

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DE LA SOBREVIVENCIA DE *Bifidobacterium breve* EN SU FORMA LIBRE Y ENCAPSULADA, DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN QUESO PANELA A 4°C”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

LUIS ALBERTO IBARRA SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dra. BENERANDA MURÚA PAGOLA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DE LA SOBREVIVENCIA DE *Bifidobacterium breve* EN SU FORMA LIBRE Y ENCAPSULADA, DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN QUESO PANELA A 4°C”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

LUIS ALBERTO IBARRA SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dra. BENERANDA MURÚA PAGOLA

SINODALES

Dra. BENERANDA MURÚA PAGOLA
DIRECTOR

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO
SINODAL

Dr. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO
SINODAL

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
SINODAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Alimentos funcionales	3
II.2 Probióticos	4
II.2.1 Bacterias probióticas	5
II.2.1.1 Bifidobacterias	5
II.2.1.1.1 <i>Bifidobacterium breve</i> (<i>B. breve</i>)	6
II.3 Productos lácteos y probióticos	6
II.3.1 Yogurt y leches fermentadas	7
II.3.2 Queso	8
II.3.2.1 Proceso tecnológico	9
II.3.2.1.1 Preparación de la leche	10
II.3.2.1.2 Inoculación de cultivos iniciadores	10
II.3.2.1.3 Coagulación	10
II.3.2.1.4 Corte de la cuajada y desuerado	11
II.3.2.1.5 Salado	11
II.3.2.1.6 Moldeo	12
II.3.2.1.7 Empaque y almacenaje	12
II.3.2.2 Queso como acarreador de microorganismos probióticos	12

II.4 Microencapsulación	15
II.5 Microencapsulación de probióticos	15
II.5.1 Materiales encapsulantes para probióticos	15
II.5.2 Aplicaciones y ventajas de la encapsulación de probióticos	17
II.5.3 Factores que afectan la encapsulación de probióticos	18
II.5.4 Métodos de encapsulación de probióticos	19
II.5.4.1 Secado por aspersion	19
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1 General	22
IV.2 Específicos	22
V. METODOLOGÍA	23
V.1 Materiales	23
V.1.1 Materiales biológicos	23
V.1.2 Materias primas	23
V.1.3 Materiales químicos	23
V.1.4 Antibióticos	23
V.2 Métodos	23
V.2.1 Modificación y caracterización de los materiales	23
V.2.1.1 Fosfatación por método convencional	23
V.2.1.2 Determinación del grado de sustitución de los materiales modificados	24
V.2.1.3 Determinación del índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) del almidón fosfatado	24
V.2.2 Caracterización de <i>Bifidobacterium breve</i>	25

V.2.2.1 Activación de la cepa	25
V.2.2.2 conteo de microorganismos	25
V.2.2.2.1 conteo de <i>B. breve</i> en queso Panela	26
V.2.2.3 Preparación de la cepa para su microencapsulación	26
V.2.3 Microencapsulación de células de <i>B. breve</i> y caracterización	
fisicoquímica de las cápsulas obtenidas por secado por aspersión	26
V.2.3.1 Preparación de materiales matriz	26
V.2.3.2 Microencapsulación de <i>B. breve</i> por secado por aspersión	27
V.2.3.3 Determinación de la viabilidad de <i>B. breve</i> después del	
proceso de secado por aspersión	27
V.2.3.4 Determinación del contenido de humedad en las	
microcápsulas	27
V.2.4 Desarrollo de queso Panela adicionado de probióticos	28
V.2.4.1 Elaboración de queso Panela con adición de	
<i>Bifidobacterium breve</i>	28
V.2.4.2 Análisis proximal del queso Panela con probióticos	29
V.2.4.2.1 Humedad	29
V.2.4.2.2 Grasa	29
V.2.4.2.3 Proteína	29
V.2.4.2.4 Carbohidratos totales	30
V.2.5 Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal	30
V.2.6 Análisis de datos experimentales	31
VI. RESULTADOS	32
VI.1 Microencapsulación de <i>Bifidobacterium breve</i> con concentrado de	
proteína de suero (CPS) y una mezcla de 90% de almidón alto en	

amilosa fosfatado por método convencional y 10% de concentrado de proteína de suero (90AAM10CPS) y determinación de la viabilidad del probiótico después del proceso de secado por aspersion	32
VI.2 Evaluación de la sobrevivencia de <i>B. breve</i> encapsulado y en su forma libre en queso Panela a 4°C	33
VI.3 Evaluación de la sobrevivencia de <i>B. breve</i> encapsulado y en su forma libre adicionado a queso Panela, durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal	35
VII. DISCUSIÓN	38
VII.1 Microencapsulación de <i>Bifidobacterium breve</i> con concentrado de proteína de suero (CPS) y una mezcla de 90% de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional y 10% de concentrado de proteína de suero (90AAM10CPS) y determinación de la viabilidad probiótico después del proceso de secado por aspersion	38
VII.2 Evaluación de la sobrevivencia de <i>B. breve</i> encapsulado y en su forma libre en queso Panela a 4°C	39
VII.3 Evaluación de la sobrevivencia de <i>B. breve</i> encapsulado y en su forma libre adicionado a queso Panela, durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal	40
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. BIBLIOGRAFÍA	43
X. ANEXOS	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Uso y estabilidad de bifidobacterias en quesos	13
2	Disminución de la viabilidad de <i>B. breve</i> durante su encapsulación por secado por aspersión en los materiales matriz	33
3	Disminución de la viabilidad de <i>B. breve</i> , encapsulada en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela, durante su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Viabilidad de <i>B. breve</i> en la suspensión acuosa de los materiales matriz (antes del secado por aspersion) y una vez encapsulado (después del secado por aspersion)	32
2 Sobrevivencia de <i>B. breve</i> encapsulado en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela durante su almacenamiento a 4°C	34
3 Sobrevivencia de <i>B. breve</i> encapsulado en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela durante su exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas	36

RESUMEN

En este estudio se elaboró un queso Panela con adición de *Bifidobacterium breve* en su forma libre y encapsulada, se determinó la sobrevivencia del probiótico a lo largo de su almacenamiento durante cuatro semanas a 4°C, y la sobrevivencia durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI) después de 14 días de almacenamiento. El probiótico se encapsuló en dos matrices poliméricas: una de concentrado de proteína de suero (CPS) y otra que fue una mezcla de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional (90%) y concentrado de proteína de suero (10%) (90AAM10CPS). El encapsulamiento fue realizado mediante el método de secado por aspersión. Se prepararon tres tratamientos por triplicado: queso control con adición de *B. breve* sin encapsular, queso con adición de *B. breve* encapsulado en CPS y queso con adición de *B. breve* encapsulado en 90AAM10CPS. La viabilidad de *B. breve* se evaluó mediante la siembra de extensión por superficie en placas de agar MRS suplementado con cisteína y vancomicina. La viabilidad de *B. breve* durante el secado por aspersión se preservó de manera similar en los dos materiales probados. Durante el almacenamiento en queso Panela a 4°C, las células de *B. breve* en su forma libre y encapsulada presentaron la misma tendencia de incrementar su número. Durante la exposición de *B. breve* de las muestras de queso Panela a condiciones del TGI simuladas, las células de *B. breve* en su forma encapsulada mostraron una disminución menor de la viabilidad (de 0.16866 y 0.38207 ciclos logarítmicos para CPS y 90AAM10CPS, respectivamente), comparadas con las células no encapsuladas (de 1.39278 ciclos logarítmicos).

I. INTRODUCCIÓN

La reciente preocupación por la alimentación y la influencia que ésta tiene sobre la salud humana ha propiciado el desarrollo de los alimentos funcionales. Los alimentos funcionales son aquellos que pueden proporcionar un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica. Se consideran aquellos que, independientemente del aporte nutrimental, han mostrado científicamente que afectan benéficamente a una o varias funciones del organismo, de tal manera que propician un mejor estado de salud y bienestar. Entre los muchos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra dietética, alimentos a los que se han añadido sustancias con actividad biológica, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que contienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos. De esta manera, el consumo habitual de alimentos funcionales puede reflejarse en la reducción del riesgo de contraer enfermedades específicas en el huésped y fomentar una vida saludable.

Los probióticos son microorganismos que se utilizan para suplementar diversos alimentos y así crear alimentos funcionales. Los efectos que se atribuyen a los probióticos incluyen: el control de infecciones intestinales, una mejor utilización de la lactosa en personas con intolerancia, actividad anticarcinógena, control de niveles de colesterol sérico y mejora del sistema inmune.

El yogurt y productos relacionados han sido utilizados como el vehículo más popular para la incorporación de organismos probióticos. Una alternativa para ampliar la variedad de productos probióticos son los quesos. Estos se perfilan como potenciales vehículos de probióticos por ser productos lácteos con propiedades nutricionales muy reconocidas, y por su matriz sólida compacta, lo cual, junto a las condiciones de almacenamiento, permiten la supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y la digestión.

El tracto gastrointestinal es uno de los principales objetivos para el desarrollo de alimentos funcionales, pues es la interface entre la dieta y las actividades metabólicas que sustentan la vida. La flora microbiana presente en el intestino, en especial las bacterias ácido lácticas, pueden vivir en simbiosis con el ser humano y su presencia se asocia a un estado saludable. Este hecho propicia el desarrollo de alimentos que incentiven la colonización de las bacterias benéficas en el intestino, como son los probióticos, mediante la adición de prebióticos y simbióticos. La pérdida de la viabilidad de microorganismos probióticos se da tanto en los productos alimenticios como a través de su paso por el tracto gastrointestinal y ha alentado a los investigadores a encontrar métodos nuevos y eficientes para conservar la viabilidad, entre los que se encuentra la microencapsulación. La microencapsulación de microorganismos involucra el uso de agentes gelificantes que forman una matriz en la cual queda atrapado el microorganismo, la cual puede ser o no ser recubierta con una capa inerte o protectora que incrementa la estabilidad del probiótico durante el paso por el tracto gastrointestinal. Entre los métodos más utilizados se encuentran el de extrusión, de emulsión, y de coacervación, los cuales han sido utilizados preferentemente a nivel de laboratorio debido a su alto costo. El secado por aspersion es un método de microencapsulación con posibilidades de escalamiento a bajo costo, y estudios realizados han demostrado que la encapsulación por este método es viable y efectiva en la protección de *B. breve* durante el proceso de secado y posterior almacenamiento.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la sobrevivencia de *Bifidobacterium breve* durante el proceso de microencapsulación mediante secado por aspersion con biopolímeros naturales (concentrado de proteína de suero y una mezcla de almidón alto en amilosa fosfatado (90% y concentrado de proteína de suero (10%)), así como su sobrevivencia tanto de su forma libre como encapsulada durante su almacenamiento en queso Panela a 4°C durante un período de 28 días y durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después de un período de almacenamiento de 14 días.

II. ANTECEDENTES

II.1 Alimentos funcionales

El término “alimento funcional” fue utilizado por primera vez en Japón, en los años 1980’s, bajo el término FOSHU (Food For Special Health Use), dando de manifiesto la existencia de alimentos con efectos sobre la salud, y que con su consumo, la población puede obtener beneficios gracias a éstos. La investigación y desarrollo de este tipo de alimentos se expandió de inmediato a varios países del mundo: Estados Unidos, Australia, Canadá, España, entre otros, debido a la creciente preocupación de la población por mantener una alimentación adecuada y a la asociación entre la alimentación y la salud (Diplock y col., 1999).

Los “alimentos funcionales” son aquéllos que, más allá de su valor nutricional, proveen un efecto beneficioso para una o más funciones en el cuerpo, para mejorar la salud y el bienestar, reducir el riesgo de enfermedad o prevenirla. Un alimento funcional debe de permanecer en forma de alimento y debe de demostrar sus efectos en cantidades que normalmente se espera que sean consumidas en la dieta y no a través de suplementos en forma de píldora o cápsula, sino parte del patrón normal de la alimentación (Roberfroid, 2000; EFIC, 2006). Se incluyen no sólo los productos manufacturados, sino también a ciertos alimentos que pueden ser convencionales tales como aceites, frutas, hortalizas, entre otros (Taranto y col., 2005; Hernández, 2006; ADA, 2009).

El desarrollo de alimentos funcionales tiene actualmente un gran interés para los sectores comercial, académico y gubernamental. Los productos alimenticios que tienen beneficios a la salud por sus capacidades funcionales son altamente aceptados por los consumidores y son prometedores en cuanto a la reducción de la morbilidad, mortalidad e incremento en la calidad de vida de la población en general. Dentro de los alimentos funcionales de mayor interés comercial, actualmente se encuentran los alimentos que contienen ácidos grasos omega 3, esteroides de plantas y microorganismos probióticos (Jones y Jew, 2007).

II.2 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que transitan el tracto gastrointestinal (Tannock y col., 2000) y tienen un efecto benéfico en el huésped durante su tránsito, mejorando el balance microbiano intestinal (Krasaekoopt y col., 2003). Después de ingerirlos en número suficiente, brindan beneficios a la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de la nutrición general inherente (Picot y Lacroix, 2004; Taranto y col., 2005).

Entre los efectos que los probióticos tienen sobre la salud se pueden nombrar:

- Control de las infecciones intestinales: Las bacterias lácticas, que colonizan el intestino humano, inhiben el crecimiento de microorganismos indeseables y de bacterias que contaminan los alimentos, como la *Salmonella* spp, que se puede encontrar en el tracto gastrointestinal. (Krasaekoopt y col., 2003).

- Mejor utilización de la lactosa en personas con intolerancia: Los cultivos normales de yogurt, *Lactobacillus delbrueckii* spp, *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, producen β -galactosidasa en presencia de bilis, de lo cual se ha concluido que la producción de esta enzima intestinal mejora la digestión de la lactosa (Krasaekoopt y col., 2003; Hui, 2007).

- Actividad anticarcinógena: Inhibición de bacterias que convierten procarcinógenos en carcinógenos, activación del sistema inmune, incremento de la peristalsis disminuyendo el tiempo de estancia de patógenos y carcinógenos al acelerar la velocidad de tránsito a través del intestino (Kailasapathy y Chin, 2000; Hui, 2007).

- Control de niveles de colesterol sérico: Especialmente para cepas de *L. acidophilus*. Aunque existe dudosa evidencia científica para este uso (Khedkar y col. 1993).

- Estimulación del sistema inmune: Incremento de respuestas inmunes tanto no específicas (función fagocítica, actividad de células NK) como específicas

(producción de anticuerpos, producción de citocinas y proliferación de linfocitos) (Kailasapathy y Chin, 2000; Hui, 2007).

- Tratamiento en patologías gastrointestinales y terapia antibiótica: Actúan mediante la competencia de nutrientes y espacio, acidificando el colon o produciendo sustancias antibióticas activas frente a patógenos como *Clostridium difficile* y *Helicobacter pylori*, que impiden la multiplicación de los mismos y la producción de sus toxinas (Hui, 2007).

II.2.1 Bacterias probióticas

Las bacterias más comúnmente utilizadas para la producción de alimentos probióticos se hallan dentro de las bacterias lácticas, como son especies de lactobacilos y de bifidobacterias (Iyer y Kailasapathy, 2005) como son: *Lactobacillus acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve* y *B. infantis* (Mortazavian y col., 2007). Los lactobacilos son una población dominante en el intestino delgado, mientras que las bifidobacterias lo son en el colon (Victoria, 2004; Motohiro y col., 2006).

II.2.1.1 Bifidobacterias

Las bifidobacterias son bacterias de forma bacilar, gram-positivas, inmóviles y no esporuladas, las cuales tienen una pared externa irregular y son generalmente cóncavas. Son microorganismos estrictamente anaerobios, aunque el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo. Son aisladas de animales y humanos. La temperatura óptima para el desarrollo de las especies humanas, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, y *B. dentium*, está entre 36 y 38°C, no crecen por debajo de los 20°C y no resisten temperaturas por arriba de 46°C. El pH óptimo de crecimiento es entre 6.5 y 7.0, mientras que a pH menores de 5.0 o mayores de 8.0 no hay crecimiento. A diferencia de los lactobacilos que cuentan con las enzimas aldolasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, las bifidobacterias cuentan con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La

fermentación de dos moles de glucosa por bifidobacterias da como resultado tres moles de acetato y dos moles de lactato (Ballongue, 2004).

II.2.1.1.1 *Bifidobacterium breve* (*B. breve*)

B. breve es una bifidobacteria que se aísla de humanos, principalmente de niños menores de 7 meses, fermenta ribosa, manitol, esculina y amigdalina, pero no fermenta arabinosa o xilosa. Tiene una tolerancia a la temperatura considerada como baja (<40% de sobrevivencia a 55°C en comparación con la sobrevivencia a 42°C), sin embargo su tolerancia al oxígeno se considera moderada (entre 5 y 30% de crecimiento aeróbico comparado con el crecimiento anaeróbico) (Simpson y col., 2005).

Este microorganismo se reconoce por su capacidad para regular la microflora intestinal lo cual permite una condición gastrointestinal más saludable (Champagne y Gardner, 2005). Se ha visto una mejoría más rápida de la flora intestinal y del estado de salud de niños que sufren de diarrea, después de la ingestión de leche fermentada con *B. breve* (Ballongue, 2004).

II.3 Productos lácteos y probióticos

La industria de la leche en México es una industria en expansión. La tendencia al consumo de derivados lácteos en México se ha incrementado en años recientes debido a factores como la modificación de la pirámide poblacional, la reducción de la natalidad, envejecimiento de la población, el aumento del ingreso *per cápita*, entre otros (Trejo, 2009).

Los lácteos representan un vehículo ideal para el suministro de probióticos por las razones siguientes: (DMI, 2004)

- Ofrecen protección para los probióticos al mantener un ambiente favorable durante su tránsito por el tracto digestivo, en especial por el estómago e intestino delgado.

- El tiempo corto y temperatura de almacenaje baja de los lácteos promueven la estabilidad de los probióticos y garantizan el efecto positivo al ser ingeridos.

- Los lácteos son ampliamente consumidos y tienen mayor aceptación al ser asociados con los beneficios de los probióticos.

- Se vuelve interesante el uso de productos lácteos con un fin funcional por su valorado contenido nutricional, pudiendo destacarse su alto contenido en proteínas de alta calidad biológica, vitaminas y minerales.

Además, gracias a la actividad metabólica de las bacterias lácticas que actúan durante el proceso de elaboración, la calidad nutritiva se mejora, ya que hay una predigestión de la lactosa y las caseínas. El metabolismo de la lactosa genera ácido láctico que da lugar a una disminución del pH, esto favorece la coagulación de las proteínas y determina la textura del producto, inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y facilita la digestión de la lactosa al consumidor. De igual manera, la degradación de la caseína genera péptidos y aminoácidos libres, más fácilmente asimilables (Sanz y col., 2003; Cabeza, 2006).

II.3.1 Yogurt y leches fermentadas

El yogurt se ha considerado siempre como un alimento saludable. Este alimento es considerado un alimento funcional por excelencia y máximo representante de probióticos y prebióticos por ser un vehículo ideal para su adición, pues además de los beneficios, tienen gran aceptación en los distintos grupos de población y son fáciles de digerir (Figuerola, 2006; Castro y Rovetto, 2006).

Otro tipo de lácteos fermentados también son producidos con adición de probióticos, como es el caso de la leche bifido fermentada o la leche acidófila, elaboradas con leche de vaca o cabra, con el uso de *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus* como probióticos, respectivamente. De igual manera se ha aplicado esta tecnología en la producción de kéfir (Hernández, 2006).

Se ha observado una baja viabilidad de cultivos probióticos tanto en yogurt y leches fermentadas, como durante su paso a través del tracto gastrointestinal al ser consumidos (Mortazavian y col., 2007). Varios factores se han señalado como responsables de la pérdida de viabilidad de los cultivos probióticos contenidos en yogurt y leches fermentadas como son: la acidez, el pH, la concentración de ácido láctico y acético, el peróxido de hidrógeno producido, el contenido de oxígeno disuelto, la temperatura de almacenaje, la concentración de la proteína de suero, así como el daño que pueden sufrir durante su procesamiento (Picot y Lacroix, 2004; Mortazavian y col., 2007).

II.3.2 Queso

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 para las especificaciones sanitarias de los quesos frescos y madurados, un queso se define como: "Producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado".

De acuerdo a la SAGARPA (SIAP, 2010) las variedades de queso más producidas son: Amarillo (21.74%), diversos quesos frescos (18.13%), Panela (17.65%), Chihuahua (15%), doble crema (11.34%), Oaxaca (9.08%), y Manchego (7.06%); cabe resaltar que los quesos frescos, Panela, Oaxaca y Chihuahua son elaborados principalmente por empresas de tipo tradicional (Cervantes y col., 2008) no obstante también son elaborados por las grandes empresas dado que son productos altamente demandados y representan un segmento de mercado importante.

Hoy es bien sabido que el queso es reconocido por su alto valor nutricional debido a sus altas concentraciones de proteína, calcio, riboflavina y vitaminas A y D (Dillon y Berthier, 2000).

La elaboración de queso generalmente involucra la concentración de grasa y caseína de la leche por la coagulación enzimática (renina) de la caseína o por coagulación ácida.

La leche de vaca es ampliamente utilizada para la elaboración de quesos, pero en los países mediterráneos, la leche de cabras y ovejas es preferentemente utilizada para la manufactura de queso (Johnson y Law, 1999).

La clasificación de los quesos incluye una indicación del proceso usado para la manufactura. Además del contenido de humedad, el tipo de maduración también es empleado para su clasificación.

De acuerdo al contenido de humedad se pueden clasificar en: quesos duros (20-45% de humedad), semi duros/semi suaves (45-55% de humedad), y quesos suaves (>55% de humedad). Estos tres tipos de queso son consumidos después de un periodo de maduración en contraste con los quesos frescos (>70% de humedad), el cual es consumido después del drenado.

En cuanto al tipo de maduración, los quesos se clasifican en: no madurados, madurados internamente por bacterias, madurados internamente por hongos, madurados externamente por hongos y madurados externa e internamente por hongos (Heller y col., 2003).

II.3.2.1 Proceso tecnológico

Las operaciones que se aplican para la obtención del queso son principalmente la acidificación y deshidratación de la leche. Existen tres factores que condicionan la elaboración de un queso, su calidad y sus características finales: la leche, la fermentación de la misma y la tecnología empleada en la elaboración (Chamorro y Lozada, 2002).

II.3.2.1.1 Preparación de la leche

La leche es una mezcla de proteínas, grasa, carbohidratos, sales y agua, en equilibrio dinámico. Sus compuestos se encuentran en suspensión coloidal, emulsión o solución. La composición de la leche depende de varios factores como tipo y raza de animal, su alimentación, medio ambiente, hora de ordeño, época del año y periodo de lactancia. El contenido de grasa, proteína y minerales (calcio y fósforo) afecta la calidad del queso y su rendimiento.

Es importante aplicar en la leche una serie de pruebas y procedimientos para acondicionarla y asegurar la calidad del producto final por obtener. La leche es sometida a un tratamiento térmico o pasteurización para la destrucción de los patógenos y de los microorganismos no deseados. Muchas veces en esta etapa se realiza la estandarización de la leche con respecto a la proporción de grasa/caseína (López y col., 2002).

II.3.2.1.2 Inoculación de cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores se añaden a la leche para que se produzca la acidificación gracias a la producción de ácido láctico. Los microorganismos que se añaden son seleccionados de acuerdo con las características que se quiera conferir al queso.

En los quesos frescos se puede o no utilizar cultivos iniciadores. Los cultivos apropiados son bacterias lácticas homofermentativas mesófilas. Actúan como protectores del queso, al impedir el desarrollo de bacterias no deseables por competencia y por crear un medio inadecuado para éstas; promueven la acción del cuajo y la sinéresis (Chamorro y Lozada, 2002).

II.3.2.1.3 Coagulación

La coagulación de la caseína es el proceso fundamental de la fabricación del queso. Puede ocurrir por dos vías: la láctica y la enzimática.

La coagulación láctica se logra por acidificación a causa del ácido láctico producido por bacterias, disminuyendo el pH hasta que se desestabilizan las micelas, se vuelven insolubles y precipitan (pH 4.6). Este método es usado preferiblemente para quesos blandos (Bylund, 2003).

La coagulación enzimática, usada de preferencia para quesos duros, consiste en la adición de cuajo para lograr la coagulación de las caseínas. La actividad enzimática del cuajo provoca que la leche coagule y pase a formar un gel irreversible (cuajada). El principio activo del cuajo es la quimosina (Bedolla y col., 2004).

II.3.2.1.4 Corte de la cuajada y desuerado

Se le da un tratamiento a la cuajada para separarla del suero, ya sea por filtración o decantación. Para acelerar y controlar el escurrimiento es necesario implementar tratamientos térmicos y mecánicos; es decir aumento de temperatura y corte (Bedolla y col., 2004).

Una vez transcurrido el tiempo de cuajado se realiza el corte. Se rompe la cuajada en granos con un tamaño que depende del tipo de queso. Para queso fresco se debe cortar en tamaño de 1 a 2 cm., en lo posible de forma homogénea. El corte ayuda a expulsar suero por aumento de la superficie. Mientras más fino, menor contenido de humedad, más intenso el desuerado y más duro el tipo de queso (Bylund, 2003)

II.3.2.1.5 Salado

El salado es un procedimiento que se aplica en todo tipo de quesos. Se sala para potenciar el sabor, darle cuerpo al producto e inhibir el crecimiento de bacterias no deseables. Como resultado se tiene una mayor conservación del queso (López y col., 2002).

Se puede salar usando uno de los siguientes métodos: directamente en la leche, en la cuajada antes de moldado, inmersión en salmuera o por aplicación directa de la sal en la superficie del queso (Chamorro y Lozada, 2002).

II.3.2.1.6 Moldeo

La cuajada se coloca en moldes con perforaciones para obtener piezas de queso con formas determinadas, permitiendo que se drene el lactosuero que se encuentra entre los coágulos. Después de haber sido moldeada, la cuajada se somete a un prensado, ya sea mediante la aplicación de presión a los moldes o aprovechando el propio peso de la cuajada, para que los coágulos se unan y formen una masa continua. Con este proceso se determina la textura del queso y se le da la forma definitiva. Se recomienda comenzar con un prensado suave e ir aumentando progresivamente la intensidad (Bylund, 2003).

II.3.2.1.7 Empaque y almacenaje

Para almacenar los quesos se deben cubrir con una película plástica para prevenir una excesiva pérdida de agua y protegerlo de la contaminación microbiana.

En el almacenaje el pH tiende a subir por el consumo de ácido láctico y formación de compuestos alcalinos. Los quesos frescos deben almacenarse en refrigeración, entre 4 y 10°C, especialmente aquellos que contienen microorganismos vivos, para garantizar su supervivencia y la estabilidad del producto (López y col., 2002).

II.3.2.2 Queso como acarreador de microorganismos probióticos

La incorporación de los microorganismos probióticos en el queso parece ser una buena alternativa para mejorar la sobrevivencia de los mismos. El queso presenta una serie de ventajas con respecto a las leches fermentadas: el pH es mayor, la matriz es más compacta, lo que hace que exista una mayor exclusión de oxígeno, por tanto genera una atmósfera más anaerobia, mayor contenido de grasa y mayor capacidad amortiguadora. El contenido de grasa también ejerce una mayor protección de los microorganismos probióticos, al estar recubiertos por la grasa láctea, lo cual favorecerá la mayor resistencia y supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y tránsito intestinal (Bergamini y col., 2005).

Cuadro 1. Uso y estabilidad de bifidobacterias en quesos (Roy, 2005).

Probióticos	Tipo de Queso	Modo de Adición	Tiempo de Almacenamiento	Estabilidad durante Almacenamiento
<i>Bifidobacterium</i>	Cottage	Crecimiento de <i>B. infantis</i> en el aderezo	14 d	La viabilidad de <i>Bifidobacterium</i> disminuyó entre 0.5 y 3 log durante 14 d de almacenamiento a 4°C
	Crescenza	10 ⁶ ufc/ml de leche con <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> y <i>B. longum</i> incorporados individualmente o como mezclas de multiespecies y como células libres o como células inmovilizadas en gel de alginato de calcio	14 d	<i>B. bifidum</i> y <i>B. longum</i> se encontraron a 8.05 y 7.12 ufc/g respectivamente, los cuales fueron números similares encontrados a 1 d de maduración. <i>B. infantis</i> disminuyó gradualmente hasta un número final de células de 5.23 log ufc/g
	Cheddar	1. <i>B. bifidum</i> adicionado con la sal, cuajadas molidas	168 d	1. <i>B. bifidum</i> incrementó de 10 ⁶ a 10 ⁷ ufc/g de queso durante 24 semanas de almacenamiento
		2. 10 ⁸ ufc/ml de leche de un cultivo liofilizado de <i>B. lactis</i> o <i>B. longum</i> .	184 d	2. <i>B. lactis</i> sobrevivió en altos números (x10 ⁸ ufc/g de queso), mientras que los números de <i>B. longum</i> fueron reducidos a 10 ⁵ ufc/g de queso, siguiendo seis meses de maduración
		3. Enriquecimiento con crema fermentada por <i>B. infantis</i>	84 d	3. Pérdida de 0.5 log de <i>B. infantis</i> durante la primera semana, pero estable durante las siguientes 11 semanas
	Canestrato Pugliese	10 ⁷ ufc de células frescas por gramo de <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , o ambas especies	90 d	Las células de <i>B. bifidum</i> sobrevivieron en quesos en concentraciones de hasta 6 log ufc/g por al menos 90 d de maduración, <i>B. longum</i> mostró una supervivencia menor, alcanzando un valor de 5 log ufc/g a 56 d
	Queso fresco	10 ⁸ ufc/ml de leche de un cultivo liofilizado de <i>B. breve</i> o <i>B. longum</i>	57 d	Cuentas viables de Bifidobacterias disminuyeron entre 5 y 6 log después de 36 d de almacenamiento a 4 o 12°C
<i>Bifidobacterium</i> y <i>L. acidophilus</i>	Queso de Cabra Semiduro	Estárter de concentrados de <i>B. lactis</i> y <i>L. acidophilus</i> adicionados a diferentes niveles de inóculo	70 d	<i>B. Lactis</i> y <i>L. acidophilus</i> perdieron hasta 1 log durante 70 d de almacenamiento
	Gouda	<i>L. acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i> sp. como cultivo iniciador	70 d	<i>B. lactis</i> disminuye de uno a dos log a 10 ⁷ ufc/g y <i>L. acidophilus</i> disminuye en un logaritmo a 10 ⁷ ufc/g con 70 d de maduración
<i>Bifidobacterium</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>L. casei</i>	Queso Fresco Argentino	Cultivos congelados (inóculos de 1% p/p) de bifidobacterias (<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , y <i>Bifidobacterium</i> sp.), <i>L. acidophilus</i> y <i>L. casei</i>	60 d	Después de 60 d de almacenamiento, el descenso en el recuento de colonias fue menor a 1 log para bifidobacterias y nulo para <i>L. casei</i> . La menor viabilidad de <i>L. acidophilus</i> durante almacenamiento.

Se han empleado diferentes tipos de quesos como vehículos para probióticos, en especial aquellos de producción industrial: Cottage, queso crema, Cheddar, Minas fresco, Gouda, etc.

La mayor parte del trabajo en la producción de queso con adición de probióticos ha sido llevada a cabo con cultivos de bifidobacterias (Cuadro 1). Para el desarrollo de quesos probióticos se han utilizado principalmente cepas de las especies *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium lactis* (Roy, 2005; Hernández, 2006).

Los quesos del tipo fresco parecen ser ideales como acarreadores de bacterias probióticas, ya que no es necesario un periodo de maduración durante su elaboración.

Este tipo de queso presenta dos opciones para la adición de probióticos:

- Junto con el cultivo iniciador
- Junto con la sal.

Si se adiciona junto con el cultivo iniciador pueden presentarse dos problemas:

- El número de bacterias probióticas en el producto final puede ser difícil de controlar, ya que un número considerable de células bacterianas se pierden durante el drenado de suero.

- La sobrevivencia de bacterias probióticas en el producto se puede ver afectada negativamente por la alta temperatura de escaldado (arriba de 55°C), como es en el caso de algunos tipos de queso como el Emmenthal, el Gruyère, el Parmesano y el Grana.

Debido a ello, la adición de probióticos junto con la sal es una alternativa deseable. Esto tiene como ventajas que el número de probióticos añadidos puede ser controlado, los efectos negativos del escaldado se evitan y, después de la adición y

el homogeneizado, el producto puede enfriarse inmediatamente por debajo de 8°C (Heller y col., 2003).

II.4 Microencapsulación

La tecnología de encapsulación en el proceso de alimentos incluye el recubrimiento de partículas diminutas de ingredientes (acidulantes, grasas y sabores) que se puede lograr por técnicas de microencapsulación (Forsell, 2004). La microencapsulación puede ser definida como el proceso de atrapamiento/enclaustramiento de materiales sólidos, líquidos y gaseosos con materiales que los recubran, en un modo que resulte en una liberación apropiada de sus contenidos a tasas controladas bajo la influencia de condiciones específicas, como en el medio intestinal (Sultana y col., 2000; Mortazavian y col., 2007).

II.5 Microencapsulación de probióticos

La microencapsulación de microorganismos se define como el proceso de atrapar y rodear células, cubriéndolas con los hidrocoloides apropiados con el fin de segregar las células del ambiente que las rodea para reducir el daño o pérdida de la viabilidad celular, de forma que resulte en la liberación de las células en el medio intestinal en el mejor estado fisiológico posible (Sultana y col., 2000; Krasaekoopt y col., 2003).

La microencapsulación de las células probióticas ha demostrado que las protege de factores ambientales perjudiciales tales como la alta acidez y bajo pH, sales biliares, choques de frío, oxígeno molecular, choques térmicos, bacteriófagos y agentes químicos antimicrobianos.

II.5.1 Materiales encapsulantes para probióticos

Entre los materiales más utilizados para la encapsulación de probióticos se encuentran los siguientes:

- Alginato y sus combinaciones. Las cápsulas de alginato tienen algunas ventajas: Fácilmente forman matrices de gel alrededor de las células bacterianas, son seguras, baratas y pueden ser fácilmente preparadas. Algunas de sus desventajas: Son susceptibles a ambientes ácidos, presenta dificultad para escalas industriales. De entre las mezclas destacan alginato con almidón y alginato-glicerol.

- Mezclas de xantana-gelana. Esta mezcla es resistente a condiciones ácidas. Por otro lado, a pesar de que la goma gelana puede generar cápsulas para la microencapsulación, no se utiliza por sí sola para este propósito por la alta temperatura a la que forma el gel (80 - 90°C durante 1 h), lo cual resulta en el daño a las células probióticas.

- Gelatina. La goma de gelatina ha sido usada para la microencapsulación de probióticos, sola o en mezclas con otras gomas. Es un polipéptido de alto peso molecular derivado del colágeno, el cual se hincha cuando se coloca en agua fría, pero al calentarse, esta forma se disuelve y se forma un gel al enfriarse. El mecanismo de gelatinización es el de reversión al azar de la hélice cuando se enfría. Esta propiedad de formar un gel es la razón por la cual se utiliza en la industria de los alimentos.

- Ftalato acetato de celulosa. Por su naturaleza segura para propósitos de ingestión humana, es usada ampliamente para la encapsulación de medicamentos en farmacia.

- Quitosano. Ha sido usado para recubrir cápsulas de gelatina. Debido a que su eficiencia en incrementar la viabilidad de las células probióticas no es satisfactoria, es usada frecuentemente como recubrimiento, pero no como cápsula.

- Proteínas de suero. El aislado de proteína de suero, que es uno de los productos secundarios de la producción del queso, puede ser un sistema efectivo de pared para las microcápsulas que contienen grasa anhidra de leche, proveyendo de una barrera efectiva contra la oxidación.

- Almidón. El almidón de maíz alto en amilosa puede ser aplicado para mejorar las funciones de la cápsula o para la formación de recubrimientos, sin embargo, se descompone después de ser sujeta a enzimas pancreáticas. El almidón resistente no es degradado por la amilasa pancreática y entra al intestino

en su forma indigerible, además de que tiene función de fibra dietaria. Los materiales basados en almidones son de bajo costo, de grado alimenticio y de fácil procesamiento. Una buena alternativa para mejorar su desempeño en microencapsulación es utilizarlos en combinación con proteínas y lípidos.

II.5.2 Aplicaciones y ventajas de la encapsulación de probióticos

Entre las aplicaciones y ventajas que presenta la encapsulación de probióticos se encuentran las siguientes:

- Producción de cultivos iniciadores. La microencapsulación puede ser usada eficientemente para la preparación de cultivos iniciadores bacterianos con alta viabilidad, incluso después de procesos de congelación.

- Viabilidad de probióticos en el tracto gastrointestinal. Varios reportes confirman que la microencapsulación incrementa eficientemente la viabilidad a través de las condiciones ácido-enzimático-biliar del tracto gastrointestinal.

- Aplicación en fermentadores. Incrementa la tolerancia de los microorganismos contra factores tales como infección por bacteriófagos, agentes químicos venenosos, protege las células de microorganismos contra cambios indeseables tales como mutaciones genéticas, alcanzan una buena productividad en producción de metabolitos especialmente con altas tasas de agitación y producen biomasas más densas.

- Producción de productos alimenticios. Incrementa la viabilidad de los probióticos en los productos hasta el momento de su consumo.

- Viabilidad de los probióticos. La microencapsulación puede mejorar notablemente la viabilidad de los microorganismos probióticos debido a sus efectos protectores contra factores ambientales perjudiciales. Incrementar la viabilidad de los probióticos permitirá incrementar la vida de anaquel de los productos.

- Nuevos métodos en producción de alimentos. La encapsulación específica de células probióticas puede causar tasas deseables de actividad metabólica celular.

- Inmovilización de células probióticas. La inmovilización de células probióticas puede realizarse usando el proceso de encapsulación para hacer una dispersión homogénea de las células a través del producto. Esto es importante especialmente en productos de polifase y viscosos como la mayonesa.

- Corrección y mejora de las propiedades sensoriales de los productos probióticos. En general, la acidez de los productos fermentados (tales como el yogurt) producida por cultivos encapsulados es más suave que la producida por cultivos no encapsulados.

II.5.3 Factores que afectan la encapsulación de probióticos

Diferentes parámetros pueden ser considerados para evaluar la efectividad del proceso de encapsulación tales como el mantenimiento de la viabilidad después de someterse a condiciones ambientales perjudiciales, la liberación de las células y la habilidad para recuperarse. Varios factores pueden influenciar los parámetros mencionados, entre los que destacan los siguientes: (Mortazavian y col., 2007)

- Características de las cápsulas con respecto a su entorno. La fuga de los iones de calcio de las capsulas de alginato permite su descomposición, por lo que las cápsulas de alginato deben evitar ambientes que contengan una alta acidez y agentes quelantes.

- Recubrimiento de las cápsulas. El recubrimiento de las cápsulas es una manera eficiente de mejorar sus características fisicoquímicas. Por ejemplo, el recubrimiento de las cápsulas de alginato las hace resistentes a los agentes quelantes de iones de calcio.

- Concentración de la solución encapsulante y el diámetro de las cápsulas. Al incrementar el diámetro de las cápsulas, sus efectos protectores contra los factores ambientales drásticos se incrementa. En el caso de las soluciones de alginato, al elevar su concentración de 0.75% a 1.8%, se tienen notables efectos en la viabilidad de *L. acidophilus* bajo condiciones gástricas simuladas.

- Condiciones ambientales. El tipo y la severidad de los factores ambientales perjudiciales son algunos de los parámetros más importantes que reducen la

efectividad de las cápsulas. Por ejemplo, las cápsulas toleran ambientes de baja acidez, como del yogurt, mucho más que en condiciones ácidas severas como las de los jugos gástricos.

- Modificación de los materiales de las cápsulas. La modificación estructural de los materiales de las cápsulas puede hacerse mediante cambios estructurales directos y/o por adición de aditivos especiales. Adicionar glicerol como agente crioprotector le confiere a las cápsulas la habilidad de proteger las células contra la congelación.

II.5.4 Métodos de encapsulación de probióticos

Actualmente existen varios métodos para encapsular microorganismos, como son el método de extrusión, de emulsión y de coacervación que proveen a las células de buena protección, sin embargo, la mayor aplicación de estos métodos ha sido a nivel de laboratorio, ya que presentan dificultades para su escalamiento a nivel industrial, especialmente costos elevados de producción. El secado por aspersión es un método de microencapsulación con posibilidades de escalamiento a bajo costo, sin embargo tiene limitantes importantes pues los microorganismos se ven afectados por el propio proceso de encapsulación, debido a las condiciones agresivas a que se exponen durante el secado por aspersión (Sultana y col., 2000; Gouin, 2004).

II.5.4.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión, es el método más utilizado para la microencapsulación en la industria de los alimentos, es económico y flexible, y produce productos de buena calidad. Este proceso puede ser operado en una base continua, es de fácil escalamiento y de bajo costo, sin embargo, el proceso involucra factores como altas temperaturas, deshidratación y fuerzas de corte que al aplicarse simultáneamente originan pérdidas en la viabilidad de las bacterias probióticas (Mortazavian y col., 2007).

El proceso involucra la dispersión del material a encapsular en una solución de polímeros, formando una emulsión o dispersión seguida de la homogenización de la mezcla y su atomización en una cámara de secado con aire caliente. La interacción de la gota pequeña del líquido con el aire caliente resulta en un rápido calentamiento y transferencia de masa y genera un producto en forma de polvo fino, es decir, se evapora el solvente (agua) y se forman las microcápsulas. Finalmente el polvo cae al fondo de la cabina y es separado del aire en el ciclón. La vida de anaquel de un producto secado por aspersion se extiende debido a la remoción de agua o humedad. Todos los procesos de secado por aspersion en la industria de los alimentos se llevan a cabo en formulaciones acuosas de alimentación, por lo que el material encapsulante debe de ser soluble en agua a un nivel aceptable y de viscosidad limitada (Goudin, 2004).

Varios estudios han demostrado que la encapsulación por secado por aspersion es efectiva en la protección de las células encapsuladas tanto en las condiciones del proceso, como el ambiente en que se almacenan y su paso a través del tracto gastrointestinal (Sultana y col., 2000; Talwalkar y Kailasapathy, 2003; Picot y Lacroix, 2004; Champagne y Gardner, 2005; Mortazavian y col., 2007).

Para la elección de la cepa probiótica a encapsular se deben de considerar varios aspectos, como son la facilidad de su producción a nivel industrial, costo, efecto biológico deseado, competencia entre cultivos lácticos, así como su adaptación al proceso al que será sometida (Champagne y Gardner, 2005) como la tolerancia a altos niveles de cizallamiento y condiciones de deshidratación y calor en el caso del secado por aspersion (Picot y Lacroix, 2004). Se ha observado que las bifidobacterias tienen una tendencia mayor a resistir las condiciones del proceso de secado por aspersion, así como una mayor tolerancia de sus células encapsuladas a las condiciones ácidas del estómago (Fávaro-Trindade y Grosso, 2002; Picot y Lacroix, 2004).

III. HIPÓTESIS

La sobrevivencia de *Bifidobacterium breve* se preservará en mayor número en su forma encapsulada en comparación con su forma libre, después de su incorporación y almacenamiento en queso Panela a 4°C y al ser sometida a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

- Estudiar la sobrevivencia de *Bifidobacterium breve* durante el proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión con biopolímeros naturales, así como su sobrevivencia tanto de su forma libre como encapsulada durante su almacenamiento en queso Panela y durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

IV.2 Específicos

- Microencapsular mediante secado por aspersión células viables de *B. breve* utilizando dos sistemas de materiales encapsulantes: por un lado una mezcla de almidón alto en amilosa fosfatado por el método convencional (90%) y concentrado de proteína de suero (10%), y por otro lado concentrado de proteína de suero usado individualmente como material de referencia.
- Determinar la tasa de sobrevivencia de *B. breve* después del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión en los dos materiales de pared a emplear.
- Adicionar en queso Panela las cápsulas de materiales propuestos utilizando como control microorganismos sin encapsular.
- Evaluar periódicamente la sobrevivencia de *B. breve* encapsulado y en su forma libre en queso Panela durante un período de almacenamiento de 4 semanas a 4°C.
- Exponer las bacterias, encapsuladas y en su forma libre adicionadas a queso Panela a los 14 días de almacenamiento a condiciones gastrointestinales simuladas y evaluar su tasa de sobrevivencia.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Materiales biológicos

Para el desarrollo del estudio se trabajó con una cepa de colección ATCC 15700 de *B. breve*.

V.1.2 Materias primas

Se utilizó almidón alto en amilosa fosfatado químicamente con trimetafosfato de sodio (STMP) (ver Anexo 1) y concentrado de proteína de suero como materias primas para las cápsulas.

Para la elaboración del queso panela se utilizó leche cruda proveniente de un establo local.

V.1.3 Materiales químicos

Cisteína, fosfato monobásico y dibásico de sodio (Sigma Chemical Co.).

V.1.4 Antibióticos

Vancomicina de marca comercial.

V.2 Métodos

V.2.1 Modificación y caracterización de los materiales

V.2.1.1 Fosfatación por método convencional

La fosfatación del almidón alto en amilosa se llevó a cabo en una suspensión de almidón de acuerdo al método propuesto por Paschall (1964) con algunas modificaciones. A una suspensión de almidón (56 g/100 ml de agua destilada) se le adicionó 2.5 g de sal de trimetafosfato de sodio (STMP) por cada 100 g de almidón

en base seca, y se ajustó a pH 8 utilizando una solución de NaOH al 5%. La suspensión se agitó por 1 h a temperatura ambiente, se colocó hasta sequedad a 45°C en una estufa (Binder 115-UL) y posteriormente se colocó en la estufa a 130°C durante 2 h. Las muestras se molieron en un triturador de alimentos. El polvo se cribó en una malla de apertura de 100 µm y se almacenó a temperatura ambiente en una bolsa de polietileno cerrada para su posterior caracterización. La cantidad de STMP utilizada se eligió en base a los resultados obtenidos por Lim y Seib (1993).

V.2.1.2 Determinación del grado de sustitución de los materiales modificados

El contenido de fósforo de los materiales modificados y sin modificar se determinó siguiendo el método descrito por Smith y Caruso (1964). Se realizaron 3 repeticiones para cada análisis y se reportó el valor promedio.

El grado de sustitución se calculó con la ecuación:

$$GS = 162P/(3100-124P).$$

El porcentaje de fósforo se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ fósforo} = (P \times \text{volumen de dilución} \times 100)/(\text{volumen de la alícuota} \times \text{peso en g de la muestra} \times 1000).$$

Donde P = contenido de fósforo (mg/100 ml) en el almidón fosfatado.

$$\text{Grado de sustitución} = (162 \times \% \text{ fósforo})/(3100 - 124 \times \% \text{ fósforo}).$$

V.2.1.3 Determinación del índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) del almidón fosfatado

Ambos índices se determinaron a los materiales fosfatados y sin fosfatar siguiendo el método descrito por Anderson y col. (1969) con algunas modificaciones. Para cada muestra, se pesaron 0.25 g en tubo de ensaye y se adicionaron 3 ml de agua

destilada. Los tubos se mantuvieron a 30°C y en agitación constante por 30 min. Enseguida, se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decantó en un crisol de aluminio, puesto previamente a peso constante, y se evaporó en una estufa a 105°C durante 2 h y el peso del residuo en el crisol se registró como residuo de evaporación. Por otra parte, el peso del pellet que quedó en el tubo de ensaye se registró como residuo de centrifugación.

Los índices de absorción de agua (IAA) y de solubilidad en agua (ISA) se calcularon de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$\text{ISA} = (\text{Peso del residuo de evaporación} \times 100) / (\text{Peso seco de la muestra})$$

$$\text{IAA} = (\text{Peso del residuo de centrifugación}) / (\text{Peso de la muestra} - \text{Peso del residuo de evaporación})$$

V.2.2 Caracterización de *Bifidobacterium breve*

V.2.2.1 Activación de la cepa

El cultivo liofilizado de *Bifidobacterium breve* se activó mediante una transferencia en 3 ml de caldo MRS suplementado con 0.05% (p/v) L-cisteína-HCl (MRS-c) bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 h.

V.2.2.2 Conteo de microorganismos

Como técnica para contar las unidades formadoras de colonia (UFC) de *B. breve* se utilizó el método de siembra de extensión por superficie. Se llevaron a cabo diluciones decimales de las muestras en una solución de peptona al 1%. Se colocaron con una micropipeta 100 µl del medio con las células a contar sobre una caja petri con agar MRS-c, el líquido de las células se extendió sobre el agar hasta sequedad utilizando una varilla en forma de "L". El agar se preparó de acuerdo a lo especificado por el proveedor y se vació en cajas petri estériles. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C durante 48 h en jarras anaeróbicas utilizando sobres generadores de dióxido de carbono (BD GasPak*EZ Anaerobe Container

System, USA). Transcurrido el tiempo de incubación se contaron y registraron las UFC de cada caja.

V.2.2.2.1 Conteo de *B. breve* en queso Panela

Para contar las células de *B. breve* viables en queso Panela se utilizó la técnica ya descrita (ver V.2.2.2) con la diferencia de que el agar MRS-c se adicionó de 5 mg/L de vancomicina (MRS-cv), después de la esterilización, cuando el medio alcanzó una temperatura aproximada de 40°C. Las diluciones de las muestras de queso Panela se realizaron en una solución amortiguadora de fosfatos. La solución amortiguadora de fosfatos se preparó con 33 ml de solución 0.2 M de fosfato monobásico de sodio y 67 ml de solución 0.2 M de fosfato dibásico de sodio.

V.2.2.3 Preparación de la cepa para su microencapsulación

La cepa probiótica activada (ver V.2.2.1) se inoculó en 100 ml de caldo MRS-c y se incubó a 37°C durante 18 h para obtener aproximadamente 10^9 UFC/ml en fase logarítmica tardía. Las bacterias se recuperaron del medio mediante centrifugación a 4500 rpm por 15 min y se lavaron dos veces en solución salina estéril al 0.085% bajo las mismas condiciones de centrifugación. Después de los lavados se desechó la solución salina y se conservó el pellet de bacterias para ser utilizado en el proceso de microencapsulación.

V.2.3 Microencapsulación de células de *B. breve* y caracterización fisicoquímica de las cápsulas obtenidas por secado por aspersión

V.2.3.1 Preparación de materiales matriz

Se prepararon suspensiones acuosas con un contenido de sólidos de 10% de los siguientes materiales encapsulantes: concentrado de proteína de suero (CPS) y una mezcla de 90% de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional y 10% CPS (90AAM10CPS). Las soluciones se homogenizaron durante 5 min en un homogenizador a velocidad media; el pH se ajustó a 7 con una solución de

NaOH al 2%, se calentaron a baño maría durante 10 min a 80°C. Las suspensiones se enfriaron a temperatura ambiente antes de agregar las bacterias. En cada suspensión del material matriz se dispersaron aproximadamente 10^9 UFC/ml de células de *Bifidobacterium breve* previamente lavadas y centrifugadas (ver V.2.2.3). Antes de la microencapsulación por secado por aspersión se tomó una muestra de 1 ml para determinar la concentración de bacterias (ver V.2.2.2) antes del proceso de secado.

V.2.3.2 Microencapsulación de *B. breve* por secado por aspersión

El proceso de microencapsulación se llevó a cabo en un secador por aspersión de laboratorio marca Büchi, Modelo 191. Las condiciones de operación del secador fueron las siguientes: temperatura de aire de entrada 160°C, capacidad de bomba de alimentación 45% y capacidad de bomba de aspiración 95%. Las cápsulas se recuperaron del vaso colector del producto del secador con una espátula estéril y se almacenaron en frascos de vidrio estériles cerrados herméticamente y en refrigeración a 4°C para estudios posteriores. Antes de secar cada muestra, las piezas del secador por aspersión se lavaron y desinfectaron con alcohol al 70%, y se dejó que el alcohol se evaporara por completo antes de montar el equipo.

V.2.3.3 Determinación de la viabilidad de *B. breve* después del proceso de secado por aspersión

Se suspendieron por triplicado 0.5 g de cápsulas de cada material en tubos con 4.5 ml de diluyente de peptona al 0.1%. Las suspensiones se agitaron en un vortex (Thermolyne, tipo 37600 Mixer, USA) a velocidad máxima durante 1 min, y se sembraron (ver V.2.2.2) para determinar la viabilidad de *B. breve* antes y después del secado por aspersión.

V.2.3.4 Determinación del contenido de humedad en las microcápsulas

El contenido de humedad de las microcápsulas se determinó gravimétricamente mediante secado en estufa con circulación forzada a 105°C durante 2 h.

V.2.4 Desarrollo de queso panela adicionado de probióticos

V.2.4.1 Elaboración de queso Panela con adición de *Bifidobacterium breve*

Se preparó el queso Panela a partir de leche cruda de bovino que se filtró sobre una manta de cielo y se depositó en una tina de acero inoxidable con chaqueta alimentada con vapor. La leche se pasteurizó a 65°C por 30 minutos con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, la leche se dejó enfriar a 35°C, una vez a dicha temperatura la leche se inoculó con una cepa comercial de cultivo láctico iniciador de adición directa (Lyofast, SACCO, Italia) al 0.05%, posteriormente se le agregó cloruro de calcio al 50% (40 ml para 100 litros de leche), el cual fue diluido en 10 veces su volumen con agua destilada estéril, se mezcló cuidando que la temperatura se mantuviera a 35°C.

A continuación se agregaron 25 ml de cuajo por cada 100 L de leche, el cuajo fue disuelto en 10 veces su volumen en agua destilada estéril previo a su incorporación a la leche. Se mezcló perfectamente y se dejó reposar (aproximadamente 45 a 75 min) hasta que la prueba de la cuajada indicó que estaba lista para cortarse.

Se cortó la cuajada con liras horizontales y verticales, con el fin de obtener cubos de 1 cm³ para acelerar el desuerado del grano. Posteriormente se procedió a cocinar la cuajada a 40°C por 30 min. Se hizo un desuerado parcial (aproximadamente 2/3 partes del suero, o 50 a 60% del volumen de leche) y se agregó 0.85% de sal en relación a la cantidad de leche empleada y se agitó por 10 min.

A la cuajada cocinada y salada se le retiró el suero restante, se pesaron 100 g de la cuajada, y se le adicionó 1 g de microcápsulas de *B. breve* (ver V.2.3.2), en el caso de las células sin encapsular se adicionó el pellet de bacterias (ver V.2.2.3) que fue resuspendido en 3 ml de leche descremada en polvo reconstituida en agua destilada, con un contenido de sólidos de 10% (p/p) esterilizada a 115°C por 15 min. La cuajada y los probióticos se homogenizaron perfectamente con ayuda de

cucharas de aluminio estériles. Se realizaron muestras de queso Panela adicionadas de *B. breve* por triplicado, de acuerdo al material con el cual fue encapsulado el probiótico: CPS, 90AAM10CPS y células sin encapsular.

La pasta con los probióticos se moldeó en canastos limpios y hervidos con capacidad aproximada de 100 g, se dejaron desuerar los quesos apilando un canasto encima de otro durante 20 minutos, luego se voltearon los quesos en el mismo canasto y se dejaron desuerar 15 minutos más. Por último se empacaron los quesos en bolsas de polietileno con cierre tipo zip-lock y fueron refrigerados a 4 °C.

La viabilidad de las bifidobacterias se determinó por recuento en placa (ver V.2.2.2.1) y fue monitoreada al momento de empacar el queso (semana cero) y semanalmente durante cuatro semanas de su almacenamiento en refrigeración a 4°C.

V.2.4.2 Análisis proximal del queso Panela con probióticos

Las determinaciones de la composición del queso Panela con probióticos se realizaron al cabo de 24 h después de la producción (ver Anexo 2).

V.2.4.2.1 Humedad

Se determinó con el método de secado en horno a 105°C descrito en el método 926.08 de la AOAC (2000) mediante diferencia de pesos.

V.2.4.2.2 Grasa

Se determinó con el método de Gerber-Van Gulik descrito en la Norma Mexicana NMX-F-100-1984 para la determinación de grasa butírica en quesos.

V.2.4.2.3 Proteína

Se determinó mediante el cálculo del contenido proteico basado en el método 920.123 de la AOAC (2000), que determina el contenido total de nitrógeno en la muestra mediante el método Kjeldahl.

V.2.4.2.4 Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales se determinó por cálculo de la diferencia de 100 % y la suma de los porcentajes de humedad, grasa y proteína.

V.2.5 Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

A los 14 días (muestras de sección V.2.4.1) de almacenamiento, se evaluó *in vitro* la sobrevivencia de las células encapsuladas y en su forma libre adicionadas al queso Panela, en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, de acuerdo a lo reportado por Charteris y col. (1998) y Blazenka y col. (2000) con algunas modificaciones.

Para la exposición de las muestras a condiciones gástricas simuladas se adicionaron 3 ml de saliva artificial y 24 ml de jugo gástrico simulado a 3 g de la muestra de queso Panela con probióticos, se homogenizaron las muestras manualmente por 1 minuto y fueron colocadas a 37°C durante 2 h. Se monitoreó la cuenta viable (ver V.2.2.2.1) recién colocados la saliva y el jugo gástrico simulado y a las 2 horas de residencia en estas soluciones. A continuación fueron expuestas las muestras a condiciones intestinales simuladas. Para ello se tomaron 25 ml de las suspensiones y se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y sobre la pastilla se adicionó 1 ml del sobrenadante recién decantado más 27 ml de jugo intestinal simulado, las muestras se colocaron a 37°C durante 4 horas. La cuenta viable de estas suspensiones se determinó recién agregado el jugo intestinal simulado, a las 2 h y a las 4 h de residencia.

La saliva artificial se preparó diluyendo 6.2 g de cloruro de sodio, 2.2 g de cloruro de potasio, 0.22 g de cloruro de calcio y 1.2 g de bicarbonato de sodio en 1 L de agua destilada. La mezcla se esterilizó a 121°C durante 15 min. Los jugos gástrico e intestinal simulados se prepararon el día del experimento. Para el jugo gástrico simulado se resuspendieron 3 g de pepsina en 1 L de solución salina estéril al 0.5% acidificada a pH 2 con ácido clorhídrico 0.1 M. El jugo intestinal simulado se

preparó con 1 g de pancreatina y 1.5 g de sales biliares en 1 L de solución salina al 0.5% estéril, el pH se ajustó a 8 con solución de NaOH 0.1 M.

V.2.6 Análisis de datos experimentales

Los tratamientos fueron aleatorizados y fueron analizados por triplicado para su aplicación. La viabilidad de los microorganismos encapsulados fue la variable respuesta durante el trabajo experimental. Hubo dos fases experimentales:

1. Comparación de materiales encapsulantes. En este caso el diseño estadístico que se utilizó para la microencapsulación fue de un factor de 2 niveles (CPS, 90AAM10CPS).
2. Para la evaluación de la viabilidad durante el almacenamiento a 4°C y la tolerancia a dos condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (pH 2.0 y pH 8.0 a 37°C) se empleó un diseño de un factor de tres niveles, los dos ya mencionados para la microencapsulación en el punto 1, más el correspondiente a las bifidobacterias sin cápsula.

Los datos experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza y se compararon las medias entre sí utilizando una prueba de Tukey. Todos los análisis se realizaron con el programa JMP versión 5.0.1.

VI. RESULTADOS

VI.1 Microencapsulación de *Bifidobacterium breve* con concentrado de proteína de suero (CPS) y una mezcla de 90% de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional y 10% de concentrado de proteína de suero (90AAM10CPS) y determinación de la viabilidad del probiótico después del proceso de secado por aspersión

En la Figura 1 se muestra el efecto del proceso del secado por aspersión sobre la viabilidad de *B. breve* en función del material matriz con el que se encapsuló. Se observa que la viabilidad de *B. breve* fue mayor en las cápsulas de CPS que en las cápsulas de 90AAM10CPS una vez terminado el proceso de encapsulación por secado por aspersión.

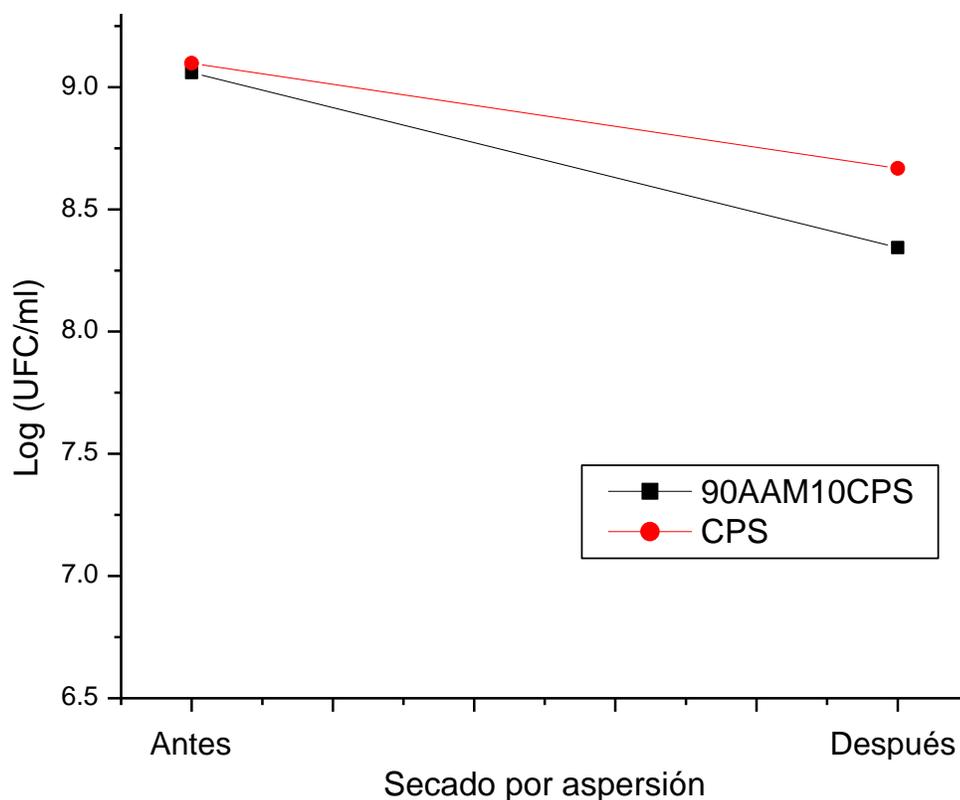


Figura 1. Viabilidad de *B. breve* en la suspensión acuosa de los materiales matriz (antes del secado por aspersión) y una vez encapsulado (después del secado por aspersión).

La viabilidad de *B. breve* en la suspensión acuosa de CPS inició con 9.1 ciclos logarítmicos y en la suspensión acuosa de 90AAM10CPS fue de 9.06 ciclos logarítmicos. Una vez sometidas las suspensiones al proceso de secado por aspersión, la viabilidad que presentó *B. breve* encapsulado fue de 8.7 y 8.3 ciclos logarítmicos para las cápsulas de CPS y 90AAM10CPS respectivamente.

Cuadro 2. Disminución de la viabilidad de *B. breve* durante su encapsulación por secado por aspersión en los materiales matriz.

Material encapsulante	Disminución promedio de la viabilidad de <i>B. breve</i> Log (UFC/ml)	Error estándar
CPS	0.43019	0.14719
90AAM10CPS	0.71561	0.02456

En el Cuadro 2 se muestra la disminución de la viabilidad total de *B. breve* por cada material encapsulante. De acuerdo a lo observado las bacterias de *B. breve* encapsuladas con CPS presentaron la menor disminución de su viabilidad total. Sin embargo no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la disminución de la viabilidad de las cápsulas de 90AAM10CPS respecto a las cápsulas de CPS.

VI.2 Evaluación de la sobrevivencia de *B. breve* encapsulado y en su forma libre en queso Panela a 4°C

En la Figura 2 se muestra el crecimiento de *B. breve*, encapsulado en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela, durante su almacenamiento a 4°C en un período de cuatro semanas.

Se observa que en los dos materiales matriz y en las células sin cápsula, se presentó la misma tendencia de *B. breve* de incrementar su viabilidad durante las primeras dos semanas, manteniéndose sin cambio significativo los recuentos entre la semana tres y cuatro de almacenamiento. En la semana cero el queso Panela

adicionado de *B. breve* mostró conteos iniciales de 7.3, 6.8 y 8.6 ciclos logarítmicos para los materiales matriz CPS, 90AAM10CPS y sin cápsula respectivamente. Al cabo de cuatro semanas de almacenamiento a 4°C los conteos de *B. breve* fueron de 8.6, 8.9 y 9.2 ciclos logarítmicos para los materiales matriz CPS, 90AAM10CPS y sin cápsula respectivamente.

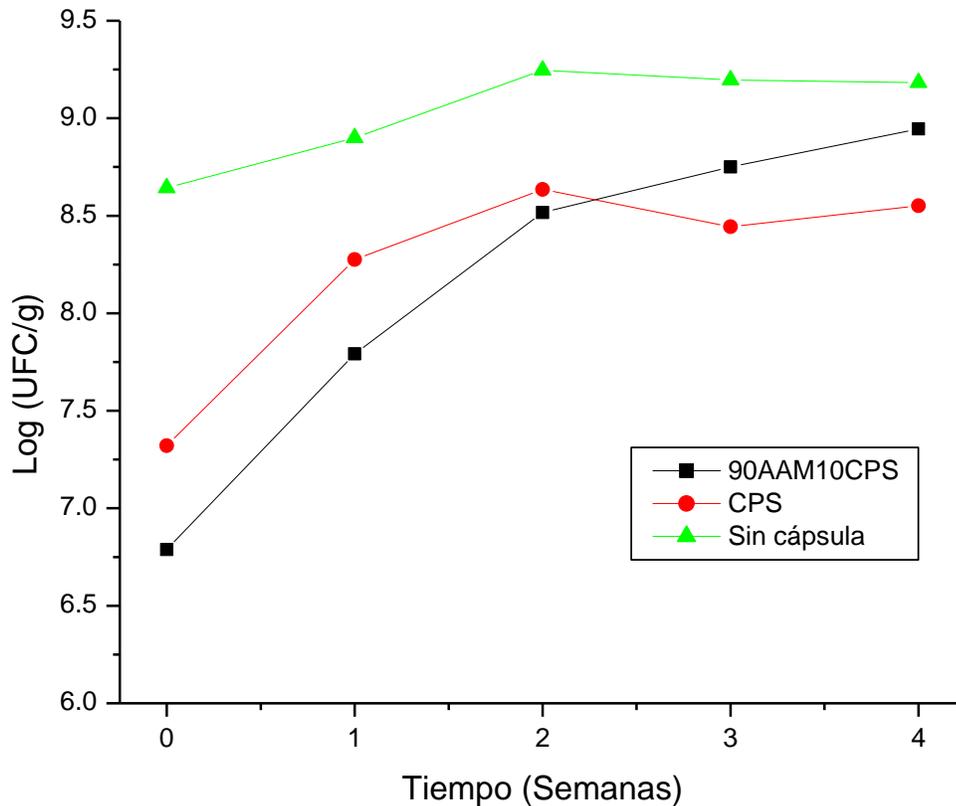


Figura 2. Sobrevivencia de *B. breve* encapsulado en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela durante su almacenamiento a 4°C.

A pesar de que los conteos iniciales de los tres tratamientos fueron diferentes se observó un crecimiento significativo en las muestras de queso adicionadas de las células encapsuladas en ambos materiales de pared, siendo más pronunciado el crecimiento en la muestra 90AAM10CPS en el que se redujo la diferencia en ciclos logarítmicos de 1.8 a 0.6 con respecto a la muestra con células sin encapsular y de 0.5 a 0.3 UFC/g con respecto a la muestra de células encapsuladas con CPS, en los recuentos del tiempo 0 y 4 semanas respectivamente.

VI.3 Evaluación de la sobrevivencia de *B. breve* encapsulado y en su forma libre adicionado a queso Panela, durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

En la Figura 3 se muestra el cambio de la sobrevivencia de *B. breve*, encapsulado en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela, durante su exposición a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (pH 2.0 y pH 8.0 a 37°C) a los 14 días de almacenamiento a 4°C.

Durante la exposición a las condiciones gástricas simuladas, no se apreció una disminución significativa en la sobrevivencia de *B. breve* tanto encapsulado en CPS, 90AAM10CPS y sin cápsula, al cabo de dos horas de residencia en la solución gástrica.

Las células sin encapsular mostraron la mayor sensibilidad al cambio de pH del medio gástrico e intestinal (2.0 y 8.0 respectivamente) registrándose una disminución de la viabilidad de más de un ciclo logarítmico con el cambio de medio.

Cuadro 3. Disminución de la viabilidad de *B. breve*, encapsulada en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela, durante su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.

Material encapsulante	Disminución promedio de la viabilidad de <i>B. breve</i> Log (UFC/g)	Error estándar
CPS	0.16866	0.16874
90AAM10CPS	0.38207	0.01731
Sin cápsula	1.39278	0.03402

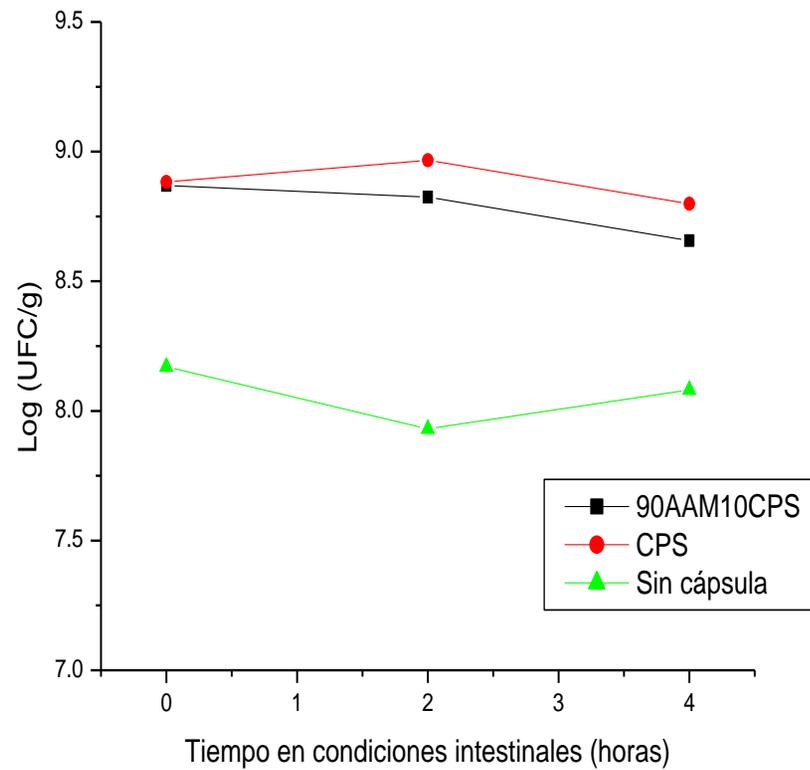
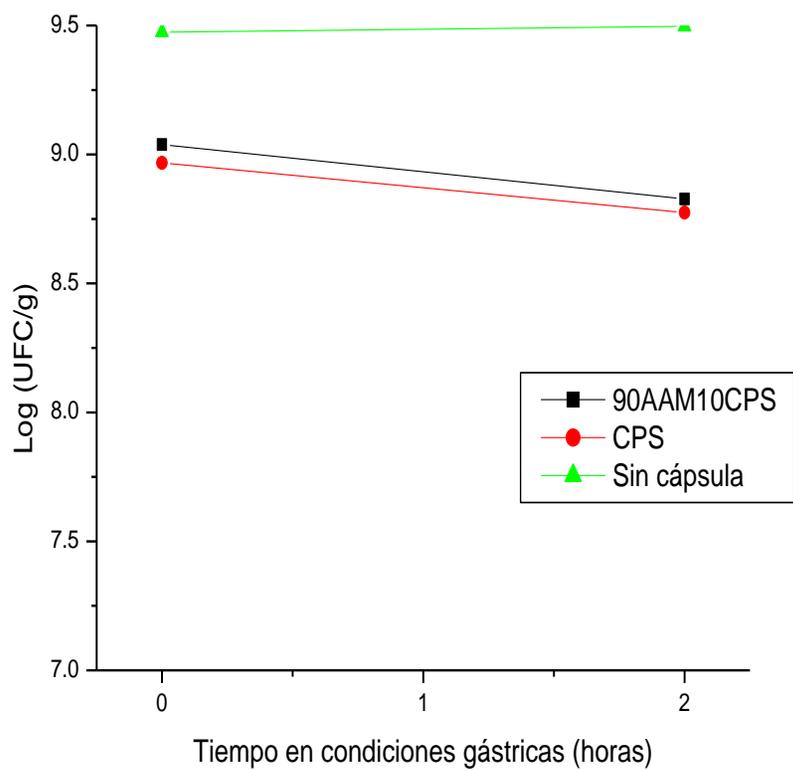


Figura 3. Sobrevivencia de *B. breve* encapsulado en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela durante su exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas.

De manera similar se observó que las muestras de queso con *B. breve* sin encapsular presentaron la mayor disminución de viabilidad al cabo de cuatro horas de residencia en la solución intestinal, mientras que no se apreció una disminución tan notable en las muestras de queso Panela con las cápsulas de CPS y 90AAM10CPS.

En el Cuadro 3 se muestra la disminución de la viabilidad total de *B. breve* en cada tratamiento. De acuerdo a lo observado las bacterias de *B. breve* encapsuladas con CPS y 90AAM10CPS presentaron la menor disminución de su viabilidad total, no existiendo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la disminución de la viabilidad de las cápsulas de 90AAM10CPS respecto a las cápsulas de CPS. La mayor disminución en viabilidad total de *B. breve* se observó en las bacterias sin cápsula, donde su pérdida de viabilidad al término de su exposición a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal fue de 1.4 ciclos logarítmicos.

VII. DISCUSIÓN

VII.1 Microencapsulación de *Bifidobacterium breve* con concentrado de proteína de suero (CPS) y una mezcla de 90% de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional y 10% de concentrado de proteína de suero (90AAM10CPS) y determinación de la viabilidad del probiótico después del proceso de secado por aspersión

En la Figura 1 se observa que los materiales matriz CPS y 90AAM10CPS, mostraron una tendencia similar en la protección de *B. breve* durante el proceso de secado por aspersión. Es importante mencionar que las cápsulas de *B. breve* en CPS fueron de difícil manejo en el secador por aspersión (y en su empleo posterior para incorporarse a queso Panela), pues las cápsulas tendían a quedarse adheridas en el interior del equipo, por lo que la recuperación del producto seco al final del proceso fue mucho menor en relación con las que se recuperaron de 90AAM10CPS.

El resultado obtenido de la preservación de la viabilidad de *B. breve* coincide con lo reportado por Castro (2010), quien observó una disminución de entre 0.3 y 0.6 ciclos logarítmicos en la viabilidad de *B. breve* (ATCC 15700) durante su encapsulación en concentrado de proteína de suero así como en mezclas con almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional y por extrusión, por medio de secado por aspersión. Dicho resultado puede atribuirse a una alta tolerancia de *B. breve* al calor, además de la protección brindada por los materiales encapsulantes (Castro, 2010).

En el Cuadro 2 se muestra la disminución de la viabilidad total de *B. breve* por cada material encapsulante, y como puede observarse, el material que confirió menor disminución de la viabilidad fue CPS. Sin embargo es importante destacar que no existe diferencia significativa entre la disminución de la viabilidad de las cápsulas de 90AAM10CPS respecto a las cápsulas de CPS. Con lo anterior podemos decir que la combinación de un pequeño porcentaje de CPS (10%) con almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional, brinda una protección a las células de

B. breve durante el proceso de secado muy similar a la protección brindada por CPS por sí solo. El CPS representa el material de referencia en este estudio, ya que ha sido probado para la protección de bacterias probióticas durante su almacenamiento en yogurt y exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (Picot y Lacroix, 2004; Castro, 2010).

Para poder realizar la comparación de la viabilidad de *B. breve* antes y después del proceso de secado por aspersión (Figura 1) fue necesario hacer un ajuste en las unidades de los microorganismos viables en las cápsulas, siguiendo el ajuste de unidades de peso (g) por unidades de volumen (ml) descrito por Castro (2010).

VII.2 Evaluación de la sobrevivencia de *B. breve* encapsulado y en su forma libre en queso Panela a 4°C

En la Figura 2 se muestra el cambio de la sobrevivencia de *B. breve*, encapsulado en CPS, 90AAM10CPS y sin encapsular, adicionado a queso Panela, durante su almacenamiento a 4°C en un período de cuatro semanas. Se puede observar un aumento en el número de células de *B. breve* con respecto a su número inicial desde la semana cero hasta la semana cuatro para los tres tratamientos. Aunque no se mostró disminución en la viabilidad de *B. breve* durante el almacenamiento en queso panela a 4°C, la sobrevivencia de la cepa ATCC 15700 de *B. breve*, utilizada en este estudio fue mayor en los materiales encapsulantes utilizados que la reportada por Castro (2010), quien obtuvo una disminución de entre 0.5 y 1.4 ciclos logarítmicos de *B. breve* encapsulado en materiales modificados por método convencional y en su forma libre al cabo de 28 días de almacenamiento en yogurt a 4°C. Esta diferencia en la sobrevivencia de *B. breve* puede atribuirse a las características de la matriz en la cual se almacenó (yogurt y queso), las bifidobacterias requieren ambientes anaeróbicos y pH neutro para sobrevivir y mantener sus números por arriba de 10^6 UFC/g, pero no todos los alimentos pueden proveer ambientes óptimos para el crecimiento de las bifidobacterias, el queso, sin embargo, provee un ambiente que puede conducir a prolongar la

sobrevivencia de estas bacterias (valores de pH más elevados, mayor contenido de grasa y una consistencia más sólida) (Boylston y col., 2004).

VII.3 Evaluación de la sobrevivencia de *B. breve* encapsulado y en su forma libre adicionado a queso Panela, durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Al exponer las muestras de queso Panela almacenadas por 14 días, con *B. breve* encapsulado y en su forma libre a condiciones simuladas gástricas (pH 2) no hubo diferencias significativas en la disminución de la viabilidad de las bacterias encapsuladas o libres al cabo de dos horas de exposición. Este mismo resultado fue obtenido por Castro (2010), quien lo atribuyó a que las bacterias de *B. breve* estaban ya adaptadas a un pH ácido al ser el pH del yogurt de 4.5. Sin embargo, en este estudio las bacterias se encontraban adaptadas a un pH más neutro (pH de 6.1 correspondiente al queso Panela). Chávarri y col. (2010) reportaron que la sobrevivencia de *B. bifidum* fue de 8.9 ciclos logarítmicos (partiendo de una población inicial de 9.38 ciclos logarítmicos) en microesferas de alginato después de 120 min de exposición a jugo gástrico simulado, mientras que las células de *B. bifidum* libres tuvieron una disminución dramática de más de 9 ciclos logarítmicos al cabo de una hora de residencia en el jugo gástrico simulado. Chávarri y col. (2010) realizaron su estudio utilizando *B. bifidum* encapsulado y en su forma libre, sin incorporarlo a ningún alimento vehículo, por lo que con nuestros resultados podemos atribuir un efecto protector no sólo por la conferida por la cápsula sino también por parte del alimento vehículo en el cual se adicionan las bacterias, con lo que aún las bacterias sin cápsula pueden mantener una viabilidad considerable durante las condiciones gástricas simuladas, además de las características de resistencia propias de la cepa de *B. breve* utilizada.

Durante la exposición a condiciones intestinales simuladas (pH 8) se observó una disminución significativa de la viabilidad de las bacterias sin encapsular, mientras que las bacterias encapsuladas con CPS y 90AAM10CPS no mostraron diferencia significativa con respecto a la disminución de la viabilidad total durante su

exposición a las condiciones gastrointestinales simuladas (Figura 3). Estos resultados se contraponen con lo reportado por Castro (2010), quien reporta una disminución de la viabilidad de *B. breve* de 1.4, 1.8 y 4.3 ciclos logarítmicos en muestras de yogurt adicionado de *B. breve* encapsulado en matrices de CPS, de una mezcla de almidón modificado por método convencional con CPS y con células sin encapsular respectivamente, durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, mientras que en este estudio la viabilidad de *B. breve* encapsulado en CPS y 90AAM10CPS disminuyó en menos de 0.5 unidades logarítmicas, y las células sin capsulas alcanzaron una reducción de 1.4 ciclos logarítmicos, lo cual puede atribuirse a la diferente protección brindada a las células tanto encapsuladas como no encapsuladas por los dos diferentes vehículos lácteos utilizados (Cuadro 3).

Los resultados de la sobrevivencia de *B. breve* en su forma libre adicionado a queso Panela de este trabajo, coinciden con el resultado obtenido por Mäkeläinen y col (2009), quienes obtuvieron una reducción de poco menos de 2 ciclos logarítmicos de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* contenidos en muestras de un queso Gouda semi-suave después de haberse sometido a una simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal. Ha sido reportado que el queso debido a su alta capacidad amortiguante y el contenido lipídico de la matriz puede proveer protección a los probióticos durante su paso a través del tránsito gastrointestinal (Kailasapathy y Chin, 2000; Vinderola y col., 2000). Esta situación fue corroborada al comparar la sobrevivencia de la cepa de *B. breve* utilizada cuando fue almacenada en yogurt y en queso Panela, registrándose una mayor sobrevivencia del microorganismo en el queso Panela.

VIII. CONCLUSIONES

El material de pared utilizado para la microencapsulación de la cepa ATCC 15700 de *B. breve* mediante secado por aspersión consistente en una mezcla de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional (90%) y concentrado de proteína de suero (10%), brindó una protección muy similar al microorganismo comparada a la conferida por el concentrado de proteína de suero usado individualmente como material microencapsulante de referencia.

El queso Panela mostró ser un buen vehículo para la incorporación de *B. breve* encapsulado y en su forma libre, permitiendo una sobrevivencia de la cepa en números suficientes ($>10^6$ UFC por gramo de queso) durante su almacenamiento a 4°C y durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

La sobrevivencia de *B. breve* se preservó en mayor número en su forma encapsulada en comparación con su forma libre, durante su almacenamiento en queso Panela a 4°C y al ser sometida a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

IX. BIBLIOGRAFÍA

ADA. 2009. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J Am Diet Assoc.* 109: 1278-1285.

Alexander, P., Bahret, M., Chavez, J., Courts, G., D'Alessio, N. 1992. *Biología.* Prentice Hall, New Jersey, Estados Unidos. 510,511.

Anderson, R., Conway, H., Pfeifer, V. y Griffin, E. 1969. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today.* 14: 10-12.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Décimo cuarta edición. Association of Official Analytical Chemists. Inc. Washington, D.C. E.U.A.

Ballongue, J. 2004. Bifidobacteria and Probiotic Action. Capítulo 2. En *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Fuctional Aspects.* S. Salminen, A. von Wright y A. Ouwehand, ed. Marcel Dekker, Inc., Neva York.

Bedolla, S., Dueñas, C., Esquivel, I., Favela, T., Guerrero, R., Mendoza, E., Navarrete, A., Olgún, L., Ortiz, J., Pacheco, O., Quiroz, M., Ramírez, A., Trujillo, M. 2004. Introducción a la tecnología de alimentos. Segunda edición, Editorial Limusa, México, D.F., México. 34-37.

Bergamini, C., Hynes, E., Quiberoni, A., Suárez, V., Zalazar, C. 2005. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International.* 38: 597- 604.

Blazenka, K., Jagoda, S., Jadranka, G. y Srecko, M. 2000. Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology.* 38: 121-127.

Boylston, T., Vinderola, C., Ghoddusi, H., Reinheimer, J. 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal.* 14: 375-387.

Bylund, G. 2003. Manual de industrias lácteas. Mundi-Prensa, Madrid, España. 18, 30, 56.

Cabeza, E. 2006. Bacterias ácido lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”. Barranquilla, Colombia. 15,9: 1-12.

Castro, A. 2010. Efecto de la microencapsulación de *Bifidobacterium breve*, en matrices de almidón fosfatado y proteína de suero mediante secado por aspersión, sobre su viabilidad en yogurt y en condiciones gastrointestinales simuladas. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias y Tecnología de los Alimentos. 42-68.

Castro, L. y Rovetto, C. 2006. Probióticos: utilidad clínica. Colombia Médica. 37: 308.

Cervantes, F., Villegas, A., Cesín, A. y Espinoza, A. 2008. Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio que debe rescatarse. Mundi Prensa, México. 186.

Chamorro, C. y Lozada, M. 2002. El análisis sensorial de los quesos. AMV Ediciones, Madrid, España. 29-32.

Champagne, G. y Gardner, N. 2005. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 45: 61-84.

Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L., Collins, J. 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology. 84: 759-768.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. International Journal of Food Microbiology. 142: 185-189.

Dillon, J. y Berthier, A. 2000. Nutritional characteristics of cheese. Science to Quality Assurance, Eck, A. y Gillis, J. Ed. Lavoisier Publishing, Paris. 663.

Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E., Roberfroid, M. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe Consensus Document. British Journal of Nutrition. 81: S1-S27.

DMI. 2004. Dairy Management Inc. Dairy Foods and Probiotics: A Perfect Opportunity.

<http://www.innovatewithdairy.com/SiteCollectionDocuments/G3ToolsforInnovIss2Vol2.pdf>

EFIC. 2006. European Food Information Council. The basics: Alimentos funcionales.

<http://www.eufic.org/article/es/nutricion/alimentos-funcionales/expid/basics-alimentos-funcionales/>

Fávaro-Trindade, C. y Grosso, C. 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. Journal of Microencapsulation. 19: 485-494.

Figuroa, I., Gómez, L., García, M., Cruz, A. 2006. El beneficio de los Probióticos. Industria Alimentaria. 28: 22-27.

Goudin, S. 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in Food Science & Technology. 15: 330-347.

Heller, K., Bockelmann, W., Schrezenmeir, J. y DeVrese, M. 2003. Cheese and its potential as probiotic food. Handbook of Fermented Functional Food. Ed. E. R. Farnworth. Fla. E.U.A. 203.

Hernández, H. 2006. Productos lácteos funcionales. Carnilac. 21: 10.

Hui, Y. 2007. Handbook of Food Products Manufacturing. Wiley-Interscience, New Jersey, Estados Unidos. 438, 960-966, 986.

Iyer, C. y Kailasapathy, K. 2005. Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. *Journal of Food Science*. 70: M28-M23.

Johnson, M. y Law, B. 1999. The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. *Technology of Cheese Making*, Law, B. A. Ed. Sheffield Academic Press, Sheffield. 32.

Jones, P. y Jew, S. 2007. Functional food development: concept to reality. *Trends in Food Science & Technology*. 18: 387-390.

Kailasapathy, K. y Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology & Cell Biology*. 78: 80-88.

Khedkar, C., Mantri, J. Garge, R. Kulkarni, S. y Khedkar, G. 1993. Hypocholesterolemic effect of fermented milks: A review. *Cultured Dairy Products Journal*. 28: 14-18.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Review. *International Dairy Journal*. 13: 3-13.

Lim, S. y Seib, P. 1993. Preparation and Pasting Properties of Wheat and Corn Starch Phosphates. *Cereal Chemistry*. 70: 137-144.

López, A., García, M., Quintero, R. 2002. *Biología Alimentaria*. Editorial Limusa, México, México. 165, 176.

Mäkeläinen, H., Forssten, S., Olli, K., Granlund, L., Rautonen, N., Ouwehand, A. 2009. Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*. 19: 675-683.

Mortazavian, A., Hadi, R., Ehsani, M., Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran Journal of Biotechnology*. 5: 1-18.

Motohiro, S., Yasunobu, M., Masatsugu, Y. y Shuji, A. 2006. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. Food Hydrocolloid. 20: 1164-1169.

NMX-F-100-1984. Alimentos. Lácteos. Determinación de grasa butírica en quesos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

NOM-121-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

Paschall, E. 1964. Phosphatation with inorganic phosphate salts. En Methods of Carbohydrate Chemistry. Vol. 4, R.L. Whistler (Ed.). Academic Press, New York. 294.

Picot, A. y Lacroix, C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions in yogurt. International Dairy Journal. 14: 505-515.

Roberfroid, M. 2000. Defining functional foods. Capítulo 1. En Functional foods concept to product. G.R. Gibson y C. M. Williams, ed. Woodhead Publishing Limited, Inglaterra.

Roy, D. 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. Le Lait. 85: 39-56.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M., Cummnings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M., Roberfroid, M., Rowland, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition. 80: 147.

Sanz, Y., Collado, M., Dalmau, J. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta Pediátrica Española. 61: 476.

SIAP. 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Marzo 22 de 2011.

Simpson, P., Stanton, C., Fitzgerald, G. y Ross, R. **2005**. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 493-501.

Smith, R. y Caruso, J. **1964**. Determination of phosphorus. En *Methods of Carbohydrate Chemistry*. Vol. 4, R.L. Whistler (Ed.). Academic Press, New York. 42

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K. **2000**. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 47-55.

Talwalkar, A. y Kailasapathy, K. **2003**. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*. 58: 36-39.

Tannock, G., Munro, K., Harmsen, H., Welling, G., Smart, J., Gopal, P. **2000**. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2578-2588.

Taranto, M., Médici, M., Font, G. **2005**. Alimentos funcionales probióticos. *Química Viva*. 4: 26.

Trejo, E. 23 de Julio de **2009**. Los derivados lácteos en México. *El Economista*.

Victoria, J. **2004**. Alimentos funcionales. Prebióticos, probióticos y otros. Aplicación actual en pediatría. <http://www.avpap.org/documentos/donostia2004/alimentosfuncionales.doc>

Vinderola, C., Prosello, W., Ghiberto, T., Reinheimer, J. **2000**. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 83: 1905-1911.

X. ANEXOS

Anexo 1. Caracterización del almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional

Las muestras de almidón fosfatado por método convencional fueron caracterizadas con respecto al porcentaje de fósforo y grado de sustitución. La cantidad máxima de fósforo permitida en alimentos para almidones modificados es de 0.4% equivalente a un grado de sustitución de 0.02.

Por otro lado se determinaron el índice de solubilidad (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) de los almidones preparados. (ver.V.2.1.2 y V.2.1.3). Para cada determinación se realizaron tres repeticiones de las cuales se reporta el valor promedio (Cuadro A1).

Cuadro A1. Caracterización del almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional.

Porcentaje de fósforo (%)	Grado de sustitución	Índice de solubilidad en agua (ISA)	Índice de absorción de agua (IAA)
0.295	0.015	2.41	1.06

Anexo 2. Análisis proximal del queso Panela con probióticos

Se llevaron a cabo las determinaciones de humedad, grasa, proteína y carbohidratos totales de acuerdo a lo reportado en la metodología (ver V.2.4.2.1, V.2.4.2.2, V.2.4.2.3 y V.2.4.2.4). Las determinaciones de la composición del queso Panela con probióticos se realizaron al cabo de 24 h después de la producción. Para cada determinación se realizaron dos repeticiones y se reporta el valor promedio (Cuadro A2). La composición del queso panela con probióticos cumplió con lo especificado en la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994.

Cuadro A2. Análisis proximal del queso Panela con probióticos.

Componente	Porcentaje (%)
Agua	52.14
Carbohidratos	2.8
Proteínas	18.06
Lípidos	27