcentaje de humedad, grasa y proteína que contiene el subproducto de molienda de maíz se observa en la Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de humedad, grasa y proteína total presente en el subproducto de harinas.

| Caracterización del subproducto de harinas |       |                     |
|--|-------|---------------------|
|  | %     | Desviación estándar |
| Humedad                                    | 6.21  | 0.37                |
| Grasa                                      | 8.38  | 0.96                |
| Proteína                                   | 14.82 | 0.1                 |
| Carbohidratos (diferencia)                 | 70.59 | -                   |

Después del almidón, y por orden de importancia, las proteínas constituyen el siguiente componente químico del grano de maíz. El contenido de proteína del grano puede cambiar dependiendo del tipo de maíz, la variedad, las condiciones agronómicas y demás factores (Lásztity, 1996). La zeína es la principal proteína de almacenamiento del maíz y constituye el 44-79% de las proteínas del endospermo, dependiendo de la variedad de maíz y el método de separación empleado (Larkins, 1981; Hosney, 1994; Hammaker *et al.*, 1995; Landry *et al.*, 2000, Lawton, 2002).

La Tabla 3 adaptada de Watson (1987) muestra la composición del maíz en función de las partes del grano de maíz.

Tabla 3. Composición química aproximada de las principales partes de los granos de maíz.

| Componente químico | Pericarpio (%) | Endospermo (%) | Germen (%) | Total del grano (%) |
|--------------------|----------------|----------------|------------|---------------------|
| Proteínas          | 3.7            | 8              | 18.4       | 8-12                |
| Lípidos            | 1              | 0.8            | 33.2       | 4-18                |
| Fibra cruda        | 86.7           | 2.7            | 8.8        | 8-10                |
| Cenizas            | 0.8            | 0.3            | 10.5       | 1-2                 |
| Almidón            | 7.3            | 87.6           | 8.3        | 72-75               |

Adaptada de Watson (1987)

Por las indicaciones dadas por la empresa que proporcionó el subproducto, éste procede de la primera molienda húmeda. En la molienda húmeda, el primer paso es el proceso de “de-germinación”, aquí la mayor parte del germen es liberado de manera íntegra. Más de la mitad del almidón y gluten se libera en esta etapa (Bemiller *et al.*, 1984; Serna, 2001; Tovar-Benítez, T. 2008).

Los resultados del análisis del subproducto muestran alto contenido de grasa y de proteínas, se deduce que éste está formado mayoritariamente de germen y parte de pericarpio y endospermo.

El germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas, el 33% por término medio, y contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas (próximo al 20%) y minerales. Sobre la distribución de nitrógeno en el grano de maíz, el endospermo aporta la mayor parte seguido por el germen y, en último lugar, por el pericarpio (FAO, 1993).

En el germen hay varias globulinas y albúminas que son indispensables para la germinación. Generalmente, este subproducto se destina para la obtención de aceite, sin embargo, la tecnología necesaria para este tipo de extracción no está disponible para todo tipo de empresas, es por ello que la extracción de zeína puede ser una alternativa interesante.

La zeína que es solubilizada sin necesidad de utilizar un agente reductor se compone de monómeros y oligómeros (Tsai, 1980, Coleman y Larkins, 1999), se le conoce como zeína nativa. Para facilitar la extracción máxima de zeína se requiere de al menos 1mM de 2-mercaptoetanol en el medio de extracción con alcohol (Coleman y Larkins, 1999). Se obtuvieron 5.8 g de zeína al realizar la extracción únicamente con 2-propanol 55% (p/p), la cantidad de prolamina (zeína) fue poca. Sin embargo, puesto que la zeína se iba a utilizar como encapsulante no se utilizó 2-mercaptoetanol. La zeína interacciona con carbohidratos y es más difícil de extraer. El mercaptoetanol rompe enlaces disulfuro que forman las proteínas y libera monómeros y dímeros.

### 6.3 Microencapsulación

En la tabla 4 se muestran los valores obtenidos de eficiencia de encapsulamiento de microorganismos probióticos.

Tabla 4. Valores promedio (N=3) de eficiencia de encapsulamiento expresado en %.

| Eficiencia de encapsulamiento |                             |                             |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                               | 2800 rpm                    | 4000 rpm                    |
| Alginato                      | 92.32% (4.28) <sup>al</sup> | 87.61%(6.73) <sup>al</sup>  |
| Alginato-zeína                | 96.20%(1.81) <sup>al</sup>  | 87.24%(16.20) <sup>al</sup> |

<sup>a</sup>: medias en la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes.  
<sup>l</sup>: medias en la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes.  
(P>0.05) Valores promedio de tres repeticiones (desviación estándar).

No se encontró diferencia significativa (P>0.05) en la eficiencia de encapsulamiento entre las cápsulas realizadas a 2800 rpm con alginato o alginato-zeína (Tabla 4), así como tampoco existe diferencia significativa en la eficiencia de encapsulamiento

entre las cápsulas realizadas a 4000 rpm con alginato o con la combinación alginato-zeína ( $P>0.05$ ).

Se obtuvieron eficiencias de encapsulamiento similares en comparación con otros trabajos reportados. Ding y Shah en 2009a reportaron una eficiencia de encapsulamiento por la técnica de homogenización estándar (en agitación magnética) de 84.37% en *Lactobacillus rhamnosus*, 86.35% para *Lactobacillus salivarius*, 85.82% para *Lactobacillus plantarum*, 84.84% para *Lactobacillus acidophilus*, 88.29% para *Lactobacillus paracasei*, 87.57% para *Bifidobacterium longum*, 86.87% para *Bifidobacterium lactis* Bi-04 y 86.02% para *Bifidobacterium lactis* Bi-07. Sin embargo cuando se realizó con agitación con homogeneizador a 4000 rpm los valores de eficiencia disminuyeron significativamente tal y como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Eficiencia de encapsulamiento con diferentes cepas probióticas reportada por Ding y Shah (2009a) a 4000 rpm por 5 min empleando alginato de sodio.

| Cepa probiótica        | Eficiencia de encapsulamiento |
|------------------------|-------------------------------|
| <i>L. rhamnosus</i>    | 59.98%                        |
| <i>L. salivarius</i>   | 69.50%                        |
| <i>L. plantarum</i>    | 63.43%                        |
| <i>L. acidophilus</i>  | 69.63%                        |
| <i>L. paracasei</i>    | 60.68%                        |
| <i>B. longum</i>       | 63.07%                        |
| <i>B. lactis Bi-04</i> | 59.80%                        |
| <i>B. lactis Bi-07</i> | 62.09%                        |

En particular, la eficiencia de encapsulamiento (87.61%) obtenida en las cápsulas de alginato elaboradas a 4000 rpm en este estudio fue mejor en comparación con lo reportado por Ding y Shah (2009a).

La eficiencia de encapsulamiento, uno de los primeros parámetros a evaluar al proponer un método de encapsulamiento, no solo depende de la matriz utilizada sino también de las características propias de la especie microbiana. En este caso se utilizó *Lactobacillus casei* Shirota, que es un microorganismo que se emplea de forma comercial desde hace varios años, presenta buena resistencia y propiedades favorables de crecimiento, lo que podría explicar los valores altos obtenidos en la eficiencia a 4000 rpm, superiores a los obtenidos por Ding y Shah (2009a).

Khosravi *et al.* (2014) reportaron una eficiencia de encapsulamiento de *Lactobacillus casei* de 98.12% en cápsulas de alginato-almidón gelatinizado y 97.21% en un recubrimiento de quitosano; también publicaron una eficiencia de atrapamiento del 97.85% para *Bifidobacterium bifidum* en cápsulas de alginato-almidón gelatinizado y 96.42% cuando se utilizó el recubrimiento de quitosano. También en el 2014, Rodklongtan *et al.*, reportaron un porcentaje de eficiencia de encapsulamiento de 95.84%  $\pm$  0.39%, encapsularon *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 con alginato-quitosano. En general, se ha reportado mejoras tasas de supervivencia de probióticos cuando el alginato se combina con otros materiales (Ding y Shah, 2009b). En este estudio, se han obtenido altas tasas de supervivencia ya sea con alginato solo o con alginato combinado con zeína. La inclusión de zeína en las microcápsulas mejoraría la tasa de supervivencia en el tiempo al hacer las cápsulas más resistentes a la humedad.

La microencapsulación de las BAL mencionadas anteriormente con la combinación alginato-zeína utilizando la técnica de emulsión/gelificación externa presentó alta eficiencia de microencapsulación (96.27% y 87.24%). Esta es una característica deseable de la microcápsulas porque el alto número de células encapsuladas potencialmente aumenta el número de células viables tras el paso por el sistema digestivo (Rodklongtan *et al.*, 2014).

Ding y Shah (2009a) reportan que a mayor número de revoluciones por minuto utilizadas para generar la emulsión se obtienen cápsulas más pequeñas y existe menor viabilidad de microorganismos probióticos, lo observado en este estudio es

que no hay diferencia en la eficiencia de microencapsulamiento al emplear mayor número de rpm para la formación de la emulsión y posteriormente de las cápsulas.

#### 6.4 Morfología de las cápsulas

En las figuras 7-10 se muestran fotografías de microcápsulas realizadas con alginato, mientras que las figuras 11-14 muestran imágenes de microcápsulas realizadas con alginato-zeína. La mayoría de las cápsulas presentaron aglomeración. Debido a la ruptura del equilibrio del sistema de emulsión, las cápsulas de alginato se aglomeran, incluso antes del endurecimiento apropiado de las mismas (Poncelet *et al.*, 1999).

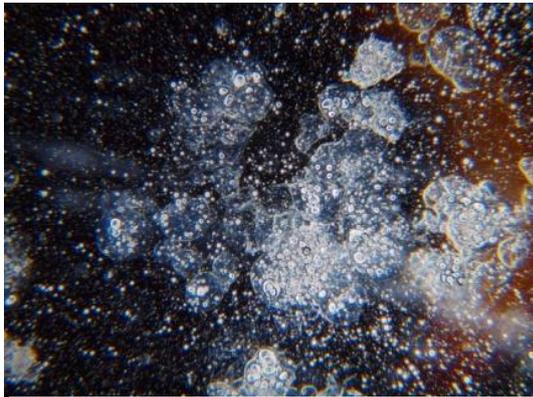


Figura 7. Fotografía de microcápsulas con alginato realizadas a 2800 rpm. Se observa mayormente a cápsulas aglomeradas. 170X

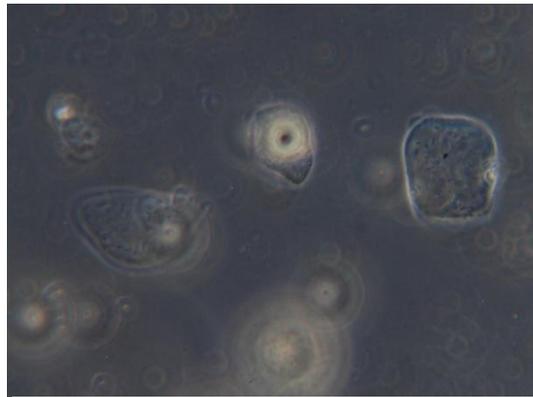


Figura 8. Fotografía de microcápsulas con alginato realizadas a 2800 rpm. Se observan tres cápsulas, una de ellas presentó forma ovoide y las otras dos tienen forma irregular. Se logran ver también pequeñas gotas de aceite. 1700X

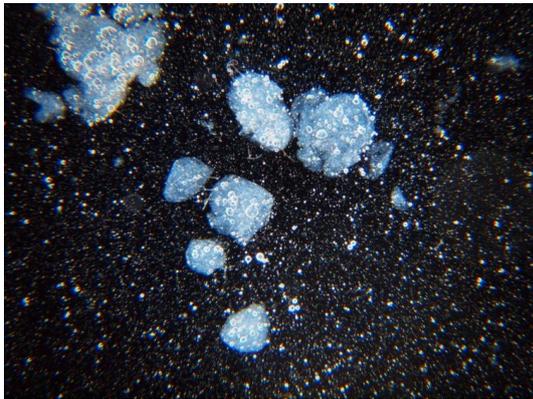


Figura 9. Fotografía de microcápsulas con alginato realizadas a 4000 rpm. Se distinguen varios aglomerados de cápsulas de alginato. 170X

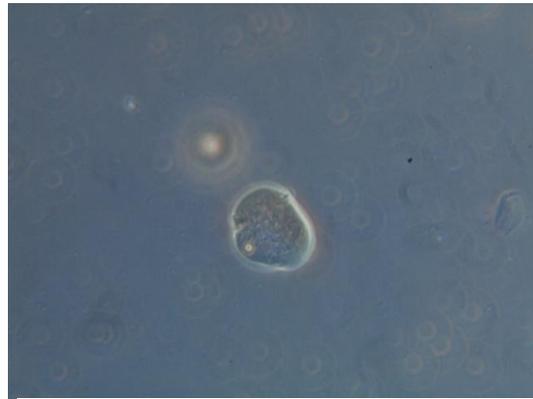


Figura 10. Fotografía de microcápsulas con alginato realizadas a 4000 rpm. Se aprecia una cápsula de alginato bien definida, casi esférica. 1700X

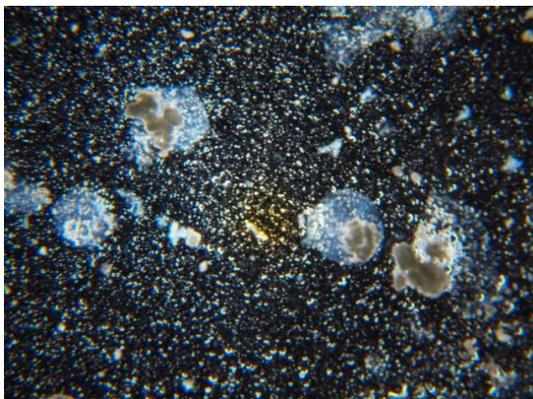


Figura 11. Fotografía de microcápsulas con alginato-zeína realizadas a 2800 rpm. En la imagen se distinguen cápsulas de alginato con partículas de zeína formando la matriz del encapsulado. 170X

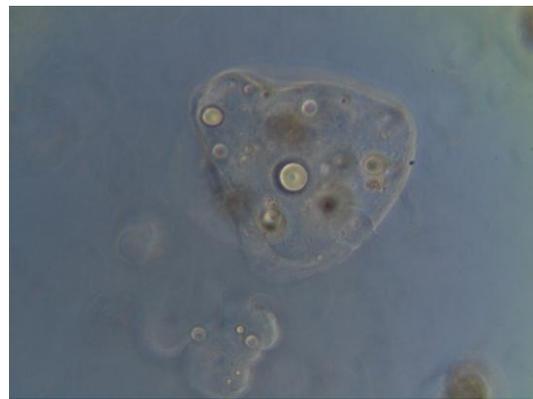


Figura 12. Fotografía de microcápsulas con alginato-zeína realizadas a 2800 rpm. Se muestra una cápsula de alginato y zeína bien definida. Es posible distinguir las partículas de zeína. 1700X

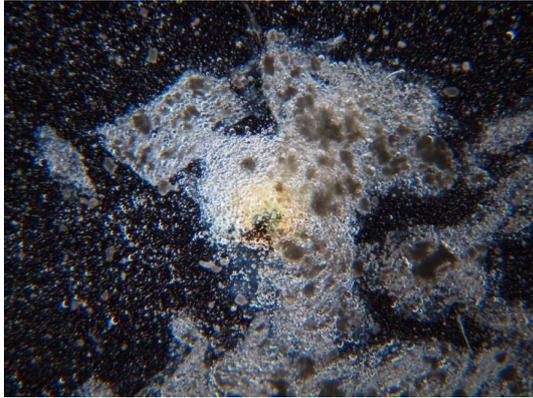


Figura 13. Fotografía de microcápsulas con alginato-zeína realizadas a 4000 rpm. Se observan aglomerados de alginato y zeína. 170X

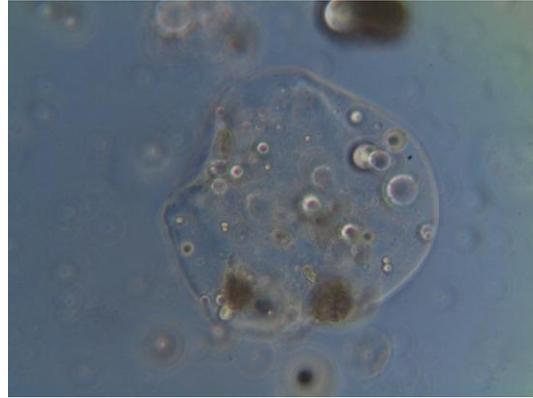


Figura 14. Fotografía de microcápsulas con alginato-zeína realizadas a 4000 rpm. La cápsula que se muestra presenta cierta esfericidad, hay zeína formando parte de la matriz y también se distinguen burbujas de aire. 1700X

Es importante señalar que la aglomeración de microcápsulas es un fenómeno que se ha reportado en otros estudios. Laelorspoen *et al.* (2014) microencapsularon *Lactobacillus acidophilus* en cápsulas de alginato recubiertas con zeína por electrospaying (aspersión electrohidrodinámica, es un método de atomización de un líquido por medio de fuerzas eléctricas) y la aglomeración de las cápsulas se presentó al momento del secado de las cápsulas.

La obtención de un tipo de estructura u otra depende de las propiedades físico-químicas del principio activo, o en este caso del microorganismo y de la matriz, así como de la técnica empleada para su preparación (Lopretti *et al.*, 2007; Lupo *et al.*, 2012). Las microcápsulas pueden tener forma esférica o irregular. Asimismo, pueden estar constituidas por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos

múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios (Gibbs *et al.*, 1999; Lupo *et al.*, 2012).

La zeína, es un polímero comestible altamente hidrofóbico y posee resistencia a la digestión gástrica (Hurtado-López y Murdan, 2006; Chen y Subirade, 2009; Luo *et al.*, 2011, Wongsasulak *et al.*, 2013; Wongsasulak *et al.*, 2014), es una material interesante como encapsulante debido a que es renovable, no tóxico, y biodegradable (Liu *et al.*, 2013), es capaz de autoensamblarse en microesferas. Se ha reportado que la presencia de zeína en la matriz puede minimizar la degradación de la composición del encapsulante en el ambiente gástrico (Wongsasulak *et al.*, 2013, Laelorspoen *et al.*, 2014), por lo tanto puede mejorar la estabilidad del encapsulado, controlar y prolongar la liberación del probiótico (Liu *et al.*, 2013). Sin embargo la inclusión de micropartículas de zeína no fue tan intensa como se esperaba, eso podría explicar los valores similares de eficiencia de encapsulamiento con y sin zeína. Se hace necesario explorar otras formas de incorporación de la zeína, como disminuir el tamaño de partícula y realizar una segunda encapsulación con zeína solubilizada y no combinada como se hizo en el presente trabajo.

## 7. CONCLUSIONES

- Se aislaron los microorganismos probióticos a partir de un producto comercial, se purificaron y conservaron adecuadamente para su incorporación en microcápsulas de alginato y microcápsulas de alginato y zeína.
- El subproducto de la molienda del maíz se caracterizó para conocer la cantidad de humedad, grasa, proteína y carbohidratos presentes, además, se redujo el tamaño de partícula a 150  $\mu\text{m}$ .
- Se logró extraer zeína de un subproducto de la molienda del maíz. Aunque el rendimiento de extracción fue bajo, se puede considerar una alternativa a la utilización del subproducto.
- Se consiguió elaborar dos tipos de microcápsulas, primero con alginato y luego con alginato-zeína por el método de emulsificación/gelificación externa considerando dos velocidades de homogeneización (2800 y 4000 rpm).
- No se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de microencapsulamiento al utilizar alginato o alginato-zeína a 2800 rpm (92.32% frente a 96.20%) o 4000 rpm (87.61% en las microcápsulas de alginato en comparación con 87.24% en las microcápsulas de alginato-zeína) para la encapsulación. La utilización de zeína en la encapsulación podría ofrecer mejores características al encapsulado frente a condiciones gástricas, sin embargo deben seguir haciéndose estudios.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aldrich, S. R., W. O. Scott y E. R. Leng. 1975. Modern corn production. A & L Publications.
2. Almanza, F. y E. Barrera. 1991. Tecnología de leche y derivados. Bogotá Unisur.
3. Anal, A. K. y H. Singh. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science y Technology 18: 240–251.
4. AOAC. 1995. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International.
5. Arribas, M. y Polo, C. 2008. Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. Food Microbiology 25:975-881.
6. Aso, Y. y H. Akazan. 1992. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. Urology International 49:125–129.
7. Augustin, M. A., y Y. Hemar. 2009. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. Chemical Society Reviews 38: 902-912.
8. Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: S. Salminen y A. Von-Wright (Eds.). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., Nueva York. p. 1-72.
9. Axelsson, L. T. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: S. Salminen, A. Von-Wright y A. Ouwehand (Eds.). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., Nueva York. p. 126-135.
10. Badui, D. S. 1990. Química de los alimentos. Alhambra. México. 648 p.
11. Bemiller J. N., E. F. Paschall y R. L. Whistler. 1984. STARCH: Chemistry and Technology. Academic Press. San Diego. 456 p.
12. Boone, R., Castenholz, R. (Eds.) 2001. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Editorial Springer, USA, Vol. 3
13. Burge, R. M. y W. J. Duesing. 1989. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. Cereal Foods World 34:535-538.

14. Champagne, P. C. y P. Fustier. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18:184-190.
15. Charalampopoulos, D., R. Wang, S. S. Pandiella y C. Webb. 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 79:131-141.
16. Chen, L., G. E. Remondetto y M. Subirade. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology* 17:272-283.
17. Chen, L. y M. Subirade. 2009. Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery. *Biomacromolecules* 10:3327-3334.
18. Coleman, C. E. y B. A. Larkins. 1999. The prolamins of maize. En: P. R. Shewry y R. Cassey (Eds.). *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. The Netherlands. p. 109-139.
19. Collins, D. M., J. Samelis, J. Metaxopoulos y S. Wallbanks. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organism from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology* 75:595-603.
20. Cook, M. T., G. Tzortzis, D. Charalampopoulos y V. Khutoryanskiy. 2011. Production and Evaluation of Dry Alginate-Chitosan Microcapsules as Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. *Biomacromolecules* 12:2834-2840.
21. Deibel, R. H., J. B. Evans. 1960. Modified benzidine test for detection of cytochrome containing respiratory systems in microorganism. *Journal of Bacteriology* 79(3):356-360.
22. Ding, W. K. y N. P. Shah. 2009. Effect of Homogenization Techniques on Reducing the Size of Microcapsules and the Survival of Probiotic Bacteria Therein. *Journal of Food Science* 74(6):231-236. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01195.x

23. Ding, W. K. y N. P. Shah. 2009. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science* 74(2):100-107. Doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01067.x
24. Esen, A. 1986. Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiology* 80:623-627.
25. Esther T. L. L., S. J. Giddings, S. G. Mohammed, P. Dubois, S. K. Johnson, R. A. Stanley, P. J. Halley y K. J. Steadman. 2013. Encapsulation of Hydrocortisone and Mesalazine in Zein Microparticles. *Pharmaceutics*.5, 277-293. Doi: 10.3390
26. FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1993. El maíz en la nutrición humana. Roma.
27. FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) 2001. El maíz en la nutrición humana. Roma.
28. FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) 2011. Energy and protein requirements. *Nutrition Meetings Report Series No. 52*.
29. FAO/WHO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud). 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation FAO y WHO. Roma. 50 p.
30. García-Ibarra, J. A. 2007. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis de Licenciatura, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. 96 p.
31. Gianazza, E., V. Viglienghi, P. C. Righetti, F. Salamini y C. Soave. 1977. Amino acid composition of zein molecular. *Phytochemistry* 16:315-317.
32. Gibbs, B. F., S. Kermasha, I. Alli y N. Mulligan. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50:213-224.
33. Girard, M., C. Sánchez, S. I. Laneuville, S. L. Turgeon y S. F. Gauthier. 2004. Associative phase separation of beta-lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 35: 15-22.

34. Gómez-Estaca, J., M. P. Balaguer, R. Gavara y P. Hernández-Munoz. 2012. Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids* 28:82-91.
35. González, R., A. Blancas, R. Santillana, A. Azaola y C. Wacher. 2004. Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations. *Applied Microbiology Biotechnology* 65:606-610.
36. Hammaker, B. R., A. A. Mohamed, J. E. Habben, C. P. Huang y B. A. Larkins. 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than conventional method. *Cereal Chemistry* 72:583-588.
37. Hartmann, R. y H. Meisel. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 163-169.
38. Hogan, S. A., B. F. McNamee, E. D. O`Riordan y M. O`Sullivan. 2001. Microencapsulation Properties of Sodium Caseinate. *Journal Agriculture of Food Chemistry* 49:1934-1938.
39. Homayouni, A., A. Azizi, M. R. Ehsani, M. S. Yarmand y H. S. Razavi. 2008. Effect of microencapsulation and resistant on the probiotic survival and sensory properties of simbiotic ice cream. *Food Chemistry* 111:50-55.
40. Hosney, R. C. 1994. Principles of Cereal Science and Technology. American Association of Cereal Chemists. 378 p.
41. Hu, D., C. Lin, L. Liu, S. Li y Y. Zhao. 2012. Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. *Journal Food Engineering* 109:545-552.
42. Hugenholtz, J. 2008. Review the lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal* 18:466-475.
43. Hurkman, W. J., L. D. Smith, J. Richter y B. A. Larkins. 1981. Subcellular compartmentalization of maize storage proteins in *Xenopus* oocytes injected with zein messenger RNAs. *Journal of Cell Biology* 89:292-299.

44. Hurtado-López, P. y S. Murdan. 2006. Zein microspheres as drug/antigen carriers: a study of their degradation and erosion, in the presence and absence of enzymes. *Journal of Microencapsulation* 23:303-314.
45. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas (INCB). 1993. *Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria*. 250 p.
46. Ingraham, J. L. y C. A. Ingraham. 1998. *Introducción a la Microbiología*. Editorial Reverté, Barcelona, España. 751 p.
47. Jackson, L. S. y K. Lee. 1991. Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft y Technologie* 24:289-297.
48. Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 3:39-48.
49. Kato, T., C. Mapes, L. Mera, J. Serratos y R. Bye. 2009. Origen y diversificación del maíz, una revisión analítica. México. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
50. Khosravi, Z. M. A., B. T. Ghiassi, A. Sharifan y N. Mohammadi. 2014. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 13(3):843-852.
51. King, A. H. 1995. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. En: S. J. Risch, G. A. Reineccius (Eds.). *Encapsulation and controlled of food ingredients*. American Chemical Society, Washington DC. p. 213-220.
52. Komenan, G. G., T. Vandamme, S. Ennahar y E. Marchioni. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology* 129:103-105.
53. Koneman, E. W. y S. Allen. 2008. *Diagnostico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto y Atlas en color/Text and Color Atlas*. Editorial Médica Panamericana. 1691 p.
54. Krasaekoopt, W., B. Bhandari y H. Deeth. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 13(1):3-13.

55. Laelorspoen, N., S. Wongsasulak, T. Yoovidhya y S. Devahastin. 2014. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein-alginate core-shell microcapsules via electrospraying. *Journal of Functional Foods* 7:342-349. Doi:10.1016/j.jff.2014.01.026
56. Landry, J., S. Delhaye y C. Damerval. 2000. Improved method for isolation and quantifying  $\alpha$ -amino nitrogen as non protein, true proteins, salt-soluble proteins, zeins and true glutelins in maize endosperm. *Cereal Chemistry* 77:620-626.
57. Laneuville, S. I., S. L. Turgeon, C. Sánchez y P. Paquin. 2006. Gelation of native beta-lactoglobulin induced by electrostatic attractive interaction with xanthan gum. *Langmuir* 22: 7351-7357.
58. Larkins, B. A. 1981. Seed storage proteins: Characterization and biosynthesis. In: A. Marcus. *Biochemistry of Plants*. Academic Press: New York. p. 449-489.
59. Larkins, B. A., Pedersen, K., Marks, M. D., Wilson, D. R. 1984. The zein proteins of maize endosperm. *Trends Biochemical Sciences* 9:306-308.
60. Larkins, B. A. y W. J. Hurkman. 1978. Synthesis and deposition of zein protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiology* 62: 256-263.
61. Lásztity, R. 1996. Maize proteins in *The Chemistry of Cereal Proteins*. Boca Raton, FL. P 185-225
62. Lawton, J. W. 2002. Zein: A History of Processing and Use. *Cereal Chemists* 79(1)1-18.
63. Liu, G., H. Wang y Y. Jiang. 2013. Research progress of Zein as carrier for drug delivery systems. *CIESC Journal* 64 (10):3493-3504.
64. Lopretti, M., F. Barreiro, I. Fernandes, A. Damboriarena, C. Ottati y A. Olivera. 2007. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *INNOTEC (Publicación anual del Laboratorio Tecnológico de Uruguay)* 2:19-23
65. Luo, Y., B. Zhang, M. Whent, L. Yu y Q. Wang. 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and it's *in vitro* controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85:145-152.

66. Lupo, P. B., A. C. González y G. A. Maestro. 2012. Microencapsulación con alimentos. Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 3(1):130-15.
67. Macarulla, J. M., y F. M. Goñi. 1994. Bioquímica humana: curso básico. Reverte. Barcelona. 530 p.
68. Madigan, M., J. Martinko y J. Parker. 2003. Brock Biología de los Microorganismos. Pearson Educación. España. 1096 p.
69. Magariños, H., P. Cartes, B. Fraser, S. Selaive, M. Costa, F. Figuerola, y O. Pizarro. 2008. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) in a milk-based dessert with cranberry sauce. Society of Dairy Technology 61:96-101.
70. McMaster, L. D., S. A. Kokott y P. Slatter. 2005. Microencapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. World Journal of Microbiology y Biotechnology 21:723-728. Doi: 10.1007/s11274-004-4798-0
71. Mestres, L. J. 2004. Productos lácteos. Tecnología. Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona. 230 p.
72. Mokarram, R. R., S. A. Mortazavi, M. B. Najafi y F. Shahidi. 2009. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Research International 42:1040-1045
73. Mora-Peñaflor, N. y A. García-Guerrero. 2007. Susceptibilidad de Bacterias Acido Lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis de Licenciatura, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 123 p.
74. Olgúin-Arteaga, G. M. 2014. Correlación de las entalpías de gelatinización con los índices de absorción de agua y de sólidos solubles en agua de granos, sémolas y harinas de maíz nixtamalizado. Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. p. 55.
75. Organización Mundial de Gastroenterología (OMGE). 2008. Guías prácticas: Probióticos y Prebióticos. 22 p.

76. Osborne, T. B. 1909. The vegetable proteins. London: New York Longmans, Green.
77. Paliwal, R. L. 2001. Morfología del maíz tropical. En: El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Paliwal, R. L., G. Granados, H. L. Renée y A. D. Violic. Roma, Italia. p. 13-20.
78. Parra, H. R. A. 2010. Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias 8(1):93:105.
79. Pérez-Xochipa, I. 2009. Estudio de la variabilidad genética de maíces criollos y su correlación con el contenido y estructura de las zeínas. Tesis de doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México. 149 p.
80. Perry, J. J., J. T. Staley y S. Lory. 2002. Microbial life. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 881 p.
81. Poncelet, D., V., Babak, C. Dulieu y A. Picot. 1999. A physic-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. Colloid and Surface A 155:171-176.
82. Poncelet, D., R. Lencky, C. Bcaulicu, J. P. Hallé, R. J. Neufeld y A. Fournier. 1992. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. Applied Microbiology and Biotechnology 38:39-45.
83. Quintanar, A., M. E. Jaramillo, R. Mora, L. Chel y J. Solorza. 2009. Changes on the structure, consistency, physicochemical and viscoelastic. Carbohydrate polymers 78:908-916.
84. Quispe-Condori, S., M. D. A. Saldaña y F. Temelli. 2011. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. LWT-Food Science and Technology 44:1880-1887
85. Rodklongtan, A., O. La-ongkham, S. Nitisinprasert y P. Chitprasert. 2014. Enhancement of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 survival in broiler gastrointestinal tract by microencapsulation with alginate-chitosan semi-interpenetrating polymer networks. Journal of Applied Microbiology 117:227-238.

86. Rojas-Molina, I., E. Gutiérrez, M. E. Cortés-Acevedo, A. Falcón, R. Bressani, A. Rojas, C. Ibarra, J. L. Pons-Hernández, S. H. Guzmán-Maldonado, A. Cornejo-Villegas y M. E. Rodríguez. 2008. Analysis of quality protein changes in nixtamalized QPM flours as a function of the steeping time. *Cereal Chemistry* 85(3):409-416.
87. Rokka, S. y P. Rantamäki. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology* 231:1–12.
88. Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondeñ, J. Maatto y T. Mattila-Sandholm. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84:197-215.
89. Serna, S. S. R. 2001. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT. México.
90. Serna-Saldivar, S. O., D. A. Knabe, L. W. Rooney, T. D. Tanksley y A. M. Sproule. 1988. Nutritional value of sorghum and maize tortillas. *Journal of Cereal Science* 7:83-94.
91. Shahidi, F. y X. Han. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33:501-547.
92. Sheu, T. Y. y R. T. Marshall. 1993. Microencapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate beads gels. *Journal of Food Science* 54(3):557-561.
93. Shukla, R. y M. Cheryan. 2001. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* 13(3):171-192.
94. SIAP. 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Biblioteca Digital, Producción Anual.
95. Song, H., W. Yu, M. Gao, X. Liu y X. Ma. 2013. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers* 96:181-189.
96. Spanhaak, S., R. Havenaar y G. Schaafsma. 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora

- and immune parameters in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 52:899–907.
97. Stiles, W. E. y W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Microbiology* 36: 1-29.
98. Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris y K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology* 62:47-55.
99. Takei, T., M. Yoshida, Y. Hatate, K. Shiomori y S. Kiyoyama. 2009. Preparation of lactic acid bacteria-enclosing alginate beads in emulsion system: effect of preparation parameters on bead characteristics. *Polymer Bulletin* 63:599-607. Doi: 10.1007/s00289-009-0111-6
100. Tanaka, R., M. A. Ohwaki. 1994. Controlled study on the ingestion of *Lactobacillus casei* fermented milk on the intestinal microflora, its microbiology and immune system in healthy adults. En: *Proceedings of XII Riken Symposium on Intestinal Flora*. Tokyo, Japón, p. 85–104.
101. Tovar-Benítez, T. 2008. Caracterización morfológica y térmica del almidón de maíz (*Zea maíz* L) obtenido por diferentes métodos de aislamiento. Tesis de Licenciatura, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 78 p.
102. Tsai, C. Y. 1980. Note on the effect of reducing agent on zein preparation. *Cereal Chemistry* 57:288-290.
103. Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters y J. Swings. 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews* 60(2):407-438.
104. Villena, M., H. Morales, G. Lara y R. Martínez. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica* 50(1):43-50.
105. Vos, P., M. M. Faas, M. Spasojevic y J. Sikkema. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Journal of Food Microbiology* 20:232-302.

106. Vos, P., G. Garruty, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K-H. Schleifer y W. B. Whitman. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer. 1476 p.
107. Währen, M. 1990. Brot und Getreide in der Ungeschichte. In: *Die ersten Bauern*. Schweizerisches Landesmuseum, Zürich. p. 117-118.
108. Watson S. A. 1987. Structure and composition. En: S. A. Watson y P. E. Ramstad. *Corn: Chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists 53-82
109. Weinbreck, F., I. Bodnár y M. L. Marco. 2010. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology* 136:364–367.
110. Wongsasulak, S., S. Pathumban y T. Yoovidhya. 2014. Effect of entrapped  $\alpha$ -tocopherol on mucoadhesivity and evaluation of the release, degradation, and swelling characteristics of zein-chitosan composite electrospun fibers. *Journal of Food Engineering* 120:110-117.
111. Wongsasulak, S., N. Puttipaiboon y T. Yoovidhya. 2013. Fabrication, gastromucoadhesivity, swelling and degradation of zein-chitosan composite ultrafine fibers. *Journal of Food Science* 78:N926-N935.
112. Wu, Y., Y. Luo y Q. Wang. 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT-Food Science and Technology* 48:283-290.
113. Xue, F., C. Liu, X. Zhu, S. Pan y L. Wang. 2013. Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. *Journal of Food Engineering* 119:439-445.
114. Zhong, Q., H. Tian y S. Zivanovic. 2009. Encapsulation of fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion. *Journal of Food Processing and Preservation* 33:255-270.

## 9. ANEXOS

1. Reactivos ocupados en las pruebas de verificación de pureza de las BAL (5.1.1, 5.1.2 y 5.1.3).

| Prueba             | Reactivo(s)   |
|--------------------|---|
| Tinción de Gram    | Cristal violeta<br><br>Solución de yodo<br><br>Alcohol-acetona (70:30)<br><br>Safranina |
| Prueba de catalasa | Peróxido de Hidrógeno al 30%  |
| Prueba de oxidasa  | Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%  |

2. Reactivos y equipos empleados para el análisis del subproducto de la molienda del maíz.

|                                   | Reactivo(s)                     | Equipo(s) empleado(s)                    |
|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| Determinación de humedad (5.2.1)  | -                               | *Balanza analítica<br>*Estufa de secado  |
| Determinación de grasa (5.2.2)    | Éter de petróleo grado reactivo | *Balanza analítica<br>*Equipo Soxhlet    |
| Determinación de proteína (5.2.3) | -                               | *Balanza analítica<br>*Equipo Dumas LECO |

3. Soluciones utilizadas para la microencapsulación con alginato y alginato-zeína.

|  |  |
|--|--|
| Microcápsulas con alginato (5.4.1)       | <ul style="list-style-type: none"><li>• Solución salina estéril al 0.85%</li><li>• peptona 0.1%</li><li>• Alginato de sodio 1.5% (p/v) y una</li><li>• Solución de CaCl<sub>2</sub> 0.05 M.</li><li>• Aceite vegetal con 0.5% de Tween 80</li><li>• Solución de peptona 0.1%(p/v) + Tween 0.3% (p/v)</li></ul>   |
| Microcápsulas con alginato-zeína (5.4.2) | <ul style="list-style-type: none"><li>• Solución salina estéril al 0.85%</li><li>• peptona 0.1%</li><li>• Alginato de sodio 1.5% (p/v) y una</li><li>• Solución de CaCl<sub>2</sub> 0.05 M.</li><li>• Aceite vegetal con 0.5% de Tween 80</li><li>• Zeína extraída del subproducto de molienda del maíz</li><li>• Solución de peptona 0.1%(p/v) + Tween 0.3% (p/v)</li></ul> |