



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

EFFECTO 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

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en

Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

LNCA. Ana Laura Castro Becerra

Querétaro, Qro., México

Agosto de 2010



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

EFFECTO 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

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.N.C.A. Ana Laura Castro Becerra

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

SINODALES

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Presidente

Dra. Beneranda Murúa Pagola

Secretario

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

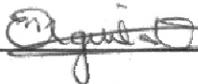
Vocal

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Suplente

Dr. Eduardo Castaño Tostado

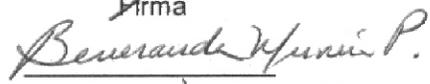
Suplente


Nombre y Firma.

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz

Director de la Facultad


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Nombre y Firma.

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval

Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario

Querétaro, Qro. México

Agosto de 2010

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sobrevivencia de *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) durante su microencapsulación en matrices poliméricas de almidón alto en amilosa (A), de concentrado de proteína de suero (CPS) y sus mezclas, mediante el método de secado por aspersión; la sobrevivencia del microorganismo a lo largo de su almacenamiento en yogurt en su forma encapsulada y su forma libre durante 28 días a 4°C; así como la sobrevivencia en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después de 2 y 4 semanas de almacenamiento. Los materiales encapsulantes basados en almidón fueron fosfatados por extrusión (ext), adicionados con diferentes proporciones de CPS y por el método convencional (conv) en suspensión. Los materiales encapsulantes fueron caracterizados mediante la determinación del grado de sustitución e índices de solubilidad y absorción de agua (ISA e IAA). La viabilidad de *B. breve* fue determinada en agar MRS adicionado de cisteína y vancomicina (MRS-cv). Los materiales modificados por extrusión presentaron un mayor grado de sustitución que los modificados por el método convencional. Los materiales extrudidos mostraron valores de ISA (9-12%) más altos que el almidón fosfatado por el método convencional (3.7%). El contenido de humedad de las cápsulas preparadas con los polímeros individuales y sus mezclas osciló entre 3 y 6%. La viabilidad *B. breve* durante el secado por aspersión se preservó de manera similar con todos los materiales probados, con excepción del Aext y Aconv cuyas muestras presentaron un menor número de células viables después del secado. Durante el proceso de fermentación del yogurt el número inicial de células adicionadas de *B. breve* tanto para bacterias encapsuladas como no encapsuladas se incrementó. Las bacterias encapsuladas en los diferentes materiales poliméricos y sus mezclas mostraron una mayor sobrevivencia durante el almacenamiento que las bacterias no encapsuladas. Un comportamiento similar se observó al exponer las células almacenadas en yogurt a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Los resultados mostraron que los materiales preparados por extrusión y por método convencional brindaron una protección muy similar a las células a la ofrecida por el material control, a diferencia del comportamiento en la viabilidad de bacterias no encapsuladas.

(Palabras clave: microencapsulación, probióticos, *B. breve*)

SUMMARY

The aim of the present work was to study the survival of *Bifidobacterium breve* through its microencapsulation process by spray drying, in polymeric matrices made of high amylose starch (A), whey protein concentrate (CPS) and blends of both. The survival of the encapsulated microorganism was also evaluated during their 28 day-storage at 4°C in yoghurt followed by their exposure to simulated gastrointestinal conditions after 2 or 4 weeks of storage. Wall materials based on starch were phosphorylated by means of extrusion (ext), mixed with different ratios of CPS and by the conventional method (conv), in a slurry using sodium trimetaphosphate as the phosphorylating reagent. Chemically modified materials were characterized by determining their degree of substitution and their water solubility and absorption index (ISA and IAA). *B. breve* survival was determined in MRS agar with cysteine and vancomycin added (MRS-cv). Moisture content of the microcapsules was determined using a gravimetric method and their morphology using scanning electron microscopy and confocal microscopy. Materials esterified by the extrusion method showed a greater substitution degree compared to the ones modified by conventional means. Extruded materials showed ISA values (9-12%) higher than the ones phosphorylated by the conventional method (3.7%). Moisture content of all the capsules was between 3 and 6%. Viable counts of *B. breve* during their spray-drying were preserved in a similar way with all the materials tested. During the fermentation process of the milk the initial count of cells was increased for free and encapsulated cells. Encapsulated bacteria showed greater survival throughout their storage time in yoghurt than free cells and a similar trend was observed after their expose to simulated gastrointestinal conditions. Results indicated that the materials prepared by extrusion and the conventional method protected the cells to a similar extent as the CPS, while the greatest decrease in the viable count of the cells was observed for the free bacteria.

(Keywords: microencapsulation, probiotics, *B. breve*)

INDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY	ii
INDICE	iii
INDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Alimentos funcionales</i>	3
2.2 <i>Probióticos</i>	4
2.2.1 Bacterias probióticas	5
2.2.1.1 Lactobacilos	5
2.2.1.2 Bifidobacterias	6
2.2.1.2.1 <i>Bifidobacterium breve (B. breve)</i>	6
2.3 <i>Lácteos y probióticos</i>	7
2.4 <i>Microencapsulación</i>	8
2.5 <i>Microencapsulación de probióticos</i>	10
2.5.1 Materiales encapsulantes para probióticos	11
2.5.1.1 Alginato y sus combinaciones	11
2.5.1.2 Mezclas de xantana-gelana	12
2.5.1.3 Carragenina y mezclas	12
2.5.1.4 Acetato ftalato de celulosa	13
2.5.1.5 Quitosano	13
2.5.1.6 Proteínas de suero.....	13
2.5.1.7 Almidón alto en amilosa fosfatado como material novedoso para la encapsulación de probióticos	14
2.5.2 Métodos de encapsulación de probióticos	17
2.5.2.1 Método de emulsión.....	18
2.5.2.2 Método de extrusión.....	19
2.5.2.3 Coacervación	19
2.5.2.4 Secado por aspersion	20
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVO GENERAL	25

5.1	<i>Objetivos específicos</i>	25
6.	Estrategia experimental	27
7.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	28
7.1	<i>Modificación y caracterización de los materiales</i>	28
7.1.1	<i>Fosfatación por extrusión</i>	28
7.1.2	<i>Fosfatación por método convencional</i>	29
7.1.3	<i>Determinación del grado de sustitución de los materiales modificados</i>	29
7.1.4	<i>Determinación del Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) de los almidones fosfatados</i>	30
7.2	<i>Caracterización de Bifidobacterium breve</i>	31
7.3	<i>Microencapsulación de células de B. breve y caracterización fisicoquímica de las cápsulas obtenidas por secado por aspersion</i>	34
7.3.3	<i>Determinación de la viabilidad de B. breve después del proceso de secado por aspersion</i>	35
7.3.4	<i>Determinación del contenido de humedad en las microcápsulas</i>	36
7.4	<i>Incorporación de Bifidobacterias en yogurt</i>	36
7.4.2	<i>Incorporación en yogurt de B. breve encapsulado en matrices modificadas por método convencional</i>	37
7.4.3	<i>Incorporación en yogurt de B. breve encapsulado en matrices modificadas por método convencional y por extrusión.</i>	38
7.5	<i>Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal</i>	39
7.6	<i>Microscopía de las cápsulas</i>	40
7.7	<i>Diseño y Análisis estadístico</i>	40
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
8.1	<i>Modificación y caracterización de los materiales</i>	42
8.2	<i>Caracterización de Bifidobacterium breve</i>	44
8.3	<i>Microencapsulación de células de B. breve y caracterización fisicoquímica de las cápsulas obtenidas por secado por aspersion</i>	48
9.	CONCLUSIONES	74
10.	LITERATURA CITADA	77
11.	APÉNDICES	83

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Producción de vitaminas por <i>Bifidobacterium breve</i>	7
2	Ingredientes alimenticios que han sido encapsulados	9
3	Materiales matriz utilizados para la microencapsulación de <i>B. breve</i>	35
4	Disminución de la viabilidad de <i>B. breve</i> durante su encapsulación por secado por aspersión en materiales modificados por método convencional y por extrusión.	50
5	pH de la leche después de 5.4 horas de fermentación en presencia de cultivo láctico iniciador comercial y del cultivo láctico iniciador más microorganismos probióticos (Antes1 y Antes 2) en el proceso de preparación de yogurt.	54
6	Disminución de la viabilidad de <i>B. breve</i> , encapsulado en matrices de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional, CPS y una mezcla de ambos, durante su almacenamiento en yogurt por 4 semanas a 4°C	58
7	Disminución de la viabilidad de células de <i>B. breve</i> , encapsuladas en materiales modificados por método convencional, CPS y sin encapsular, durante su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas	61
8	Disminución de la viabilidad de células de <i>B. breve</i> , encapsuladas en materiales modificados por método convencional, CPS y sin encapsular, desde el inicio de su almacenamiento en yogurt hasta el final de su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.	62
9	Disminución de la viabilidad de células de <i>B. breve</i> , encapsuladas en materiales modificados por método convencional, por extrusión, en CPS y sin encapsular, durante su almacenamiento en yogurt	66
10	Disminución de la viabilidad de <i>B. breve</i> , encapsuladas en materiales modificados por método convencional, por extrusión, en CPS y sin encapsular, durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal	67
11	Ejemplo del cálculo para la conversión de unidades de peso en unidades de volumen de las cápsulas obtenidas por secado por aspersión	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Porcentaje de fósforo y grado de sustitución de los materiales matriz modificados por método convencional y por extrusión	43
2	Índices de solubilidad y absorción en agua (ISA e IAA) de los materiales fosfatados por método convencional o por extrusión	45
3	Curva de crecimiento de <i>B. breve</i> realizada manualmente. Activación de la cepa a 37°C durante 24 horas e inóculo inicial de 5 µl en 100mL de agar MRS-c	46
4	Curvas de crecimiento de <i>B. breve</i> obtenidas en Bioscreen	47
5	Viabilidad de <i>B. breve</i> en la solución de materiales modificados por método convencional y por extrusión con STMP (antes del secado por aspersión) y una vez encapsulado (después del secado)	49
6	Porcentaje de células de <i>B. breve</i> estresadas, en un nivel detectable por una concentración de 2% NaCl adicionado al medio de cultivo, durante el proceso de secado por aspersión en diferentes materiales matriz	51
7	Porcentaje de humedad de las cápsulas obtenidas por medio de secado por aspersión con los diferentes materiales matriz	52
8	Tendencia del rendimiento del material encapsulante en cuanto a la cantidad de cápsulas obtenidas después del secado por aspersión de la solución matriz.	53
9	Viabilidad de <i>B. breve</i> encapsulado en 90 Aext, adicionado a la leche antes o después de la fermentación en el proceso de la elaboración del yogurt y almacenado durante 2 semanas	55
10	Exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de <i>B. breve</i> encapsulado, adicionado a la leche antes o después de su fermentación durante el proceso de elaboración del yogurt y almacenado durante 2 semanas	56
11	Cambio en el número de células de <i>B. breve</i> tanto encapsulado en materiales modificados por método convencional y CPS como en el de <i>B. breve</i> no encapsulado durante la fermentación de la leche (42°C / 6 h) en el proceso de elaboración del yogurt	57

12	Cambio en la viabilidad de <i>B. breve</i> encapsulado en materiales modificados por método convencional y concentrado de proteína de suero, durante su almacenamiento en yogurt durante 4 semanas a 4°C.	59
13	Cambio en la viabilidad de <i>B. breve</i> encapsulado en concentrado de proteína de suero, almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional, una mezcla de éste con CPS (10%) y de bacterias libres, durante su exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas	61
14	Porcentaje de células de <i>B. breve</i> que resultaron estresadas durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, detectado por la adición de 2% de NaCl en su medio de cultivo	63
15	Viabilidad de <i>B. breve</i> encapsulado en materiales modificados convencionalmente o por extrusión durante la fermentación de la leche en el proceso de elaboración del yogurt. El asterisco indica diferencia para el material marcado entre antes y después de la fermentación	65
16	Viabilidad en yogurt de <i>B. breve</i> , encapsulado en materiales modificados por método convencional o por extrusión, almacenado en yogurt durante 4 semanas	65
17	Viabilidad de <i>B. breve</i> encapsulado en materiales modificados por método convencional y por extrusión, en CPS y sin encapsular durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.	67
18	Imágenes SEM de las cápsulas de 90% almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional más 10% concentrado de proteína de suero (90Aconv)	69
19	Imágenes SEM de las cápsulas de 90% almidón alto en amilosa fosfatado por extrusión más 10% concentrado de proteína de suero (90Aext)	70
20	Imágenes SEM de las cápsulas de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional (Aconv)	70
21	Imágenes SEM de las cápsulas de almidón alto en amilosa fosfatado por extrusión (Aext)	71
22	Imágenes SEM de las cápsulas de concentrado de proteína de suero (CPS)	71
23	Imágenes en microscopio confocal de cápsulas de <i>B. breve</i> en CPS	73
24	Imágenes en microscopio confocal de cápsulas de <i>B. breve</i> en 90 Aconv	73
25	Imágenes en microscopio confocal de cápsulas de <i>B. breve</i> en 90 Aext.	74

26	Curva de calibración con fosfato monobásico de potasio para la determinación de fósforo de los materiales matriz	84
27	Curva de calibración del crecimiento de <i>B. breve</i> obtenida en el Bioscreen	86

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son productos alimenticios convencionales o modificados que se considera que proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica. El término “alimentos funcionales” cubre un muy amplio rango de productos, ejemplos típicos incluyen alimentos de consumo diario que se fortifican con nutrimentos, como es el caso de cereales para desayuno a los que se les adiciona ácido fólico y yogurts que contienen probióticos (Williamson, 2009). El mercado de probióticos es uno de los sectores de más rápido crecimiento actualmente (Jones y Jew, 2007).

Los probióticos son microorganismos que se utilizan para suplementar diversos alimentos y así crear alimentos funcionales (Pimentel-González *et al.*, 2009). 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 (Krasaekoopt, 2003; Iyer y Kailasapathy, 2005). Para cambiar significativamente el ambiente del intestino, la Federación Internacional de Lácteos recomienda que las bacterias probióticas se encuentren en el producto por lo menos en un número de 10^7 ufc / g (Sultana *et al.*, 2000; Mortazavian *et al.*, 2007). Sin embargo, en algunos países se ha aceptado un número de al menos 10^6 microorganismos vivos por g ó mL de producto al momento del consumo (Krasaekoopt *et al.*, 2003). Además, se ha sugerido una ingestión diaria de alrededor de 10^8 y 10^9 células viables (Anal y Harjinder, 2007). El número varía en función de la cepa y el efecto en la salud deseado (Champagne y Gardner, 2005).

El yogurt y productos relacionados han sido utilizados como el vehículo más popular para la incorporación de organismos probióticos (Sultana *et al.*, 2000). Sin embargo, la viabilidad de los microorganismos probióticos se ve afectada por las condiciones de fermentación como el pH, temperatura, composición del medio, entre otros factores (Pimentel-González *et al.*, 2009). Esta pérdida de 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 (Sultana *et al.*; 2000, Gouin, 2004). Actualmente se utilizan 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 diversas 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 agresivas condiciones a que se exponen durante el secado por aspersión (Sultana *et al.*, 2000; Gouin, 2004), además de que existe una limitada disponibilidad de materiales encapsulantes adecuados para microorganismos.

El objetivo general del presente trabajo fue desarrollar nuevos materiales encapsulantes, a partir de biopolímeros naturales, utilizando almidón alto en amilosa fosfatado por extrusión y el por método convencional, adicionado de bajas concentraciones de proteína de suero, para su uso como agente microencapsulante de probióticos mediante la técnica de secado por aspersión. Se evaluó el efecto del proceso de microencapsulación sobre la viabilidad de las bacterias encapsuladas después del proceso de secado en las diferentes matrices poliméricas, utilizando como control el concentrado de proteína de suero (CPS), así como la sobrevivencia de *B.breve* en su forma encapsulada y su forma libre durante su almacenamiento en un alimento vehículo (yogurt) por un período de 28 días a 4°C y durante su paso por condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después de dos y cuatro semanas de almacenamiento.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Alimentos funcionales

El término “alimentos funcionales” nació en Japón, en los años 1980’s cuando en este país se desarrollaron programas de investigación a gran escala para el análisis y desarrollo de las funciones de los alimentos. Como resultado, se estableció una categoría de alimentos con mayores beneficios potenciales como parte de un esfuerzo nacional para reducir los elevados costos de seguridad social, surgiendo así el concepto de alimentos para un uso específico en salud (FOSHU). En los años 1990’s, una variedad de términos relacionados con el término japonés FOSHU aparecieron por todo el mundo, entre ellos el de “alimentos funcionales”. En términos prácticos un alimento puede ser considerado como funcional si se demuestra satisfactoriamente que afecta benéficamente una o más funciones en el cuerpo, más allá de un adecuado efecto nutrimental, de forma que resulte relevante para mejorar el estado de salud y bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe de permanecer en forma de alimento y debe de demostrar sus efectos en cantidades que normalmente se espera 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). De acuerdo a la Asociación Americana de Dietistas (ADA) todos los alimentos son funcionales en algún nivel fisiológico pues proveen de nutrimentos y otras sustancias que suministran energía, mantienen o promueven el crecimiento, o mantienen y reparan procesos vitales. Sin embargo, de acuerdo a esta asociación, el término “alimentos funcionales” específicamente se utiliza para definir alimentos que pueden ser convencionales (como el ajo y las nueces) o modificados (como los alimentos fortificados, enriquecidos o adicionados) que proveen beneficios que van más allá de la nutrición básica como pueden ser reducir el riesgo de enfermedades y / o promover una salud óptima (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).

2.2 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que transitan el tracto gastrointestinal (Tannock *et al.*, 2000) y tienen un efecto benéfico en el huésped durante su tránsito, mejorando el balance microbiano intestinal (Krasaekoopt *et al.*, 2003). Después de ingerirlos en número suficiente, brindan beneficios a la salud más allá de la nutrición general inherente (Picot y Lacroix, 2004).

Los probióticos han atraído el interés entre los consumidores debido a sus beneficios potenciales sobre la salud, entre los que se incluyen:

- Control de 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. El efecto probiótico ha sido atribuido a la producción de ácido, de bacteriocinas, competencia con patógenos, así como el fortalecimiento del sistema inmune entre otros (Krasaekoopt, 2003).

- Mejor utilización de la lactosa en personas con intolerancia: Los cultivos normales de yogurt, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, producen β -galactosidasa en presencia de bilis. Se ha concluido que la mejoría en la digestión de la lactosa resulta de la producción

de esta enzima intestinal y no de la hidrólisis de la lactosa antes del consumo de la leche que contiene *L. acidophilus* (Krasaekoopt, 2003).

- 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).

- Control de niveles de colesterol sérico: Especialmente para cepas de *L. acidophilus*. Aunque existe dudosa evidencia científica para este uso (Khedkar *et al.*, 1993; MedlinePlus, 2008).

- 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).

2.2.1 Bacterias probióticas

Las bacterias más comúnmente utilizadas para la producción de alimentos probióticos son especies de lactobacilos y más recientemente de bifidobacterias (Iyer y Kailasapathy, 2005) como son: *Lactobacillus acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve* y *B. infantice* (Mortazavian *et al.*, 2007). Lactobacilos y bifidobacterias residen en el intestino bajo y colon, respectivamente (Motohiro *et al.*, 2006).

2.2.1.1 Lactobacilos

Los lactobacilos constituyen un grupo de bacterias gram-positivas, no formadoras de esporas, catalasa negativas, que carecen de citocromos y son anaeróbicas, sin embargo son aerotolerantes, estrictamente fermentativas. Su principal producto final, resultado de la fermentación de carbohidratos es el ácido láctico. Las bacterias ácido lácticas están asociadas a alimentos ricos en nutrimentos como la leche, carne y vegetales, además de ser miembros de la flora normal de la boca, intestino y vagina en mamíferos (Axelsson, 2004).

2.2.1.2 Bifidobacterias

Las bifidobacterias son bacterias de formas bacilares, 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-fosfatasa deshidrogenasa, las bifidobacterias cuentan con la enzima glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa. La fermentación de dos moles de glucosa por bifidobacterias da como resultado tres moles de acetato y dos moles de lactato (Ballongue, 2004).

2.2.1.2.1 *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 crecimiento anaeróbico) (Simpson *et al.*, 2005). *B. breve*, como otras bacterias lácticas, produce algunas vitaminas durante la fermentación (*ver Cuadro 1*).

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).

Cuadro 1: Producción de vitaminas por *Bifidobacterium breve* (Ballongue, 2004)

Tiamina (B1)	Riboflavina (B2)	Piridoxina (B6)	Ác. fólico (B9)	Cobalamina (B12)	Ac. ascórbico (C)	Ác. Nicotínico (PP)	Biotina (H)
+	+	++	+	+	++	+++	++

2.3 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 en la natalidad, envejecimiento de la población, el cuidado de la salud y la nutrición por algunos sectores de la población, el aumento del ingreso *per cápita*, entre otros. En el 2007 el consumo *per cápita* de leche fue de 12 litros y 2 kilogramos de derivados lácteos como queso y yogurt, con una marcada tendencia a incrementarse en este último rubro, principalmente el del yogurt bebible (Trejo González, 2009). Según la Encuesta Industrial Mensual Ampliada (INEGI, 2009) el yogurt tuvo una producción de 7,315 toneladas con valor de \$128,547,000.00 lo cual representa un 2.3% más que lo equivalente al mismo mes del año 2008.

Dentro del mercado de lácteos, el mercado de probióticos es actualmente uno de los sectores de más rápido crecimiento (Jones y Jew, 2007). La industria de los lácteos ha encontrado en los cultivos probióticos una herramienta para el desarrollo de nuevos productos, de los cuales muchos son a base de yogurt. En los Estados Unidos, aproximadamente el 60% de los yogurts refrigerados contienen cultivos probióticos. Se ha visto que los productos lácteos (yogurt, yogurt congelado, leches fermentadas carbonatadas, helado y quesos) son buenos vehículos para el consumo de probióticos por humanos (Champagne y Gardner, 2005). A pesar de que existen otros vehículos para probióticos como los

productos a base de soya, los productos lácteos siguen siendo actualmente los más utilizados y apropiados (Champagne y Gardner, 2005).

Para ejercer un efecto terapéutico y nutricional en el consumidor, los microorganismos probióticos deben de permanecer metabólicamente estables y activos en el producto y sobrevivir el paso a través del tracto digestivo superior en número suficiente para estar en forma viable cuando se encuentren en el intestino del huésped (Sultana *et al.*, 2000). Sin embargo, 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 *et al.*, 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 (Picot y Lacroix, 2004), la temperatura de almacenaje, la concentración de la proteína de suero (Anal y Harjinder, 2007), así como el daño que pueden sufrir durante su procesamiento (Picot y Lacroix, 2004; Mortazavian *et al.*, 2007).

Ante la pérdida de viabilidad en alimentos y a través de su paso por el tracto gastrointestinal, se han buscado nuevas formas de proteger a las células. La microencapsulación es una de las técnicas más novedosas y efectivas para este fin (Sultana *et al.*, 2000; Gouin, 2004).

2.4 Microencapsulación

De manera general, la tecnología de encapsulación en el procesamiento 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 es una tecnología de empaquetamiento de materiales sólidos, líquidos y gaseosos en miniatura,

cápsulas selladas que pueden liberar sus contenidos a tasas controladas bajo la influencia de condiciones específicas (Sultana *et al.*, 2000).

Una microcápsula consiste de una membrana semipermeable, esférica, delgada, y fuerte que rodea un centro sólido/líquido (Sultana *et al.*, 2000), con un diámetro que va de 1 a 2000 μm , dependiendo de la tecnología aplicada (Forseell, 2004). Las microcápsulas pueden ser diseñadas para liberar gradualmente ingredientes activos y pueden ser abiertas por diversos medios, incluyendo fractura por calor, solvatación, difusión y presión. Una cubierta también puede ser diseñada para liberar el componente activo en áreas específicas del cuerpo (Anal y Harjinder, 2007). Existen varios ingredientes alimenticios que han sido encapsulados (*ver Cuadro 2*).

Cuadro 2. Ingredientes alimenticios que han sido encapsulados (Forseell, 2004)

Tipo de ingrediente
Agentes saborizantes como aceites, especias, sazoadores y edulcorantes
Ácidos, álcalis y amortiguadores
Lípidos
Agentes redox
Enzimas y microorganismos
Agentes leudantes
Conservadores
Antioxidantes
Colorantes
Agentes con sabores u olores desagradables
Aceites esenciales, aminoácidos, vitaminas y minerales

Una gran variedad de materiales encapsulantes ha sido aprobada para alimentos. Dichos materiales pueden ser hidrofílicos, como carbohidratos y proteínas, o hidrofóbicos, como grasas, aceites y ceras. Los materiales basados en almidón pertenecen al grupo de los carbohidratos y son los materiales más utilizados para encapsulación. Sin embargo, un solo material difícilmente provee un desempeño perfecto, por ello se pueden utilizar combinaciones como carbohidratos y proteínas para preparar microcápsulas con las características deseadas (Forseell, 2004). La elección del mejor material encapsulante depende no sólo de la funcionalidad deseada y del material a encapsular sino también en gran medida de la tecnología de manufactura (Forseell, 2004). Existen varias técnicas de microencapsulación aplicadas a alimentos, como son el secado por aspersión, liofilización, extrusión, coacervación, co-cristalización, aspersión por enfriamiento o congelamiento, y recubrimiento por lecho fluidizado (Kashappa Goud y Hyun, 2005).

2.5 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 *et al.*, 2000; Krasaekoopt *et al.*, 2003). En el caso de la microencapsulación de probióticos existe la necesidad de diseñar cápsulas o recubrimientos entéricos para que las células encapsuladas puedan sobrevivir al jugo gástrico del estómago humano, en donde el pH puede ser tan bajo como 2.

Se tienen varios reportes de la eficacia de la microencapsulación utilizando varios métodos y materiales sobre la conservación de la viabilidad de microorganismos probióticos. Picot y Lacorix (2004) observaron una mayor sobrevivencia en ambientes de pH hasta de 1.5 de *B. infantis* inmovilizada en

cápsulas de gelatina-xantana. De acuerdo a Sultana (2000), la viabilidad de *B. pseudolongum* encapsulado en una matriz de acetato ftalato de celulosa se preservó en un número aceptable durante su tránsito en jugos gástricos e intestinales simulados. La adición de almidón resistente (Hi-maize) como agente prebiótico en cápsulas de alginato resultó en la recuperación de un mayor número de *Lactobacillus casei* debido al efecto sinérgico de gelificación del almidón y alginato que confirió una protección a las células atrapadas durante el secado (Sultana *et al.*, 2000). Kailasapathy (2006) reportó que cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* encapsuladas en matrices de almidón y alginato presentaron una alta sobrevivencia de las bacterias en el producto durante el almacenamiento, además de que no afectaron substancialmente las características sensoriales de yogurt.

2.5.1 Materiales encapsulantes para probióticos

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

2.5.1.1 Alginato y sus combinaciones

El alginato es un heteropolisacárido lineal natural extraído de diferentes tipos de algas. Tiene 2 unidades estructurales que consisten de ácidos D-manurónico y L-gulurónico. Los cationes divalentes como el calcio se unen preferencialmente a los polímeros de alginato incrementando la viscosidad o formando geles dependiendo de la concentración. Las ventajas de las cápsulas de alginato son que este hidrocoloide forma fácilmente matrices de gel alrededor de las células bacterianas y dichas matrices no son tóxicas para el cuerpo, son de bajo costo, utilizan condiciones de proceso moderadas (como la temperatura), son de fácil preparación y aplicación y permiten la liberación en el intestino de las células atrapadas. Sin embargo, las cápsulas de alginato son susceptibles al ambiente ácido por lo que pierden estabilidad mecánica y se fracturan en

ambientes que contienen ácido láctico, lo cual genera una rápida difusión de la humedad y otros fluidos a través de las cápsulas. Estos problemas en estabilidad se presentan durante la fermentación ácido láctica y causan la salida de las células de las burbujas (Krasaekoopt, 2003) provocando una reducción en las propiedades de barrera contra factores ambientales no favorables. Otra desventaja es su dificultad para aplicarse a gran escala debido a que su costo es elevado (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.5.1.2 Mezclas de xantana-gelana

Esta mezcla, en la proporción óptima (1:0.75 para xantana:gelana) es resistente a condiciones ácidas, además esta goma se puede estabilizar con iones de calcio. 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 de las células probióticas (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.5.1.3 Carragenina y mezclas

K-carragenina es un polisacárido que requiere altas temperaturas para disolverse (60 – 90°C), especialmente cuando se utiliza a altas concentraciones como 2% a 5%. Cuando una solución con probióticos se añade a una solución de este polímero esterilizado y enfriado (40 – 45°C), el enfriamiento subsecuente a temperatura ambiente da como resultado una gelatinización. La adición de iones monovalentes como el potasio en forma de KCl lleva a la formación de las cápsulas de gel. Sin embargo, se ha reportado que KCl tiene un efecto inhibitorio en algunas bacterias lácticas, además de que el potasio en altas concentraciones es dañino para el cuerpo. Mezclas de carragenina y goma de algarrobo han dado buenos resultados en la encapsulación de bacterias adicionadas a productos lácticos fermentados como yogurt, sin embargo, la formación del gel de la mezcla de k-carragenina y goma de algarrobo depende de iones calcio, que tiene efectos

adversos tanto en la viabilidad de *Bifidobacterium* spp. como en el equilibrio electrolítico del cuerpo humano (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.5.1.4 Acetato ftalato de celulosa

Este componente contiene grupos de ftalato cargados negativamente. Es soluble a $\text{pH} \geq 6$, pero insoluble a $\text{pH} \leq 5$. Es ampliamente utilizado en la encapsulación de fármacos por su naturaleza segura con fines de ingestión humana (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.5.1.5 Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal con carga negativa obtenida a partir de sus grupos amino procedentes de la diacetilación de la quitina. Es soluble a $\text{pH} < 6$ y forma una estructura de gel por gelación ionotrópica. El quitosano se ha utilizado para recubrir cápsulas de gelatina. Sin embargo su eficiencia en la conservación de la viabilidad de células probióticas no es satisfactoria, por lo que se utiliza como material para cubiertas y no para cápsulas (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.5.1.6 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 microcápsulas que contienen grasa anhidra de leche, proveyendo de una barrera efectiva contra la oxidación. Otra propiedad importante de las proteínas de suero es su habilidad para formar geles inducidos por sal a temperatura ambiente. Esta gelificación en frío generalmente se obtiene añadiendo iones Ca^{2+} a una suspensión de aislado de proteína de suero precalentado bajo ciertas condiciones controladas (pH y ambiente mineral). El calor incrementa las propiedades emulsificantes de las proteínas de suero y la estabilidad de las emulsiones. Las

proteínas de suero son ampliamente utilizadas como emulsificantes por sus propiedades tensoactivas, forman una membrana protectora en la superficie de las gotas de grasa que evitan la coalescencia entre éstas. El aislado de proteína de suero se ha propuesto recientemente para la protección y liberación subsecuente en el intestino de moléculas bioactivas sensibles al ambiente gástrico (Picot y Lacroix, 2003a). Además de la encapsulación, el concentrado de proteína de suero se utiliza para enriquecer las mezclas del yogurt e incrementar la capacidad amortiguadora del yogurt y para retardar la reducción del pH durante el almacenamiento (Kailasapathy y Chin, 2000).

2.5.1.7 Almidón alto en amilosa fosfatado como material novedoso para la encapsulación de probióticos

Los almidones son polisacáridos que están formados principalmente por dos estructuras: amilosa, que es un polímero lineal en el que los residuos de glucosa están unidos por enlaces α -D-(1,4) y amilopectina, que es una molécula más larga y ramificada con enlaces α -D-(1,4) y α -D-(1,6) (Sajilata *et al.*, 2006). La proporción de amilosa y amilopectina en el almidón afecta sus propiedades físicas, de textura y de viscosidad durante la cocción del almidón (Champagne, 1996). En el caso del almidón de maíz existen varias proporciones de amilosa y amilopectina que se han obtenido a través de mutaciones genéticas. El almidón ceroso está compuesto casi exclusivamente de amilopectina en el endospermo, mientras que el almidón alto en amilosa contiene cantidades de amilopectina reducidas.

El almidón alto en amilosa es considerado un almidón resistente que se ha definido como la suma del almidón y los productos de la degradación del almidón no absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Shrestha, 2010) los cuales son fermentados en el colon para formar ácidos grasos de cadena corta y que desempeñan por tanto funciones nutricionales y fisiológicas similares a las de la fibra. El almidón alto en amilosa es un material muy útil como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales y balanceados nutricionalmente (Tharanathan, 2005). Los almidones altos en amilosa se

caracterizan por tener temperaturas de gelatinización más altas que el almidón común, así como un menor pico de viscosidad y viscosidad final (Hung *et al.*, 2008).

Con frecuencia los almidones se modifican químicamente para obtener propiedades mejoradas o específicas y de esta manera extender su uso en alimentos o aplicaciones industriales. La fosfatación es un método muy utilizado para la modificación química de los almidones. La fosfatación puede producir fosfatos de mono-almidón por medio de la sustitución y/o fosfatos de di-almidón por medio del entrecruzamiento. El tipo de fosfatación está determinada por el tipo de reactivos y las condiciones de la reacción (Liu *et al.*, 1999; Tharanathan, 2005). Por ejemplo, se requiere de un pH alcalino para efectuar entrecruzamiento de las cadenas de almidón con un grupo fosfato al utilizar como sal fosfatante trimetafosfato de sodio (STMP). La reacción inicial entre el STMP y el almidón involucra la apertura del anillo de STMP formando tripolifosfato de almidón el cual a un pH por arriba de 8 reacciona con el almidón formando fosfato de di-almidón (entrecruzado) y pirofosfato. A un pH menor de 7 el grupo fosfato del tripolifosfato de almidón es protonado y ese grupo puede ser eliminado para formar un monofosfato que al reaccionar con el almidón da como resultado fosfato de mono-almidón (Lim y Seib, 1993). Los fosfatos de mono-almidón muestran una viscosidad incrementada (Landerito y Wang, 2005b) mientras que la formación de fosfatos de di-almidón ayuda a mantener la integridad del gránulo de almidón al ser expuesto a condiciones severas de procesamiento como pueden ser altas temperaturas, bajo pH y altas fuerzas de corte (Seker *et al.*, 2003; Tharanathan, 2005, O'Brien *et al.*, 2009). El proceso de esterificación del almidón con el fosfato se realiza generalmente por medio de calor. Una vez que se han adicionado las sales de fosfato al almidón, el calentamiento del almidón se puede llevar a cabo de dos formas: por método convencional en un horno o por extrusión en donde se somete a los gránulos de almidón a condiciones de alta presión y temperatura. La extrusión es un método de fácil operación y bajo costo que, a diferencia de la fosfatación por el método convencional en horno, no requiere una cantidad excesiva de reactivos y da como resultado un mayor grado de fosfatación (Lim y

Seib, 1993). Seker y Hanna (2006) mostraron que el entrecruzamiento de un almidón con STMP a pH alcalino por medio de extrusión dio como resultado un menor desarrollo de la viscosidad en comparación con el mismo tipo de almidón extrudido sin la sal, además de que un incremento en la cantidad de esta sal de fosfato dio como resultado un menor índice de absorción y de solubilidad en agua (Seker y Hanna, 2006).

El almidón alto en amilosa fosfatado tanto por el método convencional como por extrusión muestra una menor eficiencia de fosfatación que el almidón ceroso y que el almidón común. Se ha reportado que almidones altos en amilosa fosfatados por el método convencional muestran valores de viscosidad máxima y viscosidad final más altos en comparación con sus almidones nativos (Liu *et al.*, 1999; Landerito y Wang, 2005b). En el caso de los almidones extrudidos, ya sean modificados o no modificados, generalmente muestran un menor perfil de viscosidad en comparación con los almidones no extrudidos, ya sea no modificados o modificados por el método convencional lo cual puede atribuirse a la desintegración de la estructura del almidón debido a las altas presiones y temperaturas del proceso de extrusión lo cual facilita la penetración del agua, disminuyendo así la temperatura de gelatinización pero también produciendo un menor perfil de viscosidad (Chang y Lii, 1992). Un estudio en el que se fosfató almidón alto en amilosa por el método de extrusión utilizando un extrusor de doble tornillo reveló que los almidones fosfatados por extrusión exhibieron una menor temperatura de gelatinización y una mayor viscosidad final que sus contrapartes no fosfatadas ni extrudidas, sin embargo dicha viscosidad fue menor que la de los almidones fosfatados por el método convencional (Landerito y Wang, 2005b).

En cuanto a la digestibilidad de los almidones altos en amilosa fosfatados se han reportado diferentes resultados dependiendo de la enzima utilizada. Por un lado, Landerito y Wang (2005 y 2005b) reportaron una disminución en la actividad de la enzima β -amilasa en los fosfatos de almidón tanto modificados por extrusión como por el método convencional en comparación con sus almidones nativos, lo cual se ha atribuido a un posible bloqueo de la enzima β -amilasa por parte de los

grupos fosfato al competir por los iones metálicos, esenciales para la actividad de esta enzima (Feller *et al*, 1996) o a que los grupos hidroxilo del almidón sustituidos por los grupos fosfato son esenciales para la actividad de la enzima (Evers *et al.*, 1997). Liu *et al.* (1999) por otra parte, reportaron una tendencia creciente en la digestibilidad de la enzima α -amilasa en los almidones altos en amilosa al ser fosfatados por un método convencional en horno, lo cual se ha atribuido a una mayor accesibilidad de las enzimas a las cadenas del almidón, sin embargo la digestibilidad de este tipo de almidones fosfatados se mantuvo por debajo del 60%. El proceso de extrusión también parece incrementar el grado de hidrólisis del almidón lo cual se ha relacionado con un menor contenido de almidón resistente en las muestras extrudidas en comparación con las no extrudidas (Shrestha *et al.*, 2010).

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. La elección del material encapsulante adecuado depende no sólo del material a encapsular y su funcionalidad, sino también en gran medida de la tecnología de encapsulación (Forseell, 2004).

2.5.2 Métodos de encapsulación de probióticos

Para la incorporación de bacterias probióticas inmovilizadas en productos alimenticios son deseables preparaciones secas de microcápsulas insolubles en agua con tamaño de partícula bajo ($<100\mu\text{m}$) y controlado. Los cultivos con estas características tienen mayor estabilidad y su manejo y almacenamiento es más fácil, además de tener bajo impacto sobre las características sensoriales del producto, especialmente la textura (Picot y Lacroix, 2003b). La dificultad técnica y el alto costo del proceso son factores limitantes importantes para la aplicación a gran escala de las tecnologías de microencapsulación, particularmente de grado alimenticio. Se han reportado varios métodos para la encapsulación de bacterias

probióticas, como son: emulsión, extrusión, coacervación, cápsulas de alginato y secado por aspersión.

2.5.2.1 Método de emulsión

También conocido como sistema de dos fases, es una técnica en la que un volumen pequeño de la suspensión de células-polímero (fase discontinua) se añade a un gran volumen de aceite vegetal (fase continua) como aceite de soya, de girasol, de canola o de maíz. La mezcla es homogenizada para formar una emulsión agua en aceite. Una vez que la emulsión es formada, el polímero soluble en agua debe ser insolubilizado (entrecruzado), con cloruro de calcio, para formar partículas pequeñas dentro de la fase grasa. Entre más pequeño sea el tamaño de partícula de la fase interna de la emulsión, más pequeñas serán las microcápsulas. Las burbujas son después recolectadas por filtración. El tamaño de las burbujas se controla por la velocidad de agitación, el cual puede variar entre 25µm y 2mm. Esta técnica se ha utilizado exitosamente para encapsular bacterias ácido lácticas. En algunos casos se añaden emulsificantes para disminuir la tensión superficial y formar así una mejor emulsión que da como resultado esferas menores. El emulsificante más comúnmente usado es el Tween 80 a diferentes concentraciones. Entre los materiales de soporte usados en la técnica de emulsión se incluyen mezclas de k-carragenina y gomas de algarrobo, acetato de celulosa, alginato, quitosano y gelatina. Esta técnica puede ser fácilmente escalada y el diámetro de las cápsulas producidas es menor que en otros métodos como el de extrusión (Krasaekoopt, 2003). El diámetro de las cápsulas, además de tener un efecto crucial en la viabilidad de las células probióticas al influir en su tasa metabólica, también influye en las propiedades sensoriales del producto final (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.5.2.2 Método de extrusión

También llamado método de goteo, es la técnica más antigua y la más común para hacer cápsulas con hidrocoloides. Consiste en la preparación de una solución de hidrocoloide en la que se agregan los microorganismos. Esta suspensión de células se extrude a través de una aguja obteniendo gotas que caen libremente en un baño con un disolvente frío, el cual solidifica las cápsulas. El tamaño y la forma de las burbujas dependen del diámetro de la aguja y de la distancia de la caída libre, respectivamente. Este método es muy popular debido a su facilidad y simplicidad así como a la alta retención de la viabilidad celular obtenida. El material de soporte más utilizado para la extrusión es el alginato. Para formar las burbujas, una suspensión de células es mezclada con una solución de alginato de sodio, y la mezcla es goteada en una mezcla que contiene un catión multivalente (generalmente Ca^{2+} en forma de CaCl_2). Las gotas forman esferas de gel instantáneamente, atrapando las células en un entramado tridimensional de alginato entrecruzado iónicamente. El diámetro de las cápsulas formadas por este método es de 2 a 5mm. Sin embargo, el uso de este método para la producción en larga escala no es factible, debido a la lenta formación de las microcápsulas (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.5.2.3 Coacervación

La coacervación es una tecnología que puede lograr un alto nivel de atrapamiento celular (hasta 99%), además ofrece posibilidades de liberación controlada basadas en el esfuerzo mecánico, temperatura o liberación sostenida. La coacervación es utilizada típicamente para encapsular aceites esenciales de sabores, pero también se puede adaptar para la encapsulación de aceites de pescado, nutrimentos, vitaminas, conservadores, enzimas, etc. El fundamento de la microencapsulación por coacervación (simple o compleja) es la separación de fases de uno o muchos hidrocoloides de la solución inicial y posterior depósito de la fase coacervada recién formada alrededor del ingrediente activo suspendido o emulsificado en el mismo medio de reacción. El sistema hidrocoloide para

microencapsulación por coacervación más estudiado y mejor entendido es el sistema de gelatina / goma acacia. A pesar de las ventajas de la coacervación como método de encapsulación, se han enfrentado graves problemas al intentar comercializar ingredientes alimenticios coacervados pues el costo del proceso es muy elevado, el proceso es complejo y la unión del material de pared generalmente involucra glutaraldehído, que debe de ser utilizado cuidadosamente de acuerdo a la legislación de varios países (Gouin, 2004).

2.5.2.4 Secado por aspersion

El secado por aspersion, 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 *et al.*, 2007). Se ha visto que un adecuado ajuste y control de las condiciones del proceso, como la temperatura de entrada del aire, pueden dar como resultado cultivos viables encapsulados con una distribución y tamaño de partícula adecuado (Kailasapathy, 2002). 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. El propósito principal de la atomización es incrementar el área superficial del producto, esto ayuda en la rápida evaporación del agua en las superficies, además determina el tamaño de las gotas. Las gotas pierden agua por difusión pero mantienen su forma esférica. 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 aspersión en la industria de alimentos se llevan a cabo en formulaciones acuosas de alimentación, por lo que el material encapsulante debe ser soluble en agua a un nivel aceptable y de viscosidad limitada. Materiales encapsulantes típicos incluyen goma acacia, maltodextrinas, almidones hidrofóbicamente modificados y mezclas de los mismos. Una de las limitantes de la tecnología del secado por aspersión es el número de materiales encapsulantes disponibles. Realmente no se han desarrollado nuevos materiales recientemente para el secado por aspersión (Gouin, 2004). Por ello el develar nuevos materiales, modificaciones y combinaciones de ellos para el encapsulado de probióticos resulta una investigación muy útil para el desarrollo de alimentos funcionales.

Varios estudios han demostrado que la encapsulación por secado por aspersión es un método efectivo en la protección de las células encapsuladas tanto de las condiciones del proceso, como del ambiente en el que se almacenan y en su paso a través del tracto gastrointestinal (Sultana *et al.*, 2000; Talwalkar y Kailasapathy, 2003; Picot y Lacroix, 2004; Champagne y Gardner, 2005; Mortazavian *et al.* 2007). El método de microencapsulación descrito por Picot y Lacroix (2004) mostró que la dispersión de células frescas de *Bifidobacterium spp.* en una suspensión de base de proteína de suero tratada térmicamente, seguido de secado por aspersión de la mezcla, fue un método factible para preservar la viabilidad celular de los probióticos.

Para la elección de la cepa a utilizar como probiótico encapsulado se deben de considerar varios aspectos, entre ellos 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 es la tolerancia a altos niveles de cizallamiento y condiciones de deshidratación y calor en el caso del secado por aspersión (Picot y Lacroix, 2004). Se ha visto una tendencia mayor de las bifidobacterias, en comparación con los lactobacilos, a resistir las condiciones del proceso de secado por aspersión, así como una mayor tolerancia de células de bifidobacterias

encapsuladas a las condiciones ácidas del estómago. Fávaro-Trindade (2002) reportaron que *B. lactis* fue más resistente al proceso de secado por aspersión que *L. acidophilus* en todos los tratamientos térmicos probados; Sultana *et al.* (2000) mostraron que células encapsuladas, por un método modificado utilizando calcio y alginato, de las cepas *L. acidophilus* y *L. casei* fueron más sensibles a condiciones de alta acidez comparadas con células encapsuladas por el mismo método de *B. infantis*; Picot y Lacroix (2004) encontraron que de entre dos cepas de *Bifidobacterium* probadas, las células de la cepa de *Bifidobacterium breve* R070 (BB R070) tuvieron un mayor rendimiento de encapsulación, es decir mayor número de células viables dentro de las cápsulas producidas mediante secado por aspersión en comparación con células de la cepa *Bifidobacterium longum* R023 (BL R 023) encapsuladas de la misma manera, lo cual podría atribuirse a una mayor tolerancia térmica de BB R070.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha habido un interés creciente por el efecto de los microorganismos probióticos en la salud humana. La incorporación de éstos en alimentos ha ido en aumento. El efecto biológico de un cultivo probiótico está relacionado con la cepa, así como la forma y cantidad en que son consumidos. En particular, la industria de productos lácteos ha considerado a los probióticos como una herramienta importante para el desarrollo de nuevos productos ya que los derivados lácteos han mostrado ser buenos vehículos para hacer llegar los probióticos al consumidor. Sin embargo, diferentes estudios han documentado que las bacterias probióticas muestran una considerable reducción en su sobrevivencia al ser incorporadas en diferentes productos lácteos, por lo que se han propuesto algunas técnicas de microencapsulación que protejan a las bacterias probióticas durante los diferentes procesos. El secado por aspersion es un método de fácil escalamiento a nivel industrial y bajo costo en comparación con otros métodos de encapsulación. Varios estudios muestran la protección de células encapsuladas mediante secado por aspersion contra condiciones adversas durante su almacenamiento en un alimento vehículo y en su paso a través del tracto gastrointestinal (Sultana *et al.*, 2000; Talwalkar y Kailasapathy, 2003; Picot y Lacroix, 2004; Champagne y Gardner, 2005; Mortazavian *et al.*, 2007). Una de las principales limitantes de la tecnología del secado por aspersion es el número reducido de materiales encapsulantes disponibles y las condiciones de secado que disminuyen la viabilidad durante el proceso. En este trabajo se proponen nuevas formulaciones de materiales encapsulantes de probióticos mediante la fosfotación, por método convencional y por extrusión, de almidón de maíz alto en amilosa, utilizado además en mezclas con concentrado de proteína de suero, así como la evaluación del efecto de microencapsulación en la viabilidad de los microorganismos durante el proceso de secado por aspersion, en un sistema alimenticio modelo (yogurt) y en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Con este estudio se buscó contribuir con el desarrollo de materiales para su uso en la microencapsulación mediante secado por aspersion, así como generar un

mayor conocimiento sobre el comportamiento del microorganismo estudiado (*Bifidobacterium breve*).

4. HIPÓTESIS

- a. La viabilidad de *Bifidobacterium breve*, partiendo de una concentración inicial aproximada de 10^9 UFC / mL, se preservará en un número suficiente después de su paso por las siguientes etapas:
 - Durante el encapsulado mediante secado por aspersion en una matriz de proteína de suero y almidón fosfatado.
 - Después del almacenamiento por 28 días a 4°C de las bacterias encapsuladas adicionadas en un alimento modelo ácido (yogurt).
 - Después de someter las bacterias encapsuladas y almacenadas en yogurt por 2 y 4 semanas, a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal: pH 2.0 y pH 8.0 a 37°C.

- b. La viabilidad del microorganismo durante estas etapas se conservará en mayor número en el caso de las células encapsuladas que en su forma libre.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la viabilidad de *B. breve* después de ser encapsulado por secado por aspersión en materiales novedosos preparados a partir de dos biopolímeros naturales: almidón fosfatado, por método convencional y por extrusión, y proteína de suero. Evaluar además el potencial de las cápsulas de dichos materiales para preservar la viabilidad de las bacterias durante su incorporación y almacenamiento en yogurt, así como durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal a diferentes tiempos de almacenamiento.

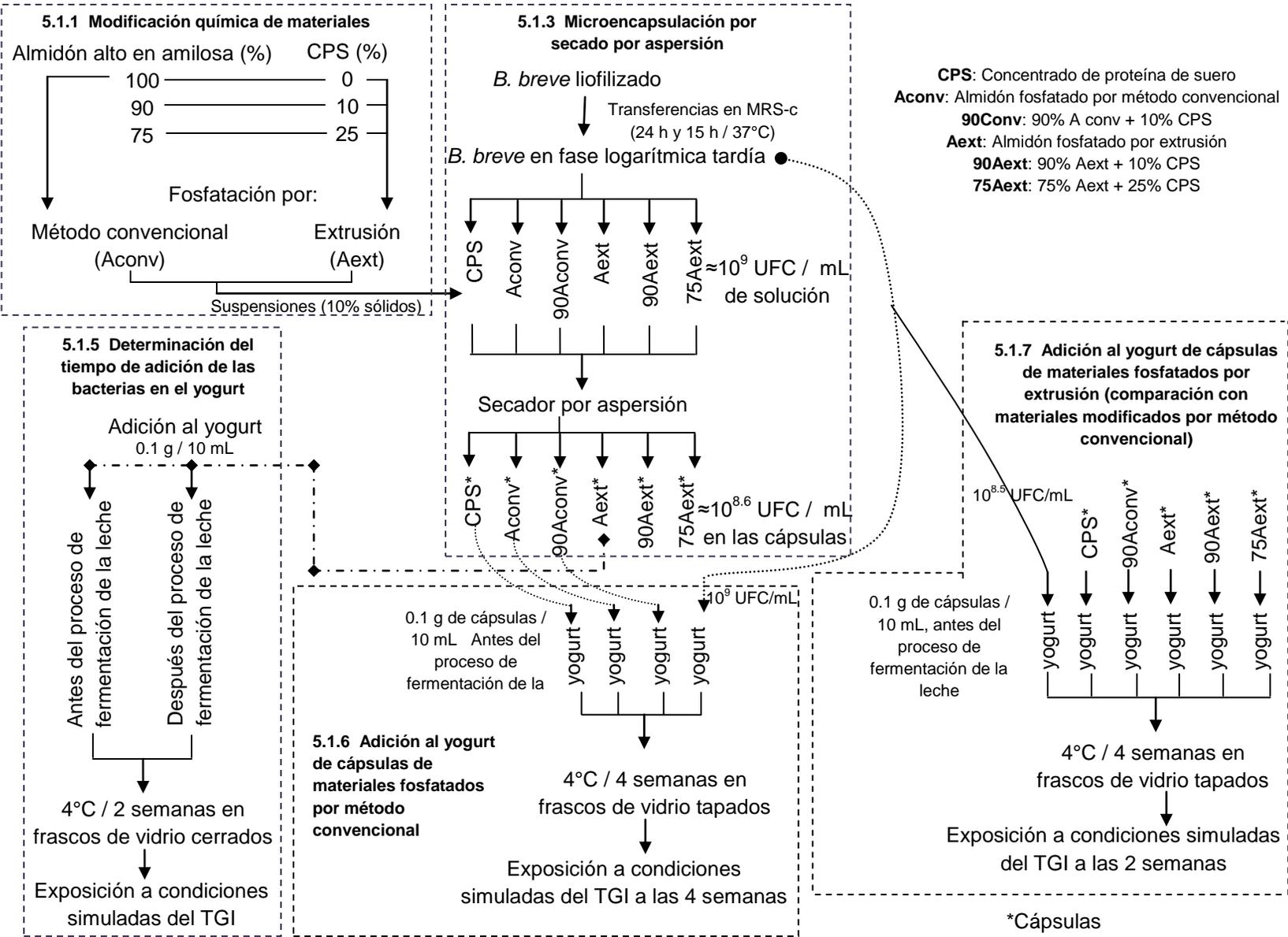
5.1 Objetivos específicos

- 5.1.1 Preparar y caracterizar fisicoquímicamente materiales encapsulantes novedosos.
- 5.1.2 Caracterizar el crecimiento de *B. breve* ATCC 15700 y definir el tiempo de incubación en el que alcanza su fase de crecimiento logarítmico tardío en la que el microorganismo es más estable para su microencapsulación mediante secado por aspersión.
- 5.1.3 Microencapsular mediante secado por aspersión células viables de *B. breve* utilizando almidón alto en amilosa fosfatado por el método convencional (Aconv) y por extrusión (Aext), y concentrado de proteína de suero (CPS), así como sus mezclas en diferentes proporciones, que permitan preservar su viabilidad durante el proceso.
- 5.1.4 Determinar la tasa de sobrevivencia de *B. breve* después del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión, en los diferentes materiales de pared.

- 5.1.5 Determinar la fase de incorporación de *B. breve* a un vehículo modelo (yogurt para beber) mediante la adición de los probióticos encapsulados antes y después de la fermentación del yogurt llevada a cabo por un cultivo iniciador de adición directa.
- 5.1.6 Adicionar en yogurt para beber las cápsulas de materiales modificados por método convencional utilizando como control microorganismos sin encapsular.
- 5.1.7 Adicionar en yogurt para beber las cápsulas de materiales modificados por extrusión utilizando como control microorganismos sin encapsular y 90Aconv.
- 5.1.8 Evaluar periódicamente la sobrevivencia de *B. breve* encapsulado y en su forma libre en yogurt durante un período de almacenamiento de 4 semanas a 4°C.
- 5.1.9 Exponer las bacterias, encapsuladas y en su forma libre adicionadas al yogurt a condiciones gastrointestinales simuladas y evaluar su tasa de sobrevivencia en diferentes períodos de almacenamiento (2 y 4 semanas).

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

NOTA: Los números que aparecen en la estrategia experimental corresponden a los empleados en los objetivos específicos. Algunos objetivos específicos se obviaron en el diagrama por cuestión de espacio.



7. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Se utilizó el cultivo liofilizado de la cepa de colección ATCC 15700 de *B. breve*. El medio de cultivo para la bacteria fue agar de Man Rogosa Sharpe (MRS). Se utilizó almidón alto en amilosa y concentrado de proteína de suero como materias primas para las cápsulas. Como sal fosfatante para la modificación química de los materiales matriz se utilizó trimetafosfato de sodio (STMP) que fue adquirido de Sigma Chemical Co, al igual que la cisteína y el fosfato monobásico y dibásico de sodio. Para la elaboración del yogurt se utilizó leche en polvo descremada. Se empleó como antibiótico una marca comercial de vancomicina. Para la observación en el microscopio confocal se utilizaron los colorantes FITC (fluorescein-isotiocianato) y Congo Red adquiridos de Molecular Probes. El resto de los químicos utilizados fue de grado reactivo a menos que se especifique lo contrario.

7.1 Modificación y caracterización de los materiales

7.1.1 Fosfatación por extrusión

La fosfatación del almidón alto en amilosa y de dos mezclas de éste con concentrado de proteína de suero (10% y 25% respectivamente) por extrusión se realizó de acuerdo al método reportado por Chang y Lii (1992) con algunas modificaciones. La extrusión se llevó a cabo en un extrusor de laboratorio de tornillo simple, diseñado y manufacturado por Cinvestav-IPN, Querétaro. Las temperaturas del barril utilizadas fueron 45°C, 100°C y 130°C para la zona de alimentación, de transición y de alta presión respectivamente. Se utilizó una velocidad de tornillo de 68 rpm, velocidad de alimentación de 7 g / min, relación de compresión del tornillo de 1:2 y un dado con un diámetro de salida de 4.0 mm. Se adicionaron 8 g de trimetafosfato de sodio por cada 100 g de sólidos en base seca y las muestras fueron acondicionadas a un contenido de humedad entre 26

y 27%. El agente fosfatante se disolvió en agua y la solución fue asperjada directamente sobre las muestras de almidón y sus mezclas con proteína de suero. Las muestras fueron homogenizadas manualmente y el pH fue ajustado a 8.6 +/- 0.2 con una solución de hidróxido de sodio al 5%. Las muestras acondicionadas se dejaron equilibrar durante 12 h en bolsas de polietileno cerradas y almacenadas a 4°C para su posterior extrusión. Las muestras extrudidas fueron secadas en una estufa a 45°C durante 24h, pulverizadas en un molino de martillos (Pulvex, México, modelo 200) y cribadas usando una malla con una apertura de 180 µm. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente en una bolsa de polietileno cerrada para su posterior caracterización.

7.1.2 Fosfatación por método convencional

La fosfatación del almidón alto en amilosa por el método convencional 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 adicionaron 2.5 g de sal de trimetafosfato de sodio (STMP) por 100 g de almidón en base seca y se ajustó el pH a 8 utilizando una solución de NaOH al 5%. La suspensión fue colocada hasta sequedad a 45°C en una estufa (Binder 115-UL) y posteriormente se colocó en la estufa a 130°C durante 2h. Las muestras fueron molidas en un molino de martillos. El polvo fue cribado en una malla con una apertura de 180 µm y almacenado 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).

7.1.3 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 2 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:

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

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

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

7.1.4 Determinación del Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) de los almidones fosfatados

Ambos índices se determinaron a los materiales fosfatados y sin fosfatar siguiendo el método descrito por Anderson y col. (1969) con algunas modificaciones. Se realizaron tres repeticiones para cada análisis y los valores se reportaron como un promedio. Para cada muestra, se pesaron 0.25 g en un tubo de centrifuga y se adicionaron 3 mL de agua destilada. Los tubos se mantuvieron a 30°C y en agitación constante por 30 minutos. Enseguida, se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó en un crisol de aluminio, puesto previamente a peso constante, 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 centrifuga 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:

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

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

7.2 Caracterización de *Bifidobacterium breve*

Cabe mencionar que todo el material utilizado para la manipulación de *B. breve* (medios de cultivo, frascos de dilución, diluyentes, soluciones, varillas de cristal, puntas para pipeta, entre otros) fue esterilizado por medio de calor húmedo a 121°C durante 15 min en autoclave, a menos que se indique un método diferente.

7.2.1 Activación de la cepa

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

7.2.2 Conteo de microorganismos

Como técnica para contar las unidades formadoras de colonia (UFC) de *B. breve* se utilizó el método de siembra de extensión en superficie. Se colocaron con una micropipeta 100 µl del medio con las células a contar sobre una caja petri con agar MRS-c, el líquido con 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. Para hacer posible la cuenta de bacterias y que dicha cuenta fuera confiable se procuró que en cada caja sembrada hubiera aproximadamente entre 25 y 250 UFC. Para ello, previo a la siembra de las bacterias, se realizaron las diluciones decimales pertinentes dependiendo de la concentración inicial del cultivo. Las diluciones se realizaron colocando en un tubo de ensaye 1 mL del cultivo celular en 9 mL de solución de peptona de carne al 0.1%.

7.2.2.1 Conteo de *B. breve* en yogurt

Para contar las células de *B. breve* viables en el yogurt se utilizó la técnica ya descrita (ver 7.2.2) con la diferencia de que el agar MRS-c fue adicionado de 5mg / L de vancomicina (MRS-cv), después de la esterilización, cuando el medio alcanzó una temperatura aproximada de 40°C. Además, las diluciones de las muestras de yogurt previas a su siembra se realizaron en 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos* y no en solución de peptona de carne.

*La solución amortiguadora de fosfatos se preparó con 33 mL y 67 mL de soluciones 0.2 M de fosfato monobásico y dibásico de sodio respectivamente.

7.2.2.2 Conteo de células de *B. breve* con un nivel de estrés fuerte

El número de microorganismos con un nivel de estrés fuerte (determinado después del proceso de secado por aspersion, durante su almacenaje en yogurt y durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal) se obtuvo de acuerdo al porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. breve* en agar MRS-cv adicionado de 2% de Cloruro de Sodio (2% NaCl) en comparación con el crecimiento del microorganismo en el mismo medio sin la adición de NaCl, utilizando el método de siembra por extensión en superficie ya descrito (ver 7.2.2). La cantidad de NaCl se eligió en base a lo reportado por Dave y Shah (1996).

7.2.3 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de las bifidobacterias se llevó a cabo con el objetivo de identificar el tiempo aproximado en el que el microorganismo alcanzaría la etapa final de la fase logarítmica tardía y principio de la estacionaria de su ciclo de vida. Además se verificó que el crecimiento de *B. breve* no disminuyera en presencia de vancomicina, antibiótico utilizado para inhibir la flora asociada en el yogurt. La curva de crecimiento se llevó a cabo de dos formas: monitoreando manualmente el crecimiento en el cultivo y utilizando un equipo de monitoreo automático Bioscreen.

7.2.3.1 Monitoreo manual del crecimiento de *B. breve*

Se inocularon 5 µl del cultivo de *B. breve* previamente activado (ver 7.2.1) en un frasco de dilución con 100mL de caldo MRS-c y se tomó una muestra para determinar el inóculo inicial por el método de siembra de extensión en superficie (ver 7.2.2). El frasco de dilución inoculado se puso a incubar herméticamente cerrado a 37°C por un total de 48 h durante las cuales se realizaron monitoreos periódicos de la viabilidad de las células (horas 12, 23, 28, 31, 36 y 48) por el método de siembra de extensión en superficie (ver 7.2.2). Con la cuenta de UFC obtenidas en cada hora muestreada se construyó una curva de crecimiento.

7.2.3.2 Monitoreo en Bioscreen del crecimiento de *B. breve*

Se activó el cultivo liofilizado de *B. breve* (ver 7.2.1) en 3 mL de caldo MRS-c. Se hicieron tres diluciones decimales en solución de peptona al 0.1 %. Por otro lado, en los pozos de una placa para Bioscreen se colocaron por separado 290 µl de caldo MRS-c, caldo MRS-cv, caldo MRS-v y caldo MRS por triplicado. De la tercera dilución del cultivo activado, previamente realizada, con una micropipeta se colocaron 10 µl en cada pozo previamente llenado con caldo MRS. El equipo se programó para realizar lecturas cada 20 min a 37°C durante 48 h. Los análisis se hicieron por triplicado y se consideró un control negativo (300 µl sin células) para cada medio probado. La densidad óptica registrada por el equipo se relacionó con las UFC a partir de la curva de calibración realizada en el mismo equipo (ver Apéndice 2).

7.2.4 Preparación de la cepa para su microencapsulación

La cepa probiótica activada (ver 7.2.1) se inoculó en 100 ml de caldo MRS-c y fue incubada a 37°C durante 16 h para obtener aproximadamente 10^9 UFC / mL en fase logarítmica tardía. Las bacterias fueron recuperadas del medio mediante centrifugación a 4500 rpm por 15 minutos (Centrífuga Hermle modelo Z383) y lavadas dos veces en solución salina al 0.085% bajo las mismas

condiciones de centrifugación. Después de los dos lavados se desechó la solución salina y se conservó el pellet de bacterias para ser utilizado en el proceso de microencapsulación.

7.3 Microencapsulación de células de *B. breve* y caracterización físicoquímica de las cápsulas obtenidas por secado por aspersión

7.3.1 Preparación de materiales matriz

Se prepararon suspensiones acuosas con un contenido de sólidos de 10% de los siguientes materiales encapsulantes: Aext, Aconv, CPS, dos mezclas extrudidas de Aext/CPS, y una mezcla de Aconv/CPS preparados de acuerdo a las proporciones descritas en el *Cuadro 3*. Las soluciones fueron homogenizadas durante 3 min en un Homogenizador CAT modelo X120 a velocidad máxima; el pH se ajustó a 7 con una solución de NaOH al 2%, se calentaron en 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 7.2.4*). Antes de la microencapsulación por secado por aspersión se tomó una muestra de 1 mL para determinar la concentración de bacterias (*ver 7.2.2*) antes del proceso de secado.

7.3.2 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 B-191 (Büchi, Flawil, Switzerland). Las condiciones de operación del secador fueron las siguientes: temperatura de aire de entrada de 160°C, temperatura de aire de salida (se registró entre 55 y 65°C dependiendo del material matriz), capacidad de bomba de alimentación y aspiración de 35 y 90% respectivamente, con un diámetro de boquilla de alimentación de 0.7 mm. Las cápsulas fueron recuperadas del vaso colector del secador con una espátula estéril y almacenadas en frascos de vidrio estériles que

fueron cerrados herméticamente y almacenados en refrigeración a 4°C para estudios posteriores. Antes de secar cada muestra las piezas del secador por aspersión fueron lavadas y desinfectadas con alcohol al 70%, el alcohol se dejó evaporar por completo antes de montar el equipo.

Cuadro 3: Materiales matriz utilizados para la microencapsulación de *B. breve*.

Materiales sin modificación química
a. Concentrado de proteína de suero (CPS)
Materiales fosfatados por método convencional
b. Almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional con STMP (Aconv)
c. Mezcla de 90% almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional con STMP y 10% CPS (90Aconv)
Materiales fosfatados por extrusión
d. Almidón alto en amilosa fosfatado por extrusión con STMP (Aext)
e. Mezcla de 90% almidón alto en amilosa y 10% CPS fosfatados por extrusión con STMP (90Aext)
f. Mezcla de 75% almidón alto en amilosa y 25% CPS fosfatados por extrusión con STMP (75Aext)

7.3.3 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, de acuerdo a lo establecido en un experimento preliminar, y se sembraron (ver 7.2.2 y 7.2.2.2) para determinar la viabilidad de *B. breve* antes y después del secado por aspersión.

7.3.4 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 horas.

7.4 Incorporación de Bifidobacterias en yogurt

7.4.1 Determinación del tiempo de adición de las bacterias encapsuladas durante el proceso de elaboración del yogurt

Se preparó yogurt utilizando leche descremada en polvo reconstituida en agua destilada, con un contenido de sólidos del 10% (p/p) de acuerdo a lo reportado por Picot y Lacroix (2004) con algunas modificaciones. La mezcla de polvo de leche descremada y agua se esterilizó a 115°C por 15 min y se enfrió a 42 +/- 1°C antes de su inoculación con una cepa comercial de cultivo láctico iniciador de adición directa (Lyofast, SACCO, Italia). La leche recién inoculada con el cultivo iniciador se dividió en 4 partes de 20 mL cada una colocándola en frascos de vidrio estériles con tapa. A dos de los frascos con leche y cultivo iniciador (*Antes 1* y *Antes 2*) se les adicionó 0.1 g de *B. breve* encapsulado en 90Aext por cada 10 mL de yogurt de inmediato, antes de la fermentación de la leche, mientras que la leche de los otros dos frascos (*Después 1* y *Después 2*) se fermentó únicamente con el cultivo iniciador. La fermentación de las 4 muestras se llevó a cabo a 42°C +/- 1°C durante aproximadamente 6 h hasta alcanzar un pH de 4.5. Al terminar la fermentación de la leche se adicionó 0.1 g de *B. breve* encapsulado en 90Aext a los frascos *Después 1* y *Después 2*. Se determinó por recuento en placa (ver 7.2.2) el número de bacterias adicionadas a cada frasco de yogurt y el número de bacterias después de la fermentación para el caso de la muestra en los frascos *Antes 1* y *Antes 2*. Todos los frascos con yogurt fueron almacenados en refrigeración (4°C) y la viabilidad de las bifidobacterias fue monitoreada semanalmente durante 2 semanas.

Al finalizar las 2 semanas de almacenamiento en yogurt se expusieron las 4 muestras a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 7.5 con la diferencia de que en el cambio de las células del jugo gástrico al jugo intestinal, después de su centrifugación para retirar el jugo gástrico se colocó en el pellet de células 1 mL de amortiguador de fosfatos, en lugar de 1 mL del sobrenadante de jugo gástrico, y 9mL de jugo intestinal.

7.4.2 Incorporación en yogurt de *B. breve* encapsulado en matrices modificadas por método convencional

El yogurt utilizado como alimento modelo para evaluar la viabilidad de las bacterias encapsuladas durante su almacenamiento en dicho producto se preparó utilizando leche descremada en polvo reconstituida en agua destilada, con un contenido de sólidos del 10% (p/p) de acuerdo a lo reportado por Picot y Lacroix (2004) con algunas modificaciones. La leche reconstituida se esterilizó a 115°C por 15 min y se enfrió a 42 +/- 1°C antes de su inoculación con un cultivo láctico iniciador de adición directa (Lyofast, SACCO, Italia). La leche recién inoculada con el cultivo iniciador se dividió en 12 partes de 40 mL y fue colocada en frascos de vidrio estériles con tapa. De inmediato, antes de la fermentación de la leche con el cultivo iniciador, en cada frasco se adicionó 0.1 g de bacterias probióticas encapsuladas por cada 10 mL de yogurt ó 10⁹ células / mL en el caso de las no encapsuladas. En los frascos 1 a 3 se adicionaron células de *B. breve* encapsuladas en CPS, en los frascos 4 a 6 células encapsuladas en 90Aconv, en los frascos 7 a 9 células encapsuladas en Aconv y en los frascos 10 a 12 las bifidobacterias sin encapsular. Todos los análisis se hicieron por triplicado y se reportó el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos. La fermentación de la leche adicionada de cultivo láctico iniciador y de las bacterias probióticas se llevó a cabo a 42°C +/- 1°C durante aproximadamente 6 h hasta alcanzar un pH de 4.5. Antes y después de la fermentación de la leche se tomaron 4 mL de muestra de cada frasco y se hicieron las diluciones correspondientes en amortiguador de fosfatos pH 7 para su posterior conteo en agar MRS-cv con y sin

NaCl (ver 7.2.2 y 7.2.2.2). Todos los frascos con yogurt fueron almacenados en refrigeración (4°C) y la viabilidad de las bifidobacterias fue monitoreada semanalmente durante 4 semanas. Al finalizar las 4 semanas de almacenamiento en yogurt se expusieron las 12 muestras a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de acuerdo al procedimiento descrito en sección 7.5.

7.4.3 Incorporación en yogurt de *B. breve* encapsulado en matrices modificadas por método convencional y por extrusión.

Se preparó la leche para el yogurt de la forma ya descrita (ver 7.4.2) con la diferencia de que ésta vez se obtuvieron 18 partes de 40 mL cada una. Se adicionó a la leche el cultivo iniciador de inoculación directa en la cantidad señalada por el proveedor y 0.1 g de bacterias probióticas encapsuladas por cada 10 mL de leche ó $10^{8.5}$ células / mL en el caso de las no encapsuladas. Se adicionaron por separado en los frascos con leche por triplicado, células de *B. breve* encapsuladas en CPS, 90Aconv, Aext, 90Aext, 75Aext y las bifidobacterias sin encapsular. Todos los análisis se hicieron por triplicado y se reportó el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos. La fermentación de la leche adicionada de cultivo láctico iniciador y de las bacterias probióticas se llevó a cabo a 42°C +/- 1°C durante aproximadamente 6 h hasta alcanzar un pH de 4.5. Antes y después de la fermentación de la leche se tomaron 4 mL de muestra de cada frasco y se hicieron las diluciones correspondientes en amortiguador de fosfatos pH 7 para su posterior conteo en agar MRS-cv con y sin NaCl (ver 7.2.2). Todos los frascos con yogurt fueron almacenados en refrigeración (4°C) y la viabilidad de las bifidobacterias fue monitoreada semanalmente durante 4 semanas. A las 2 semanas de almacenamiento en yogurt se expusieron las 18 muestras a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de acuerdo al procedimiento descrito en sección 7.5.

7.5 Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Se evaluó *in vitro* la sobrevivencia de las células encapsuladas y en su forma libre adicionadas en yogurt, 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 yogurt con probióticos, se homogenizaron las muestras manualmente por 1 minuto y se colocaron a 37°C durante 2 h. Se monitoreó la cuenta viable (*ver 7.2.2.1 y 7.2.2.2*) recién colocados la saliva y el jugo gástrico simulado y a las 2 horas de residencia en estas soluciones. A continuación se expusieron las muestras a condiciones intestinales simuladas. Para ello se tomaron 25 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 10, 000 g por 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y sobre la pastilla se adicionó 1 mL del sobrenadante recién decantado más 9 mL de jugo intestinal simulado, las muestras se colocaron a 37°C durante 4 horas. La cuenta viable de estas suspensiones fue determinada recién agregado el jugo intestinal simulado, a las 2 h y a las 4 h de residencia.

La *saliva artificial* fue preparada 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 fueron frescos, preparados 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* fue preparado 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.

7.6 Microscopía de las cápsulas

7.6.1 Microscopio Electrónico de Barrido (ESEM)

Las cápsulas de *B. breve* en CPS, 90 Aconv y 90 Aext fueron observadas en un microscopio Philips / FEI LaBy Environmental Scanning Electron Microscope ubicado en el departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Alberta, Ed., Canadá. Para su observación, las muestras se montaron en una matriz metálica y se recubrieron con una capa delgada de oro y paladio.

7.6.2 Microscopio confocal

Las cápsulas de *B. breve* en CPS, 90 Aconv y 90 Aext fueron observadas en un microscopio Leica TCS-SP2 Multiphoton Confocal Laser Scanning Microscope (TCS-MP) ubicado en el departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Alberta, Ed., Canadá. Todas las cápsulas fueron previamente teñidas con el colorante FITC (fluorescein-isotiocianato), específico de proteínas y que da una coloración verde, en una concentración de 0.01% en 80% etanol por 10 min y después con el colorante Congo Red, específico para carbohidratos y que da una coloración roja, en una concentración de 100 ppm en 15 mM KH_2PO_4 , pH 8 durante 15 minutos únicamente las cápsulas de 90 Aconv y 90 Aext. Ambos colorantes fueron lavados con sus respectivos diluyentes para eliminar el exceso de color antes de su observación en el microscopio.

7.7 Diseño y Análisis estadístico

Los tratamientos fueron aleatorizados para su aplicación. El diseño estadístico que se utilizó para la microencapsulación fue de un factor con 6 niveles (a. CPS, b. Aconv, c. 90Aconv, d. Aext, e. 90Aext, f. 75Aext). Para la evaluación de la viabilidad durante el almacenamiento y la tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal se empleó un diseño de un factor con siete niveles, los seis ya mencionados para la microencapsulación más el correspondiente a las bifidobacterias sin cápsula. Los resultados 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.

Definición de variables y réplicas:

1. Modificación química de los materiales encapsulantes: dos métodos de fosfatación, convencional y por extrusión, tres repeticiones.
2. Encapsulamiento de *B. breve* por secado por aspersión: una combinación de condiciones del equipo, tres repeticiones.
3. Adición de las cápsulas al yogurt y almacenaje: una temperatura de almacenamiento (4°C), tres réplicas.
4. Exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal: una combinación de condiciones por experimento, tres réplicas.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Modificación y caracterización de los materiales

8.1.1 Determinación del grado de sustitución de cada material

De acuerdo a la curva de calibración realizada para determinar el grado de fosfatación de todos los materiales matriz (*ver Apéndice 1*) se obtuvieron los resultados mostrados en la *Figura 1*. La tendencia en el porcentaje de fósforo de los materiales fosfatados por extrusión fue mayor que el de los materiales fosfatados por el método convencional. Los resultados mostrados fueron ajustados restando la cantidad de fósforo presente originalmente en el almidón alto en amilosa, el cual fue de aproximadamente de 0.12%. En el caso de materiales combinados con concentrado de proteína de suero, aunque éste contiene cierta cantidad de fósforo debido a que la leche contiene de origen este mineral entre otros que son transferidos al suero durante su extracción (Sammel *et al.*, 2007), éste no se consideró para el ajuste por ser el almidón el componente mayoritario y por que el método utilizado para la determinación de fósforo es específico para carbohidratos. La diferencia en la tendencia en las cantidades de fósforo encontradas entre los materiales modificados por ambos métodos se atribuyó a que el proceso de extrusión presenta en general una mayor eficiencia en el proceso de fosfatación (Martín-Martínez *et al.*, 2004) además de que en los materiales fosfatados por extrusión se adicionó una mayor cantidad de STMP (8 g por cada 100 g de sólidos) que en los materiales modificados por método convencional (2.5 g por cada 100 g de almidón). La cantidad de STMP adicionada a los materiales extrudidos estuvo basada en los resultados obtenidos por Kim *et al.* (2006), sin embargo el porcentaje de fósforo obtenido en las muestras modificadas en el presente estudio fue mayor al reportado por dichos autores. En ambos estudios se utilizaron condiciones de extrusión similares y la misma sal fosfatante, las diferencias entre estudios fueron el tipo de extrusor (de uno ó dos tornillos) y el tipo de almidón (maíz o arroz) a pesar de que se ha reportado una

mayor eficiencia de fosfatación en el almidón de arroz que en el de maíz, nuestro resultado fue contrario (Sitohy *et al.*, 2000). La cantidad de STMP adicionada a las muestras fosfatadas por método convencional en el presente estudio se definió de acuerdo a los altos porcentajes de fósforo obtenidos en nuestras muestras modificadas por extrusión y a lo reportado por Lim y Seib (1993). Se disminuyó el contenido de fósforo en los materiales modificados por método convencional en comparación con la cantidad de fósforo agregada a las muestras fosfatadas previamente por extrusión en el presente estudio, tomando en consideración que la cantidad máxima de fósforo permitida en alimentos para almidones modificados es de 0.4% equivalente a un grado de sustitución de 0.02 (Martín-Martínez *et. al.*, 2004).

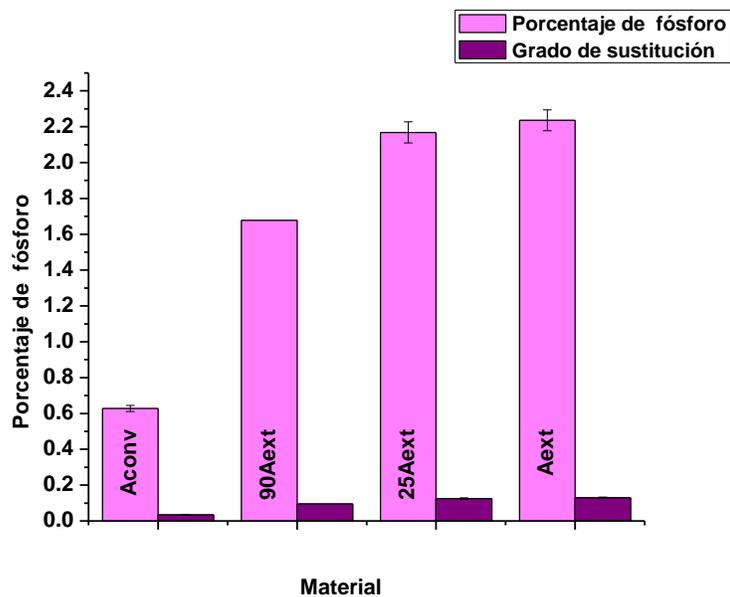


Figura 1: Porcentaje de fósforo y grado de sustitución de los materiales matriz modificados por método convencional y por extrusión.

8.1.2 Índice de Solubilidad y de Absorción de Agua (ISA e IAA)

Los resultados obtenidos de la determinación del ISA e IAA de los materiales matriz modificados químicamente se muestran en la Figura 2. Los materiales modificados por extrusión tuvieron en general un índice de solubilidad y de absorción de agua más alto que los materiales modificados por el método convencional, esto ha sido atribuido a que los gránulos sometidos a las condiciones de alta presión y temperatura durante el proceso de extrusión sufrieron cierto daño permitiendo que el agua pueda acceder con mayor facilidad (Landerito y Wang, 2005b). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Seker y Hanna (2006) quienes obtuvieron un ISA mayor en muestras extrudidas con un 5% de STMP que en muestras no extrudidas. Dichos autores reportaron además un menor ISA en muestras fosfatadas por extrusión con 15% STMP (el doble de STMP adicionado en el presente estudio) que en muestras no extrudidas, lo cual se atribuyó a un mayor grado de entrecruzamiento entre las cadenas del almidón. Un mayor entrecruzamiento permite una menor filtración y pérdida del material sólido del almidón incrementando con ello la resistencia a la ruptura del gránulo lo cual resulta deseable para ciertas aplicaciones del almidón, sin embargo, un alto nivel de entrecruzamiento en materiales modificados con fines de uso en alimentos por este método es de difícil obtención pues al incrementar la cantidad de STMP se rebasa fácilmente el límite de fosfatación permitido en alimentos (0.4%). La desintegración de la estructura del almidón durante el proceso de extrusión también se ha asociado con una menor temperatura de gelatinización, mayor grado de hidrólisis y menor perfil de viscosidad de los almidones extrudidos, modificados o no modificados, que en almidones no extrudidos (Chang y Lii, 1992).

8.2 Caracterización de *Bifidobacterium breve*

De acuerdo a las curvas de crecimiento obtenidas en el Bioscreen y de forma manual (*Figuras 3 y 4-A*), *B. breve* alcanza un máximo de crecimiento entre

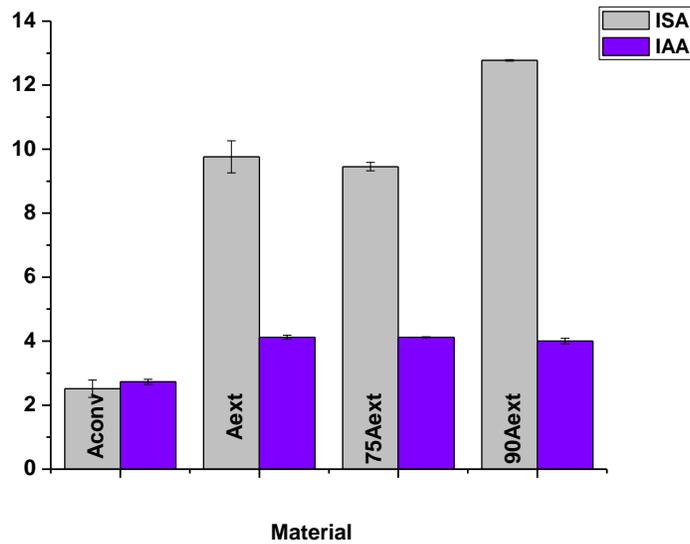


Figura 2. Índices de solubilidad y absorción en agua (ISA e IAA) de los materiales fosfatados por método convencional o por extrusión. Las letras minúsculas indican diferencias en el ISA y las mayúsculas en el IAA entre los tratamientos.

9.3 y 9.6 UFC / mL en aproximadamente 24 h en medio MRS-c, mientras que el inicio de su fase estacionaria y el final de su fase logarítmica tardía se sitúa alrededor de las 15 h a 20 h. Este resultado coincide con lo reportado por Nguyen (2009). Los cultivos que se utilizaron para la microencapsulación se dejaron crecer durante 15 h hasta alcanzar el final de su fase logarítmica tardía, por ser en esta etapa del crecimiento en la que las células se encuentran más estables (Keller y Maxcy, 1984; Kolter et al., 1993; Anderson et al., 2003) y tienen por lo tanto mayor posibilidad de preservar su viabilidad ante las condiciones de calor y deshidratación propias del proceso de secado por aspersión. En la *Figura 4-B* se observa que de los medios de cultivo probados (MRS, MRS-c, MRS-cv y MRS-v) el único que mostró diferencia significativa fue el MRS, en el cual el número de bacterias obtenido a las 28 h fue mayor que en los demás medios. Este resultado fue contrario a lo reportado por algunos autores (Sultana *et al.*, 2000; Picot y Lacroix, 2004; Kailasapathy, 2006), que refieren que el medio óptimo de crecimiento para *B. breve* y otras bifidobacterias requiere de L-cisteína-HCl. Para

finos de comparación de nuestros resultados y de acuerdo a lo reportado en la literatura, en el presente estudio se utilizó el medio de cultivo MRS adicionado de L-cisteína-HCl para el crecimiento de la cepa. Por su parte, la vancomicina (antibiótico cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la pared celular de algunos microorganismos) en una concentración de 5 mg / L no afectó el crecimiento de *B. breve* en comparación con el crecimiento del microorganismo en el medio utilizado para su crecimiento (MRS-c), por lo que este antibiótico se utilizó en los experimentos con yogurt para inhibir el crecimiento del cultivo iniciador y obtener el recuento únicamente de *B. breve*. Nuestros resultados coinciden con lo reportado en una tesis doctoral de la Universidad Politécnica de Valencia¹ en donde se menciona que dos cepas de *Bifidobacterium breve* no fueron susceptibles a una concentración de 30 µg / ml de vancomicina.

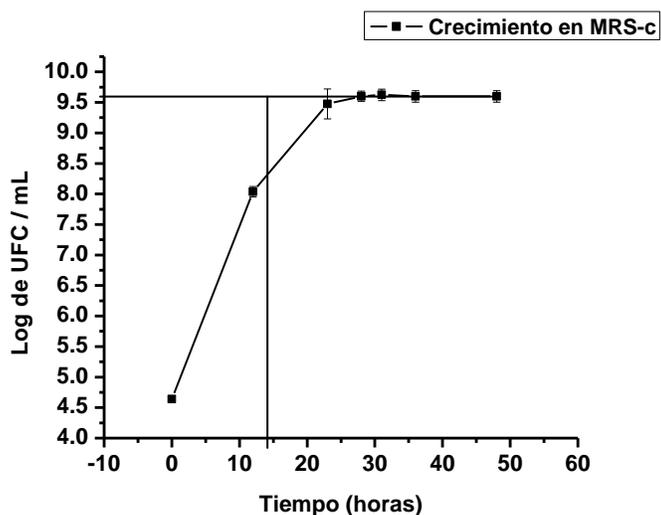


Figura 3. Curva de crecimiento de *B. breve* realizada manualmente. Activación de la cepa a 37°C durante 24 horas e inóculo inicial de 5 µl en 100mL de agar MRS-c.

¹ Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de biotecnología. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. María Carmen Collado Amores. Valencia, Noviembre de 2004.

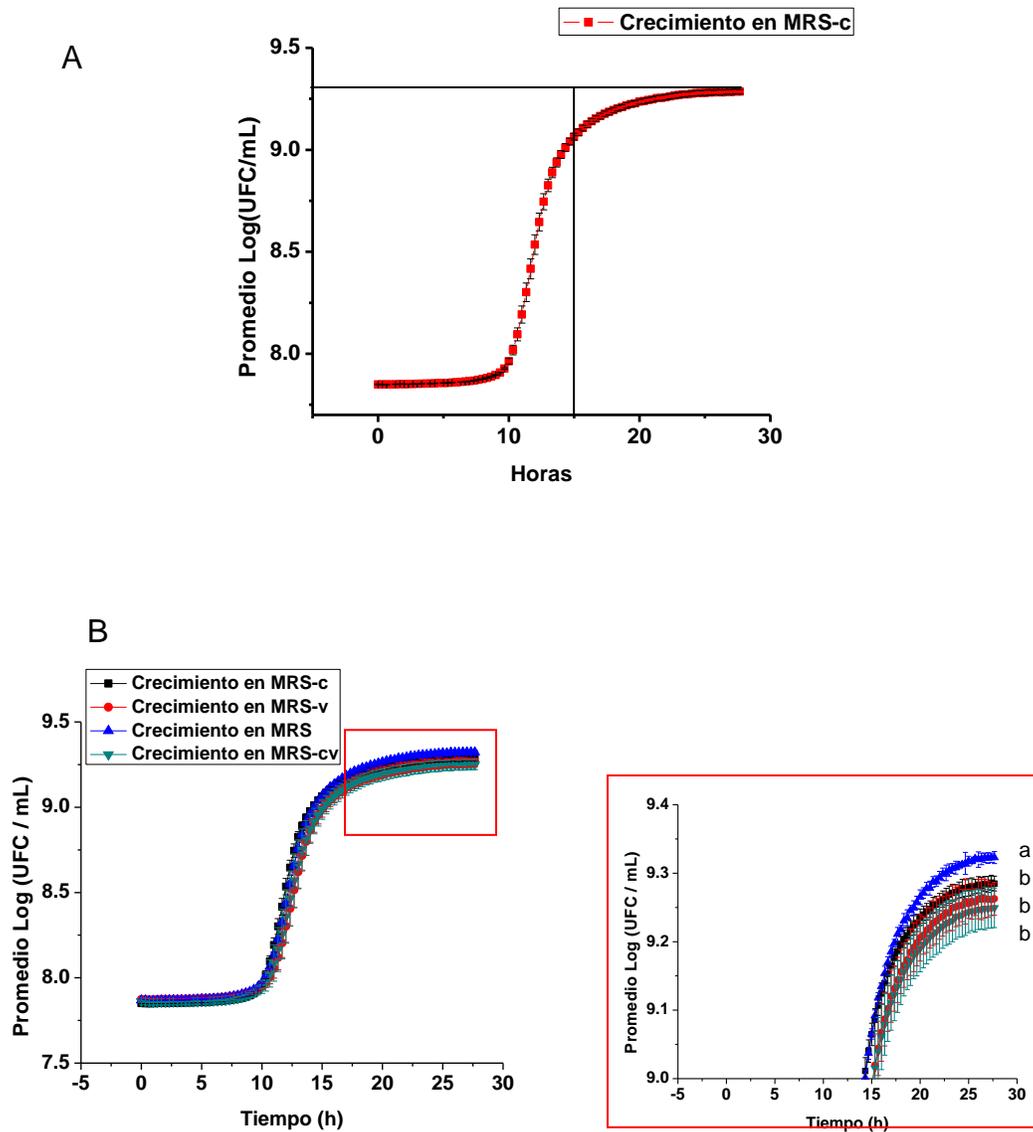


Figura 4. Curvas de crecimiento de *B. breve* obtenidas en Bioscreen. Activación de la cepa a 37°C durante 24 horas e inóculo inicial de 5 microlitros en 100mL de agar MRS-c. **A.** Crecimiento de *B. breve* en caldo MRS con 0.05% (p/v) de L-cisteína-HCL (MRS-c); **B.** Crecimiento de *B. breve* en caldo MRS, MRS con 5% de L-cisteína-HCL (MRS-c), MRS con 5 mg / L de vancomicina (MRS-v) y MRS con cisteína y vancomicina (MRS-cv). Los resultados que se muestran son el resultado de tres réplicas.

Los valores promedio del crecimiento de *B. breve* reportado como Log (UFC / mL) en la *Figura 4* se obtuvieron a partir de la conversión de las unidades

de densidad óptica registradas por el Bioscreen utilizando para ello una curva de calibración (*ver Apéndice 2*)

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

8.3.1 Viabilidad de *B. breve* encapsulado después del proceso de secado por aspersión

En cuanto a la preservación de la viabilidad de *B. breve* durante el proceso de secado por aspersión, se observa en la *Figura 5* que todos los materiales matriz probados, tanto el CPS como los fosfatados por método convencional y por extrusión, mostraron una tendencia similar en la protección al microorganismo durante el proceso de secado. La disminución de la viabilidad de *B. breve* durante el proceso de secado por aspersión para todos los materiales fue de entre 0.3 y 0.6 log. Es importante mencionar que las cápsulas de *B. breve* en Aext fueron de difícil dispersión en el medio de muestreo, no se logró una total dispersión de las cápsulas y parte de ellas quedaron asentadas, por lo que la viabilidad real de *B. breve* encapsulado en este material podría ser mayor a la reportada. Nuestros resultados en cuanto a la preservación de la viabilidad de *B. breve* durante el proceso de secado por aspersión coinciden con lo reportado por Picot y Lacroix (2004), quienes observaron una disminución de sólo 1 log en la viabilidad de *B. breve* (BB R070) durante su encapsulación en aislado de proteína de suero por medio de secado por aspersión. Este resultado puede atribuirse a una alta tolerancia de *B. breve* al calor, además de la protección brindada por los materiales encapsulantes. En el *Cuadro 4* se muestra la disminución de la viabilidad total de *B. breve* por cada material encapsulante, como vemos los materiales que menor disminución de la viabilidad mostraron fueron el CPS, y las dos combinaciones de éste con Aext, siendo los que mayor pérdida mostraron el Aext y el Aconv por sí solos. Cabe destacar que la combinación de un pequeño porcentaje de CPS (10%) con almidón alto en amilosa fosfatado por extrusión con

STMP brinda una protección a las células durante el proceso de secado muy similar a la protección brindada por el CPS por sí sólo, el cual es un material que ya 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).

Para poder realizar la comparación de la viabilidad de *B. breve* antes y después del proceso de secado por aspersión (Figura 5) fue necesario hacer un ajuste en las unidades de los microorganismos viables en las cápsulas pues esta medición se obtuvo originalmente por unidad de peso de las cápsulas (g), mientras que la viabilidad en la solución matriz se obtuvo por unidad de volumen (mL) (ver Apéndice 3).

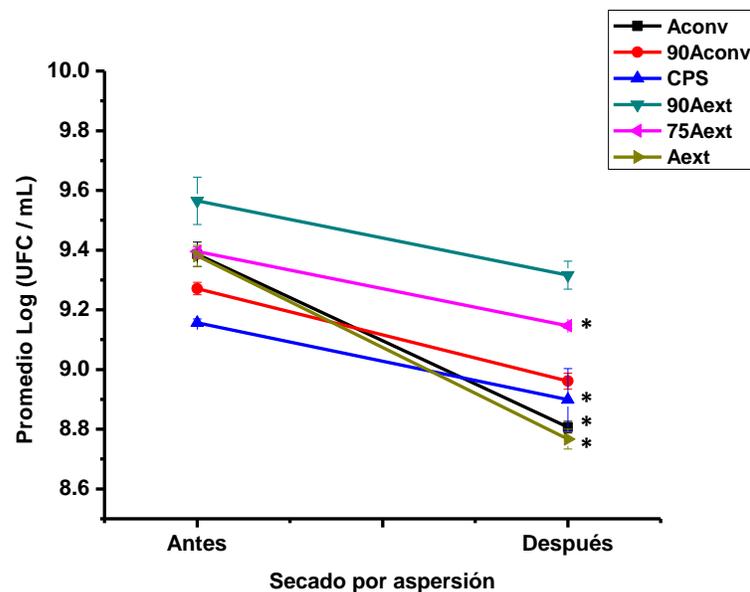


Figura 5: Viabilidad de *B. breve* en la solución de materiales modificados por método convencional y por extrusión con STMP (antes del secado por aspersión) y una vez encapsulado (después del secado). Los asteriscos indican diferencias en la viabilidad de las cápsulas con respecto a la solución inicial (antes de secar) para cada material. Los resultados que se muestran son productos de tres réplicas.

Cuadro 4. Disminución de la viabilidad de *B. breve* durante su encapsulación por secado por aspersión en materiales modificados por método convencional y por extrusión.

Material encapsulante	Disminución promedio de la viabilidad de <i>B. breve</i> durante el secado Log (UFC / mL)	Error estándar
90Aext	0.24864327 ^b	0.06582219
75Aext	0.24892717 ^b	0.0504893
CPS	0.25810673 ^b	0.10152381
90Aconv	0.31016107 ^{ab}	0.00755198
Aconv	0.57574022 ^a	0.0478678
Aext	0.6326001 ^a	0.08481856

8.3.2 Estimación del número de bacterias estresadas durante el proceso de secado por aspersión

Por el método de extensión en superficie en agar MRS-c adicionado de 2% NaCl se obtuvo un aproximado de la cantidad de bacterias probióticas que resultaron fuertemente estresadas durante del proceso de microencapsulación (*Figura 6*). Estos resultados muestran una mayor tendencia de estrés en bacterias encapsuladas en materiales modificados por método convencional en comparación con las células encapsuladas en concentrado de proteína de suero y en los materiales fosfatados por extrusión. La implicación práctica de tener células estresadas es que éstas pueden desarrollarse si se transfieren a su medio óptimo, sin embargo en condiciones adversas como lo es el pH ácido del yogurt y las condiciones gastrointestinales tienen pocas posibilidades de sobrevivir. Considerar el nivel de estrés de las células ayuda a tener una idea más real de lo que sucederá con el producto al ser consumido en cuanto al número de microorganismos que realmente llegarán viables al intestino.

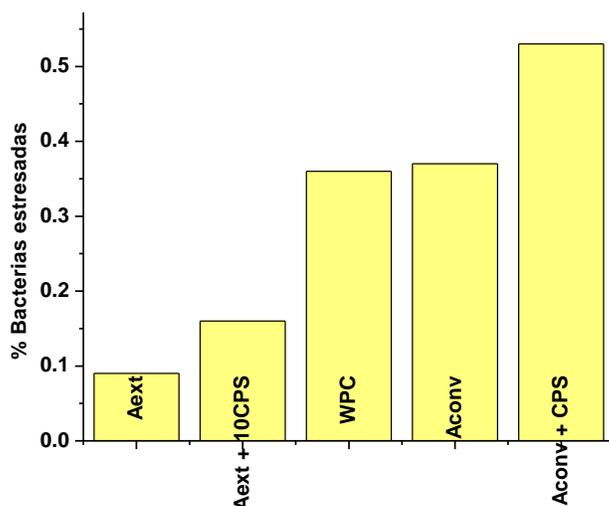


Figura 6. Porcentaje de células de *B. breve* estresadas, en un nivel detectable por una concentración de 2% NaCl adicionado al medio de cultivo, durante el proceso de secado por aspersión en diferentes materiales matriz.

8.3.3 Contenido de humedad de las cápsulas

Se obtuvo un contenido de humedad de las cápsulas de entre 3.57% y 6.58%. El porcentaje de humedad para las cápsulas de cada material se muestra en la *Figura 7*. Este resultado coincide con el reportado por otros autores que obtuvieron contenidos de humedad de alrededor de 4% en cápsulas con probióticos obtenidas por secado por aspersión (Gardiner *et al.*, 2000). Algunos autores también han reportado contenidos de humedad más bajos, de alrededor de 2% (Picot y Lacroix, 2004) sin embargo en general se considera que un contenido de humedad menor de 4% a 5% es una condición segura de almacenamiento a largo plazo en cuestión de estabilidad del producto (Chávez y Ledebøer, 2007).

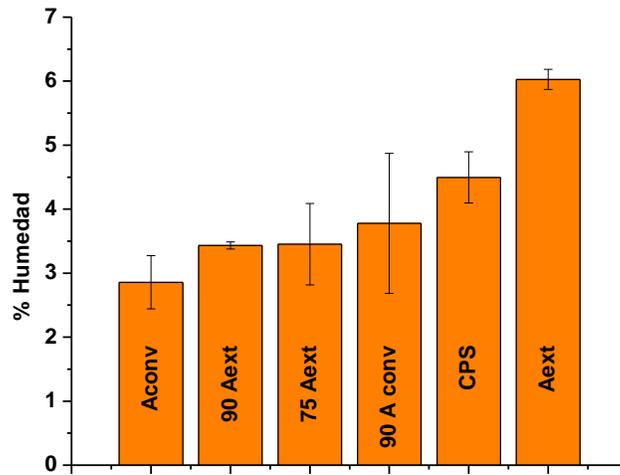


Figura 7. Porcentaje de humedad de las cápsulas obtenidas por medio de secado por aspersion con los diferentes materiales matriz.

8.3.4 Rendimiento

Se denominó como rendimiento en este estudio al porcentaje de cápsulas obtenido con respecto a la cantidad inicial de solución matriz de cada material. Como se observa en la *Figura 8*, los materiales a base de una mezcla del concentrado de proteína de suero con almidón alto en amilosa, ya sea fosfatado por el método convencional o por extrusión, dieron mayor rendimiento que los materiales a base de sólo almidón o concentrado de proteína de suero. Dado que el presente estudio es un experimento a nivel de laboratorio, en el que por cuestiones técnicas y del equipo gran parte del material no se puede recuperar del ciclón del secador por aspersion, los rendimientos mostrados aquí son relativos y únicamente pueden dar una idea general del rendimiento del material encapsulante en cuanto a la cantidad de cápsulas obtenidas durante el proceso de secado, sin embargo estos resultados no pueden escalarse a nivel industrial, en donde el rendimiento podría ser diferente.

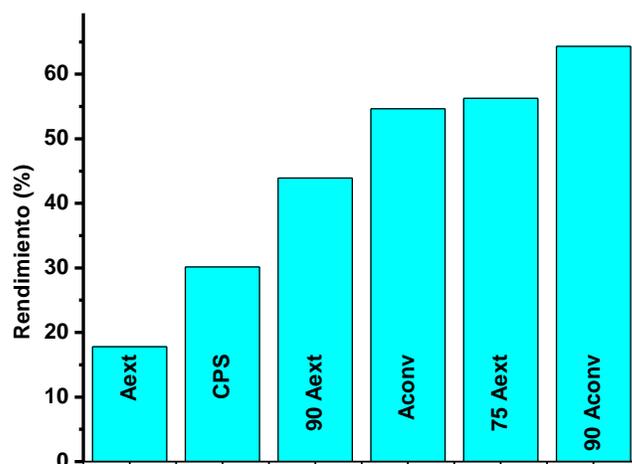


Figura 8. Tendencia del rendimiento del material encapsulante en cuanto a la cantidad de cápsulas obtenidas después del secado por aspersión de la solución matriz.

8.4 Determinación del tiempo de adición de las bacterias encapsuladas durante el proceso de elaboración del yogurt

El objetivo de este experimento fue determinar si existía alguna diferencia significativa al adicionar las bacterias probióticas encapsuladas al yogurt antes o después de la fermentación de la leche durante el proceso de elaboración del mismo, en cuanto a la disminución de la viabilidad de las bifidobacterias en el yogurt durante 2 semanas y/o al someterlas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después del almacenamiento.

La disminución del pH de la leche durante su proceso de fermentación fue similar para las muestras en las que se fermentó en presencia del cultivo iniciador comercial y de *B. breve* encapsulado y en las que se fermentó únicamente en presencia del cultivo iniciador comercial (*Cuadro 5*). Por lo que desde el punto de vista técnico de la fermentación de la leche durante el proceso de producción del yogurt, la presencia de *B. breve* no parece modificar la forma en que tradicionalmente se realiza (sin el cultivo probiótico únicamente con el iniciador).

Esto se puede atribuir a que las células de *B. breve* encapsulado no contribuyeron al proceso de fermentación de la leche, por lo menos no a la disminución de su pH, sin embargo se requieren más análisis para concluir que este microorganismo encapsulado en 90Aext no tiene una participación en el proceso de fermentación de la leche. Por motivos de salubridad no se monitoreó el pH de las muestras del yogurt durante todo el proceso de fermentación, sino solamente al final, el monitoreo en cada hora se realizó en una muestra control que consistió de la leche reconstituida y el cultivo iniciador comercial.

Cuadro 5. pH de la leche después de 5.4 horas de fermentación en presencia de cultivo láctico iniciador comercial y del cultivo láctico iniciador más microorganismos probióticos (Antes1 y Antes 2) en el proceso de preparación de yogurt.

Control	Antes	Error estándar	Después	Error estándar
4.58 ^a	4.55 ^a	0.03	4.615 ^a	0.025

Como se puede ver en la *Figura 9*, las bacterias encapsuladas en 90Aext y adicionadas a la leche antes de su fermentación durante el proceso de elaboración del yogurt, incrementaron su número inicial aproximadamente en 0.8 log presumiblemente a lo largo del proceso de fermentación de la leche con el cultivo iniciador a 42°C durante aproximadamente 6 h. Dicho número de bacterias se mantuvo durante las 2 semanas de almacenamiento a 4°C. Por otra parte, las bacterias encapsuladas adicionadas a la leche ya fermentada no mostraron este incremento y únicamente mantuvieron su número inicial durante el almacenamiento de 2 semanas. Este incremento significativo en el número de microorganismos probióticos en las muestras en las que se agregaron junto con el cultivo iniciador se ha atribuido a que las condiciones de fermentación de la leche favorecieron no sólo el desarrollo del cultivo iniciador sino también el de *B. breve*. Picot y Lacroix (2004) reportaron un ligero incremento de las bacterias probióticas libres, adicionadas antes de la fermentación junto con el cultivo iniciador, durante la fermentación de la leche, sin embargo no se reporta dicho hallazgo para las

bacterias encapsuladas. Se ha reportado además que la inoculación de la leche con el cultivo probiótico antes de su fermentación brinda mayor tolerancia a las bacterias probióticas a las condiciones ambientales al crecer junto con el cultivo iniciador (Gardini *et al.*, 1999).

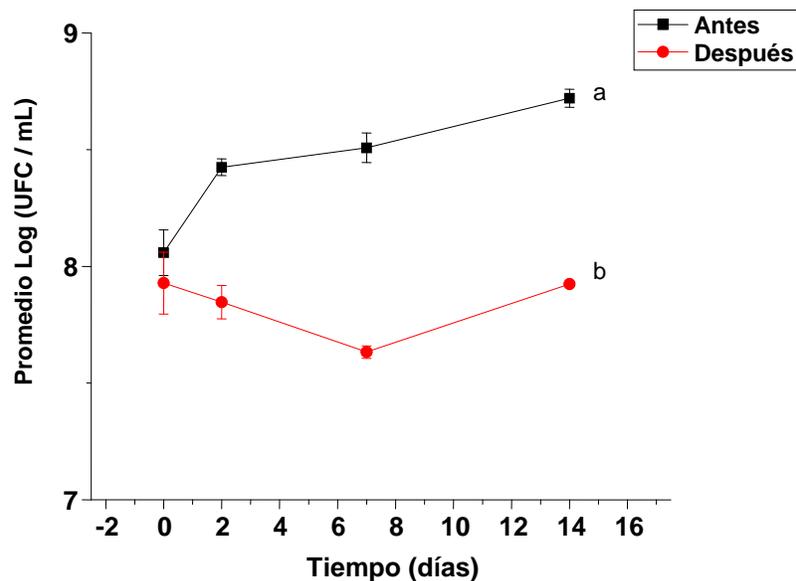


Figura 9. Viabilidad de *B. breve* encapsulado en 90 Aext, adicionado a la leche antes o después de la fermentación en el proceso de la elaboración del yogurt y almacenado durante 2 semanas.

Al ser sometidas las células, después de ser almacenadas en yogurt durante dos semanas, a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal se puede ver que tanto las células encapsuladas adicionadas antes como las adicionadas después de la fermentación de la leche disminuyeron su viabilidad en aproximadamente 1 log con respecto a su número antes de ser sometidas a las condiciones gastrointestinales simuladas (Figura 10). Las bacterias agregadas antes de la fermentación de la leche se mantuvieron en un número

significativamente mayor que las agregadas después, al final de su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Esta predominancia en número se mantuvo durante todo el experimento, desde el final de la fermentación de la leche hasta el final de su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas, a pesar de haber sido agregadas inicialmente en el mismo número que las que se agregaron después del proceso de fermentación. Por ello y tomando en cuenta que en estudios previos se ha agregado el microorganismo probiótico antes de la fermentación de la leche (Sultana *et al.*, 2000; Picot y Lacroix, 2004; Kailasapathy, 2006) y que desde el punto de vista tecnológico es preferible adicionar el cultivo probiótico junto con el iniciador, pues representa un paso menos en el proceso de producción, se decidió adicionar las cápsulas antes del proceso de acidificación, junto con el cultivo láctico iniciador, para todos los materiales que se probaron en yogurt como alimento modelo en experimentos subsecuentes.

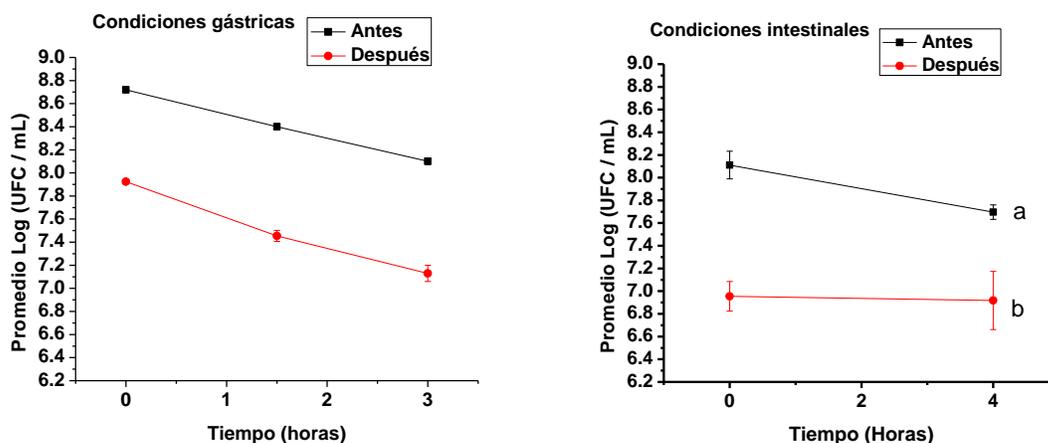


Figura 10. Exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de *B. breve* encapsulado, adicionado a la leche antes o después de su fermentación durante el proceso de elaboración del yogurt y almacenado durante 2 semanas.

8.5 Viabilidad en yogurt de *B. breve* encapsulado en materiales modificados por método convencional

En cuanto a la viabilidad de *B. breve* encapsulado en matrices de almidón alto en amilosa modificadas por método convencional y adicionado en la leche junto con el cultivo iniciador comercial antes de la fermentación de la leche durante el proceso de elaboración del yogurt, en la *Figura 11* se muestra como durante la fermentación de la leche *B. breve*, tanto libre como encapsulado, mostró una tendencia a incrementar su número, fenómeno observado también en el experimento previo (*ver 8.4*). En este caso el único material que no mostró un incremento significativo en el número de bacterias durante la fermentación fue el CPS. El incremento de *B. breve* encapsulado en Aconv y 90 Aconv, así como del microorganismo libre fue de alrededor de 0.5 log.

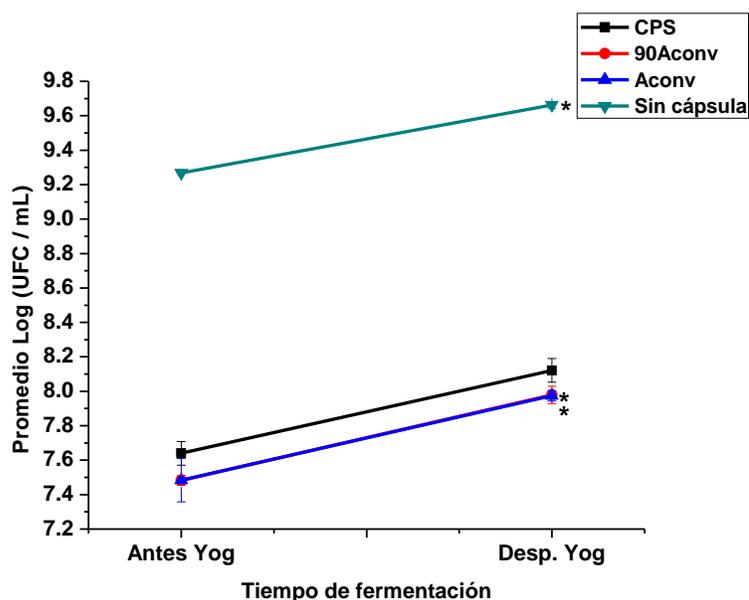


Figura 11. Cambio en el número de células de *B. breve* tanto encapsulado en materiales modificados por método convencional y CPS como en el de *B. breve* no encapsulado durante la fermentación de la leche (42°C / 6 h) en el proceso de elaboración del yogurt. Los asteriscos indican diferencias significativas en la viabilidad del microorganismo antes y después del proceso de fermentación de la leche. Los resultados mostrados fueron obtenidos a partir de dos réplicas.

En la *Figura 12* se observan los resultados de la viabilidad de *B. breve* durante el almacenamiento de yogurt por 4 semanas a 4°C en su forma libre y encapsulado en matrices modificadas por método convencional y en concentrado de proteína de suero. A pesar de que entre la semana cero y la cuatro todos los materiales mostraron una disminución significativa en el número de células de *B. breve* con respecto a su número inicial, en el *Cuadro 6* puede observarse que la mayor disminución de la viabilidad fue mostrada por las células sin cápsula, seguidas de las células encapsuladas en Aconv. Las células encapsuladas en CPS y 90Aconv son las que menor disminución de su viabilidad mostraron durante el almacenamiento en yogurt. La sobrevivencia de la cepa ATCC 15700 de *B. breve*, utilizada en el presente estudio, encapsulada en una matriz de concentrado de proteína de suero fue mayor a la reportada por Picot y Lacroix, quienes obtuvieron una disminución de 5 log en 28 días de la cepa BB R070 de *B. breve* encapsulada en aislado de proteína de suero. Esta diferencia en la sobrevivencia entre las dos cepas de bifidobacterias puede atribuirse a una tolerancia de las bifidobacterias a las condiciones de almacenamiento del yogurt dependiente de la cepa previamente observada (Hussein y Kebary, 1999; Picot y Lacroix, 2004) y/o a la protección específica brindada por los materiales.

Cuadro 6. Disminución de la viabilidad de *B. breve*, encapsulado en matrices de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional, CPS y una mezcla de ambos, durante su almacenamiento en yogurt por 4 semanas a 4°C.

Material encapsulante	Disminución promedio de la viabilidad de <i>B. breve</i> Log (UFC / mL)	Error estándar
Sin cápsula	1.3462359 ^a	0.25014663
CPS	0.59145843 ^{ab}	0.24228139
90 Aconv	0.54751627 ^{ab}	0.14574383
Aconv	0.454947 ^b	0.08169658

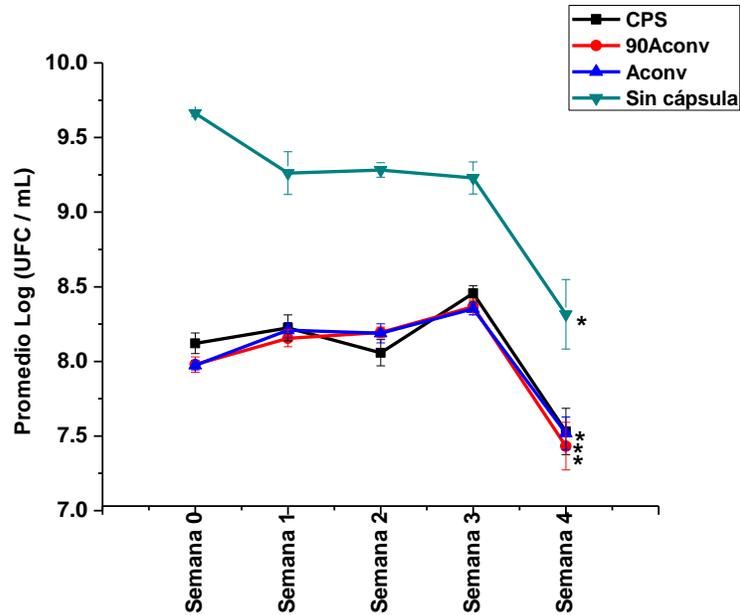


Figura 12. Cambio en la viabilidad de *B. breve* encapsulado en materiales modificados por método convencional y concentrado de proteína de suero, durante su almacenamiento en yogurt durante 4 semanas a 4°C. Los asteriscos indican diferencias en la viabilidad entre la semana 0 y la 4 para cada material.

8.6 Exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de *B. breve* libre y encapsulado en materiales modificados por método convencional y CPS

Al exponer las muestras de yogurt almacenadas por 4 semanas, con bacterias encapsuladas y en su forma libre a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, se observó que durante la etapa de exposición a condiciones gástricas simuladas (pH 2) no hubo diferencias significativas en la disminución de la viabilidad de las bacterias encapsuladas o libres, lo cual se atribuyó a que las bacterias estaban ya adaptadas a un pH ácido al ser el pH del yogurt de 4.5. Sin embargo, durante la exposición a condiciones intestinales simuladas (pH 7.5) se observó una disminución significativa de la viabilidad de las bacterias encapsuladas en todos los materiales y de las no encapsuladas con excepción de

las encapsuladas en CPS que no mostraron diferencia significativa con respecto a su número al inicio de la exposición a las condiciones intestinales (*Figura 13*). Las bacterias no encapsuladas mostraron la mayor disminución en viabilidad, teniendo una disminución durante la exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de 4.8 log (*Cuadro 7*), y una disminución total desde el inicio de su almacenamiento en yogurt hasta este punto de más de 6 log (*Cuadro 10*). Las bacterias que mejor soportaron el tránsito por las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal fueron las encapsuladas en CPS que tuvieron una disminución total, desde el inicio del almacenamiento en el yogurt hasta el final de las condiciones intestinales simuladas, de 1.7 log. Las bacterias encapsuladas tanto en Aconv como en 90 Aconv tuvieron una sobrevivencia intermedia entre las no encapsuladas y las encapsuladas en CPS y mostraron una disminución de la viabilidad total aproximada de 3.3 (*Cuadro 8*); la mayor reducción en la viabilidad se dio principalmente durante la exposición de las bacterias encapsuladas en estos materiales a las condiciones intestinales simuladas. Nuestros resultados en cuanto a la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal se contraponen con los resultados obtenidos por Picot y Lacroix (2004) quienes obtuvieron una disminución dramática (6 log) en el número de microorganismos vivos encapsulados durante su exposición a condiciones gástricas simuladas, número que no sólo no disminuyó durante la subsecuente exposición a condiciones intestinales simuladas, sino que durante esta etapa el número de bacterias viables se incrementó en 3.5 log. Se debe de tomar en consideración que la metodología utilizada en el presente trabajo y la utilizada por Picot y Lacroix (2004) en cuanto a la exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal es diferente, por lo que la comparación debe de tomarse con reservas. La sobrevivencia de las células encapsuladas y no encapsuladas durante su tránsito por condiciones gastrointestinales simuladas obtenida en el presente trabajo concuerda con lo obtenido por Kos *et al.* (2000) en cuanto a que el número de bacterias sobrevivientes disminuyó durante toda la progresión de la exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, sin embargo estos autores

obtuvieron una mayor disminución en la viabilidad durante la exposición a condiciones gástricas simuladas en comparación con la obtenida en este trabajo.

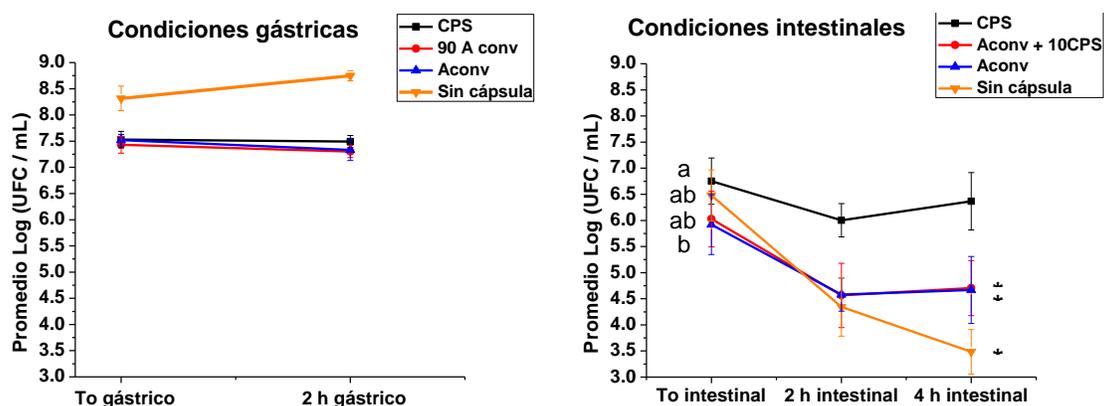


Figura 13. Cambio en la viabilidad de *B. breve* encapsulado en concentrado de proteína de suero, almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional, una mezcla de éste con CPS (10%) y de bacterias libres, durante su exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas. Los resultados son producto de tres réplicas.

Cuadro 7. Disminución de la viabilidad de células de *B. breve*, encapsuladas en materiales modificados por método convencional, CPS y sin encapsular, durante su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.

Material encapsulante	Disminución promedio de la viabilidad de <i>B. breve</i> Log (UFC / mL)	Error estándar
Sin cápsula	4.832108267 ^a	0.2514016
Aconv	2.852349833 ^b	0.20544058
90 Aconv	2.726359667 ^b	0.08217205
CPS	1.164717267 ^c	0.04427893

Cuadro 8. Disminución de la viabilidad de células de *B. breve*, encapsuladas en materiales modificados por método convencional, CPS y sin encapsular, desde el inicio de su almacenamiento en yogurt hasta el final de su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Material encapsulante	Disminución promedio de la viabilidad de <i>B. breve</i> Log (UFC / mL)	Error estándar
Sin cápsula	6.178344167 ^a	0.11691762
Aconv	3.307296833 ^b	0.21390758
90 Aconv	3.273875933 ^b	0.17253325
CPS	1.7561757 ^c	0.23701581

En la *Figura 14* se muestra un estimado del porcentaje de bacterias que resultaron fuertemente estresadas (detectable por la adición de 2% NaCl al medio de cultivo) durante la fermentación y tránsito por las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Durante la fermentación el único material que muestra diferencia significativa es el CPS en el cual aparentemente el número de bacterias estresadas disminuyó significativamente después de dicho proceso. En cuanto al nivel de estrés de las células durante la exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal no se encontró ninguna diferencia significativa para ninguno de los materiales encapsulantes ni para las células sin encapsular en el caso de los materiales encapsulados en materiales modificados por método convencional (*Figura 14-A*).

El método utilizado para la evaluación del nivel de estrés de las bacterias encapsuladas y no encapsuladas durante los diferentes pasos del proceso no mostró tendencias claras que lleven a conclusiones precisas, e incluso en varios de los ensayos las bacterias crecieron mejor en el medio adicionado de 2% de NaCl que en el no adicionado por lo que parece no ser un método adecuado para dicho fin. Se requiere de más análisis utilizando otro medio de detección de estrés para la cepa de *B. breve* utilizada en este estudio para poder concluir más

precisamente sobre el estrés de las bacterias ocasionado por los diferentes procesos a las que fueron sometidas.

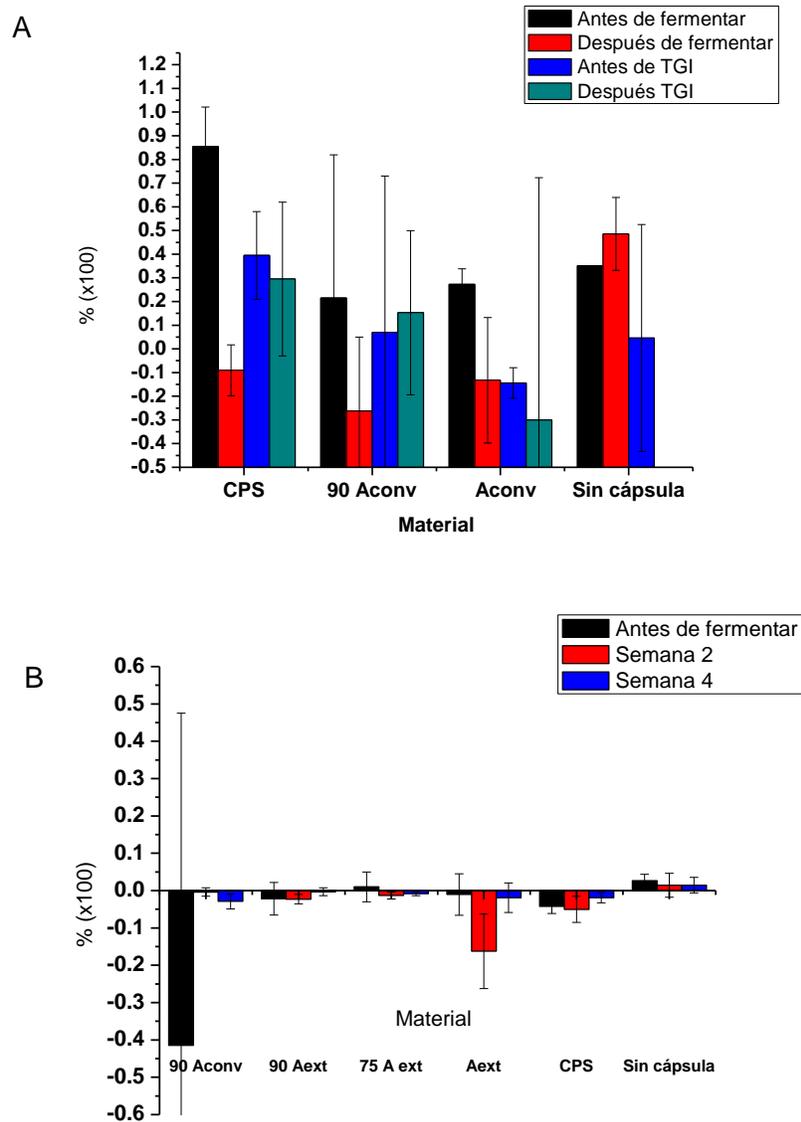


Figura 14. Porcentaje de células de *B. breve* que resultaron estresadas durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, detectado por la adición de 2% de NaCl en su medio de cultivo. **A.** encapsuladas en materiales modificados por método convencional, CPS y sin encapsular **B.** Encapsuladas en materiales fosfatados por método convencional y por extrusión, CPS y sin encapsular.

8.7 Viabilidad en yogurt de *B. breve* encapsulado en materiales modificados por método convencional y por extrusión

La fermentación de la leche durante el proceso de elaboración del yogurt en presencia del cultivo iniciador y del cultivo probiótico dio como resultado una tendencia a incrementar el número de células probióticas durante este proceso. En este experimento el incremento en el número de bacterias durante la fermentación de la leche fue significativo únicamente para los microorganismos encapsulados en CPS, 90 Aconv y para las células sin cápsula. La tendencia en el incremento en el número de las bacterias probióticas durante la fermentación de la leche coincide con resultados previamente obtenidos en este trabajo (*Figura 9 y 11*) y los cuales se han discutido con más detalle en apartados previos, sin embargo se tienen resultados diversos con respecto a los materiales que presentan una diferencia significativa en el incremento del número de bacterias durante este paso del proceso de elaboración del yogurt. Mientras que las células no encapsuladas y las encapsuladas en 90 Aconv mostraron este incremento significativo todas las veces; el CPS, el 90 Aext y el Aconv sólo tuvieron un incremento significativo en uno de dos ensayos, siendo los únicos que nunca mostraron un incremento significativo el Aext y su combinación con 25% CPS.

Después de la fermentación de la leche, durante el almacenamiento del yogurt con bacterias encapsuladas y libres se observa que únicamente las bacterias sin cápsula disminuyeron significativamente su número en la cuarta semana (*Figura 16*). En el *Cuadro 9* se muestra que las bacterias sin cápsula mostraron una reducción de aproximadamente 0.3 log durante sus 4 semanas de almacenamiento en yogurt mientras que todas las bacterias encapsuladas conservaron su número e incluso tuvieron una ligera tendencia, aunque no significativa, a incrementarlo.

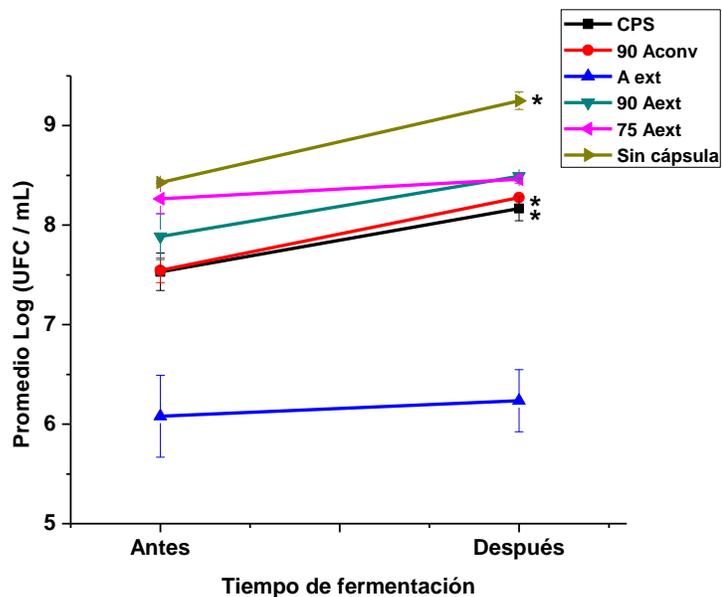


Figura 15. Viabilidad de *B. breve* encapsulado en materiales modificados convencionalmente o por extrusión durante la fermentación de la leche en el proceso de elaboración del yogurt. El asterisco indica diferencia para el material marcado entre antes y después de la fermentación.

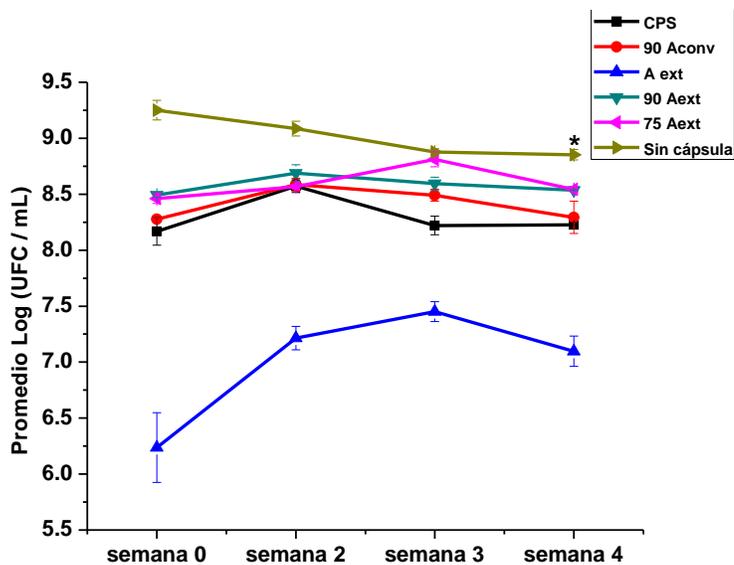


Figura 16. Viabilidad en yogurt de *B. breve*, encapsulado en materiales modificados por método convencional o por extrusión, almacenado en yogurt durante 4 semanas.

Cuadro 9. Disminución de la viabilidad de células de *B. breve*, encapsuladas en materiales modificados por método convencional, por extrusión, en CPS y sin encapsular, durante su almacenamiento en yogurt.

Material encapsulante	Disminución promedio de la viabilidad de <i>B. breve</i> Log (UFC / mL)	Error estándar
Sin cápsula	0.35341 ^a	0.10571283
CPS	-0.05948 ^a	0.14148546
90 Aconv	-0.01658 ^{ab}	0.13433786
75 Aext	-0.0818 ^{ab}	0.04601482
Aext	-0.86084 ^{ab}	0.34450491
90 Aext	-0.04207 ^b	0.02312288

8.8 Exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de *B. breve* libre y encapsulado en materiales modificados por método convencional, por extrusión y en CPS

Como se puede observar en la *Figura 17*, el comportamiento en cuanto a la viabilidad de las células de *B. breve* encapsuladas tanto en materiales modificados por método convencional como por extrusión mostró una tendencia a mantener su número durante la exposición a condiciones gástricas simuladas, tendencia que se observó también en experimentos previos reportados en el presente documento (*Figuras 10 y 13*) y que se ha discutido con anterioridad. Sin embargo, el comportamiento de los materiales fosfatados por extrusión fue diferente al mostrado en experimentos previos (*Figura 10*) en donde se ve una disminución gradual de la viabilidad de los microorganismos encapsulados en 90Aconv a diferencia del presente experimento (*Figura 17*) en donde se ve una disminución notoria del número de microorganismos, tanto encapsulados en todos los materiales como libres, al inicio de su exposición a condiciones intestinales simuladas, siendo los microorganismos que mayor disminución mostraron los que

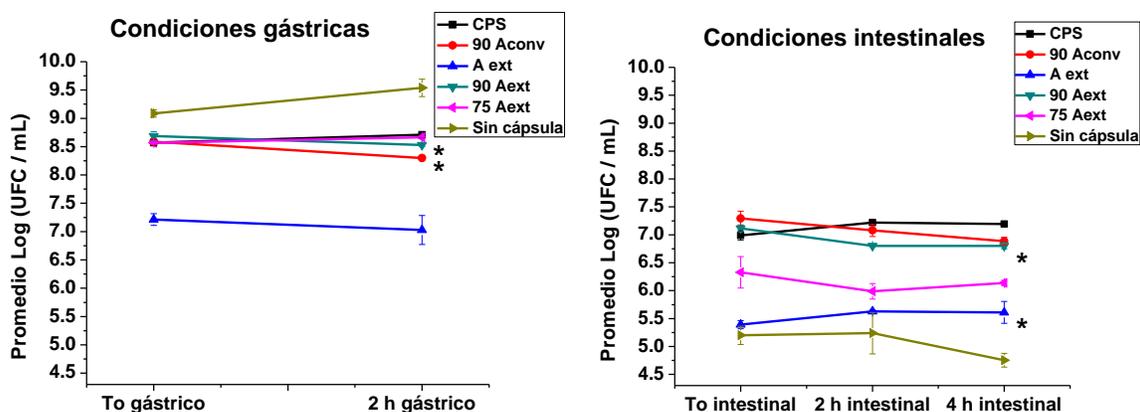


Figura 17. Viabilidad de *B. breve* encapsulado en materiales modificados por método convencional y por extrusión, en CPS y sin encapsular durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Los asteriscos indican diferencias significativas en el material marcado entre el tiempo cero y el último tiempo monitoreado ya sea de las condiciones gástricas o intestinales.

Cuadro 10. Disminución de la viabilidad de *B. breve*, encapsuladas en materiales modificados por método convencional, por extrusión, en CPS y sin encapsular, durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Material encapsulante	Disminución promedio de la viabilidad de <i>B. breve</i> Log (UFC / mL)	Error estándar
Sin cápsula	4.268536 ^a	0.12965035
25 Aext	2.443548 ^b	0.06299642
90 Aext	1.886153 ^c	0.02507028
90 Aconv	1.67794 ^c	0.00488958
Aext	1.604064 ^c	0.1365087
CPS	1.425319 ^c	0.06730057

carecían de cápsula. Esta diferencia en la disminución de la viabilidad entre ambos experimentos se ha atribuido a una sensibilidad marcada de los microorganismos al cambio de condiciones gástricas a intestinales, especialmente el pH, pues la única diferencia entre ambos experimentos fue que al transferir las

bacterias del jugo gástrico al jugo intestinal en el primer experimento se utilizó buffer de fosfatos, mientras que en el segundo caso no se utilizó. Se requieren sin embargo estudios posteriores para confirmar esta atribución.

8.9 Observación de las cápsulas en Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

Las imágenes obtenidas a través de la microscopía electrónica de barrido muestran la superficie de las cápsulas que contienen a las bacterias. Como se puede ver en las *Figuras 18 a 22* a partir de todos los materiales se obtuvieron cápsulas de diversos tamaños y morfologías. En el caso de las cápsulas de CPS se observaron algunas cápsulas predominantemente redondas con algunas cavidades en la superficie y cuyo tamaño va desde aproximadamente de 1 a 30 μm (*Figura 22*), a diferencia de las cápsulas de almidón alto en amilosa tanto fosfatado por método convencional como por extrusión en donde se observan cápsulas con morfología alargada (*Figuras 20 y 21*). Estas tendencias en la morfología de las cápsulas puede atribuirse a diferencias intrínsecas en los gránulos del material encapsulante pues se ha reportado que el almidón alto en amilosa tiende a tener una morfología alargada la cual se ha atribuido a que las moléculas de amilosa de un gránulo en el amiloplasto interactúan y forman dobles hélices con moléculas de amilosa de gránulos adyacentes evitando así la división del amiloplasto y dando como resultado gránulos alargados (Jiang *et al.*, 2010).

Por otra parte, los gránulos de almidón alto en amilosa fosfatados tanto por método convencional como por extrusión también mostraron algunas diferencias entre sí. Las cápsulas de almidón alto en amilosa fosfatado por extrusión (*Figura 21C*) muestran una forma menos definida y más partículas pequeñas dispersas, de formas amorfas en comparación con las cápsulas de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional (*Figura 20C*) cuyo tamaño es más uniforme y cuya forma se muestra mejor definida predominando cápsulas de forma alargada y en forma de dona. Esta diferencia entre los

materiales modificados por método convencional y por extrusión confirma el daño que sufren los gránulos de almidón al ser sometidos a las condiciones extremas de presión y temperatura (Chang y Lii, 1992). Esta pérdida de integridad de los gránulos expuestos a las condiciones extremas del extrusor también se mostró en otros resultados obtenidos en el presente estudio como el incremento en el ISA e IAA.

En el caso de las cápsulas de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional o por extrusión y 10% de concentrado de proteína de suero (*Figuras 18 y 19*) muestran predominantemente formas alargadas aunque también muestran algunas cápsulas redondas tal como se esperaba por la combinación de materiales. En estas cápsulas también se observó una mayor pérdida de integridad de los gránulos sometidos al proceso de extrusión que los fosfatados por el método convencional.

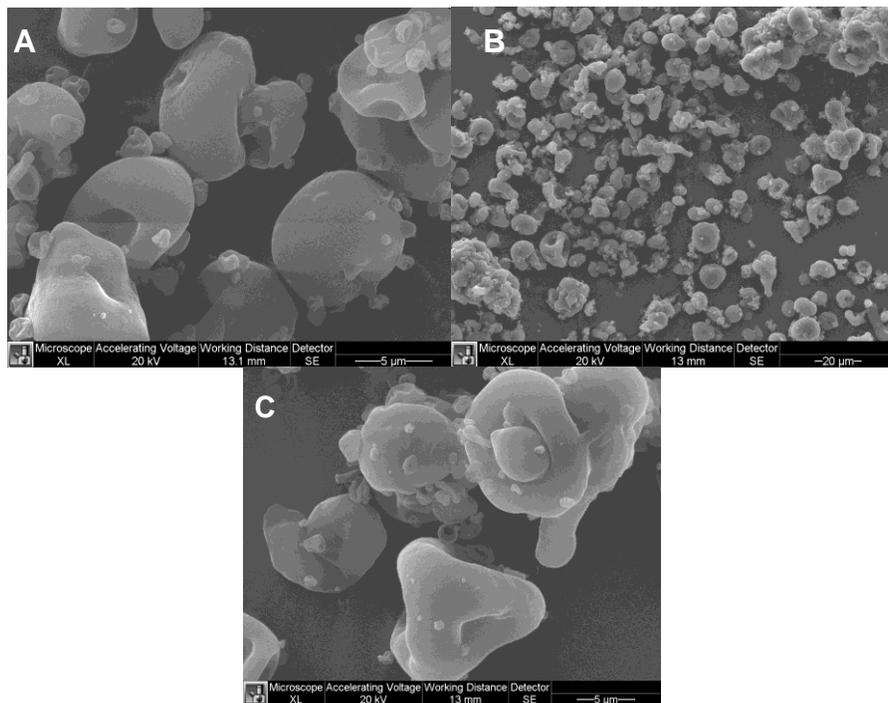


Figura 18. Imágenes SEM de las cápsulas de 90% almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional más 10% concentrado de proteína de suero (90Aconv). Resoluciones: **A.**1500x; **B.** 10000x; **C.** 8000x

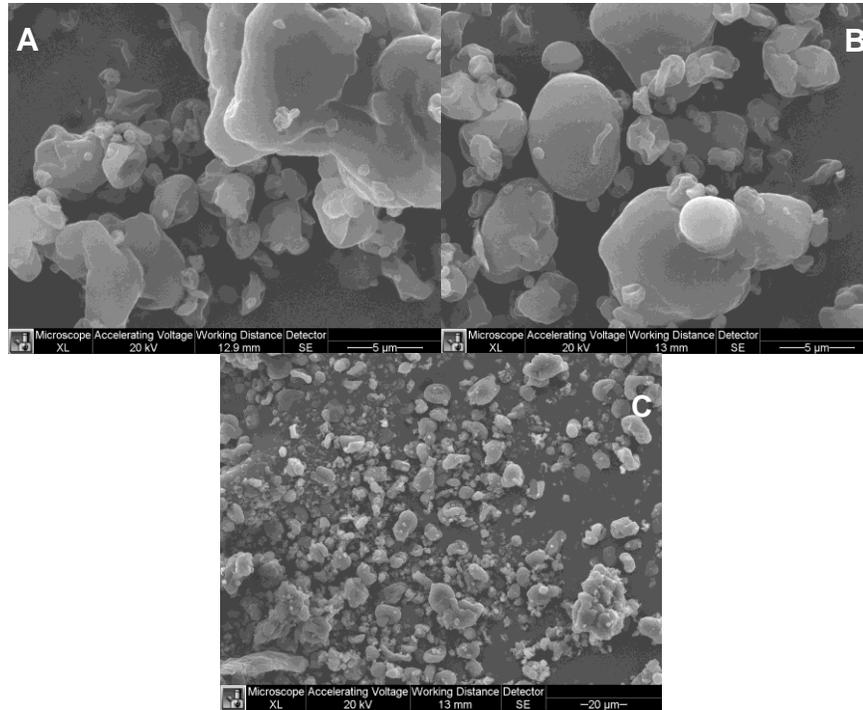


Figura 19. Imágenes SEM de las cápsulas de 90% almidón alto en amilosa fosfatado por extrusión más 10% concentrado de proteína de suero (90Aext). Resoluciones: **A.** 10000x; **B.** 10000x; **C.** 1500x

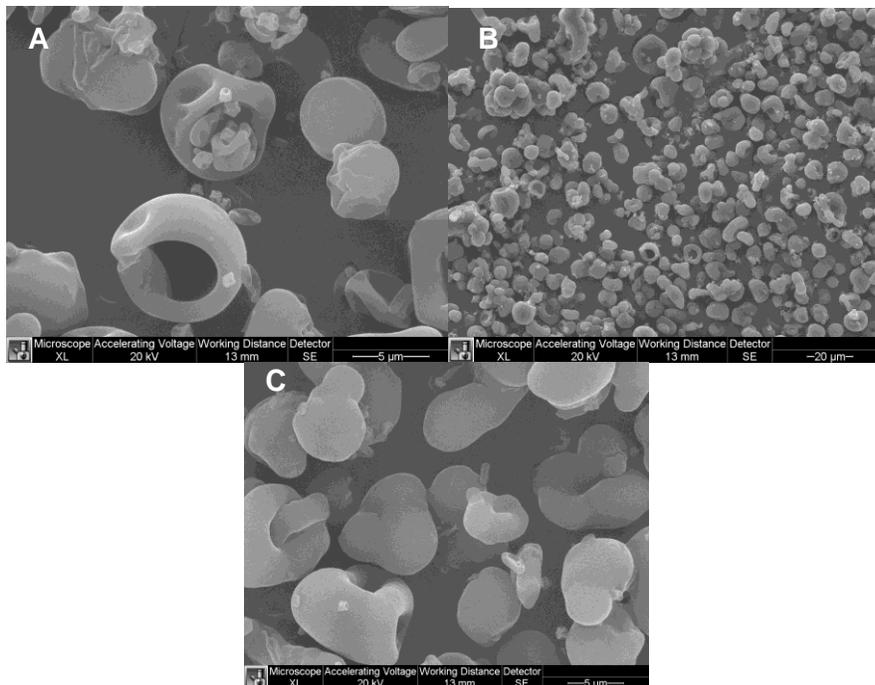


Figura 20. Imágenes SEM de las cápsulas de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional (Aconv). Resoluciones: **A.** 10000x; **B.** 1500x; **C.** 8000x

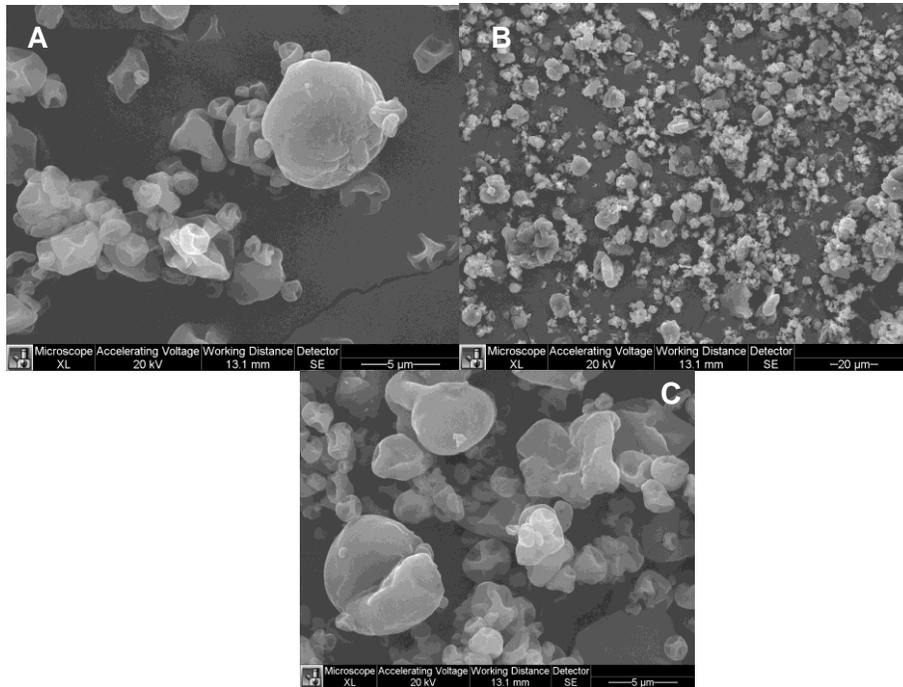


Figura 21. Imágenes SEM de las cápsulas de almidón alto en amilosa fosfatado por extrusión (Aext). Resoluciones: **A.** 10000x; **B.** 1500x; **C.** 10000x

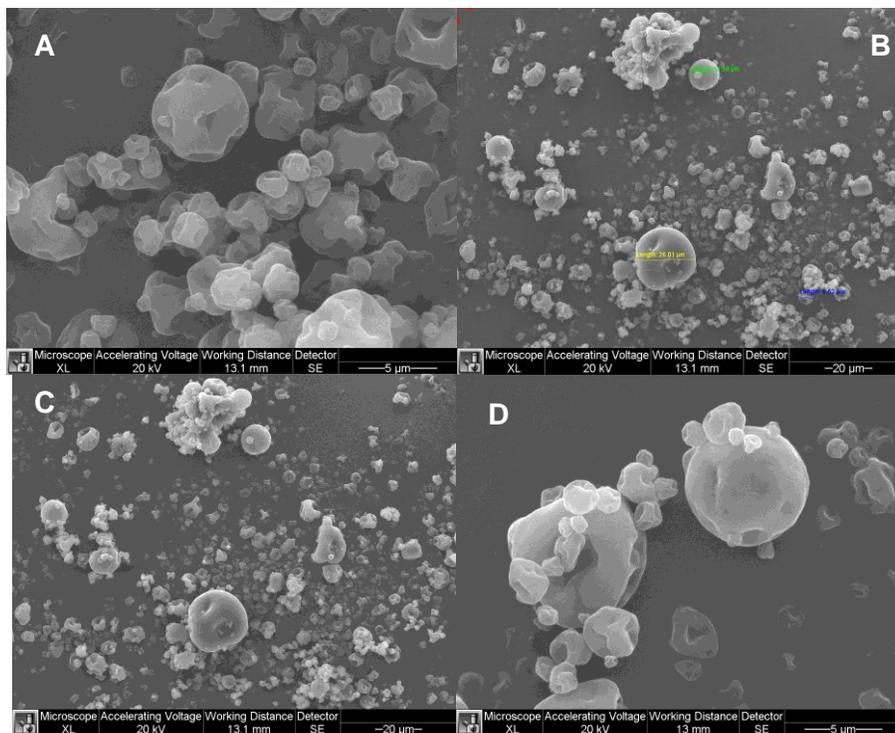


Figura 22. Imágenes SEM de las cápsulas de concentrado de proteína de suero (CPS). Resoluciones: **A.** 10000x; **B.** 1500x; **C.** 1500x; **D.** 10000x

8.10 Observación de las cápsulas en Microscopio Confocal

De acuerdo a la imagen obtenida en el microscopio confocal de las cápsulas de CPS teñidas con FITC, se puede observar que el tamaño de éstas está alrededor de los 10 μm , lo cual se encuentra dentro del intervalo observado en las imágenes obtenidas en el SEM en donde se obtuvieron cápsulas de entre 1 y alrededor de 30 μm , la diferencia puede deberse al segmento de observación de las cápsulas al momento de tomar la fotografía. A pesar de estar juntos entre sí en la imagen, se puede apreciar que los gránulos tienen una forma esférica predominantemente con algunas imperfecciones en la superficie, las cuales se pueden observar mejor en las imágenes obtenidas del SEM para este material (*Figura 23*). El colorante FITC se ha utilizado para la fluorescencia de proteínas (Picot y Lacroix, 2006) dando una coloración verde.

En el caso de las cápsulas de Aconv, se observa en la *Figura 24* como algunas cápsulas muestran un color verde brillante con otras más oscuras en el fondo que parecen no haberse teñido y que son la mayoría. El colorante Congo Red se ha utilizado con gran eficacia para detectar carbohidratos como quitina y colágeno (Michels y Büntzow, 2010), para la detección de β -glucanos y compuestos de celulosa en paredes celulares y más recientemente para teñir gránulos que han sido dañados por algún proceso, como cocción (Lamb y Joy, 2005). Se ha atribuido la predominancia del colorante verde y de las cápsulas no teñidas en nuestras imágenes de las cápsulas de Aconv a que los gránulos estaban íntegros y no se tiñeron de rojo. Las cápsulas de almidón modificado por extrusión muestran por su parte algunos gránulos teñidos en rojo que indican la presencia del almidón en las cápsulas, almidón que además ha sido dañado por las altas temperaturas y presión del proceso de extrusión (*Figura 25*).

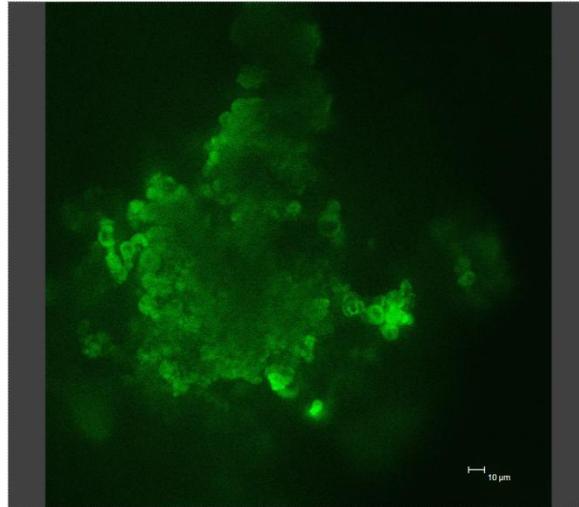


Figura 23. Imágenes en microscopio confocal de cápsulas de *B. breve* en CPS.
Resolución 20x

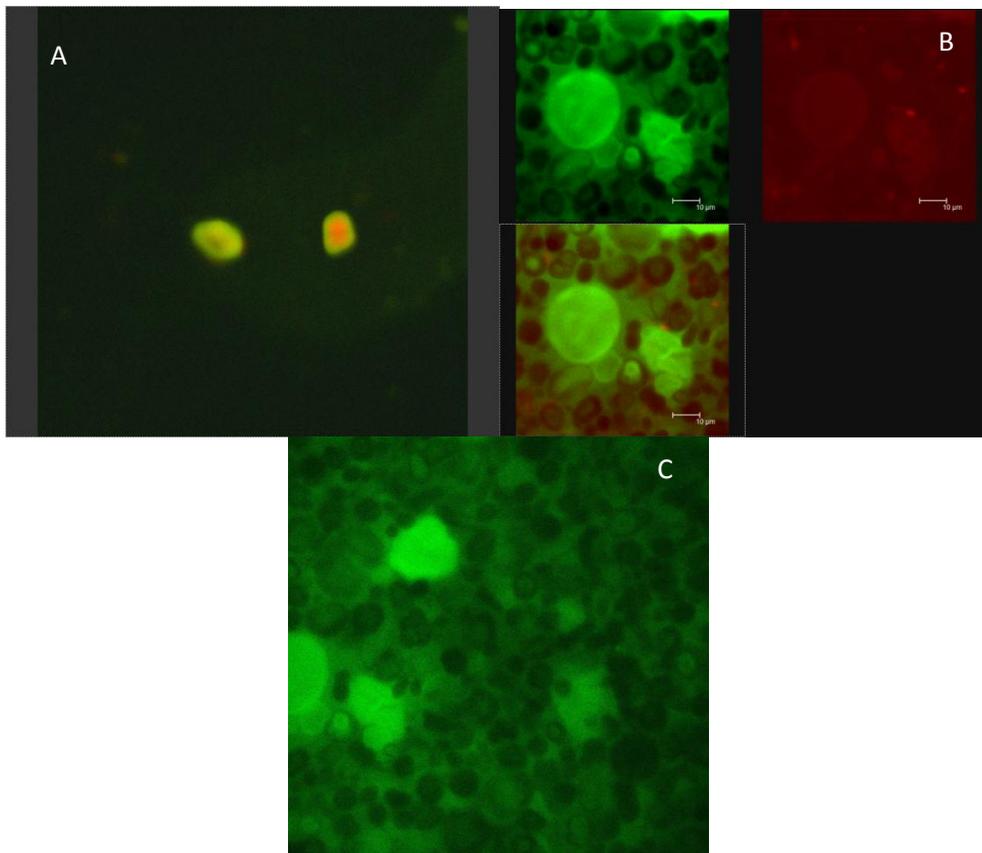


Figura 24. Imágenes en microscopio confocal de cápsulas de *B. breve* en 90 Aconv.
Resolución 100x

En cuanto a la estructura de las cápsulas compuestas tanto de almidón (90%) como de proteína (10%), la *Figura 24-A* da una idea de cómo pueden estar conformadas las cápsulas. Se observa la parte interior de la cápsula en rojo, lo cual es indicativo de la presencia de carbohidratos y la parte exterior en verde, es decir, conformada de proteína.

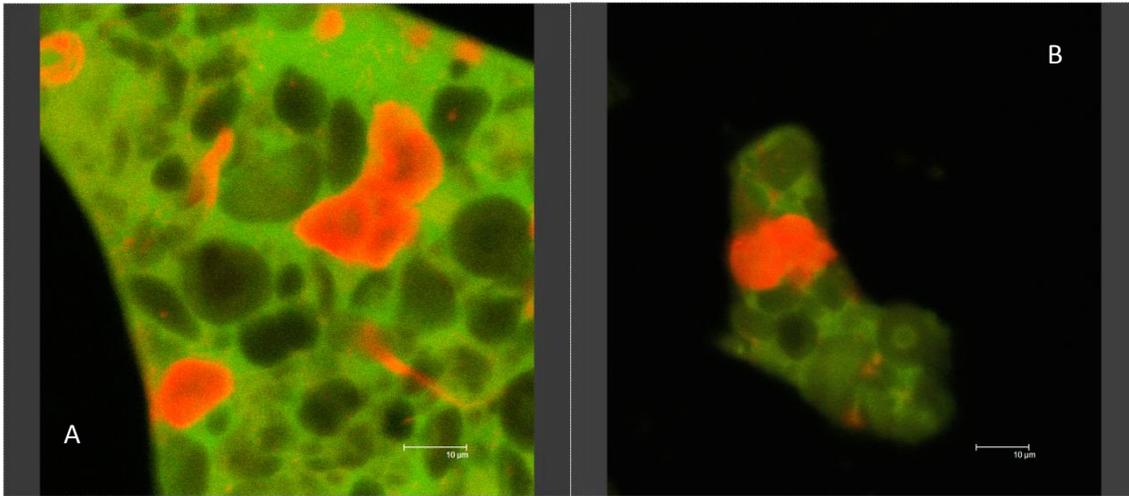


Figura 25. Imágenes en microscopio confocal de cápsulas de *B. breve* en 90 Aext. Resolución 100x

9. CONCLUSIONES

En cuanto a la fosfatización, el proceso de extrusión además de ser un método que no requiere una cantidad excesiva de reactivos lo cual es favorable desde el punto de vista económico y del cuidado del ambiente, es más eficiente en cuanto a la fosfatización de almidón alto en amilosa que el método convencional en horno. Sin embargo, el grado de degradación del gránulo al que conlleva el proceso de extrusión se ve reflejado en ciertas propiedades del gránulo como un incremento en el ISA e IAA.

En cuanto al método de encapsulación, el secado por aspersión tanto del almidón alto en amilosa como del concentrado de proteína de suero a una temperatura de entrada de 160°C, da como resultado cápsulas con un contenido de humedad aceptable (entre 3 y 6%) para la estabilidad del producto durante su almacenamiento. Además, dicha temperatura permite la sobrevivencia de los microorganismos probióticos encapsulados.

En cuanto a las cepas de probióticos, se determinó que la cepa ATCC 15700 de *B. breve* alcanza el final de la fase logarítmica tardía de su crecimiento aproximadamente entre las 15 y 24 h de cultivo. El medio de cultivo óptimo para el crecimiento de esta bacteria fue el agar MRS, sin la adición de L-cisteína-HCL. Por otra parte, la vancomicina en la concentración probada en este estudio no disminuye el crecimiento de *B. breve* ATCC 15700 en comparación con su crecimiento en agar MRS-c aunque si existe un crecimiento significativamente menor en presencia de este antibiótico al compararlo con su crecimiento en agar MRS.

En cuanto a la viabilidad de los microorganismos, durante el secado por aspersión los materiales que mayor protección brindaron al microorganismo fueron el CPS, 90 Aext y 75 Aext. Sin embargo, el comportamiento de los materiales, en cuanto a la preservación de la viabilidad de las células encapsuladas, durante su almacenamiento en yogurt y subsecuente exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal fue diferente y mostró variaciones en los diferentes experimentos realizados. En general, al final de la exposición a las condiciones gastrointestinales simuladas, la protección del microorganismo fue mayor en matrices de CPS, seguido de matrices de almidón alto en amilosa fosfatadas tanto por método convencional como por extrusión, siendo las células no encapsuladas las que mayor disminución en su viabilidad mostraron.

En cuanto a la incorporación de las bacterias probióticas en el proceso de elaboración del yogurt se observó que éstas pueden adicionarse a la leche junto con el cultivo iniciador, previo a la fermentación. Esto resulta adecuado no solamente desde el punto de vista tecnológico pues no altera los pasos del

proceso original de elaboración del yogurt, sino que además durante la fermentación de la leche por el cultivo iniciador también se observó un incremento en el número de las células probióticas lo cual desde el punto de vista económico es favorable pues podría requerirse la adición de una menor cantidad de cultivos probióticos para obtener un alimento funcional.

Se requieren más estudios para demostrar que la cepa de *B. breve* no participa en el proceso de fermentación de la leche durante la producción del yogurt, sin embargo se observó que no aceleró la disminución del pH del yogurt, lo cual es favorable en cuanto a la vida de anaquel del producto.

La utilización de 2% NaCl en el medio de cultivo como indicador de estrés de células de la cepa de *B. breve* estudiada no resultó adecuado, por lo que se requiere probar otros métodos para una determinación más precisa de este parámetro.

Las imágenes obtenidas tanto por microscopía electrónica de barrido (SEM) como por microscopía confocal, indican que el almidón fosfatado por extrusión sufrió una degradación que no sufrió el almidón fosfatado por el método convencional, esto se debe a las condiciones extremas de presión y temperatura inherentes del proceso de extrusión. En las microfotografías además se pudo observar que el tamaño de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersion está alrededor de 10 a 30 μm y que el método utilizado de microencapsulación y/o tamizaje dio como resultado partículas de varios tamaños. Posiblemente la estructura de los gránulos compuestos de una combinación de almidón y proteína involucra el centro de la cápsula compuesto de carbohidratos rodeados de una capa de proteína en el exterior, sin embargo se requieren observaciones con colorantes más específicos para los materiales utilizados para confirmar la observación obtenida.

10. LITERATURA CITADA

- Anal A.K, y S. Harjinder. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends Food Sci. Tech. 18: 240-251.
- Anderson, R. A., H. F. Conway, V. F. Pfeifer y E. L. Griffin. 1969. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. Cereal Sci Today. 14(4-7): 10-12.
- ADA. American Dietetic Association 2009. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. J Am Diet Assoc. 109 (4): 1278 – 1285.
- Axelsson, L. 2004. Lactid Acid Bacteria: Clasification and Physiology. Capítulo 1 en Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. S. Salminen, A. von Wright, y A. Ouwehand, ed. Marcel Dekker, Inc. , Nueva York.
- Ballongue, J. 2004. Bifidobacteria and Probiotic Action. Capítulo 2 en Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. S. Salminen, A. von Wright, y A. Ouwehand, ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Kos, B., J. Suskovic, J. Goreta y S. Matosic. 2000. Effect of Protectors on the Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in Simulated Gastrointestinal Conditions. Food technol biotechnol. 38(2): 121-127.
- Champagne, E.T. 1996. Rice starch composition and characteristics. Cereal Food World. 41: 833-838.
- Champagne, C. P., y N.J. Gardner. 2005. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. Crit Rev Food Sci Nutr. 45:61-84.
- Chávez B. E., A. M. Ledebøer. 2007. Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. Drying Technol. 25: 1193-2101.
- Dave, R.I. y N.P. Shah. 1996. Evaluation Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. J Dairy Sci. 79 : 1529 – 1536.
- Evers, B., M. Petricek, y J. Thiem. 1997. Specificity of amylases and cyclodextrin-glucanotransferase in reactions with 2-deoxymaltosaccharides. Carbohydr Res. 300: 153-159.

- Fávaro-Trindade, C. S., y C.R. Grosso. 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. *J Microencapsul.* 19 (4): 485-494.
- Feller, G., Le Bussy, O., Houssier, C., and Gerday, C. 1996. Structural and functional aspects of chlorine binding to *Alteromonas haloplanktis* α -amylase. *J Biol Chem.* 271: 23836-23841.
- Forseell, P. 2004. Starch in food. Structure, function and applications, Ed. Woodhead Publishing Limited, Inglaterra.
- Gardini, F., R. Lanciotti, M.E. Guerzoni, S. Torriani. 1999. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *Int Dairy J*, 9: 125 – 134.
- Gouin, S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Tech.* 15: 330-347.
- Hung P.V., T. Maeda, D. Miskelly, R. Tsumori, N. Morita. 2008. Physicochemical characteristics and fine structure of high-amylose wheat starches isolated from Australian wheat cultivars. *Carbohydr Polym.* 71: 656-663.
- Hussein, S.A. y K.M.K. Kebary. 1999. Improving viability of bifidobacteria by microentrapment and their effect on some pathogenic bacteria in stirred yogurt. *Acta Aliment Hung.* 28: 113-131.
- INEGI. Mayo de 2009. Encuesta Industrial Mensual Ampliada.
- Iyer, C., y K. Kailasapathy. 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. *J Food Sci.* 70(1): M28-M23.
- Jiang H., H.T. Horner, T.M. Pepper, M. Blanco, M. Campbell, J. Jane. 2010. Formation of elongated starch granules in high amylose maize. *Carbohydr Polym.* 80 : 533 – 538.
- Jones, P. J., y S. Jew. 2007. Functional food development: concept to reality. *Trends food sci tech.* 18: 387-390.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria. *Curr Issues Intest Microbiol.* 3: 39-48.

- Kailasapathy, K. y J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol.* 78: 80-88.
- Kailasapathy, K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Food Sci Technol.* 39: 1221-1227.
- Kashappa Goud, H. D., y J.P. Hyun. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Dry Technol.* 23: 1361-1394.
- Keller L.C., y A.B. Maxcy. 1984. Effect of Physiological Age on Radiation Resistance of Some Bacteria That Are Highly Radiation Resistant. *Appl Environ Microbiol.* 47(5): 915-918.
- Khedkar, C. D., J.M. Mantri, R.D. Garge, S.A. Kulkarni y G.D. Khedkar. 1993. Hypocholesterolemic effect of fermented milks: A review. *Cult Dairy Prod.* 28: 14-18.
- Kolter, R., D.A. Siegele, y A. Tormo. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol.* 47: 855-874.
- Krasaekoopt W., B. Bhandari, H. Deeth. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Review. *Int Dairy J.* 13: 3-13.
- Lamb, J., T. Joy. 2005. Seeing red: the use of Congo Red dye to identify cooked and damaged starch grains in archaeological residues. *J Archaeol Sci.* 32: 1433 – 1440.
- Landerito N.A., Y.J. Wang. 2005a. Preparation and Properties of Starch Phosphates Using Waxy, Common, and High-Amylose Corn Starches. I. Oven-Heating Method. *Cereal Chem.* 82(3): 264–270.
- Landerito N.A., Y.J. Wang. 2005b. Preparation and Properties of Starch Phosphates Using Waxy, Common, and High-Amylose Corn Starches. I. Oven-Heating Method. *Cereal Chem.* 82(3): 271–276.
- Lim S., P.A. Seib. 1993. Preparation and Pasting Properties of Wheat and Corn Starch Phosphates. *Cereal Chem.* 70(2): 137-144.
- Liu H., L. Ramsden, H. Corke. 1999. Physical Properties and Enzymatic Digestibility of Phosphorylated ae, wx, and Normal Maize Starch Prepared at Different pH Levels. *Cereal Chem.* 76(6): 938-943.

- Martín-Martínez, E.S., M.A. Aguilar-Méndez, T. Espinosa-Solares, R.C. Pless, Z.D. Quintana. 2004. Starch Phosphates Produced by Extrusion: Physical Properties and Influence on Yogurt Stability. *Starch/Stärke* 56: 199-207.
- MedlinePlus. 1° de febrero de 2008. Biblioteca Nacional de Medicina de E.E.U.U. Recuperado el 1° de julio de 2009, de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/patient-acidophilus.html>
- Michels, J., M. Büntzowi. 2010. Assessment of Congo red as a fluorescence marker for the exoskeleton of small crustaceans and the cuticle of polychaetes. *J Microsc.* 238: 95 – 101.
- Motohiro, S., M. Yasunobu, Y. Masatsugu, y A. Shuji. 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.
- Mortazavian, A., R.S. Hadi, M.R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran J Biotechnol.* 5 (1): 1-18.
- Murúa-Pagola, B., C. Beristain-Guevara, y F. Martínez-Bustos. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J Food Eng.* 91: 380-386.
- Nabeshima, E.H. y M.V.E. Grossmann. 2001. Functional properties of pregelatinized and cross-linked cassava starch obtained by extrusion with sodium trimetaphosphate. *Carbohydr Polym.* 45: 347-353.
- Nguyen, T.M.P, Y.K. Lee, W. Zhou. 2009. Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. *Int Dairy J.* 19: 410-416.
- O'Brien S., Y.J. Wang, C. Vervaet y J.P. Remon. 2009. Starch phosphates prepared by reactive extrusion as a sustained release agent. *Carbohydr Polym.* 76: 557-566.
- Paschall, E.F. 1964. Phosphation with inorganic phosphate salts. In *methods of Carbohydrate Chemistry*. Vol. 4, R.L. Whistler (Ed.), p. 294. Academic Press, New York.
- Picot, A., y C. Lacroix. 2003a. Optimization of dynamic loop mixer operating conditions for production of o/w emulsion for cell microencapsulation. *Lait.* 83: 237-250.

- Picot, A., y C. Lacroix 2003b. Production of Multiphase Water-Insoluble Microcapsules for Cell Microencapsulation Using an Emulsification/Spray-drying Technology. *J Food Sci.* 68(9): 2693-2700.
- Picot A., y C. Lacroix. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions in yogurt. *Int Dairy J.* 14:505-515.
- Pimentel-González, D. J., R.G. Campos-Montiel, C. Lobato-Calleros, y R. Pedroza-Islas. 2009. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Res Int.* 42: 292-297.
- Roberfroid, M.B. 2000. Defining functional foods. Capítulo 1 en *Functional foods concept to product*. G.R. Gibson y C.M Williams, ed. Woodhead Publishing Limited, Inglaterra
- Sajilata, M.G., R.S. Singhal, P.R. Kulkarni. 2006. Resistant Starch –A Review. *Compr Rev Food Sci F.* 5: 1-17.
- Sammel, L.M., J.R. Claus, M.L. Greaser, J.A. Lucey. 2007. Identifying constituents of whey protein concentrates that reduce the pink color defect in cooked ground turkey. *Meat Science* 77 : 529 – 539.
- Seker, M., H. Sadikoglu, M. Ozdemir, M.A. Hanna. 2003. Phosphorus binding to starch during extrusion in both single-and twin-screw extruders with and without a mixing element. *J Food Eng.* 59: 355-360.
- Seker, M., M.A. Hanna. 2006. Sodium hydroxide and trimetaphosphate levels affect properties of starch extrudates. *Ind Crop Prod.* 23(3): 249-55.
- Shrestha, A.K., C.S. Ng, A. Lopez-Rubio, J. Blazek, E.P. Gilbert. 2010. Enzyme resistance and structural organization in extruded high amylose maize starch. *Carbohydr Polym.* 80: 699-710.
- Simpson, P. J., C. Stanton, G.F. Fitzgerald, y R.P. Ross. 2005. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J Appl Microbiol.* 99: 493-501.
- Sitohy, M. Z., S.S. El-Saadany, S.M. Labib, y M.F. Ramadan. 2000. Physicochemical Properties of Different Types of Starch Phosphate Monoesters. *Starch.* 52 : 101 – 105.
- Smith, R.J., J.L. Caruso. 1964. Determination of phosphorus. In R.L. Whistler (Ed.), *Methods in carbohydrate chemistry*. p. 42. New York: Academic Press.

- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol.* 62: 47-55.
- Talwalkar, A., y K. Kailasapathy. 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Aust J Dairy Technol.* 58: 36-39.
- Tannock, G. M., K. Munro, H. J. M. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart, y P. K. Gopal. 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing lactobacillus rhamnosus DR20. *Appl Environ Microb.* 66: 2578-2588.
- Tharanathan, R. N. 2005. Starch - Value Addition by Modification. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 45: 371-384.
- Trejo González, E. 23 de Julio de 2009. Los derivados lácteos en México. *El Economista.*
- Williamson, C. 2009. Functional foods: what are the benefits? *Brit J Commun Nurs.* 14 (6): 230-236.

11. APÉNDICES

APÉNDICE 1. Curva de calibración utilizando fosfato monobásico de potasio para determinar el grado de fosfatación de los materiales modificados.

Para conocer el equivalente en porcentaje de fósforo contenido en cada muestra de material matriz con respecto a las unidades de absorbancia obtenidas del método espectrofotométrico para la determinación de fósforo reportado por Smith y Caruso (1964), se realizó una curva de calibración siguiendo la metodología reportada por los mismos autores. Para la curva de calibración se utilizó una solución estándar fosfato monobásico de potasio en alícuotas de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg de fósforo aforadas a 100 mL de agua. La curva obtenida se muestra en la *Figura 26*, cuya ecuación fue utilizada para el cálculo del porcentaje de fósforo de los materiales matriz reportado en el presente trabajo (*Figura 1*).

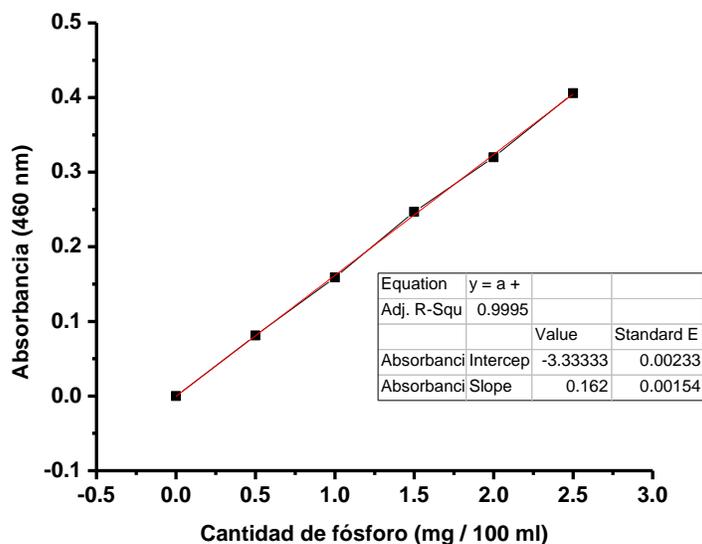
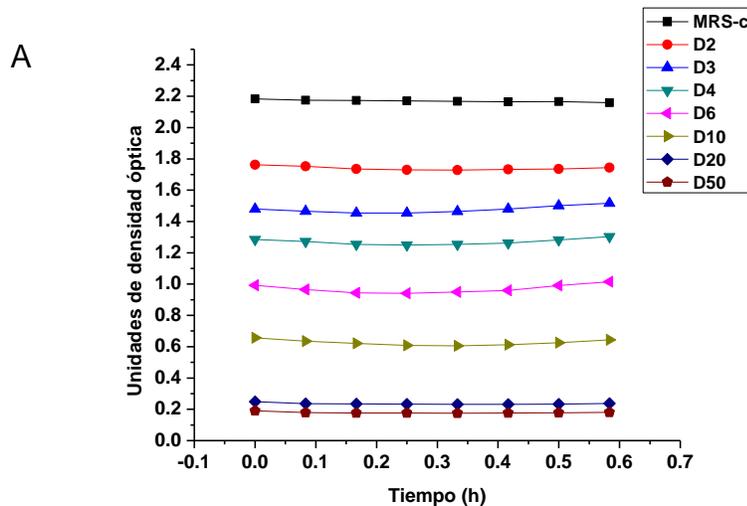


Figura 26. Curva de calibración con fosfato monobásico de potasio para la determinación de fósforo de los materiales matriz.

APÉNDICE 2. Curvas de calibración para la conversión de las unidades de densidad óptica registradas por el bioscreen en UFC.

Para conocer el equivalente de UFC con respecto a las unidades de densidad de densidad óptica obtenidas en el bioscreen, se realizó la siembra en placa por extensión en superficie (ver 7.2.2) de varias de las diluciones del microorganismo monitoreadas en el bioscreen. Con las UFC obtenidas de dicho recuento en placa se obtuvo una ecuación (ver Figura 27B) que permitió la conversión a UFC de todos los resultados obtenidos en el bioscreen durante el crecimiento de *B. breve* por 24 h.

En pozos de una placa para Bioscreen se colocó por triplicado 300 µl del cultivo activado directo, así como de las diluciones 2, 3, 4, 6, 10, 20 y 50 del mismo en caldo MRS-c. El equipo se programó para realizar lecturas cada 5 min durante 30 min a 37°C. Por separado, se sembraron en agar MRS-cv (ver 7.2.2) algunas de las diluciones probadas para obtener la equivalencia de unidades de densidad óptica obtenidas por el equipo con respecto a UFC.



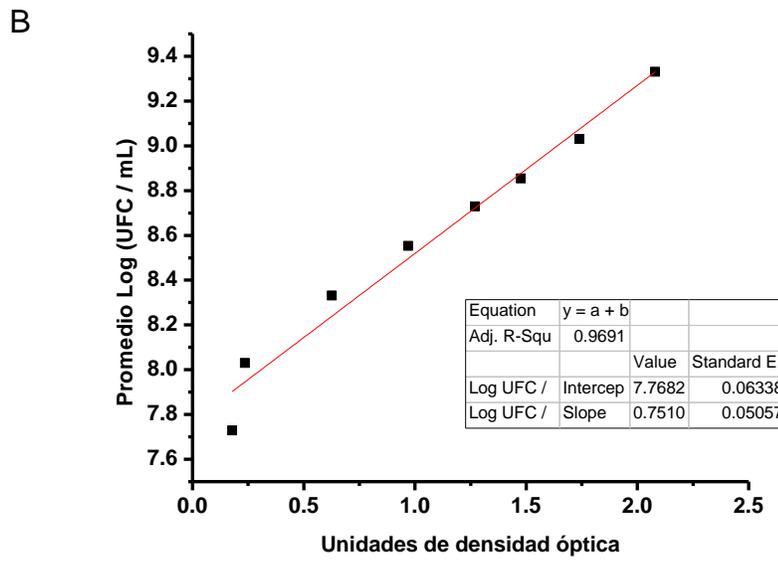


Figura 27. Curva de calibración del crecimiento de *B. breve* obtenida en el Bioscreen. **A.** Unidades de densidad óptica de las diferentes diluciones de *B. breve* en caldo MRS-c registradas por el Bioscreen. **B.** Relación de las Unidades de densidad óptica obtenidas en el Bioscreen con respecto a las unidades formadoras de colonia de *B. breve*.

APÉNDICE 3. Ajuste de unidades de las cápsulas (gramos a miligramos)

El ajuste de unidades de peso (g) por unidades de volumen (ml) en las cápsulas obtenidas del proceso de secado por aspersion de *B. breve* en diferentes materiales matriz se realizó tomando en cuenta la concentración inicial de las soluciones matriz (10%), su peso (400 g) y su volumen (410 mL) los cuales fueron medidos en el laboratorio, así como el contenido de humedad final de las cápsulas el cual fue determinado por un método gravimétrico (*ver Figura 7*). Se dividió el volumen inicial de la solución matriz (mL) entre el peso de las cápsulas obtenidas (g) al secar dicha solución en el secador por aspersion. La relación obtenida de mililitros de solución matriz por gramo de cápsulas se utilizó para ajustar los resultados de viabilidad de *B. breve* en las cápsulas después del proceso de secado y así convertir UFC / g de cápsulas a su equivalente en UFC / mL. En el *Cuadro 11* se muestra un ejemplo del cálculo.

Cuadro 11. Ejemplo del cálculo para la conversión de unidades de peso en unidades de volumen de las cápsulas obtenidas por secado por aspersión

	Antes de secar	Pérdida durante el secado	Después de secar
% Humedad	90%	86%	4%
Peso (g)	400	344	56
Volumen (ml)	410		

$$410\text{mL} / 56\text{g} =$$

$$7.329285714 \text{ mL} / \text{g}$$