



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“MICROENCAPSULACIÓN DE DOS CEPAS PROBIÓTICAS
USANDO ALMIDÓN TIPO 4 Y EVALUACIÓN DE SU
VIABILIDAD EN UN PRODUCTO CÁRNICO COCIDO Y SU
DIGESTIÓN *IN VITRO*”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

BLANCA MONTSERRAT ESCOBAR GARCÉS

DIRIGIDA POR

DRA. SILVIA LORENA AMAYA LLANO

CODIRIGIDA POR

DRA. MAYRA ESTHELA GONZÁLEZ MENDOZA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Microencapsulación de dos cepas probióticas usando
almidón tipo 4 y evaluación de su viabilidad en un
producto cárnico cocido y su digestión in vitro.

por

Blanca Montserrat Escobar Garcés

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIN-267658



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“MICROENCAPSULACIÓN DE DOS CEPAS PROBIÓTICAS
USANDO ALMIDÓN TIPO 4 Y EVALUACIÓN DE SU
VIABILIDAD EN UN PRODUCTO CÁRNICO COCIDO Y SU
DIGESTIÓN *IN VITRO*”**

TESIS INDIVIDUAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

BLANCA MONTSERRAT ESCOBAR GARCÉS

DIRIGIDA POR

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO

CODIRIGIDA POR

Dra. MAYRA ESTHELA GONZÁLEZ MENDOZA

SINODALES

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO

DIRECTORA

Dra. MAYRA ESTHELA GONZÁLEZ MENDOZA

CODIRECTORA

Dr. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO

SINODAL

Dra. BENERANDA MURÚA PAGOLA

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	2
I.1 Probióticos	2
I.1.1 Generalidades	2
I.1.2 Beneficios a la salud	3
I.1.3 Efecto de diversos tipos de estrés sobre la viabilidad de los probióticos	5
I.2 <i>Lactobacillus</i>	6
I.2.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	7
I.2.2 <i>Lactobacillus casei</i>	9
I.3 Encapsulación de probióticos	11
I.3.1 Métodos de encapsulación	12
I.3.1.1 Secado por aspersión	13
I.3.2 Materiales encapsulantes	15
I.3.2.1 Almidones como material de pared	18
I.3.2.2 Almidones succinatados	19
I.4 Aplicación de probióticos microencapsulados en productos cárnicos	22
I.5 Consumo de productos cárnicos en México	23
I.6 Salchicha	25
I.6.1 Composición	26

I.6.2 Aplicación de probióticos microencapsulados en salchicha cocida	26
II. OBJETIVOS	28
II.1 General	28
II.2 Específicos	28
III. METODOLOGÍA	29
III.1 Materiales	29
III.1.1 Reactivos	29
III.1.2 Equipos	29
III.2 Métodos	30
III.2.1 Microencapsulación de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 mediante secado por aspersión	30
III.2.1.1 Recuento de bacterias, eficiencia y rendimiento de la microencapsulación	30
III.2.2 Caracterización de las microcápsulas	31
III.2.2.1 Actividad de agua	31
III.2.2.2 Evaluación de la resistencia térmica	32
III.2.3 Elaboración de producto cárnico cocido	32
III.2.3.1 Determinaciones en la salchicha tipo Viena	33
III.2.3.1.1 Análisis proximales	33
III.2.3.1.2 Color y pH	34
III.2.3.1.3 Textura	34
III.2.3.1.4 Concentración de nitritos	35
III.2.3.1.5 Análisis microbiológicos	36
III.2.4 Sobrevivencia a digestión <i>in vitro</i>	37
III.3 Diseños experimentales	38
III.3.1 Análisis estadístico	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39

IV.1 Microencapsulación de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103 y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 mediante secado por aspersión	39
IV.1.1 Recuento de bacterias y eficiencia de microencapsulación	39
IV.2 Evaluación de la resistencia térmica	45
IV.3 Determinaciones en la salchicha tipo Viena	51
IV.3.1 Análisis proximales	51
IV.3.2 Color y pH	53
IV.3.3 Textura	57
IV.3.4 Análisis microbiológicos	61
IV.4 Sobrevivencia a digestión in vitro	62
V. CONCLUSIONES	69
VI. REFERENCIAS	70
VII. ANEXOS	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Algunos de los principales rasgos fenotípicos que caracterizan a las especies del grupo <i>Lactobacillus casei</i>	11
2	Típicos materiales de pared utilizados para encapsular por el método de secado por aspersión	16
3	Métodos y materiales de pared utilizados para encapsular <i>L. rhamnosus</i> GG	17
4	Métodos y materiales de pared utilizados para encapsular <i>L. casei</i>	17
5	Tipos de salchicha y dimensiones	25
6	Formulación de la salchicha tipo Viena	32
7	Análisis microbiológicos para la salchicha tipo Viena	37
8	Diseño experimental para <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. casei</i>	38
9	Rendimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG microencapsulados mediante secado por aspersión de usando almidón modificado tipo 4.	41
10	Evaluación de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG microencapsulados mediante secado por aspersión usando almidón modificado tipo 4.	42
11	Rendimiento de <i>Lactobacillus casei</i> microencapsulados mediante secado por aspersión usando almidón modificado tipo 4.	43
12	Evaluación de <i>Lactobacillus casei</i> microencapsulados mediante secado por aspersión usando almidón modificado tipo 4	44
13	Evaluación de la resistencia térmica de <i>L. casei</i> y <i>L. rhamnosus</i> GG libres a diferentes tiempos y temperaturas.	48

14	Evaluación de la resistencia térmica de <i>L. casei</i> y <i>L. rhamnosus</i> GG en diferentes materiales encapsulantes a distintos tiempos y temperaturas.	49
15	Composición de la salchicha de cerdo tipo Viena sin probióticos.	51
16	Análisis de color de la salchicha cocida tipo Viena.	54
17	Análisis de textura de la salchicha tipo Viena.	57
18	Análisis microbiológicos para la salchicha cocida tipo Viena sin la adición de probióticos.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Características del sistema gastrointestinal: fisiológico, enzimático y microbiológico	6
2	Apariencia de las colonias de <i>L. rhamnosus</i> GG en placa	7
3	Capacidad de adherencia de diferentes especies de <i>Lactobacillus</i>	8
4	Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido de <i>Lactobacillus casei</i>	9
5	Métodos de encapsulación utilizados comúnmente en la industria de alimentos	13
6	Esquema del proceso de secado por aspersión	14
7	Reacción de esterificación de almidón con anhídrido octenilsuccínico (OSA-MS)	20
8	Hidrofobicidad en el sustituyente succinato de octenilo esterificado al polímero de almidón	21
9	Adición de probióticos en productos lácteos y no lácteos	22
10	Volumen y valor de la producción por producto de carnes frías en 2022	24
11	Niveles de producción de salchichas	24
12	Evaluación de la resistencia térmica a tres diferentes temperaturas (65, 75 y 85°C) a 5 y 10 min	46
13	Muestras de salchichas tipo Viena para el análisis de color. a) SV Control=Salchicha tipo Viena sin la adición de <i>Lactobacillus</i> microencapsulado, b) SV LGG-MNLOK=Salchicha tipo Viena con LGG microencapsulado con NLOK®, c) SV LC-MNLOK= Salchicha tipo Viena con LC microencapsulado con NLOK®, d) SV LC-AM4= Salchicha tipo Viena con LC microencapsulado	56

con AM4, e) SV LGG-AM4= Salchicha tipo Viena con LGG microencapsulado con AM4.

- 14 Sobrevivencia a la digestión *in vitro* de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* (Log de UFC/g). a) Tiempo vs Log de LC en estado libre y microencapsulado con NLOK® o AM4, b) Tiempo vs Log de LGG en estado libre y microencapsulado con NLOK® o AM4, c) Tiempo vs Log de la salchicha cocida con LC microencapsulado con NLOK® o AM4, d) Tiempo vs Log de la salchicha cocida con LGG microencapsulado con NLOK® o AM4 63

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que aportan beneficios en la salud. Se pueden encontrar en productos como yogur, alimentos fermentados, suplementos alimenticios, entre otros. Actualmente incorporarlos a productos que requieren cocción en una parte de su procesamiento, constituye un reto debido a su sensibilidad ante el estrés térmico. Es por esto que se han implementado metodologías de microencapsulación para protegerlos de condiciones hostiles a las que puedan llegar a exponerse ya sea en el procesamiento del producto o durante su ingesta. El objetivo del trabajo fue evaluar la microencapsulación de dos cepas probióticas (*Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei*) con almidón modificado tipo 4, para la eficiencia y rendimiento de encapsulación, así como la sobrevivencia a estrés térmico y digestibilidad *in vitro* en un producto cárnico cocido. Para ambas cepas las mejores condiciones utilizadas para microencapsular cumplieron con una eficiencia mayor a 85% y con rendimientos del 50%. Microorganismos microencapsulados de ambas cepas mostraron mayor resistencia a condiciones térmicas y a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal en comparación con sus estados libres; *Lactobacillus rhamnosus* GG resultó ser más resistente a las condiciones adversas que *Lactobacillus casei*. Una vez adicionados los microorganismos microencapsulados a la salchicha cocida, se obtuvo una concentración entre 10^6 - 10^7 log (UFC/g) después de la simulación del tracto digestivo con lo que se obtuvo una salchicha cocida probiótica.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día se está en la búsqueda constante de consumir alimentos más sanos que respondan a las necesidades en cuanto a requerimientos nutricionales, fácil preparación y consumo. El consumo de salchichas cocidas ha aumentado en los últimos años. Debido a que estos productos no suelen aportar beneficios a la salud o la microbiota del organismo, se tiene el interés de darle un valor agregado al producto adicionándole probióticos, donde existen desafíos debido a que, al ser adicionados en este tipo de alimentos cocidos, su viabilidad se ve sumamente reducida debido a la inestabilidad que presentan en condiciones adversas, como temperatura de cocción, concentración de sal, aditivos, entre otros. Es por eso que, se han implementado tecnologías como la microencapsulación de probióticos con materiales modificados para protegerlos contra entornos hostiles y que al momento de consumirlos cumplan con su función probiótica. Por ello, este trabajo busca microencapsular dos probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei*) e incorporarlos en la formulación de una salchicha cocida y comparar su sobrevivencia y digestibilidad *in vitro*.

I. ANTECEDENTES

I.1 Probióticos

La palabra probiótico viene de la era moderna, en 1907 Metchnikoff y Mitchell, expresaron que los probióticos son una modificación de la diversidad microbiana en los humanos y reemplaza los microorganismos dañinos por otros útiles, en la cual sugerían administrar de forma oral organismos vivos (bifidobacterias) a niños con diarrea para restaurar la microbiota intestinal. Fue hasta 1960 que se le dio el nombre “probiótico” para nombrar a sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965).

En la era moderna Havenaar y col. (1992), propusieron la definición de probiótico como un mono o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o al hombre, afectan al huésped de forma beneficiosa al mejorar las propiedades de la microbiota autóctona. Fue así como el concepto de probiótico evolucionó a través del tiempo y en el 2001 la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) y WHO (World Health Organization) definieron probiótico como “microorganismo vivo que, cuando se administra en cantidades adecuadas, confiere un beneficio en la salud del huésped”. Después en el 2014 la definición fue analizada por 12 expertos integrados en la ISAAPP (International Scientific Organization of Probiotics and Prebiotics) confirmándolo como correcto (Vinderola y Burns, 2021).

I.1.1 Generalidades

Los probióticos comprenden una amplia gama de microorganismos e implican ciertas características como: célula microbiana, identidad, viabilidad y un beneficio para la salud demostrado por un ensayo clínico (Vinderola y Burns, 2021).

En 2018 la ISAPP propuso los criterios mínimos que debe tener un microorganismo para que se considere probiótico, los cuales se anuncian a continuación (Lebeer y col., 2008; Ellen, 2018):

1. Caracterización suficiente para identificar el probiótico dentro del género, especie y nivel de cepa.
2. Probiótico nombrado de acuerdo con la nomenclatura científicamente válida.
3. Nombre del probiótico incluyendo la designación de la cepa.
4. Seguridad de probióticos demostrada para el uso previsto.
5. Cepa probiótica depositada en una colección de cultivo internacional.
6. Demostrar al menos un estudio en humanos que tiene beneficios en la salud.
7. Mantener la homeostasis microbiana e inhibir la proliferación de patógenos a través de interacciones microbianas.
8. Promover el funcionamiento de la barrera epitelial o modular la respuesta inmune.

Las cepas más utilizadas son *Lactobacillus* y en menor medida *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Escherichia* (Vinderola y Burns, 2021).

I.1.2 Beneficios a la salud

Los probióticos tienen beneficios en la salud, algunos de ellos como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus* aumentan la formación de metabolitos y producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como ácido acético, propiónico, butírico y láctico, teniendo actividad anti patógena, es decir inhiben los microorganismos patógenos como *Salmonella entérica*, *Serovar typhimurium* y *Clostridium difficile*, además los AGCC disminuyen el pH del colon protegiendo a las células, previniendo la colonización patógena y la absorción de carcinógenos (Wollowski y col., 2001; Tejero-Sariñena y col., 2013; Nistal y col., 2015).

Se ha demostrado que la suplementación a corto plazo estimula, modula, mejora y regula la función inmunitaria celular al iniciar la activación de genes específicos de las células del huésped (Kristensen y col., 2016; Miller y col., 2018). También la microbiota vaginal se ve beneficiada manteniendo un equilibrio, teniendo una menor incidencia de infecciones en el tracto urinario (Waigankar y col., 2011; Tachedjian y col., 2017). En adultos con sobrepeso u obesidad el perfil lipídico se regula debido a

que se estimula el sistema nervioso simpático asociándose a una pérdida de peso por respuestas termogénicas y lipolíticas pudiendo reducir significativamente los niveles de colesterol total y triglicéridos (Wang y col., 2021).

Los probióticos estimulan la permeabilidad de la barrera intestinal disminuyendo su rigidez, igualmente controlan la inflamación intestinal, reducen la migración de la microbiota patógena al lumen intestinal, tratan el síndrome del intestino irritable, reducen el colesterol, disminuyen la toxemia, también tienen propiedades antioxidantes, mejoran la sensibilidad a la insulina, modulan la liberación de hormonas gastrointestinales, regulan el comportamiento cerebral a través de señales neuronales bidireccionales como parte del eje intestino-cerebro del que se ha mostrado que el consumo de probióticos mixtos tiene efectos anti-alérgicos (Kristensen y col., 2016; Majewska y col., 2020; Eastwood y col., 2021; Nawaz y col., 2021; Zhang y col., 2021).

De la misma manera los probióticos tienen actividad anticancerígena. Badgeley y col. (2020), reportaron que las bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han mejorado la apoptosis de las células cancerosas, en específico se observó que la adición de *Bifidobacterium* como probiótico, tuvo un efecto anticancerígeno disminuyendo la población de *Fusobacterium* que es un microorganismo que produce un tipo de cáncer, además disminuye la proliferación de células cancerosas mediante la inhibición de la señalización del factor de crecimiento, así como la inducción de apoptosis mediada por mitocondrias. Se ha asociado que durante la quimio/inmuno/radioterapia se inhiben las citocinas proinflamatorias mejorando la acción de los medicamentos, ya que la microbiota intestinal se ve modificada. También algunas cepas de *Lactobacillus* como *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. casei* inhiben el crecimiento y migración de células cancerosas del colorrectal disminuyendo la expresión de algunos genes en específico (Escamilla y col., 2012; Faghfoori y col., 2020).

Pegah y col. (2021) reportaron que bacterias del género *Bifidobacteria* y *Lactobacillus* retrasan la progresión y desarrollo de la diabetes tipo II protegiendo contra el estrés oxidativo, secretando hormonas gastrointestinales para mantener la homeostasis y controlar la proliferación de las células epiteliales. Otras cepas de *Lactobacillus* como *L. Johnsonii*, *L. rhamnosus* GG, *L. fermentum* y *L. acidophilus* GMN-185, poseen actividad antagónica sobre *Helicobacter pylori* (Gao y col., 2021).

En los últimos años se han realizado estudios para ver si existe una relación con los trastornos psicológicos y la administración de probióticos en el cual se informa que hay una mejoría de los síntomas afectivos y cambios en el estado de ánimo al momento de consumir probióticos (Long-Smith y col., 2019).

1.1.3 Efecto de diversos tipos de estrés sobre la viabilidad de los probióticos

El consumo de alimentos probióticos en dosis adecuadas ha aumentado debido a la conciencia sobre los beneficios para la salud, sin embargo, su aplicación en diversos productos aún es un reto tecnológico debido a la sobrevivencia de los microorganismos probióticos sobre diversos tipos de estrés.

La FAO/OMS (2002) informó que el consumo de microorganismos probióticos debería oscilar entre 10^6 y 10^7 UFC/g o mL (UFC, unidad formadora de colonias). Sin embargo, cuando se utilizan bacterias como probióticos, su viabilidad debe permanecer estable durante toda la vida útil del producto alimenticio y debe mantenerse su resistencia al ambiente ácido del estómago y a las sales biliares en el intestino delgado. Otros factores que afectan la viabilidad bacteriana son el pH, la concentración de ácido láctico y acético, peróxido de hidrógeno y contenido de oxígeno disuelto del producto. A continuación, se observa en la Figura 1 la viabilidad de algunas bacterias en el sistema digestivo al momento de consumir diferentes probióticos.

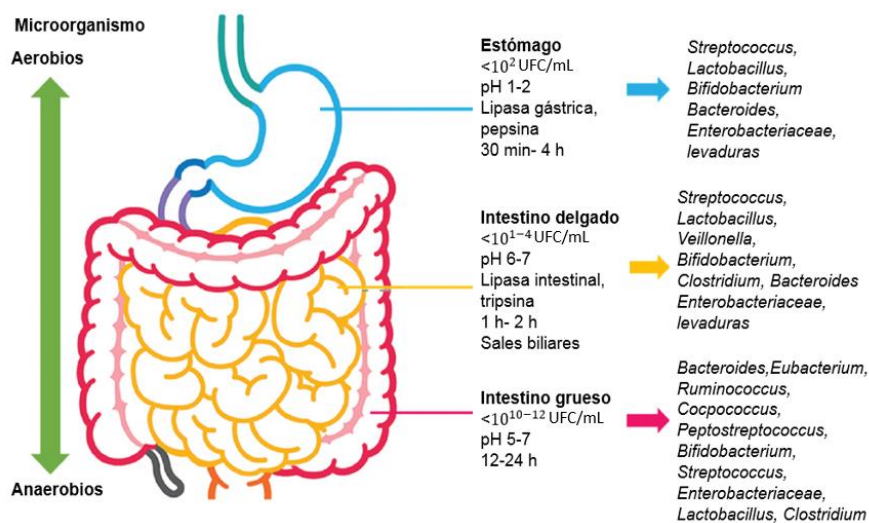


Figura 1. Características del sistema gastrointestinal: fisiológico, enzimático y microbiológico (UFC = unidades formadoras de colonias) (Modificado de Barajas-Álvarez y col., 2021).

Otro factor que afecta la viabilidad de los probióticos es la aplicación de métodos de conservación, como la microencapsulación. En estos procesos se pueden utilizar condiciones estresantes o letales (destructivas), por ejemplo, la alta temperatura del aire durante el proceso de encapsulación mediante secado por aspersión. Habitualmente, las bajas temperaturas del aire provocan una disminución de las lesiones celulares probióticas, lo que aumenta las UFC/g en las microcápsulas (Alfaro-Galarza y col., 2020).

1.2 *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus spp.* son microorganismos bacilos gram-positivos, no formadores de endosporas, comensales, generalmente considerados anaerobios tolerantes al oxígeno con metabolismo fermentativo, que forman la microbiota normal de los tractos oral, genitourinario y gastrointestinal (Zotta y col., 2017; Khaled, 2020; Pasala y col., 2020).

Existen más de 200 especies pertenecientes al género *Lactobacillus* y el principal metabolito que producen es el lactato, aunque algunas especies pueden fermentar el azúcar en ácido láctico y otras especies también pueden producir alcohol.

En particular *L. casei* y *L. rhamnosus* muestran propiedades antiinflamatorias, efectos en la prevención del cáncer, protección contra patógenos, alivio de los síntomas de enfermedades alérgicas, modulan la microbiota intestinal y protegen la mucosa contra las lesiones causadas por microorganismos patógenos, estas dos bacterias se consideran como los probióticos que son más utilizados en una amplia gama de alimentos lácteos (leche, yogurt, queso, helado) y no lácteos (jugos de fruta, té verde, cerveza, embutidos) (Altarugio y col., 2017; Khaled, 2020; Berezhnaya y col., 2021).

1.2.1 *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG), fue aislado originalmente de muestras fecales de un adulto humano sano por Sherwood Gorbach y Barry Goldwin en 1985, explicando sus típicas letras de apellido GG (Gorbach y col., 2017).

LGG es un microorganismo en forma de varilla, gram-positivo con olor a mantequilla cuando se cultiva y su morfología en colonia es de color blanco cremoso como se observa en la Figura 2 (Gorbach y col., 2017).



Figura 2. Apariencia de las colonias de *L. rhamnosus* GG en placa (Gorbach y col., 2017).

LGG es capaz de fermentar celobiosa, fructosa, glucosa, manitol, manosa, melecitosa, ramnosa, ribosa, salicina, sorbitol, trehalosa, L-fucosa y xilosa, pero no fermenta lactosa, maltosa o sacarosa, ni fermenta amigdalina, arabinosa, eritritol, glucógeno, inositol, melibiosa, o afinosa (Gorbach y col., 2017).

LGG produce ácido fórmico, un compuesto de bajo peso molecular, activo a pH ácido y con actividad antimicrobiana contra bacterias anaerobias, como *Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium*, así como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Salmonella* (Silva y col., 1987; de Keermaecker y col., 2006).

La cepa probiótica se identifica como potencial debido a su resistencia al ácido y la bilis. Una de las características clave es su fuerte capacidad adhesiva por mostrar un tropismo tisular preferencial a la capa epitelial intestinal esto es debido a que en la pili de la bacteria posee la proteína spaC que une a la bacteria a la mucosa de la barrera intestinal, también puede persistir en el colon descendente en comparación con cepas relacionadas como la *L. casei Shirota* como se observa en la Figura 3 (Douillard y col., 2013; Segers y Lebeer, 2014).

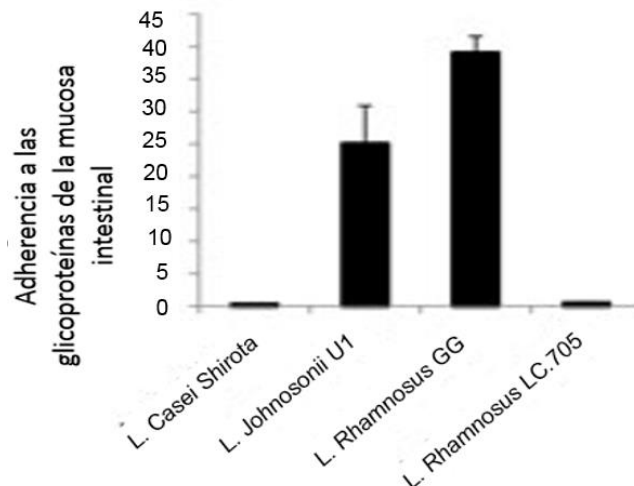


Figura 3. Capacidad de adherencia de diferentes especies de *Lactobacillus* (Modificado de Segers y Lebeer, 2014).

Es de destacar que LGG tiene la capacidad de colonizar la mucosa intestinal y parece ser significativamente mejor en los recién nacidos, lo que se relaciona con una menor resistencia a la colonización ejercida por una microbiota menos establecida de los lactantes y que probablemente sea una característica general de muchas cepas probióticas (Segers y Lebeer, 2014).

En cuanto al crecimiento a temperaturas no óptimas, el 90% de las cepas de LGG crecen a una temperatura de 45°C, y algunas otras cepas de LGG como las de origen humano y la cepa *L. rhamnosus* CTC1676 aislada de la carne, muestran crecimiento a temperaturas de hasta 49°C, sin embargo, no se considera un microorganismo resistente a temperaturas más elevadas como se observa en el Cuadro 1 (Reale y col., 2015).

1.2.2 *Lactobacillus casei*

Es una bacteria gram-positiva inmóvil, no esporulada y catalasa negativa, sus células son bastones de 0.7–1.1 × 2.0–4.0 µm, a menudo con extremos cuadrados, que tienden a formar cadenas como se observa en la Figura 4 (Gobetti, 1999).

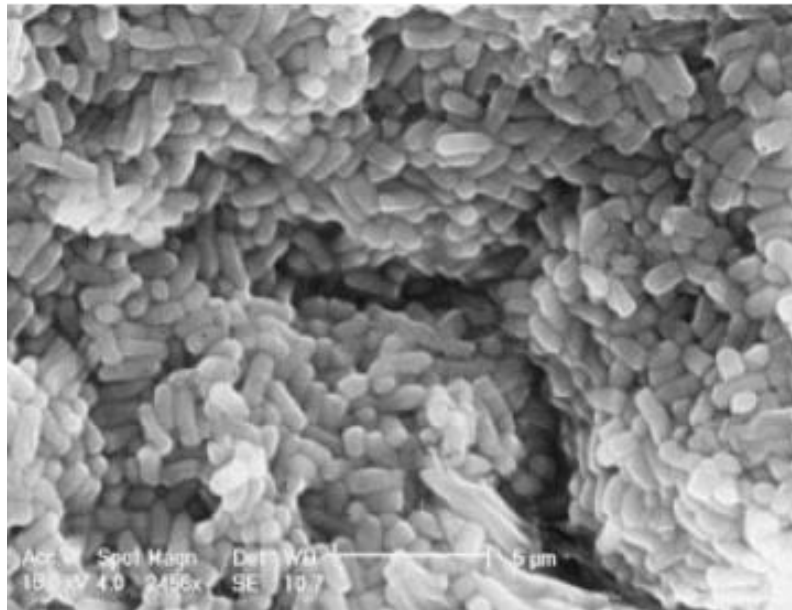


Figura 4. Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido de *Lactobacillus casei* (Gobetti, 1999).

La pared celular contiene peptidoglicano y polisacáridos que determinan la especificidad serológica que se basa en el contenido de ramnosa o glucosa-galactosa, el contenido de G + C del ADN es del 45 al 47% y requieren riboflavina, ácido fólico, pantotenato de calcio y niacina para el crecimiento (Gobetti, 1999; Gobetti y Minervini, 2014).

L. casei se puede distinguir por su capacidad para crecer sobre sustratos (gluconato, malato y pentitoles) que son poco utilizados por las bacterias ácido lácticas, además son resistentes a la bilis y a diferencia de LGG puede fermentar L-arabinosa, adonitol, maltosa, lactosa, sacarosa, lixosa, pero no puede fermentar D-arabinosa, melezitosa y L-fucosa, mientras LGG si puede hacerlo (Gobetti, 1999; Douillard y col., 2013).

El manual de bacteriología sistemática de Bergey reconoce cuatro subespecies: *L. casei subsp. casei*, *pseudopplantarum* (rafinosa no fermentadora y melibiosa), *rhamnosus* (fermentadora de ramnosa) y *tolerans* (tolera el calentamiento a 72°C durante 40 min) (Gobetti, 1999), sin embargo, la taxonomía de *L. casei* cambia continuamente y en la actualidad la nomenclatura aceptada y la división taxonómica del grupo *L. casei* es la siguiente:

- (1) *L. casei* (cepa tipo: ATCC 393 TM)
- (2) *L. paracasei subsp. paracasei* (cepa tipo: ATCC 25302 TM) y *L. paracasei subsp. tolerans* (cepa tipo: ATCC 25599 TM)
- (3) *Lactobacillus rhamnosus* (cepa tipo: ATCC 25599 TM).

En el Cuadro 1 se observa las características que tienen cada subespecie.

Cuadro 1. Algunos de los principales rasgos fenotípicos que caracterizan a las especies del grupo *Lactobacillus casei* (Modificado de Gobetti y Minervini, 2014).

Característica	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	<i>L. paracasei subsp. Tolerans</i>	<i>L. rhamnosus</i>
Crecimiento a 10°C	+	+	+	D
Crecimiento a 45°C	-	-	-	+
Resistencia a 72°C por 40 s	-	-	+	-
Lactosa	-	D	+	+
Maltosa	D	+	-	+
Rhamnosa	-	-	-	+
Sacarosa	-	+	-	+

D= 50–90% de cepas, += aplica, -= no aplica.

Se ha demostrado que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia aerogenes* y *Helicobacter pylori* se inhiben por la actividad ácido láctica o también se ha asociado con la capacidad de inducir la producción de IL-6 y/o IL-12 (interleucinas mediadoras en la resistencia viral, fúngica, bacteriana y parasitaria), aliviando la inflamación y sin alterar la homeostasis microbiana intestinal (Lu y col., 2011; Čitar y col 2015; Wu y col., 2021).

L. casei puede aislarse no solo de la leche y los productos lácteos, sino también de salchichas fermentadas, verduras, vino, del tracto reproductivo, gastrointestinal y de heces humanas (Gobetti y Minervini, 2014; Wu y col., 2021).

I.3 Encapsulación de probióticos

La encapsulación se define como un método en el que pequeñas partículas o gotitas están rodeadas por una pared de revestimiento o incrustadas en una pared homogénea o matriz heterogénea, se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica pero la industria alimentaria se ha acoplado para conservar ingredientes delicados en forma de polvos, proteger los aceites contra la oxidación y la evaporación, lograr

una liberación sostenida, promover un manejo más fácil durante la fabricación y el almacenamiento, liberación del núcleo bajo condiciones específicas de temperatura, humedad, pH, evitar daños por calor durante la cocción y prolongar la vida útil de los olores agregados y enmascararlos (Keogh, 2005; Tian y col., 2021).

Se lleva a cabo cuando la pared de la matriz aísla el compuesto activo como barrera funcional del entorno circundante para evitar reacciones químicas y físicas que prolonguen su estabilidad y biodisponibilidad. La encapsulación a base de emulsión permite la compartimentación de compuestos activos aceitosos en gotitas de aceite y la fase acuosa favoreciendo el proceso de formación de paredes (Tian y col., 2021).

Para poder encapsular microorganismos o compuestos, existen diferentes métodos para hacerlo, los cuales van a depender del material utilizado, el costo, tamaño final de la partícula y la forma deseada ya sea en polvo o gel (Onwulata, 2005).

La encapsulación se puede clasificar en base al tamaño de las cápsulas (Jafari, 2017):

- Macroencapsulación (>500 μm)
- Microencapsulación (0.2-500 μm)
- Nanoencapsulación (<0.2 μm)

La microencapsulación se considera una de las estrategias más eficientes para proteger los cultivos probióticos de condiciones adversas. Se han desarrollado diversos métodos como extrusión, emulsión, secado por aspersion, lecho fluidizado y enfriamiento por aspersion para proteger a los microorganismos contra condiciones de almacenamiento, gastrointestinales y ambientales para mejorar viabilidad y liberación de células vivas dentro del organismo (Silva y col., 2022).

I.3.1 Métodos de encapsulación

Para seleccionar el proceso por el cual se va a encapsular un probiótico se necesita conocer el tamaño de partícula que se requiere, la viscosidad esperada, las propiedades de textura que brinda o se quiere generar y la solubilidad que tendrá,

porque estos parámetros alterarán las características del producto final (Barajas-Álvarez y col., 2021). Algunos de estos procesos son: secado por aspersión, recubrimiento en lecho fluidizado, recubrimiento líquido o recubrimiento en polvo seco, coacervación, entre otros (Clark, 2002).

Si bien la mayoría de estos procesos son adecuados para la industria farmacéutica y otras industrias debido a sus altos costos, la encapsulación de alimentos en polvo se realiza principalmente mediante secado por aspersión porque es más económico (Clark, 2002).

A continuación, se muestran los métodos más utilizados en la industria de alimentos para encapsular en la Figura 5.

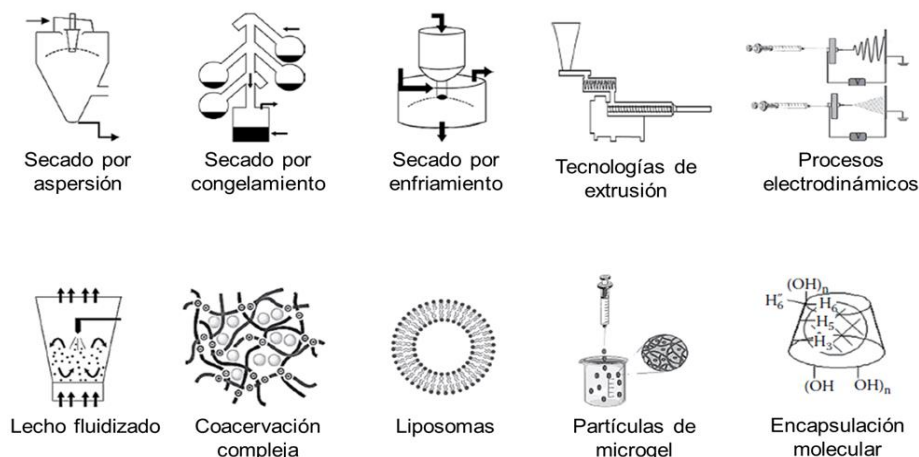


Figura 5. Métodos de encapsulación utilizados comúnmente en la industria de alimentos (Modificada de Krokida, 2018).

I.3.1.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión o atomización es un proceso físico que involucra la reducción de pequeñas gotas de emulsión bifásicas que se atomizan en una cámara de aire caliente (aire de entrada puede alcanzar los 200°C) en donde las gotas pequeñas por medio de un fluido y el poder de la corriente de aire caliente hace que se sequen para generar pequeñas esferas finas y redondas (Keogh, 2005; Tian y col., 2021).

El proceso consiste en cuatro pasos fundamentales (Sosnik y Seremeta, 2015):

1. Atomización del líquido en la alimentación.
1. Secado por aerosol dentro de un aire seco.
2. Formación de partículas secas.
3. Separación y colección del producto seco del aire seco.

En la Figura 6 se muestra el esquema del proceso, en donde primero el fluido es alimentado a la cámara de secado por una bomba peristáltica a través de un atomizador o boquilla que puede ser un atomizador rotatorio, una boquilla de presión o una boquilla de dos líneas y la atomización se produce por energía centrífuga, de presión o cinética, respectivamente.

Las pequeñas gotas generadas (escala del micrómetro de 10 – 400 μm) se someten a una rápida evaporación de disolventes, lo que hace que el núcleo se pliegue dentro de la gota (hidrófobo) mientras que el almidón o el recubrimiento de proteína o el material encapsulante hidrófilo forme la pared separadas del gas de secado, formando las partículas secas mediante un filtro ciclónico que los deposita en un colector de vidrio situado en la parte inferior del dispositivo (Sosnik y Seremeta, 2015; Jafari, 2017).

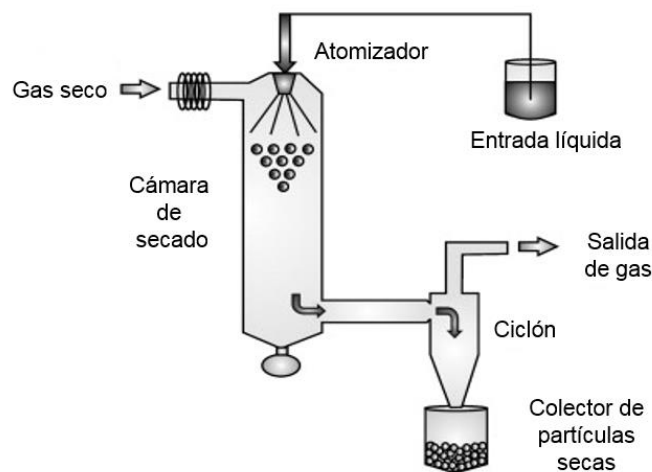


Figura 6. Esquema del proceso de secado por aspersión (Modificado de Sosnik y Seremeta, 2015).

El secado por aspersión puede ser de circuito abierto, en el cual se utiliza el aire como gas de secado que no se recircula o de circuito cerrado en el que un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno) se recicla en la cámara de secado durante todo el proceso, se prefiere el primero ya que es más rentable y estable, sin embargo el cerrado evita mezcla de gases explosivos y ayuda a manipular sustancias sensibles al oxígeno (Sosnik y Seremeta, 2015).

En cuanto a la dirección del flujo existen dos (Sosnik y Seremeta, 2015):

- a) Paralelo (misma dirección): el producto está en contacto con aire frío, por lo que es preferible para el secado de materiales sensibles al calor.
- b) Contracorriente (dirección opuesta): El producto está en contacto con el aire más caliente y es deseable para una mayor eficiencia térmica.
- c) Mixto: Con paralelo y contracorriente.

Las condiciones que afectan las propiedades del polvo son la temperatura de entrada de aire, la temperatura de salida de aire, velocidad del flujo, presión de atomización, tipo de flujo, el tamaño de la boquilla y alta concentración de la formulación (Sosnik y Seremeta, 2015; Keogh, 2005).

Es importante el ajuste y control de las condiciones de procesamiento, las temperaturas del aire de entrada y salida, así como el tipo de material utilizado para encapsular de manera viable los microorganismos probióticos (Alfaro-Galarza y col., 2020).

I.3.2 Materiales encapsulantes

Los carbohidratos y las proteínas son los materiales de pared más utilizados en el proceso de secado por aspersión. Aparte de la hidrofilia y biocompatibilidad, los carbohidratos y las proteínas generalmente tienen baja viscosidad en agua, buena propiedad de dispersión durante la emulsificación y buena propiedad de formación de películas.

También se utiliza la goma arábica siendo un hidrocoloide de baja viscosidad, que tiene una fracción de proteína única y por lo tanto puede servir como un emulsionante (Keogh, 2005; Tian y col., 2021).

En el Cuadro 2 se presenta una comparación de las propiedades encapsulantes de los carbohidratos y proteínas típicos utilizados en la industria de alimentos (Keogh, 2005; Tian y col., 2021).

Cuadro 2. Típicos materiales de pared utilizados para encapsular por el método de secado por aspersión (Modificado de Tian y col., 2021).

Material Encapsulante	Propiedades		
	Ventajas	Desventajas	
Carbohidrato	Qitosano	Capacidad de formación de película	Baja solubilidad
	Goma arábica	Alta habilidad de retención	Alto costo
	Almidón	Estabilizador de emulsión	Baja capacidad de retención
	Maltodextrinas	Baja viscosidad	Baca emulsificación
Proteína	Proteína de suero	Protección contra la oxidación	Baja capacidad encapsulante
	Gelatina	Capacidad de formar película	Baja solubilidad
	Caseinato de sodio	Anfifílica	Alto costo

A continuación, se muestran en el Cuadro 3, los métodos y materiales de pared utilizados para encapsular *L. rhamnosus* GG, y se observa que el material más utilizado en todos los métodos es el aislado de proteína.

Cuadro 3. Métodos y materiales de pared utilizados para encapsular *L. rhamnosus* GG.

Método	Material	Referencia
Electrospray	Aislado de proteína de suero de leche, inulina, goma persian.	Moayyedi y col., 2018.
Congelación por aspersión	Aislado de proteína de suero de leche, inulina, goma persian, alginato, lecitina.	Hug y col., 2017, Moayyedi y col., 2018.
Emulsión	Concentrado de proteínas de suero de leche, isomaltooligosacáridos, alginato, lecitina.	Liu y col., 2017, Hug y col., 2017.
Gelificación iónica	Alginato, goma de algarrobo, almidón de maíz con alto contenido de amilosa, proteínas de mantequilla y mucílago de semilla de membrillo.	Cheow y col., 2016; Dokoohaki y col., 2019; Ningtyas y col., 2019; Hugues-Ayala y col., 2020.
Secado por aspersión	Aislado de proteína de suero de leche, caseína, quimosina, inulina, goma persian, trehalosa, lactosa, maltodextrina y almidón modificado.	Guerin y col., 2017; Moayyedi y col., 2018; Su y col., 2018; Hernández-Barrueta y col., 2020; Agudelo-Chaparro y col., 2021.

En el Cuadro 4 se muestran los métodos y materiales de pared utilizados para encapsular *L. casei*. Donde se destaca que el material alginato es el más utilizado en los métodos encapsulantes.

Cuadro 4. Métodos y materiales de pared utilizados para encapsular *L. casei*.

Método	Material	Referencia
Electrospray	Proteína de suero, aislado de proteína de suero, pectina y alginato de sodio.	Coghetto y col., 2016; Alehosseini y col., 2018.
Congelación por aspersión	Polisacárido de pectina, goma gellan, goma xantano, κ-carragenano, dextrina, acetato ftalato de celulosa, quitosano, almidón y alginato de sodio.	Haiping y col., 2019; Beldarrain-Iznaga y col., 2021; Jouki y col., 2021.
Emulsión	Almidón resistente de arroz y aislado de proteína de suero.	Ashwar y col., 2018, Xiao y col., 2020.
Gelificación iónica	Alginato y quitosano.	Farias y col., 2018.
Homogeneización	Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) deshidratado, trehalosa.	Leone y col., 2017.
Secado por aspersión	Maltodextrina, goma arábica, almidón de maíz, leche desnatada, trehalosa, aislado de proteína de suero, alginato y quitosano.	Lian-Kun y col., 2017, Homayouni-Rad., 2021; Bommasamudram y col., 2022.

I.3.2.1 Almidones como material de pared

El almidón es uno de los polisacáridos naturales más abundantes, hipoalergénico, biocompatible y biodegradable, se ha utilizado para la encapsulación de componentes bioactivos sensibles (como probióticos, vitaminas, licopeno, polifenoles y sabores) en aplicaciones alimentarias. Sin embargo, la estructura de cadena larga del almidón nativo conduce a la degradabilidad bajo la existencia de ácido gástrico y enzimas intestinales por lo que se ha restringido su aplicación como material portador en estado estacionario; gracias a tratamientos físicos, químicos y/o enzimáticos, se ha modificado el almidón para dar las características deseadas y liberar de manera controlada lo que se protege en su interior (Reny col., 2021).

Los almidones modificados pueden ser materiales viables para microencapsular. El almidón se hidroliza para reducir la viscosidad, aumentar la solubilidad y se repolimeriza para formar polímeros pequeños altamente ramificados, que atrapan los glóbulos de aceite y proporcionar un obstáculo estérico (Keogh, 2005).

Estudios han informado que los almidones con tamaño pequeño de gránulo, o almidones modificados, son agentes encapsulantes efectivos que tienen un efecto protector sobre los compuestos químicos encapsulados formando agregados esféricos. Sin embargo, hay poca información sobre el uso de almidón en gránulos pequeños en la encapsulación de probióticos (Ávila-Reyes y col., 2014; Hoyos-Leyva y col., 2018; Alfaro-Galarza y col., 2020).

Los almidones se pueden hacer resistentes dependiendo del tratamiento que se les den. Existen cinco tipos diferentes de almidón resistente (Champ, 2004; Birkett y Brown, 2007; Yi y col., 2021):

- Almidón resistente tipo 1 (RS1): Este tipo de almidón es resistente porque el almidón queda atrapado físicamente dentro de la matriz alimentaria. Es físicamente inaccesible y se encuentra en cereales integrales.

- Almidón resistente tipo 2 (RS2). Este tipo de almidón es naturalmente resistente debido a la naturaleza del gránulo de almidón. RS2 ocurre en alimentos donde el almidón se come crudo (almidón del plátano verde) o donde los gránulos no se gelatinizan durante la cocción (almidón de maíz con alto contenido de amilosa) y son resistentes a la digestión enzimática.
- Almidón resistente tipo 3 (RS3): Son almidones retrogradados y se dan generalmente en los almidones ricos en amilosa, en donde se gelatinizan y luego se enfrían y/o se mantienen a temperatura ambiente, 4°C (refrigerador) o – 20°C (congelador) y se da como en el arroz cocido.
- Almidón resistente tipo 4 (RS4). Este tipo de almidón es modificado químicamente con una introducción de enlaces químicos (ésteres de almidón, éteres, enlaces cruzados, etc.) al polímero del almidón interfiriendo con la acción de las amilasas digestivas y se utiliza en muchos alimentos procesados como sopas o alimentos infantiles.
- Almidón resistente tipo 5 (RS5): Es un almidón complejo de amilosa-lípido, debido a que la amilosa tiene la capacidad de interactuar con moléculas anfifílicas o hidrofóbicas (ligandos), formando complejos de inclusión helicoidales, en función de sus temperaturas de fusión, se pueden identificar dos tipos de complejos: tipo I y tipo II. El tipo I tiene una temperatura de fusión inferior a 100°C debido a la organización aleatoria de los segmentos de la hélice y el tipo II tiene una estructura semicristalina más ordenada lo cual hace que la temperatura de fusión sea superior a 100°C (Cabrera-Ramírez y col., 2021), esto hace que este tipo de almidón tenga algunas ventajas específicas en comparación con otros tipos de RS, por ejemplo, tiene mejor estabilidad térmica que RS2 cuando se calienta.

1.3.2.2 Almidones succinatados

Los almidones succinatados son almidones modificados (Tipo 4) con OSA (anhídrido octenil succínico) mediante la reacción de esterificación entre los grupos hidroxilo (OH) del almidón y el anhídrido octenilsuccínico. La sustitución con OSA puede

ocurrir en el carbono 2, 3 y 6 en la molécula de glucosa de almidón y se conocen por sus abreviaturas en inglés como OSA-MS (Octenyl succinic anhydride modified starches) (Figura 7) (McNamee y col., 2018).

La modificación química del almidón granular se lleva a cabo en un medio acuoso bajo condiciones alcalinas suaves. Se cree que los grupos de OSA están presentes principalmente en las partes amorfas de la molécula de amilopectina en el interior del almidón. Sin embargo, también pueden existir en el exterior del gránulo en donde algunos de los grupos hidroxilo de las moléculas del almidón son esterificados con el OSA como se observa en la Figura 7 (McNamee y col., 2018).

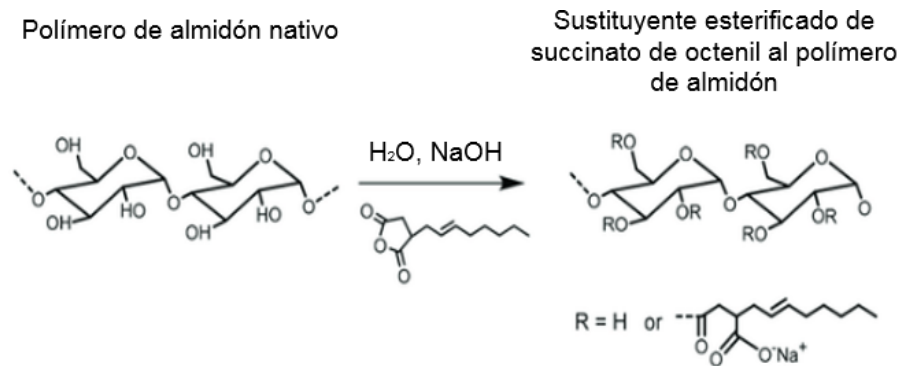


Figura 7. Reacción de esterificación de almidón con anhídrido octenilsuccínico (Modificado de McNamee y col., 2018).

El nivel de modificación de OSA es reportado por el porcentaje de OSA usado basado en el peso seco de almidón o el grado de sustitución (DS), que es el promedio número de derivados de succinato de octenilo (OS) por unidad de glucosa (McNamee y col., 2018).

El número de sustituciones de OH por OSA es proporcional a la hidrofobicidad del almidón nativo hidrófilo, es decir a medida que aumenta el número de sustituciones de OSA el almidón se vuelve más hidrófobo como se observa en la Figura 8, esto le da una mayor capacidad emulsionante a la partícula (McNamee y col., 2018).

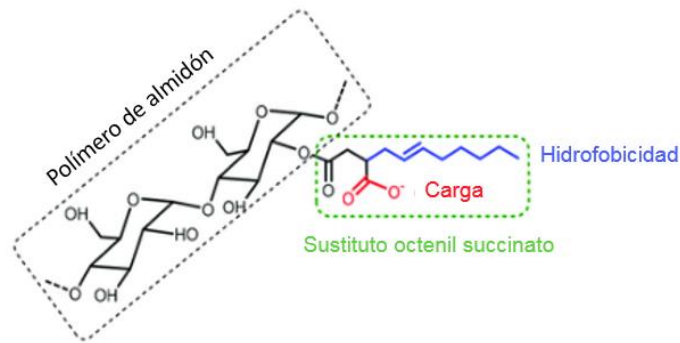


Figura 8. Hidrofobicidad en el sustituyente succinato de octenilo esterificado al polímero de almidón (Modificado de McNamee y col., 2018).

Este tipo de almidones se pueden utilizar como emulsionantes de calidad alimentaria eficaces para formar y estabilizar emulsiones, ya que tienen la capacidad de formar una capa gruesa alrededor de las gotas de aceite, lo que aumenta la repulsión estérica entre las gotas, inhibiendo así la coalescencia (Liu y col., 2020). Además, son excelentes formadores de paredes evitando el paso del oxígeno brindando estabilidad eficiente con las tensiones como la fuerza iónica el pH y el calor (Rehman y col., 2021).

Se ha permitido el uso de OSA-MS como aditivos alimentarios y están presentes en el mercado con diversos grados de polimerización y peso molecular.

- a) OSA-MS de pesos molecular alto: se utilizan en concentraciones elevadas para aumentar la viscosidad de la emulsión, genera un secado problemático y con baja estabilidad de almacenamiento.
- b) OSA-MS de menor peso molecular: se utilizan en mayores cantidades para dar una menor viscosidad de la emulsión alimentaria.

Alguna de las funciones de los almidones modificados con OSA es que pueden proteger el bioactivo atrapado de la oxidación, la carga adicional de un antioxidante certifica la defensa suprema durante el procesamiento y almacenamiento. La encapsulación de aceites enriquecidos con omega-6 junto con antioxidantes puede mejorar su estabilidad frente a la oxidación (Rehman y col., 2021).

I.4 Aplicación de probióticos microencapsulados en productos cárnicos

La principal industria en incluir probióticos libres y encapsulados debido al manejo de los productos son los productos lácteos, como en helados, yogurt bebible, yogurt tipo set, quesos y leche (Barajas-Álvarez y col., 2021; Afzaal y col., 2020).

Los probióticos se encapsulan para tener una mayor viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento y consumo, por lo que recientemente ha habido un interés por encapsularlos y así alargar la vida de anaquel de los productos. A continuación, en la Figura 9 se muestran las industrias en donde se han utilizado los probióticos (Barajas-Álvarez y col., 2021).



Figura 9. Adición de probióticos en productos lácteos y no lácteos (Modificada de Barajas-Álvarez y col., 2021).

Se ha desarrollado un interés por incrementar el valor agregado de los embutidos que son productos no lácteos, por ello, se han realizado en los últimos años estudios de adición de probióticos microencapsulados en productos como el chorizo fermentado seco (suck) al que se adicionó *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado en un material combinado de alginato, goma gellan, gelatina, péptido derivado de la caseína digerida por el páncreas y fructooligosacáridos, lo que ayudó a conservar el microorganismo durante el procesamiento obteniendo un recuento de colonias mayor que el registrado en el producto inoculado con el probiótico sin encapsular; el mismo efecto protector se observó contra el estrés gástrico (ÜNAL y col., 2017).

Lactobacillus reuteri se encapsuló en alginato mediante extrusión para adicionarse a una salchicha fermentada y obtuvieron más células microencapsuladas que libres en el producto final (Muthukumarasamy y Holley, 2006). Así mismo Turhan y col., (2017) concuerdan con la conservación de *Lactobacillus rhamnosus* en salchicha fermentada ya que se agregaron microencapsulados en alginato, goma gellan, gelatina y fructooligosacáridos por medio de extrusión y se hicieron recuentos bacterianos a los 0, 2, 4 y 6 meses, obteniendo 8.19 ± 0.25 , 8.46 ± 0.18 , 8.01 ± 0.27 , 7.99 ± 0.23 Log UFC/g respectivamente, concluyendo que después de 6 meses de almacenamiento la disminución de recuento bacteriano no fue significativo; en cambio en *L. rhamnosus* libre hubo una disminución 7.35 ± 0.87 Log UFC/g en el mes 0 a 6.59 ± 0.53 Log UFC/g en el mes 6, siendo significativo.

Calvaheerio y col. (2021) incorporaron *Enterococcus faecium* encapsulado en perlas de alginato para generar una salchicha fermentada probiótica y mostraron efectividad en la protección del probiótico durante el proceso de maduración y almacenamiento; sin embargo, en otro estudio realizado por Song y col. (2018) se agregaron células microencapsuladas de *Bifidobacterium longum* en L-cisteína liofilizándolas y sólo se conservaron la mitad de las bifidobacterias en la salchicha fermentada.

De igual manera De Marins y col. (2022), demostraron que es posible producir hamburguesas cocidas con la adición de *Bifidobacterium animalis* ssp, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* encapsuladas con alginato, β -ciclodextrina y goma de xantana, logrando la protección de las bacterias probióticas, permitiendo su viabilidad en el momento del consumo y la supervivencia durante la digestión gastrointestinal simulada.

1.5 Consumo de productos cárnicos en México

Dentro de la producción de carnes frías en 2022 se realizó un estudio de agrupación por producto en volumen (toneladas) y el valor en millones de pesos, del cual se desprende que el 51% de la producción está destinada para salchichas, 40% para

jamones y un 10% para otras carnes frías como chorizo, tocino, mortadela y queso de puerco; como se muestra en la Figura 10 (Consejo Mexicano de la Carne, 2022).

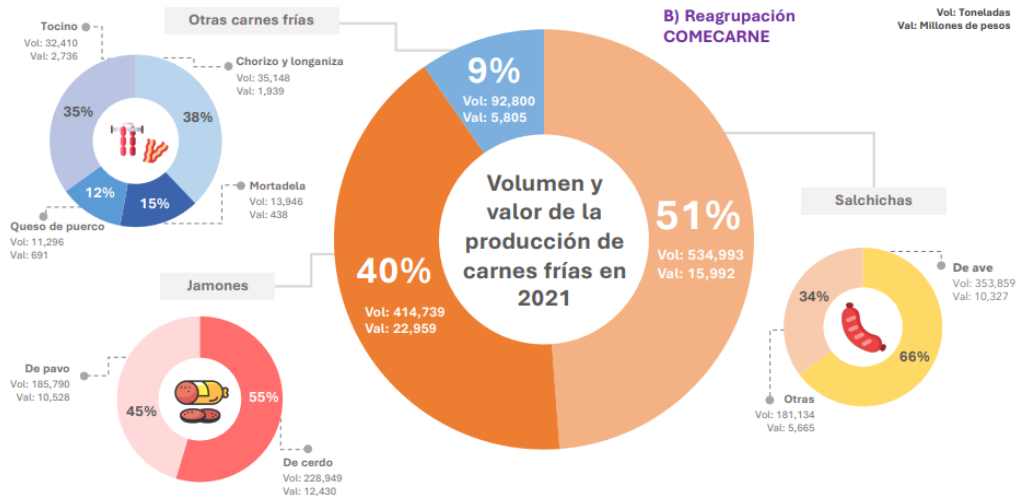


Figura 10. Volumen y valor de la producción por producto de carnes frías en 2022 (Consejo Mexicano de la Carne, 2022).

El consumo *per cápita* de carnes frías se ha mantenido desde el 2016 hasta el 2021 con un total de 8.2 kg/persona y el aumento de producción de salchichas ha aumentado del 2016 al 2021 un 12.32% (Figura 11) (Consejo Mexicano de la Carne, 2019).

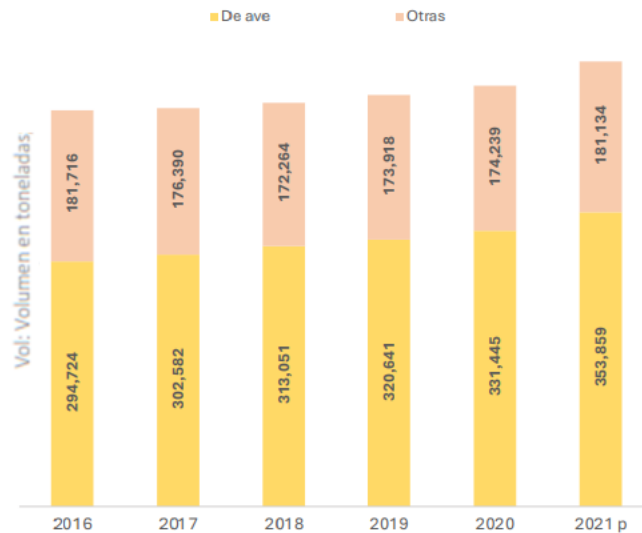


Figura 11. Niveles de producción de salchichas (Consejo Mexicano de la Carne, 2022).

I.6 Salchicha

La salchicha en base a la norma mexicana (NMX-F-065-1984), se define como un producto alimenticio embutido de pasta semifirme de color característico, elaborado con la mezcla de carne de ternera o res/cerdo y se le puede agregar grasas de las especies antes mencionadas.

En algunos casos se agregan vísceras, se condimenta y se adicionan aditivos para alimentos como fosfato de sodio que funge como espesante y retenedor de humedad, eritorbato de sodio (antioxidante) y nitrito de sodio aportando color y como conservante (PROFECO, 2020).

La mezcla resultante de todos los componentes se amasa y se embute en fundas naturales (tripas, por lo general de cerdo) o artificiales (colágeno o celulosa) y se le da un tratamiento por calor para la gelificación de la estructura proteica característica de los batidos cárnicos, para reducir carga bacteriana, inactivar enzimas y obtener características sensoriales deseadas como un color rosado característico, consistencia semiblanda con la masa compactada, olor y sabor agradable (Pérez y col., 2007; PROFECO 2020).

Las salchichas se clasifican en tres tipos y un solo grado de calidad además cada tipo tiene sus dimensiones establecidas por la NMX-F-065-1984, como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Tipos de salchicha y dimensiones (NMX-F-065-1984).

Tipo	Salchicha	Dimensiones (mm)	
		Diámetro	Longitud
I	Viena	14-26	50-300
III	Franckfort	20-33	80-300
II	Cocktail	14-26	30-65

I.6.1 Composición

Como la norma mexicana NMX-F-065-1984 no es obligatoria, sólo es una guía, se recomienda que las salchichas contengan en su composición no menos de 60% de carne de res y cerdo, mezclada con grasa de cerdo y emulsificados, pudiendo ser ahumados o no, sometidos a cocción y enfriamiento, empacados en material adecuado para su distribución y conservación en refrigeración.

En el mercado según lo reportado por la PROFECO (2020), se encuentran salchichas de:

- Pavo o pechuga de pavo: Si se ostenta la salchicha como de pavo sólo deberá contener pavo.
- Hot dog: Puede ser elaborada con pavo, pollo o lardo de cerdo.
- Viena: Se elaboran con cerdo, grasa de cerdo, lardo de cerdo, pavo o pollo.
- Cocktail.
- Para asar: Está compuesta por cerdo, pollo, lardo o corazón o grasa de cerdo.
- Reducida en grasa.
- Reducida en sodio.

I.6.2 Aplicación de probióticos microencapsulados en salchicha cocida

Generalmente se incorporan cepas probióticas a la carne antes de ser fermentada, pero se han estudiado muy poco los probióticos en carne cocida, debido al efecto negativo del tratamiento térmico sobre su viabilidad y estabilidad del microorganismo.

Se han integrado en estos productos cocidos microorganismos probióticos termófilos encapsulados. Pérez-Chabela y col. (2013), microencapsularon bacterias ácido lácticas termotolerantes (TLAB) (*Aerococcus viridians*, *Enetrococcus Faecium*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*) en goma de acacia por secado por aspersion y se inocularon en carne cocida (rebozados de 20 mm de diámetro); durante el almacenamiento de ocho días, las muestras inoculadas con *L. plantarum*

y *P. pentosaceus* obtuvieron un recuento significativamente mayor de LAB ($p < 0.05$) que *A. viridans* o *E. faecium*, y el conteo viable de LAB totales aumentó significativamente ($p < 0.05$) conforme pasaron los días.

También se ha utilizado la microencapsulación para proteger los cultivos iniciadores como una técnica emergente para regular los procesos de fermentación y mantener las características específicas del producto de sucuks fermentados y tratados térmicamente.

Como lo descrito por Bilenler y col. (2017) que prepararon una salchicha cocida fermentada con *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus xylosus* microencapsulados en una mezcla de alginato y almidón por medio de liofilización y obtuvieron que la supervivencia de las bacterias después del tratamiento térmico a 70°C durante 20 minutos sólo se redujo 1 logaritmo en el número de células viables de *L. plantarum* y *S. xylosus*, por lo tanto, la encapsulación de cultivos iniciadores adicionados en la producción de sucuks tratados térmicamente aseguró su viabilidad antes, durante y después de la producción (tanto de fermentación como de tratamiento térmico).

También en salchichas cocidas se ha evaluado la incorporación de probióticos microencapsulados (*Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*) con co-productos de la industria como prebióticos (harina de cáscara de tuna, harina de orujo de manzana o inulina).

Barragán-Martínez y col. (2019), estudiaron lo antes mencionado y obtuvieron un mayor recuento de bacterias ácido-lácticas cuando se microencapsularon *E. faecium* y *P. pentosaceus* con un prebiótico.

III. OBJETIVOS

III.1 General

Evaluar la microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 con almidón modificado tipo 4. Así como, evaluar la sobrevivencia de las microcápsulas a estrés térmico y digestibilidad *in vitro* en un producto cárnico cocido.

III.2 Específicos

- Comparar la microencapsulación en diferentes condiciones de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 usando almidón modificado tipo 4 y determinar el número de células viables después del secado por aspersión
- Evaluar la resistencia térmica de las microcápsulas de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, a tres diferentes temperaturas (65°C, 75°C y 85°C) y dos tiempos de exposición (5 y 10 minutos), determinando el número de células viables después del tratamiento térmico.
- Evaluar la sobrevivencia en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 microencapsulados y adicionados al producto cárnico cocido.

III. METODOLOGÍA

III.1 Materiales

III.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Las cepas *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 fueron de Christian-Hansen nu-trish® LGG® y las cepas *Lactobacillus casei* ATCC 393 fueron donadas por el laboratorio de bioprocesos agrícolas del Dr. Michael J. Miller de la Universidad de Illinois.

El material encapsulante utilizado fue un almidón modificado tipo 4 (AM4, almidón de haba hidrolizado y succinatado por energía de microondas con un grado de sustitución de 0.015), donado por el trabajo de investigación doctoral inédito de González-Mendoza y col. (2023).

Material encapsulante comercial NLOK® marca Ingredion®, almidón de maíz con doble hidrólisis una ácida y enzimática además de ser succinatado, (Ingredion, 2023).

III.1.2 Equipos

AquaLab (Pawkit, Decagon®).

Cutter (TALSA® K15E).

Embutidora (TALSA® H15PA)

Homogeneizador (IKA® T18 digital Ultra Turrax®).

HunterLab Colorflex Colorimeter

Incubadora (Felisa®).

Molino de carne (Torrey®).

Potenciómetro HI 99163 (HANNA® Instruments, Inc.).

Secador por aspersion (BÜCHI® Mini Spray Dryer B-290).

Stomacher (Bag Mixer®).

Texturómetro (Texture Analyser, TA. XT-Plus®).

Vórtex (Maxi Mix II, Thermolyne®).

III.2 Métodos

III.2.1 Microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 mediante secado por aspersión

De acuerdo con lo descrito por Murúa-Pagola y col. (2009) y Pérez-Chabela y col. (2013) se realizó la microencapsulación con algunas modificaciones. Una colonia de LGG o *L. casei* según fuera el caso, se añadió en 10 mL de caldo MRS y se incubó a 37°C durante 24 h bajo condiciones de anaerobiosis en una incubadora (Felisa®). En un frasco de 90 mL de caldo MRS se agregaron 10 mL del inóculo y se incubó a 37°C durante 6 h y 4 h, respectivamente. Se centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 10 min y se hicieron dos lavados con peptona (0.5%) al sedimento, éste se resuspendió en 100 mL del material encapsulante (almidón tipo 4; de González-Mendoza y col., (2022) o almidón modificado NLOK® de Ingredion® como Control) con un 30% de sólidos totales, utilizando un homogeneizador (IKA® T18 digital ULTRA TURRAX®) se homogeneizó a 7000 rpm durante 1 min (de Mantos y col., 2019).

Una vez terminado se procedió a microencapsular la cepa probiótica utilizando un secador por aspersión (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290®) con diámetro de boquilla de la tobera de 0.7 mm, estimando un tamaño de partícula entre 1-25 µm. Las condiciones del secado por aspersión se evaluaron mediante un diseño experimental, con dos factores (temperatura de entrada y flujo) y dos niveles en cada factor con un total de cuatro combinaciones de tratamiento (diseño factorial 2²) aleatorizado y con tres réplicas, donde se evaluó el rendimiento y sobrevivencia de los microorganismos.

III.2.1.1 Recuento de bacterias, eficiencia y rendimiento de la microencapsulación

La viabilidad se determinó hidratando 1 g de las bacterias microencapsuladas en 9 mL de caldo MRS y se homogeneizó con un vórtex (Maxi Mix II, Thermolyne®). Se llevaron a cabo las diluciones correspondientes para sembrar en placas de agar MRS

y se incubó a 37°C durante 24 h, bajo condiciones de anaerobiosis para reportar las unidades formadoras de colonias por mililitro (Pérez-Chabela y col., 2013).

El número de células viables antes (N_0) y después del secado por aspersión (N) se expresó como eficiencia de microencapsulación (EE): $EE = (N/N_0) \times 100$ (Rajam y Anandharamakrishnan, 2015).

El rendimiento de la microencapsulación se calculó después del secado por aspersión por los pesos del producto obtenido (P) y del material encapsulante antes del secado (P_0) y se hizo de la siguiente manera: $\text{Rendimiento \%} = (P/P_0) \times 100$ (Kawakita y col., 2021).

III.2.2 Caracterización de las microcápsulas

III.2.2.1 Actividad de agua

La actividad de agua de las microcápsulas de LGG, *L. casei* y control se determinó empleando un AquaLab (Pawkit, Decagon®) previamente calibrado, las determinaciones se realizaron por triplicado (Pérez-Chabela y col., 2013).

III.2.2.2 Evaluación de la resistencia térmica

La resistencia se evaluó pesando 1 g de células libres o microencapsuladas (LGG o *L. casei* o control) en un tubo que contenía 9 mL de agua destilada previamente estéril.

Los tubos se agitaron y sometieron a tratamiento térmico a diferentes temperaturas (65°C, 75°C y 85°C) durante 5 y 10 min y se enfriaron inmediatamente en un baño de agua helada, se procedió a tomar las diluciones pertinentes para sembrar en placas de MRS y se realizó el conteo de las células viables (Ashwar y col., 2018).

III.2.3 Elaboración de producto cárnico cocido

El producto cárnico cocido fue una salchicha cocida tipo Viena, el procedimiento se realizó de acuerdo con lo reportado por Barragán y col. (2019) con algunas modificaciones y se formuló de la siguiente manera (Cuadro 6):

Cuadro 6. Formulación de la salchicha tipo Viena.

Ingrediente	Composición (%)
Carne de cerdo	45
Carne de res	18
Grasa de lomo de cerdo	8.95
Hielo	25.00
NaCl	1.15
Mezcla de fosfatos (FABPSA®)	0.400
Mezcla de sal cura (contiene 0.5% de NaNO ₂)	0.250
Glutamato monosódico	0.100
Pimienta blanca	0.005
Eritorbato de sodio	0.050
Azúcar	0.200
Ajo en polvo	0.050
Pimentón rojo	0.350
Probiótico microencapsulado (<i>L. rhamnosus</i> GG o <i>L. casei</i>)	5

Se compró la carne magra de cerdo y lardo de un establecimiento local con certificado TIF, eliminando el tejido conectivo visible y se congeló. Se pesaron los ingredientes y en un molino de carne (Torrey®), se molió la carne y la grasa a través de una placa de 3 mm y 8 mm respectivamente, primeramente, se adicionó la mezcla de fosfatos comercial (FABPSA, México), sal y la mezcla de sal cura, se agregó un tercio del hielo y se mezcló en el cutter (TALSA® K15E) durante 7 min a velocidad baja. Se añadió la grasa de lomo de cerdo congelada y se emulsionó durante 2 min a velocidad alta. Se añadió un tercio de hielo a la emulsión y se homogenizó durante 2 min y 30 s, se agregaron los condimentos y los aditivos y se homogeneizó durante 1 min, se agregó el último tercio del hielo y se mezcló durante 2 min.

Después una funda de celulosa de 20 mm de diámetro fue previamente remojada en una solución de sal al 10% durante 20 min, posteriormente la masa cárnica se embutió en la funda de celulosa. Se realizaron dos diferentes mezclas, una de ellas fue sin microcápsulas (salchicha control) y la otra fue inoculando las microcápsulas de LGG o *L. casei*, se mezclaron homogéneamente (obteniendo una concentración de aproximadamente 10^8 UFC/mL en la salchicha), se embutieron usando una embutidora (TALSA® H15PA) y se cocinaron a baño María hasta alcanzar una temperatura interna de $70 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, luego se enfriaron en un baño de agua de hielo y se empacaron al vacío en bolsas cryovac, hasta sus análisis correspondientes (Barragán y col., 2019).

Cabe mencionar que la temperatura del procedimiento del mezclado y el embutido se hizo por debajo de los $12 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para todas las determinaciones en la salchicha tipo Viena que se describen a continuación, se utilizó como control una salchicha sin la adición de microcápsulas y también salchichas inoculadas con microcápsulas de LGG o *L. casei*.

III.2.3.1 Determinaciones en la salchicha tipo Viena

III.2.3.1.1 Análisis proximales

A las 24 h de ser elaboradas las salchichas se determinó por triplicado la humedad, proteína, grasa y cenizas de acuerdo con los métodos Oficiales de Análisis de la AOAC.

Humedad por secado en horno a 105°C hasta peso constante (AOAC. 950.46:2005), proteínas por Kjeldahl (AOAC 981.10:2005), grasa por el método de extracción semicontinuo (AOAC 960.39 B) y cenizas por incineración en mufla (AOAC 920.153:2005).

III.2.3.1.2 Color y pH

La determinación del color se hizo de acuerdo con lo descrito por AMSA (2012) y Barragán-Martínez y col. (2019). Las muestras a analizar fueron las salchichas control e inoculadas con las microcápsulas de LGG o *L. casei*. Se molió cada muestra y se colocó en una celda de vidrio en un espectrocolorímetro HunterLab Colorflex Colorimeter (con iluminante D65, en función de ángulo observador estándar a 2°).

Los parámetros medidos fueron: la luminosidad (L^*), índice rojo-verde (a^*) e índice amarillo-azul (b^*). El resultado fue el promedio de las cuatro lecturas y girando 90° la muestra y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Ángulo de matiz (HUE)} = \text{ARCTan} \frac{b^*}{a^*}$$

$$\text{Índice de saturación (S)} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

La diferencia de color total en las muestras de salchichas tomando como referencia la muestra control, se calculó como:

$$\text{Diferencia de color } (\Delta E) = \sqrt{((L^*_{control} - L^*)^2 + (a^*_{control} - a^*)^2 + (b^*_{control} - b^*)^2)}$$

En cuanto a la determinación de pH se utilizó un potenciómetro HI 99163 (HANNA® Instruments Inc.) previamente calibrado a 4 y 7 de pH, se pesaron 10 g de las muestras de salchichas y se añadieron 100 mL de solución de NaCl al 5% (p/v) (Barragán-Martínez, 2019). La mediciones se realizaron por triplicado.

III.2.3.1.3 Textura

Las muestras de salchichas se cortaron en longitudes de 2 cm para realizar el análisis de perfil de textura con un texturómetro (Texture Analyser, TA. XT-Plus®), comprimiendo axialmente en dos ciclos consecutivos con una sonda acrílica de 25

mm de diámetro, a una velocidad de 1 mm/s, con una compresión del 50% y un periodo de espera de 5 s (Barragán y col., 2019).

Los parámetros de textura se calcularon de acuerdo con las curvas de fuerza-tiempo de la siguiente manera: dureza, cohesión y elasticidad (Szczesniak, 1963; Bourne, 1978).

La elasticidad se determinó a partir de las curvas de fuerza-deformación midiendo el área encerrada por el ciclo (Voisey et al., 1975). Los resultados fueron la media de tres ejecuciones reproducibles de cada lote de salchichas elaboradas (Barragán y col., 2019).

III.2.3.1.4 Concentración de nitritos

La determinación de nitritos se realizó de acuerdo con la AOAC 973.31-1996, en donde a 5 g de la muestra previamente triturada, se le agregaron 40 mL de agua caliente a 80°C y se mezcló hasta deshacer todos los grumos.

La mezcla se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL (sólo se agregaron 300 mL de agua caliente a 80°C) y se puso a baño María caliente por 2 h con agitación ocasional, se enfrió a temperatura ambiente y se aforó el matraz. La solución se filtró y se centrifugó hasta tener una solución clara.

De la solución filtrada (solución madre), se tomaron 25 mL y con agua destilada se aforó en un matraz volumétrico de 50 mL, de esta solución se tomaron 45 mL y se agregaron 2.5 mL de solución de sulfanilamida (0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de CH₃COOH glacial al 15% (v/v)), se dejó reposar 5 min y después se adicionaron 2.5 mL de solución de N-(1-naftil)-etilendiamina NED (0.2 g de NED en 150 mL de CH₃COOH glacial al 15% (v/v)). Se mezcló y se dejó reposar 15 min. Una porción se transfirió a una celda del espectrofotómetro y se determinó la absorbancia a 540 nm.

Para el blanco se agregaron 45 mL de agua, 2.5 mL de solución de sulfanilamida, se reposó 5 min y se añadieron 2.5 mL de solución de NED y se volvió a reposar 15 min.

Para la realización de la curva estándar, se agregaron 10, 20, 30 40 mL de solución de trabajo (1 $\mu\text{g/mL}$ de NaNO_2) en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 2.5 mL de solución de sulfanilamida (se reposó 5 min) y 2.5 mL de solución NED (se reposó 15 min), se mezcló y se midieron las absorbancias.

El cálculo de la concentración de nitritos se realizó de la siguiente manera:

$$y = ax + b$$

$$\text{Concentración de nitritos ppm } (\mu\text{g/mL}) = \frac{(\text{Prom.abs} - b)(FD)(500)}{(a)(g)}$$

Donde:

Prom.abs= Promedio de las absorbancias.

FD= Factor de dilución.

g=gramos de salchicha utilizada.

a=pendiente de la línea de la curva de calibración.

b=Intercepción de la línea de la curva de calibración.

III.2.3.1.5 Análisis microbiológicos

Para los recuentos microbiológicos se pesaron 25 g de muestra de salchicha cocida y se añadieron 225 mL de agua peptonada (0.1%), se homogeneizaron en un Stomacher (BagMixer®) durante 10 min, se hicieron las diluciones decimales pertinentes, transfiriendo 1 mL del cultivo pre-enriquecido a tubos con diluyente de peptona (0.5%).

Para los análisis microbiológicos respectivos, se tomaron 0.1 mL y dependiendo del análisis microbiológico a realizar se seleccionó la técnica y el medio del análisis (Cuadro 7) (NOM-2010-SSA1-2014).

Cuadro 7. Análisis microbiológicos para la salchicha cocida tipo Viena.

Tipo de análisis	Técnica de análisis	Medio	Referencia
Bacterias mesófilas aerobias	Vaciado en placa	Agar para cuenta estándar (Extracto de levadura, triptona, dextrosa, agar y agua)	NOM-092-SSA-1994
<i>Escherichia coli</i>	Número más probable	Caldo bilis verde brillante y agar eosina azul de metileno	NOM-2010-SSA1-2014
<i>Salmonella</i> spp	Presencia/ausencia	Caldo RVS, caldo MKTTn, agar XLD, agar ASB y agar verde brillante.	NOM-2010-SSA1-2014
<i>Listeria monocytogenes</i>	Presencia/ausencia	Agar Oxford y agar PALCAM	NOM-2010-SSA1-2014

III.2.4 Sobrevivencia a digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* se realizó con adecuaciones de acuerdo con lo descrito por Madureira y col. (2011), Falfán-Cortés y col. (2014), Kim y Hurt. (2018), Poletto y col. (2019), de Mantos y col. (2019) y Hugues-Ayala y col. (2019) en donde las células libres, microcápsulas o en la salchicha según sea el caso se sometieron a diferentes condiciones simulando cada parte de la digestión *in vitro*.

Para la simulación de la saliva se tomó 1 mL o 1 g de se hizo de células libres o microcápsulas respectivamente y se homogeneizaron en 5 mL de saliva artificial (1.7 mL de NaCl (175 g/L), 290 mg de α -amilasa, 0.22 g/L CaCl_2 manteniendo un pH de 6.8) y se homogeneizó en un Stomacher (BagMixer®) durante 5 min para simular la masticación a 37°C (Naim y col., 2006). Las muestras de salchichas (control y con microcápsulas) se pesaron 20 g y se agregaron 20 mL de la saliva artificial y se homogeneizó en el Stomacher durante 10 min.

Para la simulación de esófago y estómago a las muestras anteriores, se le añadieron 10 mL de fluido gástrico (18 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (22.2 g/L), 6.5 mL de HCl concentrado y 2.5 g de pepsina en 1 L) manteniendo un pH de 2 ajustándolo con HCl 1 M o NaOH 1 M, se agitó a 37°C durante 90 min. Después se simuló el duodeno,

agregando 10 mL de jugo intestinal (9 mL de CaCl₂ · 2H₂O (22.2 g/L), 6.3 mL KCl (89.6 g/L), 9 g de pancreatina en 1 L) y 5 mL de jugo biliar (68.3 mL de NaHCO₃ (84.7 g/L), 15 g de bilis bovina en 1 L) manteniendo un pH de 5 ajustándolo con NaHCO₃ 1 M o HCl 1 M y se agitó a 37°C durante 20 min.

Para finalizar se simuló el ileón ajustando la muestra a un pH de 7 con NaHCO₃ 0.1 M y se agitó a 37°C durante 90 min.

En cada punto de la simulación (boca, esófago/estómago, duodeno e ileón) se tomó 1 mL de muestra y se diluyeron en 9 mL de peptona para el análisis de sobrevivencia de los *Lactobacillus* a los tiempos 0, 90, 110 y 220 minutos respectivamente

III.3 Diseños experimentales

Para la evaluación de la microencapsulación mediante secado por aspersión se planteó un diseño factorial 2² con tres réplicas y completamente aleatorizado. Donde los factores y niveles se muestran en el Cuadro 8. El diseño se evaluó para cada microorganismo y se eligió el mejor tratamiento de cada cepa probiótica.

Cuadro 8. Diseño experimental para *L. rhamnosus* GG y *L. casei*.

Factor	Temperatura de entrada (°C)	Flujo (mL/min)
-1	120	7
1	140	12

Para la elaboración de la salchicha probiótica se realizó un diseño unifactorial con tres réplicas completamente aleatorizado, donde el factor fue la adición de las dos cepas probióticas microencapsuladas y como control se tuvieron salchichas sin la adición de los microorganismos.

III.3.1 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados de acuerdo con las restricciones de los diseños. Y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 mediante secado por aspersión

IV.1.1 Recuento de bacterias y eficiencia de microencapsulación

Para la determinación de las condiciones óptimas en el secador por aspersión de *L. rhamnosus* GG (LGG) y *L. casei* (LC) se evaluaron los siguientes parámetros: temperatura de salida, rendimiento, eficiencia, células viables antes y después de la microencapsulación y a_w de los diferentes tratamientos. Esto se realizó por medio de un diseño experimental con dos temperaturas (120°C y 140°C) y dos flujos de alimentación (7 mL/min y 12 mL/min). Las probabilidades del análisis ANOVA se presentan en el Cuadro A del ANEXO y se obtuvieron los siguientes resultados.

En el caso del microorganismo LGG, se observó que el factor temperatura de entrada tiene influencia sobre el parámetro temperatura de salida ($P=0.036$, Cuadro A, ANEXO). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el rendimiento (Cuadro 9). Se pudo observar que el material encapsulante actúa de manera eficaz a 120 o 140°C y con un flujo medio o rápido.

Arsalan y col. (2015) reportaron que al utilizar almidón modificado con una concentración de sólidos totales del 20% (p/v) obtuvieron un rendimiento de $39.33 \pm 6.37\%$ similar al de este trabajo que fue de 44 – 55% para ambos microorganismos, este intervalo concuerda con el rendimiento óptimo (50%) para escala de laboratorio, por lo que se considera un secado exitoso (Borrmann y col., 2013, Sahin-Nadeem y Afsin, 2014). En comparación a la escala industrial en donde el rendimiento se acerca al 100%, a escala de laboratorio el rendimiento es más bajo (20 - 70%), debido a la pérdida del producto en las paredes de la cámara del secado, el volumen del lote utilizado, y al paso de partículas finas ($<2 \mu\text{m}$) que suelen pasar al aire de escape debido a la ineficaz capacidad de separación del ciclón, mientras que a nivel industrial los sistemas de filtración son efectivos para aumentar el rendimiento (Sosnik y col., 2015).

Los bajos valores de rendimiento del producto pueden ser por la pérdida durante la etapa del secado ya sea por algunas gotas del líquido dentro de la pared de la cámara de secado o en el ciclón, afectando de manera directa al rendimiento del método como fue con el caso de Cevher y col. (2006) con un contenido de sólidos totales de 0.5% (p/v), obtuvieron microcápsulas de quitosano con un rendimiento de (47 – 50%) debido al tamaño del lote (200 mL de solución) y pérdidas dentro del secado.

También los bajos valores de rendimiento se pueden deber por la concentración la concentración de sólidos totales, Carlan y col. (2019) obtuvieron un rendimiento del 30% al microencapsular vitamina B1 con almidón modificado a una concentración de sólidos totales del 1% (p/v) con una temperatura de entrada de 120°C, mediante el método de secado por aspersion, este comportamiento fue similar a lo reportado por O` Riordan y col. (2001) donde evaluaron el rendimiento del método de secado por aspersion microencapsulando *Bifidobacterium* con almidón de maíz modificado con OSA con una concentración de sólidos totales del 10% (p/v) y temperatura de entrada de 100°C y obtuvieron un rendimiento del 30% también menor al de este trabajo, esto se pudo deber a que nuestra concentración sólidos totales era del 30% (p/v). Hernández-López y col. (2018) microencapsularon con el material NLOK® la cepa *L. penthosus* por el método de secado por aspersion y analizaron las condiciones óptimas para obtener una mayor eficiencia y obtuvieron que fue con una concentración de sólidos totales del 30% como lo ideal.

Por otra parte, tanto la temperatura de salida como el rendimiento se puede ver influenciado por la temperatura de entrada durante el secado (Kawakita y col., 2021), como se observa en los datos obtenidos en el Cuadro 9 y 11, a una temperatura de entrada de 120°C con un flujo de alimentación de 7 mL/min y 12 mL/min, visualmente obtuvimos menores temperaturas de salida y rendimientos en comparación con la temperatura de entrada de 140°C. Por lo que, independiente del microorganismo (LGG o LC) a microencapsular, si la temperatura de entrada es de 140°C se obtendrán valores más altos en cuanto a temperatura de salida y rendimiento.

Cuadro 9. Rendimiento de *Lactobacillus rhamnosus* GG microencapsulado mediante secado por aspersion de usando almidón modificado tipo 4.

Tratamiento	Factor		Temperatura de salida (°C)	Rendimiento (%)
	Temperatura de entrada (°C)	Flujo (mL/min)		
LGGM1	120	7	83.5 ± 2.12 ^a	44.5 ± 3.53 ^a
LGGM2	140	7	99 ± 8.50 ^a	54.5 ± 2.12 ^a
LGGM3	120	12	85 ± 4.24 ^a	45.5 ± 4.94 ^a
LGGM4	140	12	91 ± 1.41 ^a	48.0 ± 1.41 ^a

LGGM= *Lactobacillus rhamnosus* GG microencapsulado, n=3 réplicas. Media ± desviación estándar, valores con diferentes superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$).

Posteriormente, se evaluaron los resultados de la viabilidad celular, eficiencia y a_w de los tratamientos (Cuadro 10). De acuerdo con los resultados obtenidos, tampoco se encontraron diferencias significativas en los tratamientos, lo que indica que, a pesar de haberse utilizado diferentes temperaturas de entrada y caudales de alimentación, el material y la cepa probiótica se comportaron de la misma manera. No obstante, se decidió utilizar como mejor tratamiento al tratamiento LGGM4 debido a que usando los factores de éste, se tenía una menor adherencia del material a la cámara del secado y al ciclón, permitiendo tener un mejor manejo del instrumento, lo que se reflejó en una menor variación en los resultados obtenidos, teniéndose una menor desviación estándar en los datos.

Para la medición de actividad de agua (a_w) es importante destacar que los datos obtenidos para ambos microorganismos son los ideales, presentando valores de 0.19-0.21 (Cuadro 10 y Cuadro 12). Un intervalo en el cual los polvos tienen buenas características como baja aglomeración, alta estabilidad y sobrevivencia del microorganismo (Hernández-López y col., 2018). La a_w desempeña un papel fundamental en la evaluación de la estabilidad, seguridad y crecimiento microbiano.

Mantener la actividad de agua dentro del intervalo apropiado garantiza la protección del material central en una microcápsula estable.

Cuadro 10. Evaluación de *Lactobacillus rhamnosus* GG microencapsulado mediante secado por aspersión usando almidón modificado tipo 4.

Tratamiento	Factor		Células viables totales		Eficiencia (%)	a _w
	T de entrada (°C)	Flujo (mL/min)	Antes de microencapsular (Log UFC/mL)	Después de microencapsular (Log UFC/g)		
LGGM1	120	7	10.5 ± 0.05 ^a	9.0 ± 0.50 ^a	86 ± 5.2 ^a	0.21 ± 0.014 ^a
LGGM2	140	7	10.5 ± 0.01 ^a	8.5 ± 0.21 ^a	81 ± 2.1 ^a	0.15 ± 0.000 ^a
LGGM3	120	12	10.4 ± 0.15 ^a	9.3 ± 0.21 ^a	89 ± 3.3 ^a	0.19 ± 0.023 ^a
LGGM4	140	12	10.5 ± 0.02 ^a	8.8 ± 0.14 ^a	84 ± 1.5 ^a	0.21 ± 0.078 ^a

LGGM= *Lactobacillus rhamnosus* GG microencapsulado, n=3 replicaciones. Media ± desviación estándar, valores con diferentes superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$).

Por otro lado, los resultados para la microencapsulación de LC se presentan en el Cuadro 11.

En el Cuadro A del ANEXO, se pudo observar que el factor temperatura es el que tiene influencia sobre todos los parámetros excepto a_w. Esto pudo deberse a que LC es más termosensible que LGG.

Al analizar las condiciones óptimas para LC, se observó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos para las variables temperatura de salida y rendimiento, similar a lo observado anteriormente para LGG.

Cuadro 11. Rendimiento de *Lactobacillus casei* microencapsulados mediante secado por aspersión usando almidón modificado tipo 4.

Tratamiento	Factor		Temperatura de salida (°C)	Rendimiento (%)
	Temperatura de entrada (°C)	Flujo (mL/min)		
LCM1	120	7	90 ± 4.36 ^a	49 ± 1.26 ^a
LCM2	140	7	101 ± 2.65 ^a	54 ± 0.96 ^a
LCM3	120	12	89 ± 8.54 ^a	49 ± 5.08 ^a
LCM4	140	12	98 ± 5.86 ^a	55 ± 3.63 ^a

LCM= *Lactobacillus casei* microencapsulado, n=3 réplicas. Media ± desviación estándar, valores con diferentes superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$).

En el Cuadro 12 se presentan los resultados de viabilidad, eficiencia y actividad de agua para LC. Se puede observar que los tratamientos LCM1 y LCM3 presentaron mejores resultados en términos de viabilidad celular y eficiencia de la microencapsulación. Específicamente, se observó que fueron menores las células viables después del proceso de microencapsulación para los tratamientos LCM2 y LCM4, los cuales tienen una temperatura de entrada de 140°C, lo cual sugiere que la temperatura de entrada de 120°C favoreció el aumento de la viabilidad celular y la eficiencia de la microencapsulación. En este sentido, los tratamientos LCM1 y LCM3 se consideraron los mejores.

No obstante, al comparar la eficiencia de la microencapsulación y las células viables totales de LC bajo estos tratamientos, se observó una menor desviación en el tratamiento LCM1 y una ligera mayor eficiencia en comparación con LCM3. Por esta razón, se seleccionó finalmente el tratamiento LCM1 como el mejor tratamiento para el microorganismo LC.

Cuadro 12. Evaluación de *Lactobacillus casei* microencapsulado mediante secado por aspersión usando almidón modificado tipo 4.

Tratamiento	Factor		Células viables totales		Eficiencia (%)	a _w
	T de entrada (°C)	Flujo (mL/min)	Antes de microencapsular (Log UFC/mL)	Después de microencapsular (Log UFC/g)		
LCM1	120	7	9.9 ± 0.06 ^a	8.4 ± 0.03 ^{ab}	85 ± 0.5 ^a	0.19 ± 0.016 ^a
LCM2	140	7	9.9 ± 0.12 ^a	7.5 ± 0.54 ^{ab}	75 ± 5.8 ^a	0.18 ± 0.034 ^a
LCM3	120	12	10.0 ± 0.06 ^a	8.4 ± 0.30 ^a	84 ± 2.8 ^a	0.15 ± 0.010 ^a
LCM4	140	12	10.0 ± 0.12 ^a	7.4 ± 0.49 ^b	74 ± 5.5 ^a	0.19 ± 0.040 ^a

LCM= *Lactobacillus casei* microencapsulado, n=3 réplicas. Media ± desviación estándar, valores con diferentes superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$).

Al comparar los microorganismos LGG y LC en el proceso de microencapsulación por secado por aspersión (Cuadros 10 y 12), se observó que ambos valores de a_w de los tratamientos elegidos 0.21 ± 0.078 y 0.19 ± 0.016 respectivamente están dentro del intervalo de 0.15 a 0.30; al encontrarse dentro de este intervalo específico, se previene el apelmazamiento y la recristalización del material de la microcápsula (Jian y col., 2020). Esto fomenta la uniformidad de las cápsulas, asegurando un encapsulado adecuado, protegiendo las células de condiciones adversas tanto ambientales como físicas.

En cuanto a la viabilidad de las células, se observan en los Cuadros 10 y 12 que LGG logró mantener una viabilidad más alta de sus células después de la microencapsulación que *L. casei* teniendo un promedio de reducción de 1.5 Log UFC/g y 2 Log UFC/g respectivamente después de la microencapsulación. La reducción de LGG microencapsulado fue similar a lo reportado por Ying y col., (2013) donde microencapsularon LGG con almidón resistente a 20% (p/v) de sólidos totales y con 100 mL de jugo de manzana y tuvieron una pérdida de viabilidad después del secado de 1 Log UFC/g. Falfán-Cortés y col., (2014) microencapsularon *L. casei* con almidón de amaranto succinatado mediante secado por aspersión y obtuvieron una

viabilidad celular de 8.62 Log UFC/g, tomando en cuenta la suspensión celular antes de microencapsular fue de 9 Log UFC/g, por lo cual la reducción celular fue menos de 1 Log UFC/g esto indica que el almidón de amaranto succinatado es mejor material protector que el de este trabajo, de igual forma una de las condiciones del secador es que tenía una temperatura de entrada de 100-110°C lo cual en este trabajo fue de 120 y 140°C y de acuerdo al Cuadro A del ANEXO la temperatura de entrada si tiene un efecto significativo sobre la eficiencia para LC que a diferencia de LGG no influye la temperatura de entrada para obtener una buena eficiencia. Por lo que se puede decir que LC es más termosensible que LGG.

Además, Matos-Jr y col. (2019) mencionan que es oportuno explorar el perfil de hidrofobicidad de las paredes de LGG y *L. paracasei*, quienes microencapsularon mediante una coacervación compleja por emulsión, obtuvieron una mayor retención en LGG debido a que presentó una mayor retención del material emulsificante que *L. paracasei*; aunque en el presente trabajo se realizó una microencapsulación mediante secado por aspersion con un almidón modificado, es de interés estudiar las interacciones que se generan entre el material encapsulante y la membrana, ya que una parte del material encapsulante es hidrófobo (Figura 8) y puede interaccionar con la membrana celular.

Se puede afirmar que las condiciones seleccionadas de temperatura de entrada y flujo para ambas cepas, LGG y LC, tratamiento LGGM4 (140°C y 12 mL/min) y LCM1 (120°C y 7 mL/min), muestran eficiencias de microencapsulación del $84 \pm 1.5\%$ y $85 \pm 0.5\%$ respectivamente. Estas eficiencias se consideran adecuadas cuando la supervivencia es del 85% o superior según lo reportado por Bradford y col. (2019).

IV.2 Evaluación de la resistencia térmica

Para la evaluación de la resistencia se sometieron los microorganismos en estado libre y microencapsulados a tratamiento térmico con diferentes temperaturas (65, 75 y 85°C) durante 5 y 10 min y se enfriaron inmediatamente en un baño de agua helada. Los resultados se presentan en la Figura 12.

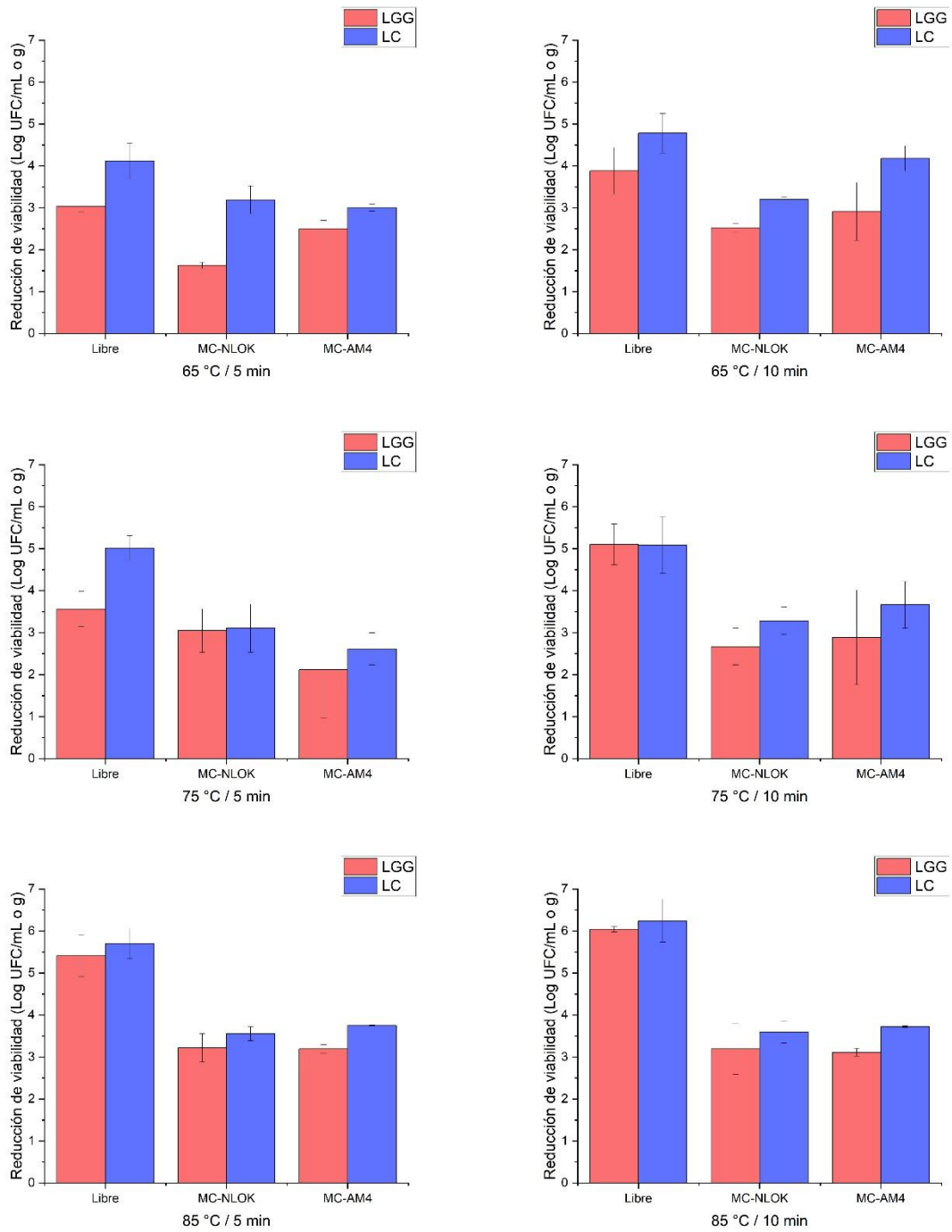


Figura 12. Evaluación de la resistencia térmica a tres diferentes temperaturas (65, 75 y 85°C) a 5 y 10 min.

En la Figura 12, se puede apreciar que las células libres de LGG así como LC, tienen una mayor reducción en su viabilidad en comparación a las células que se encuentran microencapsuladas, independientemente de las condiciones de exposición a las que fueron sometidas. Además, a medida que se aumenta la temperatura y tiempo de exposición, se observa una mayor reducción en la viabilidad de las células libres y microencapsuladas, este comportamiento fue similar a lo reportado por Ashwar y col. (2018) lo cual se atribuye a que una temperatura elevada por un tiempo prolongado desestabiliza la estructura de las células. En primer lugar, la membrana celular se ve afectada, ya que los ácidos grasos, tanto saturados como insaturados se desnaturalizan. En especial los ácidos grasos insaturados, debido a que poseen dobles enlaces en su cadena, siendo más susceptibles a la degradación inducida por el calor en comparación con los ácidos grasos saturados. Esta desnaturalización desestabiliza la función de la membrana celular, afectando su capacidad como barrera selectiva y transporte de sustancias a través de esta, causando daños irreversibles en la membrana, ácido nucleico y las proteínas, rompiendo los enlaces en monómeros, conduciendo a la muerte celular (Haddaji y col., 2015).

Con este mismo comportamiento, en la Figura 12, se evidencia que tanto las células en su forma libre (LGG y LC) como microencapsuladas en los materiales AM4 o NLOK®, exhiben un patrón de comportamiento similar en las diversas temperaturas y tiempos. En otras palabras, se observa que las microcápsulas de LGG, ya sea en el material encapsulante NLOK® o AM4, tienden a mostrar una mayor resistencia a las condiciones térmicas conforme al tiempo en comparación con las células de LGG en su estado libre, esta tendencia de comportamiento de reducción se ha reportado por Ashwar y col. (2018). Por lo que la microencapsulación es una alternativa eficaz para mantener la sobrevivencia celular de manera efectiva cuando los microorganismos son sometidos a estrés térmico por un tiempo prolongado.

Para llevar a cabo una comparación más detallada en la evaluación de la resistencia térmica, se presenta el comportamiento de las cepas libres en la reducción de la viabilidad de las cepas (Cuadro 13).

Cuadro 13. Evaluación de la resistencia térmica de *L. casei* y *L. rhamnosus* GG libres a diferentes tiempos y temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Reducción logarítmica	
		LC (Log UFC/mL)	LGG (Log UFC/mL)
65	5	4.12 ± 0.42 ^{bA}	3.04 ± 0.13 ^{bB}
75	5	5.01 ± 0.30 ^{abA}	3.60 ± 0.42 ^{bB}
85	5	5.70 ± 0.36 ^{aA}	5.41 ± 0.49 ^{aA}
65	10	4.78 ± 0.47 ^{bA}	3.88 ± 0.56 ^{bA}
75	10	5.09 ± 0.68 ^{abA}	5.10 ± 0.48 ^{aA}
85	10	6.24 ± 0.51 ^{aA}	6.04 ± 0.06 ^{aA}

LC= *Lactobacillus casei* libre; LGG= *Lactobacillus rhamnosus* GG libre. n=3 réplicas. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras minúsculas superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$) entre temperatura para el mismo tiempo; valores en la misma fila con diferentes letras mayúsculas superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$) entre cepas.

En el Cuadro 13 se observan diferencias significativas en el comportamiento de la cepa LC libre en función a la temperatura de exposición. Específicamente, entre las temperaturas de 65 y 85°C, tanto a los 5 como a los 10 minutos de exposición, mientras que a 75°C el comportamiento es similar a las temperaturas mencionadas anteriormente, este patrón de comportamiento sugiere que a 85°C se produce una mayor reducción logarítmica significativa en la viabilidad de la cepa, tanto a 5 como a 10 minutos de exposición. En el caso de la cepa LGG libre, a los 5 minutos no existen diferencias a 65 y 75°C, mientras que a la temperatura de 85°C se ve una mayor reducción, lo que nos indica que esta cepa tiende a ser más resistente a la temperatura en un tiempo de 5 minutos. Sin embargo, durante el tiempo de exposición de 10 minutos hay diferencia significativa a 65 vs 75 y 85°C, teniendo una reducción logarítmica significativamente mayor cuando la temperatura aumenta (65°C < 75°C = 85°C).

En cuanto a las temperaturas de 65 y 75°C durante 5 minutos de exposición, se observa que entre LC y LGG hay diferencias significativas, lo que indica que a esta temperatura y durante este tiempo, LC libre es más termosensible que LGG libre. Sin

embargo, para las demás condiciones ambas cepas no presentaron diferencias significativas en sus reducciones, aunque si se puede observar que LC tiende a tener una ligera mayor reducción que LGG libre.

En el Cuadro 14, se presenta la reducción logarítmica de la evaluación de la resistencia térmica de las cepas LC y LGG microencapsuladas con AM4 o NLOK®.

Cuadro 14. Evaluación de la resistencia térmica de *L. casei* y *L. rhamnosus* GG en diferentes materiales encapsulantes a distintos tiempos y temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Reducción logarítmica			
		MCAM4		MCNLOK	
		LC (Log UFC/g)	LGG (Log UFC/g)	LC (Log UFC/g)	LGG (Log UFC/g)
65	5	3.00 ± 0.08 ^{bA}	2.50 ± 0.20 ^{aB*}	3.19 ± 0.33 ^{aA}	1.63 ± 0.07 ^{bB*}
75	5	2.61 ± 0.38 ^{bA}	2.12 ± 1.16 ^{aA}	3.11 ± 0.57 ^{aA}	3.05 ± 0.52 ^{aA}
85	5	3.75 ± 0.01 ^{aA}	3.20 ± 0.10 ^{aB}	3.56 ± 0.17 ^{aA}	3.21 ± 0.34 ^{aA}
65	10	4.18 ± 0.30 ^{aA*}	2.91 ± 0.70 ^{aB}	3.21 ± 0.05 ^{aA*}	2.52 ± 0.10 ^{aB}
75	10	3.66 ± 0.55 ^{aA}	2.89 ± 1.13 ^{aA}	3.28 ± 0.33 ^{aA}	2.67 ± 0.43 ^{aA}
85	10	3.72 ± 0.02 ^{aA}	3.11 ± 0.10 ^{aB}	3.60 ± 0.26 ^{aA}	3.20 ± 0.61 ^{aA}

LC= *Lactobacillus casei*; LGG= *Lactobacillus rhamnosus* GG; MCAM4= microcápsulas de almidón modificado tipo 4; MCNLOK= microcápsulas de NLOK®. n=3 réplicas. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras minúsculas superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$) entre temperatura para el mismo tiempo; valores en la misma fila con diferentes letras mayúsculas superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$) entre cepas. * indica diferencia estadística significativa ($\alpha = 0.05$) entre material encapsulante para la misma cepa y condición.

En el Cuadro 14 se observa que a 5 minutos para LC con MCAM4 se presentó una reducción logarítmica significativa a 85°C en comparación con 65 y 75°C, así mismo LGG con MCNLOK presenta una mayor sobrevivencia a 65°C en comparación a las demás temperaturas. Para las demás condiciones tanto para LC, como para LGG con ambos materiales encapsulantes (AM4 o NLOK®) no hay diferencias significativas entre las temperaturas a 5 o 10 minutos, por lo que se puede asociar a

que el material encapsulante ayuda a mantener la viabilidad de las cepas independientemente de cualquier temperatura a 5 o 10 minutos de exposición.

Comparando el comportamiento de las cepas con los diferentes materiales encapsulantes, se observa que para 65°C durante 5 minutos de exposición, las microcápsulas de LGG con los materiales AM4 y NLOK® presentaron diferencias significativas; en donde las microcápsulas de LGG con AM4 mostraron una reducción significativamente mayor en comparación con las de NLOK®, lo que sugiere que, en esta condición específica, el material comercial NLOK® proporcionó una protección superior a la cepa (Cuadro 14). Algo similar se puede observar para LC a 65°C durante 10 minutos.

Para la temperatura de 75°C durante 5 y 10 minutos de exposición, se observa que para las microcápsulas de LC y LGG con los materiales NLOK® y AM4 se comportan de la misma manera; aunque de forma visual en la Figura 12 se puede observar que las células microcapsuladas de LC con AM4 (2.89 ± 1.13 Log UFC/g) tuvieron una ligera menor reducción que con NLOK® (3.28 ± 0.33 Log UFC/g), aunque estadísticamente no se considera que el material AM4 tienda a tener una mayor protección que NLOK®, teniéndose estadísticamente comportamientos similares independientemente de la cepa utilizada.

Se puede decir que el método de microencapsulación es de gran importancia ya que si hay diferencias en la viabilidad celular cuando éste se emplea. Ashwar y col. (2018) evaluaron la microencapsulación de *Lactobacillus casei* con almidón de arroz fosforilado utilizando sales de fosfato y por el método de emulsión y cuando se expusieron las microcápsulas a 75°C durante 10 min, la reducción celular fue de 6 Log UFC/g; comparándolo con este trabajo la reducción fue menor, la cual fue de ~3 Log UFC/g (Cuadro 14) si bien al tener diferentes modificaciones, ambos almidones pertenecen a los almidones modificados tipo 4. Por lo que el método de secado por aspersión utilizado se puede asociar a que favorece más la protección de los microorganismos que el método de emulsión.

IV.3 Determinaciones en la salchicha tipo Viena

IV.3.1 Análisis proximales

Se evaluó la composición de la salchicha tipo Viena control (sin la adición de probióticos), obteniendo lo siguiente (Cuadro 15):

Cuadro 15. Composición de la salchicha de cerdo tipo Viena sin probióticos.

Composición	% o ppm
Humedad (%)	71.6 ± 2.33
Ceniza (%)	6.6 ± 0.67
Grasa (%)	21.8 ± 4.87
Proteína (%)	12.6 ± 1.64
Nitritos (ppm)	82.4 ± 6.67

Media ± desviación estándar en base seca. n=3 réplicas.

El contenido de humedad de las salchichas fue de $71.574 \pm 2.33\%$, como se detalla en el Cuadro 15, lo cual cumple con la norma mexicana vigente (NMX-F-065-1984) que marca un máximo de contenido de humedad del 70%. Este valor superó al $66 \pm 0.041\%$ informado previamente por Barragán-Martínez y col. (2019) aunque para ambas se agregó la misma proporción de hielo, la diferencia podría atribuirse a las modificaciones que se realizaron en la formulación en cuestión de la composición de la carne ya que mientras en la literatura se reporta la adición de un 50% de carne de cerdo y un 20% de grasa de cerdo, se optó por incluir un 45% de carne de cerdo, un 18% de carne de res y un 9% de grasa de cerdo en la formulación. Estas variaciones en la composición de ingredientes son fundamentales para comprender la diferencia en los resultados de contenido de humedad. Dado que la carne de res y de cerdo tienen un contenido de humedad que oscila entre el 65.3% y el 72.8%, según lo reportado por Oh y col. (2016) y Noidad y col. (2019), por lo tanto, es razonable inferir que el aumento en el contenido de humedad en las salchichas se deba a la incorporación de carne de res y de igual forma al contenido de humedad que proporciona la carne de cerdo además que se agregó menos grasa que en lo reportado en la literatura (Barragán-Martínez y col., 2019).

Para el contenido de ceniza se obtuvo un valor de $6.6 \pm 0.67\%$, el cual supera a lo reportado por Da Silva y col. (2019), quienes registraron un contenido del 3.7%. Esta variación podría explicarse por la diferencia en la composición de las muestras utilizadas en ambos estudios. Mientras que en lo reportado adicionan exclusivamente carne de cerdo, en el presente trabajo se utilizó además carne de res (pierna) que naturalmente contiene 6.93% de ceniza (Oh y col., 2016). Esta información se corrobora con lo reportado por Okoro y col. (2010), quienes elaboraron una salchicha utilizando únicamente carne de res y obtuvieron un contenido de ceniza del 6.5% lo cual concuerda con lo obtenido. Adicionalmente, la adición de condimentos, incluyendo el cloruro de sodio (sal), podría contribuir al aumento del contenido de ceniza en el producto final de este proyecto. Es importante recordar que los componentes químicos que conforman las cenizas son minerales en forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos y cloruros, los cuales pueden provenir tanto de la carne utilizada como de los aditivos adicionados en el proceso de elaboración.

En cuanto al contenido de grasa, se obtuvo un contenido de $21.8 \pm 4.87\%$, lo cual no concuerda con lo que se adicionó que fue 8.95% de grasa, la diferencia se puede atribuir a que la carne de res contiene 29% de grasa y la pierna de cerdo (4.39%) (Oh y col., 2016; Jang y col., 2017), esto contribuye al aumento del contenido de grasa de la salchicha. El valor obtenido se ajusta a la normativa vigente que establece un límite máximo del 30% de grasa permitida. En lo que respecta a la proteína, se obtuvo un valor de $12.6 \pm 1.64\%$ que fue similar al contenido de proteína reportado por Da Silva y col. (2019); esto es debido a que ambas salchichas se formularon con 63% y 65% de carne respectivamente. El contenido de proteína sobrepasa el requisito mínimo del 9.5% establecido por la norma mexicana "NMX-F-065-1984". Es relevante destacar que esta norma es de naturaleza voluntaria, sin requerimientos legales obligatorios. No obstante, fue empleada como referencia para garantizar la calidad y satisfacer las expectativas de los consumidores.

En cuanto a los nitritos se registraron 82.4 ± 6.67 ppm, lo cual cumple con la NOM-213-SSA1-2018 en donde se indica que el límite máximo en productos cárnicos

cocidos procesados permitidos es de 156 mg/kg (1 mg/kg es equivalente a 1 ppm). Es importante mencionar que al ser una norma oficial mexicana es de cumplimiento obligatorio para garantizar la seguridad alimentaria ya que si se supera el límite máximo permitido puede provocar la formación de nitrosaminas, sustancias con efectos carcinogénicos probados.

Sin embargo, también tiene efectos beneficiosos como que es un compuesto antioxidante que protege a los lípidos de los daños oxidativos, reaccionando con especies reactivas de oxígeno como los radicales hidroxilos para inhibir la oxidación de lípidos y también estabiliza el hierro hemo actuando como un quelante de iones metálicos, que son los principales prooxidantes en los productos cárnicos.

Además, el nitrito (NO^{2-}) inhibe el crecimiento de bacterias patógenas como *C. botulinum* y *L. monocytogenes*, ayuda a conferir el color característico de una salchicha, debido a que el nitrito (NO^{2-}) por una reacción redox se reduce (el nitrito gana un electrón) para producir óxido nítrico (NO), que este reacciona con la mioglobina (Fe^{2+}) para formar el complejo nitrosomioglobina, este complejo al ser inestable, cuando se aplica calor por medio de la cocción de la salchicha a 70°C se convierte en un pigmento rosado estable, es decir en nitrosilhemocromo (Jo y col., 2020).

IV.3.2 Color y pH

Se realizó el análisis de color de la salchicha cocida tipo Viena sin la adición de probióticos (SV Control), con la adición de LGG o LC microencapsulados con NLOK® (SV LGG-MNLOK o SV LC-MNLOK) y las mismas cepas microencapsuladas con AM4 (SV LGG-AM4 o SV LC-AM4) y los resultados se presentan en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Análisis de color de la salchicha cocida tipo Viena.

Parámetro	Ángulo de matiz ° (HUE)	Índice de saturación (S)	Diferencia de color (ΔE)	pH
SV Control	27.06 ± 3.09 ^a	17.37 ± 1.04 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	6.10 ± 0.034 ^a
SV LGG-MNLOK	30.32 ± 0.31 ^a	16.87 ± 0.171 ^a	1.22 ± 0.07 ^a	6.00 ± 0.04 ^b
SV LC-MNLOK	30.09 ± 0.44 ^a	16.94 ± 0.118 ^a	1.30 ± 0.18 ^a	5.97 ± 0.01 ^b
SV LC-AM4	27.77 ± 0.12 ^a	16.75 ± 0.126 ^a	1.45 ± 0.17 ^a	5.98 ± 0.02 ^b
SV LGG-AM4	26.83 ± 0.55 ^a	16.74 ± 0.067 ^a	0.75 ± 0.09 ^b	5.95 ± 0.02 ^b

SV Control= Salchicha tipo Viena sin la adición de microcápsulas; SV LGG-MNLOK= Salchicha tipo Viena con LGG microencapsulado con NLOK®; SV LC-MNLOK= Salchicha tipo Viena con LC microencapsulado con NLOK®; SV LC-AM4= Salchicha tipo Viena con LC microencapsulado con AM4; SV LGG-AM4= Salchicha tipo Viena con LGG microencapsulado con AM4. n=3 réplicas. Media ± desviación estándar, valores en la misma fila con diferentes letras minúsculas superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$).

Se puede observar en el Cuadro 16 que el ángulo de matiz es igual en todas las muestras, es decir que no presentan diferencias estadísticas significativas. Estos valores indican la posición de un color en un círculo de 360° en un plano colorimétrico, por lo que los valores obtenidos podrían indicar que el color de las salchichas se encuentra en la parte rojiza en una gama de colores cálidos, pero más hacia el rojo que hacia el amarillo, los resultados obtenidos difieren de lo reportado por Barragán y col. (2019) en donde obtuvieron ángulos entre 1.14° y 1.32° indicando que se encuentra muy poco mezclado con tonos rojizos, siendo cercano al rojo puro, a pesar de haber acoplado su metodología en la elaboración de la salchicha con la única diferencia que se agregó carne de res y no solo carne de cerdo, se observan ángulos completamente diferentes, esto se puede deber a esa variación en la composición de la salchicha. Por otra parte comparando la salchicha cocida con una salchicha fermentada como la elaborada por Igor y col. (2021), se encontraron diferencias en los ángulos de matriz obtenidos entre 39.92° y 43.44°, indicando que su salchicha es un color anaranjado en tonos cálidos, es decir, existe una transición

de rojo a amarillo, lo cual se puede deber a que durante la fermentación de la salchicha el pH disminuye debido a las bacterias lácticas e impacta en el color, ya que se producen ácidos y desestabilizan los pigmentos dando colores diferentes a las salchichas cocidas.

El índice de saturación es una medida que indica la intensidad o pureza del color. En el contexto de la colorimetría, un índice de saturación más alto generalmente sugiere un color más intenso mientras que un índice de saturación más bajo indica un color menos intenso o más apagado, por lo que Barragán y col. (2019) obtuvieron un valor entre 8.6 y 10.87, en cambio la salchicha realizada tuvo intervalos entre 16.74 y 17.37 lo cual nos indica que es más saturado y vibrante, esto se puede deber a diferentes factores como la formulación y procesamiento de las salchichas.

La tolerancia de color es un límite para saber la diferencia de color entre una muestra y el estándar (control) para poder considerar la muestra aceptable o no. Para obtener esta diferencia de color mejor conocida como ΔE , se utilizan los valores de luminosidad (L^*), índice rojo-verde (a^*) e índice amarillo-azul (b^*) de dos muestras tomando de estándar el control con cada una de las muestras analizadas es decir, se obtiene la distancia que existe entre dos puntos medidos, en este caso el control con cada una de las muestras. De acuerdo con los resultados obtenidos (Cuadro 16) se puede decir que la diferencia de color en la muestra SV LGG-AM4 es diferente estadísticamente a las otras muestras y de igual forma tiende a acercarse más al control que las otras, pero sigue siendo diferente estadísticamente al control. Por lo que todas las muestras son diferentes en color al control, aunque para poder corroborar esto, no solo hay que basarse en lo estadístico sino se debe deben correlacionar con el ojo humano de tal forma que el color sea tanto visual como numéricamente aceptable. En la Figura 13, se observan las muestras de las salchichas analizadas.

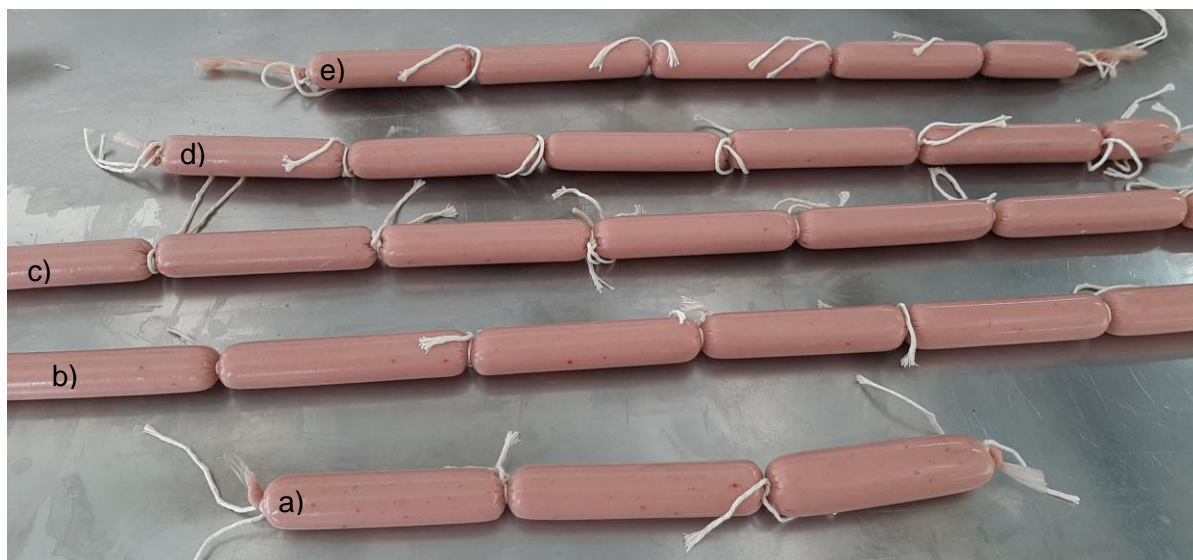


Figura 13. Muestras de salchichas tipo Viena para el análisis de color. a) SV Control=Salchicha tipo Viena sin la adición de *lactobacillus* microencapsulado, b) SV LGG-MNLOK=Salchicha tipo Viena con LGG microencapsulado con NLOK®, c) SV LC-MNLOK= Salchicha tipo Viena con LC microencapsulado con NLOK®, d) SV LC-AM4= Salchicha tipo Viena con LC microencapsulado con AM4, e) SV LGG-AM4= Salchicha tipo Viena con LGG microencapsulado con AM4.

En la Figura 13, visualmente no se observa ninguna diferencia de color entre las muestras y control; esto se puede corroborar y correlacionar con la escala de Mokrzycki y Tatol (2012), quienes mencionan que cuando $0 < \Delta E < 1$, el observador no percibe la diferencia y si $1 < \Delta E < 2$, solo un observador entrenado puede notar la diferencia, con base a la información, para SV LGG-AM4 el observador ya sea experimentado o no, no va a observar ninguna diferencia entre ésta con el control, en cambio para las demás muestras solo un observador entrenado podrá notar las diferencias. Se puede decir que la salchicha ya sea con o sin la incorporación de probióticos, van a ser percibidas en color de igual forma entre una y otra.

Respecto al pH, existe diferencia estadísticamente significativa entre la salchicha control (SV Control) y las muestras, siendo mayor en SV Control. Esta disminución

de pH en las muestras podría atribuirse a la producción de ácido láctico proveniente del metabolismo de los microorganismos, como se observa en el estudio de Bilenler y col. (2017) donde se midió la producción de ácido láctico en salchichas con y sin la adición de probióticos, obteniendo una mayor producción de ácido láctico en las salchichas con probióticos y una menor en las salchichas de control. A pesar de eso los intervalos de pH obtenidos son óptimos de un producto cárnico cocido.

IV.3.3 Textura

El Cuadro 17 presenta los resultados del análisis de textura de la salchicha tipo Viena para las cuatro diferentes muestras: SV Control refiriéndose a la salchicha sin la adición de probióticos, para la salchicha con la adición de microcápsulas de NLOK® con LGG o LC (SV LGG-MNLOK o SV LC-MNLOK) y para la salchicha adicionada con microcápsulas de AM4 con LC o LGG (SV LC-AM4 o LGG-AM4). Los parámetros evaluados fueron dureza, cohesión, elasticidad y masticabilidad.

Cuadro 17. Análisis de textura de la salchicha tipo Viena.

Parámetro	Dureza (N)	Cohesión	Elasticidad (mm)	Masticabilidad (N)
SV Control	32.46 ± 3.84 ^{ab}	0.68 ± 0.02 ^a	0.89 ± 0.02 ^a	19.61 ± 1.94 ^{ab}
SV LGG-MNLOK	25.17 ± 4.83 ^b	0.59 ± 0.08 ^a	0.86 ± 0.02 ^a	13.16 ± 4.35 ^b
SV LC-MNLOK	25.93 ± 4.22 ^{ab}	0.57 ± 0.07 ^a	0.87 ± 0.06 ^a	13.83 ± 4.27 ^b
SV LC-AM4	35.92 ± 5.55 ^{ab}	0.66 ± 0.01 ^a	0.88 ± 0.02 ^a	21.97 ± 0.91 ^a
SV LGG-AM4	38.28 ± 5.64 ^a	0.65 ± 0.03 ^a	0.90 ± 0.01 ^a	22.56 ± 0.81 ^a

SV Control= Salchicha tipo Viena sin la adición de microcápsulas; SV LGG-MNLOK= Salchicha tipo Viena con LGG microencapsulado con NLOK®; SV LC-MNLOK= Salchicha tipo Viena con LC microencapsulado con NLOK®; SV LC-AM4= Salchicha tipo Viena con LC microencapsulado con AM4; SV LGG-AM4= Salchicha tipo Viena con LGG microencapsulado con AM4. n=3 réplicas. Media ± desviación estándar, valores en la misma fila con diferentes letras minúsculas superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$).

Los resultados del análisis de textura de la salchicha tipo Viena indican que hubo diferencias significativas en la dureza entre las muestras evaluadas, en específico se obtuvo diferencia significativa entre SV LGG-MNLOK con un valor de 25.17 ± 4.83 N en comparación con SV LGG-AM4 (38.28 ± 5.64 N), lo que nos indica que SV LGG MNLOK presenta una menor dureza que SV LGG-AM4, aunque ambos materiales son almidones tipo 4 succinatados uno es diferente del otro, el AM4 proviene del haba y el NLOK® del maíz. Barragán y col. (2019) analizaron la dureza de la salchicha cocida en diferentes materiales encapsulantes (inulina, cáscara de nopal nativo y bagazo de manzana nativo) y obtuvieron diferencias significativas entre cada una de ellas, afirmando que el material encapsulante aumenta la consistencia de la fase continua de las emulsiones de carne, mejorando la retención de agua y grasa, generando una menor pérdida de agua durante la cocción, aumentando la estabilidad de la emulsión por lo que al incorporar las microcápsulas hechas con cualquier fibra afecta la textura.

Ahora bien en específico el material encapsulante utilizado fue el almidón modificado con OSA (NLOK® o AM4), este material afecta la estabilidad de la emulsión de la salchicha porque el almidón OSA es un emulsificante efectivo debido a la adición de grupos funcionales hidrofílicos e hidrófobos, por lo que el agua de la salchicha puede interactuar con la parte hidrofílica del almidón modificado y la parte hidrófoba interacciona con la grasa de la salchicha, formando una red tridimensional y así aumentando la consistencia de la fase continua de la emulsión cárnica, mejorando la retención de agua y grasa como ya fue antes mencionado (Song y col., 2010; Barragán y col., 2019) esto se asocia con la dureza de la salchicha.

Además, cabe mencionar que este parámetro depende también de la fuente de almidón; en el Cuadro 17 se obtuvieron valores de dureza de 35.92 N y 38.28 N para las microcápsulas del material AM4, siendo similar a la dureza de una salchicha de pavo comercial en la que se obtuvo un valor de 34.43 ± 1.86 N.

Se evaluó en este trabajo con el único fin de asemejar la dureza de la salchicha de pavo con la de cerdo, ya que en México las salchichas que más se consumen son las de ave con 66%; mientras las de cerdo un 34%, por lo que el consumidor está más familiarizado con la textura de una salchicha de pavo (Consejo Mexicano de la Carne, 2022).

El material AM4 generó una textura similar a la salchicha comercial de pavo siendo más rígida y dura. Para las microcápsulas del material NLOK® proveniente del maíz se obtuvieron durezas de 25.17 N y 25.93 N, estos valores visualmente son menores a los obtenidos de las microcápsulas AM4, material que proviene de haba. Lo que se puede intuir es que el almidón de fuente del maíz (NLOK®) genera una salchicha más blanda en comparación con el almidón proveniente del haba (AM4), probablemente porque el material NLOK® pudiera generar una red tridimensional con mayor interacción con el agua y la grasa generando una mayor absorción de agua y por consiguiente una salchicha más blanda, que la salchicha con almidón AM4.

Al obtener una salchicha blanda con el material NLOK®, no significa que la salchicha con las microcápsulas de NLOK® tenga una textura diferente a una salchicha de cerdo convencional, esto se afirma comparando los resultados del Cuadro 17, la muestra SV Control con SV LGG-MNLOK y SV LC-NLOK, en donde el control vs ambas muestras no presentó diferencias significativas entre una y otra, afirmando que la dureza es la misma entre la salchicha control y las salchichas con el material NLOK®.

El valor obtenido de este trabajo es similar a lo reportado por Barragán y col. (2019) y Shin y col. (2022) quienes elaboraron una salchicha de cerdo y de pollo respectivamente, por lo que la dureza de la salchicha es aceptable.

Por lo que al agregar en este caso AM4 con LGG generó una salchicha más dura en comparación a NLOK® con LGG; sin embargo, ambas salchichas comparadas con la salchicha control son similares estadísticamente.

En cuanto a la cohesión, no hubo diferencias significativas entre las muestras; los valores que presentaron fueron entre 0.57 y 0.68, lo cual nos indica que la salchicha con o sin adición de probióticos microencapsulados tiene misma la capacidad de mantener unidas las partículas y no separarse antes de fracturarse la salchicha.

Para la variable de elasticidad, no se observaron diferencias significativas entre las muestras, con valores entre 0.86 mm y 0.90 mm, lo cual nos indica que las salchichas tienen el mismo comportamiento de volver a su forma original después de ser comprimidas mostrando ductilidad.

La masticabilidad mostró que de igual forma el material encapsulante juega un papel importante sobre el trabajo necesario para desintegrar la salchicha; las muestras con material NLOK®, ya sea con LGG o LC, presentaron menores valores que con el material AM4, es decir que con el material NLOK® se necesita un menor esfuerzo para desintegrar el alimento, aunque si comparamos ambos materiales con las respectivas cepas con la salchicha control, no mostraron diferencias significativas, por lo que ambas conservan la textura de la salchicha.

En general, el tipo de material encapsulante y la cepa utilizada afectan la dureza y masticabilidad de las salchichas, pero no influyen significativamente en la cohesión y elasticidad. El material NLOK® hace que las salchichas sean más suaves y fáciles de masticar en comparación con el material AM4, sin embargo, todas las muestras conservan en gran medida la textura de la salchicha en comparación con la salchicha control.

IV.3.4 Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos de la salchicha control se presentan en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Análisis microbiológicos para la salchicha cocida tipo Viena sin la adición de probióticos.

Tipo de análisis	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Bacterias mesófilas aerobias (UFC/g)	50	60	100
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<3	<3	<3
<i>Salmonella</i> spp (Presencia/ausencia)	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> (Presencia/ausencia)	Ausente	Ausente	Ausente

La salchicha control es considerada un producto cárnico cocido listo para consumo humano en el cual se lleva a cabo un tratamiento térmico para alcanzar una temperatura de 70°C internamente, en una relación tiempo – temperatura para garantizar la destrucción de patógenos, el cual debe cumplir con los estándares permitidos por la norma oficial (NOM-213-SSA1-2018).

Los resultados obtenidos cumplen con los límites la legislación para las bacterias mesófilas aerobias, *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

La salchicha fue elaborada atendiendo las buenas prácticas de manufactura, los instrumentos utilizados fueron previamente lavados y desinfectados, se verificó por medio de un termómetro la temperatura de la salchicha para su correcta y uniforme cocción para evitar la sobrevivencia de las bacterias patógenas, y se evitó una vez cocinada la salchicha una contaminación cruzada.

Es importante el aseguramiento de la calidad de cualquier alimento en este caso la salchicha, para salva guardar la salud del consumidor, ya que la *Listeria*

monocytogenes es un microorganismo patógeno el cual puede provenir de una mala sanitización de los instrumentos ya que estos microorganismos tienden a formar una biopelícula en las paredes y es muy difícil eliminarlas si no hay una buena limpieza mecánica y después una desinfección de los mismos. Este patógeno que afecta a las mujeres embarazadas, generando un aborto espontáneo o infecciones mortales en el recién nacido por lo que su ausencia un alimento es fundamental (CDC, 2022). La ausencia de *Salmonella* y *E. coli* indican que la salchicha no tuvo contacto con heces. Las bacterias mesófilas aerobias son controladas por buenas prácticas de higiene las cuales se llevaron a cabo de manera adecuada y se ve reflejado en los resultados por lo que la salchicha elaborada es segura para el consumo humano.

IV.4 Supervivencia a digestión *in vitro*

La Figura 14 presenta los resultados de la simulación del sistema digestivo *in vitro* para LC y LGG en diferentes tratamientos. Las gráficas a) y b) presentan el comportamiento de los microorganismos LC y LGG en estado libre (LC-Libre y LGG-Libre) y microencapsulados ya sea con NLOK® o AM4 (LC-NLOK, LC-AM4, LGG-NLOK y LGG-AM4). En las gráficas c) y d) se presentan los resultados de la supervivencia de los microorganismos en condiciones simuladas de la digestión en muestras de salchichas adicionadas de las microcápsulas de ambos microorganismos con ambos materiales.

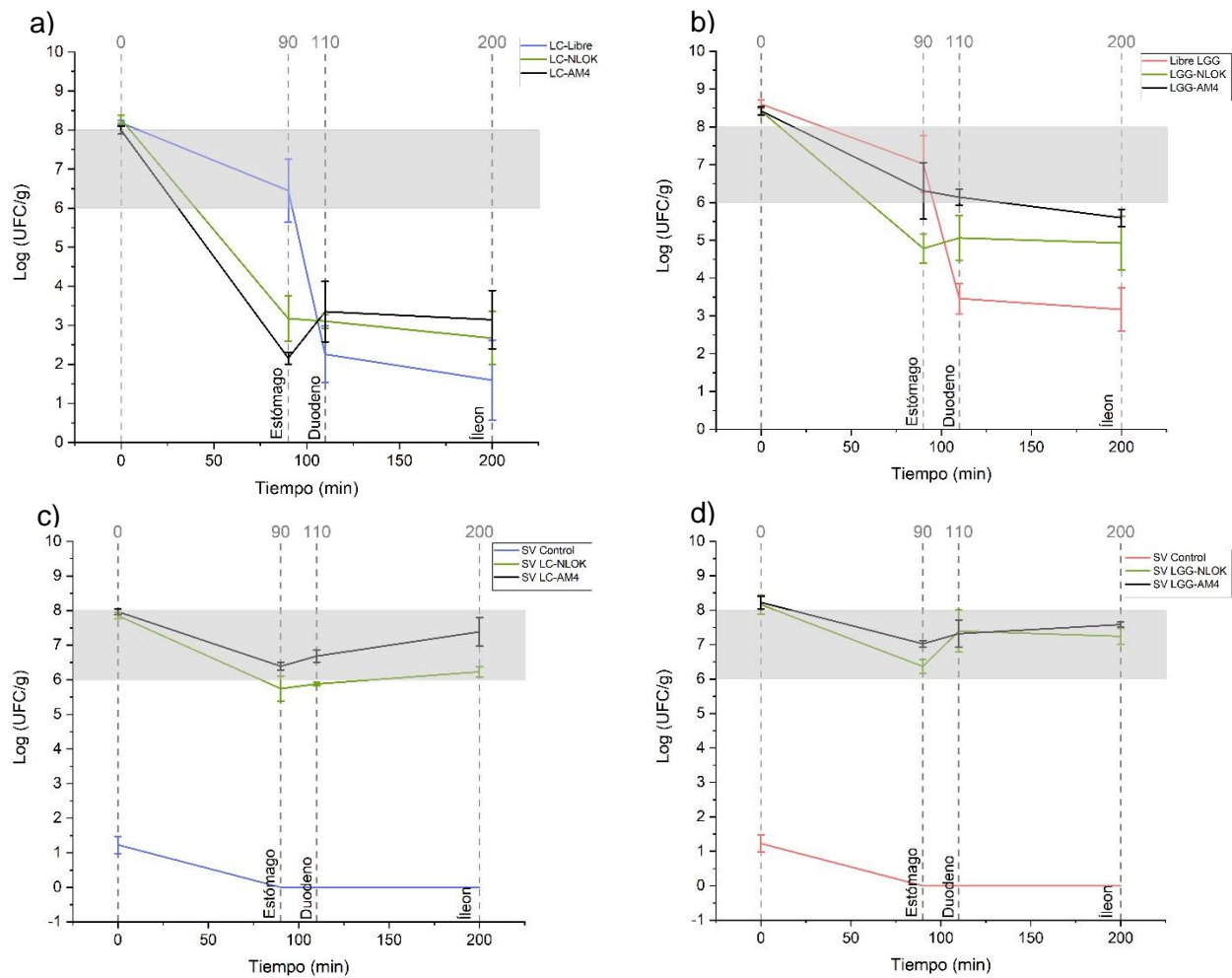


Figura 14. Sobrevivencia a la digestión *in vitro* de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* (Log de UFC/g). a) Tiempo vs Log de LC en estado libre y microencapsulado con NLOK® o AM4, b) Tiempo vs Log de LGG en estado libre y microencapsulado con NLOK® o AM4, c) Tiempo vs Log de la salchicha cocida con LC microencapsulado con NLOK® o AM4, d) Tiempo vs Log de la salchicha cocida con LGG microencapsulado con NLOK® o AM4

Para la Figura 14a se observa que LC libre tiene una mayor sobrevivencia en la etapa del estómago que para LC microencapsulada con los diferentes materiales (LC-NLOK y LC-AM4), este comportamiento concuerda con lo reportado por Liu y col. (2023) quienes encapsularon donde *L. acidophilus* mediante coacervación de aislado

de proteína de leche, almidón modificado con OSA y un complejo de ambos materiales observando que en la etapa del estómago, duodeno e íleon existe una muerte celular significativa en estado libre a diferencia de los microencapsulados.

En específico se observó una sobrevivencia significativamente menor de células microencapsuladas del tratamiento LC-AM4 en condiciones simuladas del estómago que las células en LC-NLOK, mostrando un incremento en la sobrevivencia durante el ensayo en el duodeno manteniéndose así hasta el íleon; este aumento se puede deber a que el almidón resistente en un medio acuoso (estómago) se rehidrata lentamente y la entrada del agua a través de las membranas celulares disminuye lo que resulta una liberación más lenta del microorganismo microencapsulado en una atmósfera simulada del tracto gástrico. Aparentemente en el duodeno hay una mayor sobrevivencia de las microcápsulas (LC-AM4) en comparación a LC-NLOK, probablemente debido a que durante la etapa del estómago las células en las microcápsulas se empezaron a liberar y contribuir con el conteo de la población. Con el material NLOK® se observó una disminución significativa en la población en la etapa gástrica indicando que las microcápsulas son vulnerables al pH del estómago; sin embargo, se mantuvo la viabilidad posteriormente en duodeno e íleon, por lo que NLOK® es estable con LC a partir del estómago hasta el íleon. De manera general al finalizar la etapa del íleon el almidón modificado de haba (AM4) tiende a proteger más que el almidón modificado de maíz (NLOK®) con LC.

Para Figura 14b, la cepa LGG en sus diferentes tratamientos LGG-Libre, LGG-NLOK y LGG-AM4, tiene una mayor sobrevivencia en la simulación del sistema digestivo en comparación a LC en sus diferentes tratamientos (LC-Libre, LC-NLOK y LC-AM4) lo que nos indica que LC ya sea libre o microencapsulado es más sensible a las condiciones gastrointestinales que LGG libre o microencapsulado, el comportamiento de los microorganismos libres concuerda con lo reportado por Mantos-Jr y col. (2019), quienes expusieron a condiciones gástricas simuladas a *L. paracasei* y LGG en estado libre y también microencapsulados con un complejo de gelatina y goma arábica por medio de coacervación; los autores reportaron que los

microorganismos microencapsulados mostraron una reducción del tiempo 0 a 200 minutos de 1.41 Log UFC/g y 1.76 Log UFC/g para *L. paracasei* y LGG respectivamente. En este trabajo hubo reducciones para las microcápsulas de LC de ~4.5 Log UFC/g y LGG de ~3 Log UFC/g, lo cual indica que la encapsulación por coacervación compleja formando una emulsión de grasa vegetal y solución de gelatina al 2.5% p/v (aceite-agua), brindó mayor protección a los microorganismos en la simulación gastrointestinal que la observada en este trabajo.

En la Figura 14b, LGG-Libre en la etapa del estómago se observa que la sobrevivencia celular es mayor, seguido de LGG-AM4 y LGG-NLOK, manteniéndose las microcápsulas del material AM4 dentro del intervalo de un alimento probiótico en la etapa del estómago y duodeno, para el estado libre también se mantuvo dentro del intervalo de un alimento probiótico en la etapa del estómago, sin embargo, al momento de la etapa del duodeno disminuye significativamente su sobrevivencia mostrando el mismo comportamiento para LC-Libre. Por otro lado, LGG-NLOK se mantuvo en su intervalo hasta el íleon, de forma similar a lo observado con LC-NLOK. Con ambas bacterias microencapsuladas con AM4 se observó una mayor sobrevivencia al final del ensayo gastrointestinal. Por lo anterior se puede decir que el almidón modificado proveniente del haba (AM4) confirió un mayor efecto protector que el generado por el almidón comercial NLOK® proveniente del maíz.

Es de suma importancia la procedencia del almidón, el cual es modificado para su uso como material encapsulante. Los almidones utilizados en este trabajo fueron modificados mediante esterificación con anhídrido octenyl succínico (de haba y comercial de maíz). El nivel de sustitución de OSA va a darle las características a las microcápsulas, entre mayor nivel de sustitución OSA mayor hidrofobicidad tendrá el almidón modificado, el cual interaccionará mejor con la membrana celular del probiótico, rodeándola para formar una microcápsula con mayor efecto protector, este grado de sustitución depende en gran medida de la fuente del almidón, ya que la composición de amilosa y amilopectina en diferentes fuentes varían.

Las composiciones de amilosa y amilopectina también variarán dependiendo del tratamiento de cada uno de los almidones al momento de modificarse, como González-Mendoza y col. (2022) donde hidrolizaron y aplicaron energía de microondas al almidón de haba y obtuvieron composiciones diferentes de amilosa para cada tratamiento. Simsek y col. (2015) determinaron la composición de amilopectina y amilosa del almidón nativo y modificado con OSA para maíz, tapioca, arroz, papa y trigo, obteniendo que la fuente del almidón puede determinar si la composición después del tratamiento será mayor o menor entre cada fuente; los autores registraron que el almidón de maíz nativo junto con el modificado contiene mayor amilosa que el de papa, arroz y trigo, excepto para tapioca (maíz>papa>arroz>trigo) y el almidón de maíz tiene menor amilopectina que las demás fuentes de almidones (trigo>arroz>papa>maíz). Los almidones nativos de haba y maíz contienen 38.3% y 28.94% de amilosa respectivamente (haba>maíz) y 61.7% y 71.06% de amilopectina (maíz>haba) (Simsek y col., 2015; González-Mendoza y col., 2022).

Se ha determinado que la sustitución ocurre principalmente en la región amorfa que se encuentra en la periferia de los gránulos, y a nivel molecular la sustitución de OSA ocurre cerca de los puntos ramificados de la amilopectina y un almidón modificado con alta amilopectina da una alta estabilidad y protección al microorganismo y una alta concentración de amilosa tiene la capacidad de producir una red estructural que facilita la formación de las microcápsulas, también la liberación del microorganismo hace que sea más lento además (Simsek y col., 2015; González-Mendoza y col., 2022). Es así como Muhammad y col. (2021) microencapsularon *L. acidophilus* mediante secado por aspersion y obtuvieron que el microorganismo microencapsulado con almidón modificado proveniente del maíz tuvo una mayor protección en comparación con el almidón modificado de papa y arroz respectivamente (maíz>papa>arroz). En este trabajo el almidón modificado proveniente del haba (AM4), mostró mayor efecto protector que el almidón proveniente del maíz (NLOK®) y el microorganismo LGG mostró mayor

sobrevivencia en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal comparado con LC.

En las Figuras 14c y 14d se observa el comportamiento de la salchicha control en donde se obtuvo 1.5 Log UFC/g de bacterias ácido lácticas (LAB) en el tiempo 0 minutos, esta concentración inicial de LAB concuerda con lo reportado por Mohammadpourfard y col. 2020 que fue de 1.17 Log UFC/g en donde igual forma evaluaron una salchicha cocida, pero de carne de res. Se considera esta concentración de LAB como la microbiota natural de una salchicha, los microorganismos dominantes que lo conforman son *Lactobacillus* en su mayoría *Lactobacillus casei* seguido de *L. curvatus* y *L. mesenteroides* de igual forma tenemos *Enterococcus durans* y *Pedococcus pentosaceus* (Mäkelä y Korkeala, 1987; Danilovic y col., 2018), cuando ésta salchicha control se expuso a 60 minutos en la etapa del estómago la sobrevivencia fue nula hasta el íleon, lo cual indica que la microbiota natural de la salchicha no es resistente a un ambiente ácido.

La salchicha cocida con las microcápsulas de LGG y LC en sus diferentes materiales (NLOK® y AM4), la concentración inicial en el tiempo 0 fue de ~8 Log UFC/g la cual considera el 1.5 Log UFC/g de la microbiota natural de la salchicha, por lo que la reducción a través de todo el sistema digestivo simulado fue entre 1 y 2 Log UFC/g este comportamiento concuerda con lo reportado por de Marins y col. (2022) quienes evaluaron la sobrevivencia a la digestión de *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. lactis* microencapsulados en una solución de alginato, dextrina y goma xantana generadas por un secador de aspersión en carne cocida para hamburguesa.

Además, para las Figuras 14c y 14d se observa que para las microcápsulas de LC o LGG con ambos materiales adicionados en la salchicha cocida hay una mayor sobrevivencia en el sistema digestivo en comparación con las microcápsulas sin la adición a la salchicha (LC-NLOK, LC-AM4, LGG-NLOK y LGG- AM4), esto se debe a que la matriz alimentaria confiere una cierta protección a las microcápsulas, en específico una de las características que tiene una microcápsula de almidón modificado es que tiene una alta capacidad emulsificante, ya que la esterificación del

material con OSA mejora las propiedades de emulsificación del almidón incorporando grupos hidrofóbicos en la molécula hidrofílica del almidón dando la propiedad de una emulsión estable, eso hace que al incorporarse estas microcápsulas a la salchicha éstas interaccionen con la grasa presente de la salchicha generando una capa de grasa alrededor de la microcápsula y aumentando la protección del microorganismo y brindando estabilidad a la cápsula evitando el paso del oxígeno, así como tensiones entre la fuerza iónica del pH en las diferentes etapas del sistema digestivo y promoviendo una mayor sobrevivencia de los microorganismos (Simsek y col., 2015).

Ahora bien, comparando la misma cepa, pero con los diferentes materiales, se observa en la Figura 14c que SV LC-AM4 tuvo una mayor protección que SV LC-NLOK en toda la simulación del sistema digestivo, aumentando significativamente la viabilidad al final de la simulación en SV LC-AM4 que en SV LC-NLOK donde en ésta última se ve una disminución en la sobrevivencia estando por debajo del intervalo de concentración de un alimento probiótico en la etapa del estómago, sin embargo conforme pasa las áreas del sistema se ve un incremento estando en el mínimo de la concentración indicada para un alimento probiótico, por lo que puede apreciarse que SV LC-AM4 tuvo una mayor sobrevivencia que SV LC-NLOK SV.

En la Figura 14d, se observa que SV LGG-NLOK y SV LGG-AM4 exhiben un comportamiento similar, manteniendo sus concentraciones dentro del intervalo probiótico.

Este hallazgo sugiere que la matriz alimentaria, junto con los materiales utilizados, es eficaz para preservar la viabilidad de los microorganismos. Ambos materiales encapsulantes con sus respectivos microorganismos son opciones viables para adicionarse a una salchicha cocida y proporcionar beneficios para la salud al mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal ya que, durante el proceso digestivo, se mantienen viables y con una concentración mayor a 6 Log UFC/g, la cual es la concentración mínima para que puedan los microorganismos ejercer acciones probióticas (Terpou y col., 2019).

V. CONCLUSIONES

Las mejores condiciones utilizadas para la microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 con el almidón modificado tipo 4, tuvieron eficiencias, rendimientos y viabilidad celular aceptables para el proceso de secado por aspersión utilizado.

El microorganismo LC libre tiene mayor sensibilidad a estrés térmico y a condiciones simuladas del sistema digestivo que LGG libre, así como también en sus formas encapsuladas, independientemente del material encapsulante utilizado (NLOK® o AM4).

Las microcápsulas de LGG y LC muestran una mayor resistencia a las condiciones térmicas y condiciones gastrointestinales en comparación a su estado libre.

La salchicha cocida control cumplió con los intervalos señalados en las normas mexicanas de análisis bromatológicos y microbiológicos y la adición de las microcápsulas de LGG o LC con AM4 generaron una salchicha con una textura más consistente y dura siendo similar a una salchicha de pavo comercial.

Con o sin la incorporación de probióticos en cuanto al color se identificó una prevalencia de tonalidades rojizas dentro de la gama de colores cálidos y vibrantes y finalmente la supervivencia de LGG y LC al final del tracto gastrointestinal fue superior en las microcápsulas del material AM4 añadidas a la salchicha cocida en comparación con las microcápsulas NLOK®. Esto resultó en una salchicha cocida probiótica con una concentración óptima, convirtiéndola en un alimento probiótico debido a la supervivencia al final del sistema digestivo.

VI. REFERENCIAS

Afzaal M, Khan AU, Saeed F, Arshad MS, Khan MA, Saeed M, Aslam A, Kashif M, Aftab ZI, Tufail T, Anjum FM. Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Sci and Nutr.* **2020**; 8: 1649–1656.

Agudelo-Chaparro J, Ciro-Velásquez HJ, Sepúlveda-Valencia JU, Pérez-Monterroza EJ. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 by spray drying using maltodextrin, whey protein concentrate and trehalose. *Food Science and Technology Int.* **2021**; 28(6): 476-488.

Alehosseini A, Sarabi-Jamab M, Ghorani B, Kadkhodae R. Electro-encapsulation of *Lactobacillus casei* in high-resistant capsules of whey protein containing transglutaminase enzyme. *LWT-Food Sci and Tech.* **2018**; 102: 150-158.

Alfaro-Galarza O, López-Villegas EO, Rivero-Pérez N, Tapia-Maruri D, Jiménez-Aparicio AR, Palma-Rodríguez HM, Vargas-Torres A. Protective effects of the use of taro and rice starch as wall material on the viability of *encapsulated Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*. *LWT-Food Science and Technology.* **2020**; 117:0023-6438.

Altarugio R, Vellano IHB, Moraes ACI, Milbradt EL, Andreatti Filho RL, Guimarães-Okamoto PTC, Padovani CR, Okamoto AS. *In vitro* probiotic selection and characterization of *Lactobacillus* spp. Isolated from healthy domesticated Turkeys. *The J of Appl Poult Research.* **2017**; 27: 81–91.

AMSA. Meat Color Measurement Guidelines. American Meat Science Association. **2012.**

AOAC. Association Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis (18th ed.). AOAC International. **2005.**

AOAC 973.31-1996. Nitrites in cured meat. Colorimetric met. AOAC 973.31-1996. Official Method. **1997.**

Arslan S, Erbas M, Tontul I y Topuz A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT – Food Science and Technology.* **2015**; 63(1): 685–690.

Ashwar BA, A. Gani, A. Gani, A. Shah, and F. A. Masoodi. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chem.* **2018**; 239: 287–94.

Ávila-Reyes SV, García-Suarez FJ, Jiménez MT, Martín-González MF, Bello-Pérez, LA. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *CHO Polymers.* **2014**;102: 423–430.

Badgeley A, Anwar H, Modi K, Murphy P, Lakshmikuttyamma A. Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives. *Biochim et Biophys Acta (BBA) – Reviews on Cancer.* **2020**; 1875(1): 0304-0419.

Bagchi T. Traditional food & modern lifestyle: impact of probiotics *Indian J Med Res.* **2014**; 140:333-335.

Barajas-Álvarez P, González-Ávila M, Espinosa-Andrews H. Recent Advances in Probiotic Encapsulation to Improve Viability under Storage and Gastrointestinal Conditions and Their Impact on Functional Food Formulation. *Food Reviews Int.* **2021**; 1–22.

Barragán-Martínez LP, Totosa A, Pérez-Chabela M. Probiotication of cooked sausages employing agroindustrial coproducts as prebiotic co-encapsulant in ionotropic alginate–pectin gels. *Int J of Food Sci & Technic.* **2019**;102: 1-9.

Beldarrain-Iznaga T, Villalobos-Carvajal R, Sevillano-Armesto E, Leiva-Vega J. Functional properties of *Lactobacillus casei* C24 improved by microencapsulation using multilayer double emulsion. *Food Resch Int.* **2021**;141: 0963-996.

Berezhnaya Y, Bikaeva I, Gachkovskaia A, Demidenko A, Klimenko N, Tyakht A, Volokh O, Alexeev D. Temporal dynamics of probiotic *Lacticaseibacillus casei* and *rhamnosus* abundance in a fermented dairy product evaluated using a combination of cultivation-dependent and -independent methods. *LWT-Food Science and Technology.* **2021**; 148: 0023-6438.

Bilal M, Si W, Barbe F, Chevaux E, Sienkiewicz O, Zhao X. Effects of novel probiotic strains of *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions. *Poultry Science.* **2021**; 100(3): 0032-5791.

Bilenler T, Karabulut I, Candogan K. Effects of encapsulated starter cultures on microbial and physicochemical properties of traditionally produced and heat-treated sausages (sucuks). *LWT-Food Sci and Tech.* **2017**; 75: 425–433.

Birkett AM, **Brown** IL. Resistant starch. *Novel Food Ingredients for Weight Control.* **2007**; 174–197.

Bommasamudram J, Muthu A, Devappa S. Effect of sub-lethal heat stress on viability of *Lactocaseibacillus casei* N in spray-dried powders. *LWT-Food Science and Technology.* **2022**; 155: 0023-6438.

Borrmann D., Pierucci APTR, Leite SGF y Leão MHM da R. Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. *Food and Bioproducts Processing.* **2013**; 91(1): 23–27.

Bourne MC. Texture Profile Analysis. *Food Tech.* **1978**; 32: 62–66.

Cabrera-Ramírez AH, Cervantes-Ramírez E, Morales-Sánchez E, Rodríguez-García ME, Reyes-Vega Gaytán-Martínez M. Effect of Extrusion on the Crystalline Structure of Starch during RS5 Formation. *Polysaccharides.* **2021**; 2(1):187-201.

Carlan IC, Estevinho BN y Rocha, F. Production of vitamin B1 microparticles by a spray drying process using different biopolymers as wall materials. *The Canadian Journal of Chemical Engineering.* **2020**;1-14.

Cavalheiro CP, Ruiz-Capillas C, Herrero AM, Pintado T. Dry-fermented sausages inoculated with *Enterococcus faecium* CECT 410 as free cells or in alginate beads. *LWT - Food Science and Technology.* **2021**; 0023-6438.

CDC. *Listeria* (Listeriosis). [serie de internet] **2022**. [consultado 2023 septiembre 25]: 1-30. Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/faq.html#:~:text=Cuando%20la%20listeriosis%20ocurre%20durante,nacido%20en%20alrededor%20del%203%25>

Champ M. Resistant starch. *Starch in Food.* **2004**; 560–574.

Cheow WS, Kiew TY, Hadinoto K. Effects of adding resistant and waxy starches on cell density and survival of encapsulated biofilm of *Lactobacillus rhamnosus* GG probiotics. *LWT – Food Science and Technology.* **2016**; 69: 497–505.

Čitar M, Hacin B, Tompa G, Štampelj M, Rogelj I, Dolinšek J, Narat M, Matijašić BB. Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with

probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Beneficial Microbes*. **2015**; 6: 325–336.

Clark JP. Food encapsulation: capturing one substance by another. *Food Technology*. **2002**; 56: 63–65.

Coghetto CC, Brinques GB, Siqueira NM, Pletsch J, Soares RMD, Ayub MZ. Electro spraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. *J of Func Foods*. **2016**; 24: 316–326.

Falfán-Cortés RN, Gaytán-Martínez M, Verdalet-Guzmán I, Amaya-Llano SL, Ferreira-Grosso CR y Martínez-Bustos F. Evaluation of Modified Amaranth Starch as Shell Material for Encapsulation of Probiotics. *Cereal Chemistry Journal*. **2014**; 91(3): 300–308.

Consejo Mexicano de la Carne. Compendio Estadístico 2022 [serie de internet] **2022**. [consultado 2023 agosto 05]: 1-30. Disponible en: https://comecarne.org/wp-content/uploads/2022/05/compendio_estadistico_2022.pdf

Danilovic B, Dzinic N, Milosavljevic N y Savic D. Influence of processing conditions on the lactic acid bacteria population of a traditional sausage. *Romanian Biotechnological Letters*. **2018**; 23(3): 1-8.

Da Silva SL, Amaral JT, Ribeiro M, Sebastião EE, Vargas C, de Lima Franzen F, Schneider G, Lorenzo JM, Martins LL, Cichoski AJ y Campagnol PCB. Fat replacement by oleogel rich in oleic acid and its impact on the technological, nutritional, oxidative, and sensory properties of Bologna-type sausages. *Meat Science*. **2019**; 149: 141–148.

De Keersmaecker SCJ, Verhoeven TLA, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett*. **2006**; 259: 89–96.

De Marins AR, Ferreira de Campos TA, Pereira AF, Gesser V, Peralta R, Gratton JM, Guttierrez R, Feihmann AC. Effect of the addition of encapsulated *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115, *Bifidobacterium animalis* spp. *Lactis* Bb-12, and *Lactobacillus acidophilus* La-5 to cooked burger. *LWT – Food Sci and Tech*, **2022**; 155: 0023-6438.

Douillard FP, Ribbera A, Järvinen HM, Kant R, Pietilä TE, Randazzo C, Paulin L, Laine PK, Caggia C, von Ossowski I, Reunanen J, Satokari R, Salminen S, Palva A, de Vos WM. Comparative Genomic and Functional Analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* Strains Marketed as Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. **2013**; 79: 1923–1933

Dokoohaki ZN, Sekhavatizadeh SS, Hosseinzadeh S. Dairy dessert containing microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) with quince seed mucilage as a coating material. *LWT – Food Science and Technology*. **2019**; 115: 0023-6438.

Eastwood J, Walton G, Van Hemert S, Williams C, Lamport D. The effect of probiotics on cognitive function across the human lifespan: A systematic review. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. **2021**; 128: 311–327.

Ellen M. Minimum criteria for probiotics: ISAPP perspectives. ISAPP [serie en internet]. **2018** [2021, septiembre 26]; Disponible en: <https://isappscience.org/minimum-criteria-probiotics/>

Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutrition and Cancer*. **2012**; 64: 871-878

Faghfoori Z, Pourghassem GB, Saber A, Seyyedi M, Fazelian S, Khosroushahi AY. Prophylactic effects of secretion metabolites of dairy *lactobacilli* through downregulation of ErbB-2 and ErbB-3 genes on colon cancer cells. *Eur. J. Cancer Prev*. **2020**; 29: 201–209.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. **2022**. [2021, diciembre, 29]; Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. 2002

Falfán-Cortés RNF, Martínez MG, Guzmán IV, Llano SLA, Grosso CRF, Bustos FM. Evaluation of Modified Amaranth Starch as Shell Material for Encapsulation of Probiotics. *Cereal Chemistry Journal*. **2014**; 91: 300–308.

Farias TGS, Ladislau HFL, Stamford TCM, Costa JA, Mendonça BL, Stamford ATM, Stamford TLM. Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in

yellow mombin ice cream. *LWT – Food Science and Technology*. **2018**; 100: 391-396.

Gao F, Sui L, Mu G, Qian F, y Zhu X. Screening of potential probiotics with anti-*Helicobacter pylori* activity from infant feces through principal component analysis. *Food Bioscience*. **2021**;42: 2212-4292.

Gobbetti M. *Lactobacillus casei*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. **1999**.

Gobbetti M, **Minervini F**. *Lactobacillus casei*. *Ency of Food Microbiology*. **2014**: 432–438.

González-Mendoza ME, Martínez-Bustos F, Castaño-Tostado E, Amaya-Llano SL. *Evaluación del uso de almidón modificado de haba en la microencapsulación de Lactobacillus rhamnosus GG para su incorporación en salchicha cocida*. (Tesis doctoral inédita). Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. **2022**.

González-Mendoza ME, Martínez-Bustos F, Castaño-Tostado E, Amaya-Llano SL. Effect of Microwave Irradiation on Acid Hydrolysis of Faba Bean Starch: Physicochemical Changes of the Starch Granules. *Molecules*. **2022**;27(11):3528.

Gorbach S, Doron S, Magro F. *Lactobacillus rhamnosus* GG. *The Microbiota in GI Pathophysiology*. **2017**: 79–88.

Guerin J, Petit J, Burgain J, Borges F, Bhandari B, Perroud C, Desoby S, Scher J, Gaiani C. *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *Journal of Food Engineer*. **2017**;193: 10–19.

Haddaji N, Mahdhi AK, Krifi B, Ismail MB, Bakhrouf A. Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment. *FEMS Microbiology Letters*. **2015**; 362: 1-7.

Haiping L, Pei Z, Shuhai Z, Dengyun Z, Herong F, Yi S, Xinqian W. Protective effect of polysaccharides from *Pholiota nameko* on *Lactobacillus casei* ATCC 334 subjected to freeze-drying. *LWT- Food Science and Technology*. **2019**;115: 108463.

Havenaar R, Huis in't Veld JHJ, Wood BJB. *The Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Chapman & Hall. **1992**;1: 209–224.

Hernández-Barrueta T, Martínez-Bustos F, Castaño-Tostado E, Lee Y, Miller MJ, Amaya-Llano SL. Encapsulation of probiotics in whey protein isolate and modified

huauzontle's starch: An approach to avoid fermentation and stabilize polyphenol compounds in a ready-to-drink probiotic green tea. *LWT-Food Science and Technology*. **2020**; 124: 0023-6438.

Hernández-López Zenia, Rangel-Vargas Esmeralda Castro-Rosas, Javier Gómez-Aldapa, Carlos Alberto Cadena-Ramírez, Arturo Acevedo-Sandoval, Otilio Arturo Gordillo-Martínez, Alberto José Falfán-Cortés, Reyna Nallely. Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. *LWT-Food Science and Technology*. **2018**; 95: 216–222

Homayouni-Rad A, Mortazavian AM, Mashkani MG, Hajipour N, Pourjafar H. Effect of *Alyssum homolocarpum* mucilage and inulin microencapsulation on the survivability of *Lactobacillus casei* in simulated gastrointestinal and high-temperature conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **2021**; 35: 1878-8181.

Hoyos-Leyva JD, Chávez-Salazar A, Castellanos-Galeano F, Bello-Perez LA, Álvarez-Ramírez J. Physical and chemical stability of l -ascorbic acid microencapsulated into taro starch spherical aggregates by spray drying. *Food Hydrocolloid*.**2018**; 83:143–152.

Huq T, Frascini C, Khan A, Riedl B, Bouchard J, Lacroix M. Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *CHO Polymers*. **2017**; 168: 61–69.

Hugues-Ayala AM, Sarabia-Sainz JAI, González-Ríos H, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont MG. Airbrush encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in dry microbeads of alginate coated with regular buttermilk proteins. *LWT Food Science and Technology*. **2019**;117: 0023-6438.

Ingredion. N-LOK® 1930 – 31111102. 2023. [2023, diciembre 10]; Disponible en: <https://www.ingredion.com/na/en-us/ingredient/nlok-1930-31111102.html>

Jafari SM. An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *NEP Techn for the Food and Nut Inds*. **2017**. 1–34.

Jang HL, Park SY, Lee JH, Hwang MJ, Choi Y, Kim SN, Kim JH, Hwang J, Seo D, Nam D. Comparason of Fat Content and Fatty Acid Composition in Differents Parts

of Korean Beef and Pork. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. **2017**; 46(6): 703-712.

Jiang N, Kumar GD, Chen J, Mishra A, Solval, Kevin M. Comparison of concurrent and mixed-flow spray drying on viability, growth kinetics and biofilm formation of *Lactobacillus rhamnosus* GG microencapsulated with fish gelatin and maltodextrin. LWT- Food Science and Technology. **2020**. 124: 0023-6438.

Jo K, Lee S, Yong HI, Choi YS y Jung S. Nitrite sources for cured meat products. LWT- Food Science and Technology. **2020**;129: 1-31.

Jouki M, Khazaei N, Rashidi-Alavijeh S, Ahmadi S. Encapsulation of *Lactobacillus casei* in quince seed gum-alginate beads to produce a functional synbiotic drink powder by agro-industrial by-products and freeze-drying. Food Hydrocoll. **2021**; 120: 0268-0275.

Keogh MK. Capítulo 18. Spray-Dried Microencapsulated Fat Powders. En: Encapsulated and Powdered Foods. Onwulata, C. EUA. Advisory Board. **2005**; 1: 477-482.

Khaled JMA. Probiotics, prebiotics, and COVID-19 infection: A review article. Saudi J Biol Sci. **2020**; 28:865-869.

Kim HS, **Hur** SJ. Effect of six different starter cultures on the concentration of residual nitrite in fermented sausages during in vitro human digestion. Food Chem. **2018**; 239: 556–560.

Kittibunchakul S, Yuthaworawit N, Whanmek K, Suttisansanee U, Santivarangkna C. Health beneficial properties of a novel plant-based probiotic drink produced by fermentation of brown rice milk with GABA-producing *Lactobacillus pentosus* isolated from Thai pickled weed. J Func Foods. **2021**; 86: 1756-4646.

Kristensen NB, Bryrup, T, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Pedersen O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. Genome Med. **2016**; 8: 1-11

Krokida M. Thermal and nonthermal encapsulation methods. 1ra edición. CRC Press. **2018**: 1-221.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. Microbiol Mol Biol R. **2008**; 72: 728-764

Leone RS, de Andrade EF, Ellendersen LN, Tais da Cunha A, Chupel Martins AM, Granato D, Masson ML. Evaluation of dried yacon (*Ailanthus sonchifolius*) as an efficient probiotic carrier of *Lactobacillus casei* LC-01. *LWT- Food Science and Technology*. **2017**; 75: 220–226.

Liang-Kun L, Xiao-Yi W, Xiao G, Ji-Hua L, Tao H, Tao X, Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion, *LWT – Food Science and Technology*. **2017**; 82: 82-89

Lilly DM, **Stillwell** RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Sci*. **1965**; 147: 747–748.

Liu L, Chen P, Zhao W, Li X, Wang H, Qu X. Effect of microencapsulation with the Maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival rate of *Lactobacillus rhamnosus* in white brined cheese. *Food Control*. **2017**; 79: 44–49.

Liu Y, Yan C, Chen J, Wang Y, Liang R, Zou L, McClements DJ, Liu W. Enhancement of beta-carotene stability by encapsulation in high internal phase emulsions stabilized by modified starch and tannic acid. *Food Hydrocolloids*. **2020**;109: 0268-0275.

Luo F, Feng S, Sun Q, Xiang W, Zhao J, Zhang J, Yang Z. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai–Tibet plateau. *Food Control*. **2011**; 22: 50–53.

Madureira AR, Amorim M, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Int. Food Res J*.**2011**; 44: 465–470

Majewska K, Kręgielska-Narożna M, Jakubowski H, Szulińska M, Bogdański P. The Multispecies Probiotic Effectively Reduces Homocysteine Concentration in Obese Women: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Journal Clinical Medicine*. **2020**; 9: 1-11.

Mäkelä P y **Korkeala** H. Contaminación por lactobacilos de salchichas cocidas en aros en plantas procesadoras de salchichas. *Revista internacional de microbiología de alimentos*.**1987**; 5(4): 323–330.

Matos-Jr FE, da Silva MP, Kasemodel MGC, Santos TT, Burns P, Reinheimer J, Viderola G, Favaro-Trindade CS. Evaluation of the viability and the preservation of

the functionality of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* BGP1 and *Lactobacillus rhamnosus* 64 in lipid particles coated by polymer electrostatic interaction. Journal of Functional Foods. **2019**; 54, 98–108.

Moayyedi M, Eskandari MH, Rad AHE, Ziaee E. Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **2018**;40: 391-399

Mokrzycki WS y Tatol M. Colour difference ΔE –A survey. Mach. Graph. Vis. **2012**; 20, 383–411.

McNamee CE, Sato Y, Wiege B, Furikado I, Marefati A, Nylander T, Nylander T, Kappl M, Rayner M. Rice Starch Particle Interactions at Air/Aqueous Interfaces-Effect of Particle Hydrophobicity and Solution Ionic Strength. Front Chem. **2018**; 6: 1-15

Muhammad Z, Ramzan R, Zhang R y Zhang M. Resistant Starch-Based Edible Coating Composites for Spray-Dried Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*, Comparative Assessment of Thermal Protection, In Vitro Digestion and Physicochemical Characteristics. Coatings. **2021**;11(5), 587.

Muthukumarasamy P, Holley RA. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. International Journal Food Microbiology. **2006**;11: 164–169.

Naim F, Leblanc D, Messier S, Saucier L, Piette G, Houde A. Shiga toxin production by sausage-borne *Escherichia coli* O157:H7 in response to a post-processing in vitro digestion challenge. Food Microbiology. **2006**; 23:231–240.

Nawaz A, Yasmin H, Ghazanfar S, Nadeem M, Keyani R, Khan I, Gohar M, Shahzad A, Hashim, Ahmad A. Antagonistic, Antioxidant, Anti-inflammatory and Anti-diabetic Probiotic Potential of *Lactobacillus agilis* Isolated from the Rhizosphere of the Medicinal Plants. Saudi Journal of Biological Sciences. **2021**; 28:6069-6076.

Metchnikoff E, **Mitchell** PC. The Prolongation of Life: Optimistic Studies. Londres. Springer Publishing Company. **1907**. 61-183

Miller LE, Lehtoranta L, Lehtinen MJ. Short-term probiotic supplementation enhances cellular immune function in healthy elderly: Systematic review and meta-analysis of controlled studies. Nutr Res. **2018**; 64:1-8.

Mohammadpourfard I, Khanjari A, Akhonzadeh Basti A, Herrero-Latorre C, Shariatifar N y Hosseini H. Evaluation of microbiological, chemical, and sensory properties of cooked probiotic sausages containing different concentrations of astaxanthin, thymol, and nitrite. *Food Science & Nutrition*.**2020**. 345-356.

Murúa-Pagola B, Beristain-Guevara CI, Martínez-Bustos F. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal Food Engineer*. **2009**; 91: 380–386.

Ningtyas DW, Bhandari B, Bansal N, Prakash S. The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage. *Food Control*. **2019**;100: 8-16

Nistal E, Fernández-Fernández N, Vivas S, Olcoz, JL. Factors Determining Colorectal Cancer: The Role of the Intestinal Microbiota. *Frontiers in Oncology*. **2015**; 5: 220-239.

NMX-F-065-1984. Alimentos-Salchichas-Especificaciones. Norma Mexicana.**1984**.

NMX-F-097-S-1978. Determinación de nitritos en embutidos. Norma Mexicana. Dirección general de normals.**1978**.

Noidad S, Limsupavanich R, Suwonsichon S, Chaosap C. Effect of visual marbling levels in pork loins on meat quality and Thai consumer acceptance and purchase intent. *Asian-Australas Journal of Animal Sciences*. **2019**. 1;32(12):1923-1932

NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. **1994**.

NOM-210-SSA1-2014. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Norma Oficial Mexicana.**2014**.

NOM-213-SSA1-2018. Productos y servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.**2018**.

Long-Smith C, O’Riordan KJ, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan J F. Microbiota-Gut-Brain Axis: New Therapeutic Opportunities. Annual Review Pharmacolgy Toxicology. **2019**. 60: 477-502.

Oh M., Kim EK, Jeon BT, Tang Y, Kim MS; Seong H, Moon SH. Chemical compositions, free amino acid contents and antioxidant activities of Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) beef by cut. Meat Science.**2016**;119:16-21.

Okoro CU y Antai SP. Influence of local spices (*Terapieura tetraptera* and *Allium sativum*) on the keeping quality of sausages prepared under laboratory conditions. Global Journal of pure and applied science. **2010**; 16:281-287.

O’Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., & Conway, P. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. Journal of Applied Microbiology. **2001**; 91(6): 1059–1066.

Pasala S, Singer L, Arshad T, Roach K. *Lactobacillus endocarditis* in a healthy patient with probiotic use. IDCases. **2020**; 22: 1-3.

Pegah A, Abbasi-Oshaghi E, Khodadadi I, Mirzaei F, Tayebinia H, Pegah A, Abbasi-Oshaghi E, Khodadadi I, Mirzaei F, Tayebinia H. Probiotic and resveratrol normalize GLP-1 levels and oxidative stress in the intestine of diabetic rats. Metabolism Open.**2021**; 10: 2589-9368.

Pérez-Chabela ML, Ramírez L. Utilización de bacterias lácticas termorresistentes con probióticos en productos cárnicos cocidos. NACAMEH. **2007**; 1: 87-96.

Pérez-Chabela, ML, Lara-Labastida R, Rodriguez-Huezo E, Totosaus A. Effect of Spray Drying Encapsulation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria on Meat Batters Properties. Food and Bioproc Tech. **2013**; 6: 1505–1515.

Poletto G, Raddatz GC, Cichoski AJ, Zepka LQ, Lopes EJ, Barin JS, Wagner R, Ragagnin de Menezes C. Study of viability and storage stability of *Lactobacillus acidophilus* when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. Food Hydrocolloides. **2019**;95: 238–244

PROFECO. La Guía de los Embutidos. Revista Consumidor. **2020**;522: 22-31

Rajam R, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT- Food Science and Technology*. **2015**;60: 773–780.

Reale A, Di Renzo T, Rossi F, Zotta T, Iacumin L, Preziuso M, Coppola R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT - Food Science and Technology*. **2015**; 60(2): 721–728.

Rehman A, Tong Q, Jafari SM, Korma SA, Khan IM, Mohsin A., Manzoor MF, Ashraf W, Mushtaq BS, Zainab S, Cacciotti I. Spray dried nanoemulsions loaded with curcumin, resveratrol, and borage seed oil: The role of two different modified starches as encapsulating materials. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2021**; 186: 820–828.

Salgaço MK, Perina NP, Tomé TM, Mosquera EMB, Lazarini T, Sartoratto A, Sivieri K. Probiotic infant cereal improves children’s gut microbiota: Insights using the Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Food Research International*.**2021**; 143: 0963-9969.

Sahin-Nadeem H y Afşin ÖM. Physical properties and fatty acid composition of pomegranate seed oil microcapsules prepared by using starch derivatives/whey protein blends. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2014**; 116: 847–856

Szczesniak AS. Classification of textural characteristics. *Journal Food Science*. **1963**; 28:385–389

Segers, M.E, y Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG – host interactions. *Microbiological Cell Factories*. **2014**; 13:1-16.

Soukoulis C, Yonekura L, Gan HH, Behboudi-Jobbehdar S, Parmenter C, Fisk I. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloide*.**2014**; 39: 231–242.

Song MY, Van-Ba H, Park WS, Yoo JY, Kang HB, Kim JH, Kang SM, Kim BM, Oh MH, Ham JS. Quality Characteristics of Functional Fermented Sausages Added with Encapsulated Probiotic *Bifidobacterium longum* KACC 91563. *Korean J F Sci Anim Resour*. **2018**;38: 981–994.

Song X, Zhu W, Li Z y Zhu J. Characteristics and application of octenyl succinic anhydride modified waxy corn starch in sausage. *Starch/Staerke*. **2010**; 62(12): 785-792.

Shin DJ, Yim DG, Kwon JA, Kim SS, Lee HJ y Jo C. Effect of cutting time and cooking temperature on physicochemical properties of chicken breast meat emulsion sausage with olive oil. *Poultry Science*. **2022**. 101(1), 0032-5791.

Silva M, Jacobus NV, DenekeC, Gorbach SL. Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.**1987**.31. 1231-1233.

Silva R, Pimentel TC, Junior FE, Esmerino EA, Freitas M, Fávoro-Trindade CS, Silva MC, Cruz A. Microencapsulation with spray-chilling as an innovative strategy for probiotic low sodium requeijão cremoso processed cheese processing, *Food Bioscience*. **2022**; 46: 2212-4292.

Simsek S, Ovando-Martinez M, Marefati A, Sjö M, y Rayner, M. Chemical composition, digestibility and emulsification properties of octenyl succinic esters of various starches. *Food Research International*. **2015**; 75: 41–49.

Su Y, Zheng X, Zhao Q, Fu N, Xiong H, Wu WD, Chen XD. Spray drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG with calcium-containing protectant for enhanced viability. *Powder Technology*. **2018**; 358: 87-94.

Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw CS, Cone RA. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in Microbiology*. **2017**; 168: 782–792.

Tejero-Sariñena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I. Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: Is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? *Anaerobe*. **2013**; 24: 60–65.

Terpou A, Papadaki A, Lappa IK, Kachrimanidou V, Bosnea LA y Kopsahelis N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*. **2019**; 11(7). 1-32.

Tian Q, Zhou W, Cai Q, Ma G, Lian G. Concepts, processing, and recent developments in encapsulating essential oils. *Chin J Chem Eng*. **2021**; 30: 255–271.

Turhan EU, Erginkaya Z, Selli S. The effect of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* and storage period on aroma properties of Turkish dry-fermented sausage (sucuk). *Journal of Food Measurement and Characterization*. **2017**;11:2131–2141

Ünal E, Erginkaya Z, Süleyman P, Ayse E. Design of probiotic dry fermented sausage (sucuk) production with microencapsulated and free cells of *Lactobacillus rhamnosus*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. **2017**;41: 598-603

Vinderola G, y Burns P. Capítulo 1. The Biotics Family. Probiotics and Prebiotics in Foods. Challenges, Innovations, and Advances. Academic Press. **2021**. 2-2.

Waigankar S, Patel V. Role of probiotics in urogenital healthcare. *Journal of Mid-Life Health*. **2011**; 2: 237-242.

Wang C, Sijia L, Xue P, Yu L, Tian F, Zhao J, Chen W, Xue Y, Zhai Q. The effect of probiotic supplementation on lipid profiles in adults with overweight or obesity: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal Functional Foods*. **2021**; 86: 1756-4646.

Wu D, Cao M, Zhou J, Yan S, Peng J, Yu, Zhang A, Wu J, Yan X, Zhao J. *Lactobacillus casei* T1 from kurut against *Helicobacter pylori*-induced inflammation and the gut microbial disorder. *J Funct Foods*. **2021**; 85: 104611.

Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr*. **2001**; 73: 451S-455S

Xiao Y, Han C, Yang H, Liu M, Meng X, Liu B. Layer (whey protein isolate) -by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of *L. bulgaricus* and *L. paracasei* under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions. *Int J of Biol Macromol*, **2020**; 148: 238–247.

Yi D, Maike W, Yi S, Xiaoli S, Dianxing W, Wenjian S. Physicochemical Properties of Resistant Starch and Its Enhancement Approaches in Rice. *Rice Science*. **2021**; 28: 31–42.

Ying D, Schwander S, Weerakkody R, Sanguansri L, Gantenbein-Demarchi C y Augustin, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*. **2013**; 5(1): 98-105.

Zhang J, Ma J, Li Q, Su H, Sun X. Exploration of the effect of mixed probiotics on microbiota of allergic asthma mice. *Cellular Immunology*. **2021**; 367: 1-11.

Zotta T, Parente E, Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry. *Journal Applied Microbiology*.**2017**; 122: 857–869.

VII. ANEXOS

Cuadro A. ANOVA de probabilidades para cada factor y su interacción. Diseño factorial para la microencapsulación de los microorganismos.

Parámetro	Temperatura de entrada		Flujo		Temperatura de entrada*Flujo	
	LGG P(>F)	LC P(>F)	LGG P(>F)	LC P(>F)	LGG P(>F)	LC P(>F)
Rendimiento (%)	0.552	0.026	0.304	0.745	0.183	0.924
Temperatura de salida (°C)	0.036	0.018	0.402	0.534	0.243	0.735
Células viables totales después de la microencapsulación (Log UFC)	0.087	0.002	0.198	0.946	0.911	0.932
Eficiencia (%)	0.097	0.003	0.247	0.853	0.974	0.944
a_w	0.491	0.395	0.587	0.361	0.275	0.225

LGG= *Lactobacillus rhamnosus* GG, LC= *Lactobacillus casei*. (P>0.05 es significativo).

Anexo. Dictamen de bioética

C.U., Querétaro, marzo 14, 2022
No. de oficio. CBQ22/005

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Facultad de Química
Presente

At'n. Blanca Montserrat Escobar Garcés

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado **“Microencapsulación de dos cepas probióticas usando almidón tipo 4 y evaluación de su viabilidad en un producto cárnico cocido y su digestión *in vitro*”**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **exento**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Presidente

M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez
Representante investigador

Ccp archivo