

2021

Encapsulación de *Bacillus coagulans* en el desarrollo
de un sustituto de crema para café con prebiótico

Luis Alejandro
Ramón Javier



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Encapsulación de *Bacillus coagulans* en el desarrollo
de un sustituto de crema para café con prebiótico”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en ciencia y tecnología de los alimentos

Presenta:

Luis Alejandro Ramón Javier

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Querétaro, Qro. a Diciembre 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Encapsulación de *Bacillus coagulans* en el desarrollo de un sustituto de crema para café con prebiótico”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en ciencia y tecnología de alimentos

Presenta:

Luis Alejandro Ramón Javier

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidente

Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

Firma

Dra. Lucía Guadalupe Abadía García
Vocal

Firma

Dr. Carlos Regalado González
Suplente

Firma

Dra. Beneranda Murúa Pagola
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano.
Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.

Agradecimientos

A mis compañeros de laboratorio Edgar, Nayeli, Mina, Mayra e Isaac; por todo el apoyo que me brindaron y los momentos que pasamos durante la maestría y laboratorio, que lo hicieron sentir más cálido y divertido.

A la Dra. Silvia Amaya Llano, por su dirección y paciencia de este proyecto.

A mi sinodales, el Dr. Eduardo Castaño, Dr. Carlos Regalado, Dra. Beneranda Purúa que me hizo trasnochar durante el establecimiento de este trabajo, y por último y no menos importante a la Dra. Lucía Abadía por su gigantesca paciencia y apoyo constante durante todo el proceso.

A Carmelita y a todo el personal administrativo, por su orientación y ayuda.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al programa de posgrado en alimentos del centro de la república, por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante el programa de maestría

Dedicatoria

A mi madre querida, poco se sabe de mi historia, inclusive ella misma la desconoce, pero sabe que todos mis logros han sido y serán por ella, que todo el esfuerzo y sacrificio que hizo hace 24 años, le demuestro y le hago saber cada día que valió la pena.

INDICE GENERAL

Resumen.....	9
Abstract	10
I. Introducción.....	<u>12</u>
II. Antecedentes.....	<u>15</u>
II.I Probióticos.....	15
II.II Factores que afectan la sobrevivencia de probióticos.....	<u>17</u>
II.III Encapsulación y agentes encapsulantes	20
II.IV Efecto en vida de anaquel	<u>26</u>
III. Justificación.....	<u>28</u>
IV. Objetivos.....	<u>30</u>
General	<u>30</u>
Específicos.....	<u>30</u>
V. Material y Métodos o Metodología.....	<u>31</u>
Preparación de crema	31
Secado por aspersión del sustituto de crema.....	32
Contenido de humedad.....	32
Actividad de agua.....	32
Viscosidad aparente.....	<u>33</u>
Índice de solubilidad en agua (ISA)	<u>33</u>
Proceso de encapsulación de GanedenBC ³⁰ con sustituto de crema.....	33
Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE) de <i>B. coagulans</i>	34
Evaluación de la sobrevivencia de <i>B. coagulans</i> durante la elaboración de la bebida de café...	34
Evaluación de las cápsulas en condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i>	35
Evaluación sensorial	<u>36</u>
Evaluación de la vida de anaquel del sustituto de crema probióticos encapsulados.....	36
Análisis estadístico	37
VI. Resultados y discusión	<u>38</u>
Características fisicoquímicas.....	<u>38</u>
Humedad y actividad de agua.....	<u>38</u>
Viscosidad aparente	<u>39</u>
Índice de solubilidad en agua (ISA)	39

Eficiencia de encapsulación (EE) de <i>B. coagulans</i>	40
Evaluación de la sobrevivencia de <i>B. coagulans</i> durante la elaboración de la bebida de café. ...	41
Evaluación en condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i>	<u>44</u>
Evaluación sensorial	<u>46</u>
Evaluación de la vida de anaquel del sustituto de crema con probióticos.....	<u>47</u>
VII. Conclusiones	<u>49</u>
VIII. Bibliografía.....	<u>50</u>
Anexos.....	<u>64</u>
Anexo 1.....	<u>64</u>
Anexo 2.....	<u>65</u>
Anexo 3.....	<u>66</u>

Índice

Cuadro No	Página
1- Diseño de formulación del sustituto de crema	32
2- Características fisicoquímicas de sustitutos de crema.....	38
3- Diseño de mezclas para el establecimiento de sabor en el sustituto de crema.....	46

Índice

Figura No	Página
1- Factores asociados a la viabilidad de probióticos.....	17
2- Viscosidad aparente de sustitutos de crema	39
3- Índice de solubilidad de sustitutos de crema	40
4- Eficiencia de encapsulación de <i>Bacillus coagulans</i> en sustituto de crema.....	41
5- Viabilidad a temperatura de consumo en café tostado a 65 ° C	42
6- Viabilidad a temperatura de consumo en café tostado a 82 ° C	42
7- Viabilidad a temperatura de consumo en café liofilizado 65 °C	43
8- Viabilidad a temperatura de consumo en café liofilizado 82 °C	43
9- Viabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas.....	45
10- Viabilidad en anaquel en condición normal.....	47
11- Distribución Weibull de muerte microbiana en distintas temperaturas	48

Resumen

El café es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo, comúnmente adicionada con azúcar y crema. Siendo los sustitutos de crema en polvo los más utilizados por su fácil almacenamiento y manipulación. Sin embargo, se les considera poco saludables por su alto contenido en grasa y azúcares. Recientemente, ha incrementado el consumo de alimentos o ingredientes saludables, por ejemplo, la inulina, como sustituto de las grasas y promoción de la supervivencia de la microbiota benéfica. El probiótico *Bacillus coagulans* ha mostrado una alta resistencia al pH, temperatura y estabilidad al almacenado, y es capaz de modular el sistema inmunológico y la microbiota. Los procesos de encapsulación de los probióticos incrementan su viabilidad durante procesos de estrés, siendo el secado por aspersión el más común para este proceso. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un sustituto de crema para café bajo en grasa adicionado de prebiótico. Se añadió *Bacillus coagulans* al sustituto, y se evaluó la sobrevivencia durante el secado por aspersión, digestión *in vitro*, temperatura de consumo y almacenamiento. Se desarrollaron 6 formulaciones de sustituto de crema para café a través de un diseño 3x2 de inulina y caseinato. Las tres mejores en propiedades fisicoquímicas se usaron para encapsular *Bacillus coagulans* mediante secado a 180°C. Se evaluó la eficiencia de encapsulación, solubilidad, viscosidad y A_w . Además, se estudió la resistencia a la temperatura de consumo del café (65 °C y 82 °C) y a una digestión *in vitro*. Se evaluaron 3 mezclas de sabores de crema, leche y vainilla. La eficiencia de encapsulación de *Bacillus* no tuvo efecto ($p=0.1710$) al cambiar concentraciones de inulina y caseinato. Se obtuvieron diferencias en solubilidad ($p= 0.0000$) y viscosidad ($p= 0.0074$), las mezclas con inulina fueron más solubles y viscosas. La viabilidad a la temperatura de consumo y las condiciones gástricas fue mayor al agregar 8% de inulina. Los sustitutos no mostraron diferencias entre la aceptabilidad del sabor por los consumidores, el sabor vainilla es mayormente preferido. La presencia de inulina promueve una mayor solubilidad y resistencia a la digestión *in vitro*.

Palabras claves: coagulans, inulina, secado por aspersión

Abstract

Coffee is one of the most consumed beverages in the world, commonly added with sugar and cream. Being the most used powdered cream substitutes due to its easy storage and handling. However, they are considered unhealthy because of their high fat and sugar content. Recently, the consumption of healthy foods or ingredients has increased, for example, the inclusion of inulin, as a substitute for fats and promoting the survival of the beneficial microbiota. Probiotics such as *Bacillus coagulans* have shown high resistance to pH, temperature and shelf life, and is capable of modulating the immune system and the microbiota. The encapsulation processes of probiotics increase their viability during stress processes, being spray drying the most common. The objective of this research was to develop a prebiotic-added coffee creamer substitute. *Bacillus coagulans* was added, and survival during spray drying, *in vitro* digestion, consumption temperature and storage was evaluated. 6 coffee creamer formulations were developed with 0, 4 and 8% inulin as a prebiotic and 5 to 10% caseinate. The three best in physicochemical properties were encapsulated with *Bacillus* by means of a dryer at 180°C. Encapsulation efficiency, solubility, viscosity and Aw were evaluated. In addition, resistance to coffee drinking temperature (65 ° C and 82 ° C) and *in vitro* digestion was studied. 3 flavors mixes of cream, milk and vanilla were evaluated. *Bacillus* encapsulation efficiency showed no effect (0.1710) with different concentrations of inulin and caseinate. Differences were obtained in solubility ($p = 0.0000$) and viscosity ($p = 0.0074$), being the mixtures with inulin with higher values with respect to without the prebiotic. Viability at consumption temperature and gastric conditions showed greater resistance when adding 8% of inulin. The substitutes did not show differences between the acceptability of the taste by the consumers. The presence of inulin promotes greater solubility and resistance to *in vitro* digestion, the vanilla flavor is mostly preferred by consumers.

Keywords: coagulans, Inulin, Spray-dryer

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos y resultados que han surgido de esta investigación se obtuvieron durante el periodo que desarrollé este proyecto de tesis, con valores éticos y que posee los detalles necesarios para la reproducibilidad de los mismos en futuros proyectos.

Adicionalmente, esta tesis es un trabajo original y conciso en el cual declaro y doy conocimiento a cualquier colaborador o cita textual presentados en el manuscrito.



Atte, Luis Alejandro Ramón Javier

I. Introducción

Anteriormente, la nutrición había sido dirigida principalmente para proveer la cantidad suficiente de alimentos que cubrieran los requerimientos nutritivos en una dieta balanceada, generando al consumidor una sensación de bienestar (Blasco, 2017). El conocimiento generado actualmente en el área de alimentos ha permitido observar que los alimentos ingeridos regulan algunas funciones en el organismo humano más allá de las funciones básicas de nutrición y saciedad, coadyuvando a mantener un mejor estado de salud y disminuyendo el riesgo de padecer algunas enfermedades (Singh et al., 2017; Rodríguez-Concepcion et al., 2018 Thakkar et al., 2020; Tsai et al., 2020; Wang et al., 2019).

La necesidad de contar con alimentos que aporten más beneficios a la salud, se ve apoyada por los cambios socioeconómicos y demográficos que se están dando en la población por la desnutrición y mal nutrición, además, del deseo de gozar una mejor calidad de ésta (Akombi et al., 2017; Ogden et al., 2018). Actualmente, se ha potenciado la investigación en el sector alimentario debido a la búsqueda de alimentos que ayuden a prevenir o mitigar desórdenes gastrointestinales, como la intolerancia a la lactosa o cáncer de colon atribuidos principalmente al estilo de vida actual (Wegh et al., 2018; Fernández-Tomé et al., 2019; Vitellio et al., 2019). Constantemente se están desarrollando nuevos alimentos que añaden o amplían estos beneficios, por las ventajas que suponen para la salud y sus convenientes efectos fisiológicos a los que se denominan como alimentos nutraceuticos (Ney y Etzel, 2017; Kim et al., 2020; Hudson et al., 2020).

Los alimentos o ingredientes nutraceuticos son productos que, además de nutrir, aportan beneficios a la salud y reducen el riesgo de enfermedades, a través de las sustancias biológicamente activas que contienen y desempeñan una acción específica en las funciones del organismo (Vitellio et al., 2019; Ghoshal, 2019; Tsai et al., 2020). Existe una gran variedad de productos alimenticios nutraceuticos a disposición del consumidor, como vinos, lácteos y bebidas tales como kombucha y café (López, 2017; Kantachote et al., 2017; Garcia et al., 2020; Tsai et al., 2020).

El consumo anual de café en México es de 1.4 kg *per cápita* (CEDRSSA, 2018). El café contiene compuestos nutritivos como vitaminas del complejo B, compuestos estimulantes como cafeína, que tiene efectos antiinflamatorios y de modulación en el sistema inmune, o

de regulación como polifenoles que ayudan a modular radicales libres (Boon et al., 2017; Sharif et al., 2017; Vitaglione et al., 2019). Dependiendo del gusto del consumidor pudiera elegirse en su forma oscura o clara, por lo que la mayoría de los bebedores de café prefieren agregar cremadores o blanqueadores al café oscuro, ya que potencializa el aroma y sabor (Tan et al., 2021). Sin embargo, éstos se consideran poco saludables ya que poseen una gran cantidad de grasas hidrogenadas que pudieran eventualmente aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Oteng y Kersten, 2020). El remplazo y reducción de grasas en estos productos permite obtener mejores características físicas y químicas en una taza de café y asimismo reducir los efectos que éstas generan (Hedayatnia y Mirhosseini, 2018).

Para disminuir estos riesgos, se han desarrollado productos con la intención de aumentar el alcance nutritivo, utilizando prebióticos como inulina o la suplementación de proteína en bebidas (Konar et al., 2018; De Paulo Farias et al., 2019; Souza et al., 2019; Hudson et al., 2020), así como se han incorporado probióticos que son microorganismos vivos cuyo consumo se encuentra asociado con beneficios a la salud del sistema digestivo y respuesta inmune (Aditya et al., 2017; Kantachote et al., 2017; Vitellio et al., 2019; Majeed et al., 2019; Won et al., 2020), resultando atractivos para el consumidor. Debido a esto se han desarrollado matrices alimentarias no convencionales, a través de las cuales se adicionan probióticos, tales como jugo de moringa en polvo, jugo de cereza, jugos deshidratados de naranja, frambuesa, agua de coco y cereales, entre otros (Alves et al., 2017; Kantachote et al., 2017; López, 2017; Looi et al., 2019; Vivek et al., 2020).

A pesar de ello, es difícil asegurar su aprovechamiento cabal de los probióticos, dada su ingesta a través del tracto gastrointestinal, donde pueden sufrir cambios debido a procesos mecánicos, químicos y enzimáticos que pueden generar estrés en ellos y perjudicar su establecimiento en el intestino (Holgún et al., 2017; Amoah et al., 2019).

Se han propuesto diversas alternativas con el propósito de evitar la pérdida y el deterioro de los probióticos (Cassani et al., 2019). La encapsulación, es uno de los métodos que mejores resultados ha dado para lograr este propósito, es un proceso aplicado para proteger, mediante un material de recubrimiento o material pared, la estabilidad, biodisponibilidad y conservación de componentes bioactivos y/o la viabilidad en microorganismos (Kim et al., 2020; Mis-Solval et al., 2019). La selección del material pared es un aspecto importante para

la encapsulación, pues de éste dependerá la protección eficaz del probiótico contra factores adversos (Cassani et al., 2019). Un agente utilizado con fines saludables y de protección es la inulina (Hedayatnia y Mirhosseini, 2018; Dos Santos et al., 2018). La inulina es un prebiótico no digerible con un valor energético bajo (Ahmed y Rashid, 2019). Es utilizada como sustituto parcial de grasa, modificador de la textura, viscosidad, características sensoriales y también prolonga la vida útil de los productos (Michalska et al., 2020, Lachowicz et al., 2020). En probióticos como agente protector permite mayor eficiencia de encapsulado, supervivencia alta en simulaciones gástricas *in vitro*, además, promueve el desarrollo de los probióticos (Dos santos et al., 2018). Recientemente, se ha potenciado la investigación en el sector alimentario debido a la búsqueda y desarrollo de alimentos saludables, considerándose una rama de interés para la industria provocado por el consumidor que busca mejorar su salud a través de la alimentación cotidiana. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de *Bacillus coagulans* encapsulado en sustituto de crema para café con prebiótico.

II. Antecedentes

En la actualidad se ha incrementado el interés del consumidor por su salud y la expectativa de que los alimentos que consuma contribuyan a ella y más aún, que sean capaces de prevenir enfermedades, sobre todo porque factores tales como el estilo de vida, la exposición constante a factores de estrés, los cambios en los patrones dietéticos y hábitos alimenticios, así como el consumo de fármacos (en particular antibióticos), afectan negativamente a la salud. Lo anterior, ha favorecido la demanda de alimentos que favorecen el buen estado de salud, denominados alimentos nutraceuticos (Bagchi, 2019; Ghoshal, 2019). Existe una gran variedad de alimentos nutraceuticos a disposición del consumidor, los de mayor estudio son los añadidos con probióticos (López, 2017; Kantachote et al., 2017; Tsai et al., 2020). Recientemente el desarrollo de alimentos simbióticos, que son una combinación sinérgica de probióticos y prebióticos, se ha establecido como una de las alternativas tecnológicas y saludables para el consumidor, principalmente relacionado con la promoción de buena salud del colon, la prevención o reducción del riesgo de enfermedades (Mohanty et al., 2018).

II.I Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped y carecen de factores de virulencia y/o la capacidad de metabolitos indeseables para el hospedador (Kerry et al., 2018). Los productos con probióticos son considerados dentro de los alimentos nutraceuticos, confiriendo un mejor proceso digestivo o de regulación en el hospedador (Cao et al., 2020). Su beneficio en la salud, se debe principalmente a que éstos fomentan el balance microbiano en el intestino, provocado por exclusión competitiva, antagonismo bacteriano e inmuno-modulación (Molina, 2019). Generalmente se relacionan los alimentos probióticos a los del sector lácteo fermentado, sin embargo, éstos trascienden más allá de este grupo (Colombo et al., 2018). Con la finalidad de mejorar la alimentación de las personas, se han realizado estudios en estos seres permitiendo evaluar su potencial efecto benéfico en el consumidor (Lee et al 2020).

Para su uso en alimentos los probióticos deben estar presentes en concentraciones de 1×10^8 UFC/mL o mg, además, deben ser capaces de sobrevivir durante su paso por el tracto digestivo, tener la capacidad de proliferar en el intestino y no alterar las características del

alimento de forma negativa (Amoah et al., 2019; Hernández-Barrueta et al., 2020). Los microorganismos utilizados, son de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* mayormente, aunque también existen otros géneros como *Saccharomyces* y *Bacillus* (Rodríguez et al., 2016; López, 2017).

El género *Lactobacillus* es de los probióticos comúnmente utilizados, *L. gasseri* mejora los efectos causados en sujetos con tendencia al estreñimiento (Sawada et al., 2016). *L. reuteri* en concentraciones de 1×10^9 UFC/mL o mg promueve la desinflamación de las vías respiratorias y la respuesta de Th2 en los tejidos pulmonares a través de la modulación de la microbiota presente en el intestino mediante la producción de butirato (Li et al., 2020). Shonyela et al. (2020) observaron que la inclusión de *L. rhamnosus* incrementa la longitud de las vellosidades ileales en lechones y también puede regular la proliferación de linfocitos T en el intestino. Además, en ratones con *Porphyromonas gingivalis* y *Fusibacterium nucleatum* disminuye la inflamación en el duodeno y modula los niveles de IL-6 en el íleon, aunado a cambios en el microbioma intestinal (Gatej et al., 2020). La utilización de *L. salivarius* mejora la fuerza muscular y el rendimiento de resistencia, aumenta el almacenamiento de glucógeno hepático y muscular, además de disminuir los niveles de lactato, nitrógeno ureico en sangre, amoníaco y creatina quinasa después del ejercicio (Lee et al., 2020). Nam et al. (2020) encontraron que *L. plantarum* HY7714 mejora la salud de la piel reduciendo metalopeptidasas (MMP-2, MMP-9), la zonulina y la calprotectina en plasma, además, mejora la integridad de la barrera del intestino. En personas con síndrome de intestino irritable se comprobó que la inclusión de *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R y *L. rhamnosus* CLR2 mejora el dolor abdominal y distensión, siendo en los grupos femeninos los efectos más pronunciados (Preston et al., 2018).

Con las *Bifidobacterium*, se han inducido fermentaciones con *Bifidobacterium* sp MKK4 en bebida de arroz permitiendo enriquecerla y una supervivencia al jugo gástrico *in vitro* hasta por 4 h (Ray et al., 2017). La utilización de *B. longum* y *L. rhamnosus* mejoró los síntomas gastrointestinales por intolerancia a la lactosa e incrementó la cuenta microbiana en el intestino de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, reduciendo las enterobacterias (Vitellio et al., 2019). Kim et al., (2020) observaron que la utilización de *B. longum* y *B. bifidum* mejora la salud mental y cognitiva en personas mayores de 65 años, además de producir cambios en

la microbiota intestinal. La inclusión individual de *B. longum* promueve la disminución de ansiedad y mejora los puntos de depresión en pacientes con síndrome de intestino irritable en un periodo de 6 semanas (Pinto-Sánchez et al., 2017). Barba-Vidal et al., (2017) describen que la combinación de *B. longum* subsp. *infantis* y *B. animalis* subsp. *lactis* generan beneficios en lechones al ser desafiados con *Salmonella Typhimurium* aumentando los linfocitos intraepiteliales, la ingesta voluntaria y la relación vellosidad-cripta.

II.II Factores que afectan la sobrevivencia de probióticos

Se ha establecido que la viabilidad de los microorganismos se ve afectada por diversos factores (Figura 1). Kulkarni et al. (2018), observaron que el efecto de un entorno con temperatura de 65 °C en una variante salvaje de *L. acidophilus* generó una disminución significativa de células en 10 minutos, de igual forma resultó afectada de manera drástica en niveles de pH 2 de una simulación gástrica. Según Srisukchayakul et al., (2018), incluso utilizando *L. acidophilus* NCIMB 8826 con el método de adaptación ácida, en jugos de frutas como lima y limón con pH de 2.5-3.8 no resulta adecuado para generar una mayor supervivencia en éstos a través del tiempo.

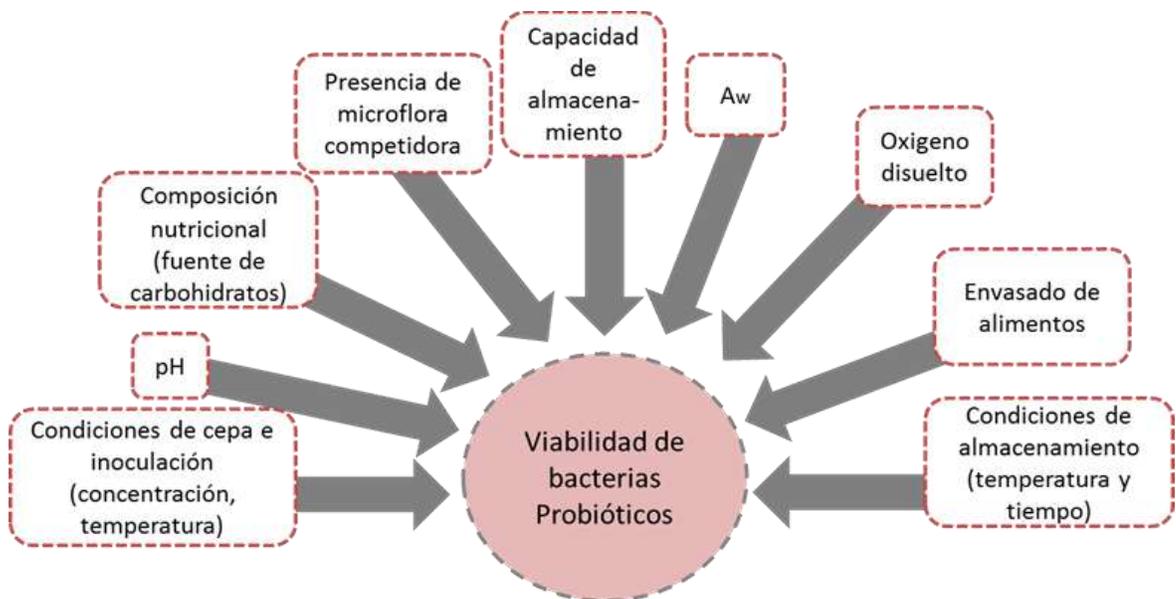


Figura 1. Factores asociados a la viabilidad de probióticos. Adaptado de Cassani et al. (2019).

La fuente de carbohidratos que el probiótico puede metabolizar resulta vital para su desarrollo y para la generación de metabolitos, además, también puede ayudar a inhibir la

interacción con patógenos en el tracto gastrointestinal permitiendo establecerse de manera más adecuada como manosa, glucosa, galactosa, xilitol entre otros (Rätsep et al., 2017; Bello et al., 2018). Otro factor intrínseco relevante para la viabilidad de los probióticos, es la actividad de agua, que puede inhibir el desarrollo de los microorganismos, debido a los límites de A_w que requieren para su correcto funcionamiento cuando se presentan valores mayores a 0.8 en alimentos (Tapia et al., 2020). Generalmente durante el almacenado, los microorganismos sufren cambios debido a condiciones intrínsecas mencionadas anteriormente y externas como la temperatura ambiente o de refrigeración (4 °C) y el tiempo de 40 a 80 días de almacenamiento que pueden provocar la muerte celular del género *Lactobacillus* hasta de 5.8×10^9 CFU g⁻¹ (Afzaal et al., 2020; Pourjafar et al., 2020).

También se ha observado que durante el proceso de elaboración de alimentos, los probióticos se ven afectados por el estrés causado por temperatura, generando muerte parcial o total de la cuenta microbiana presente (Majeed et al., 2019). Debido a ello, el desarrollo de alimentos con probióticos, aquellos con pH ácidos, baja actividad del agua, o que estarán expuestos a procesos térmicos con temperaturas superiores a 60 °C, son un gran desafío ya que las bacterias ácido lácticas (LAB) son susceptibles a tales condiciones adversas (Kulkarni et al., 2018; Afzaal et al., 2020; Tapia et al., 2020; Pourjafar et al., 2020). Debido a la susceptibilidad de los probióticos comúnmente utilizados, se han propuesto la utilización de bacterias formadoras de esporas como algunas especies del género *Bacillus*, que muestran estabilidad a condiciones de almacenamiento (temperatura de refrigeración), de composición, de elaboración de diferentes alimentos como queso, pan y jugo de naranja (Soares et al., 2019, Majeed et al., 2020). La esporas de estos probióticos tienen características que permiten una mayor resistencia al ácido gástrico y a las altas temperaturas, mayor supervivencia, y es más resistente a los antibióticos que otras LAB (Bernardeau et al, 2017; Mazkour et al., 2019; Majeed et al., 2019; Xing et al., 2020). Incluso se ha logrado conseguir la germinación en condiciones óptimas de esporas de *B. subtilis* después de un proceso de inactivación superior de 100°C (Den Besten et al., 2017).

La utilización de *Bacillus* ha ido en aumento derivado de los beneficios que se han ido encontrando. Se observó que *B. subtilis* en conjunto con *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus* incrementaron la altura de las vellosidades intestinales y la respuesta inmune,

además de promover una mayor actividad enzimática de tripsina, amilasa y lipasa, involucradas en la digestión (Won et al., 2020). Las cepas probióticas de *B. subtilis* poseen efectos antimicrobianos, antivirales y anticancerígenos; además, *B. subtilis* P223 inhibió la adhesión de *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* a las células HT-29 (Jeon et al., 2017). La utilización de *B. subtilis* y *B. coagulans* como probióticos promovieron efectos beneficiosos en la microflora intestinal, a medida que aumentaron el recuento de bacterias beneficiosas como las bacterias ácido lácticas y disminuyeron las dañinas como los coliformes (Mazkour et al., 2019). Además, crea un ambiente no favorable para los patógenos ya que puede producir coagulina, una bacteriocina, que tiene un efecto antimicrobiano contra microorganismos entéricos como *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella*; las formas de esporas pueden proporcionar una ventaja para los alimentos con probióticos como *B. coagulans* (Lee et al., 2019; Xing et al., 2020).

GanedenBC30™ (BC30) son esporas de *B. coagulans* comercial, que se caracterizan por su resistencia a factores de estrés como pH 2, con una supervivencia del 90% en un modelo de simulación gástrica (Keller et al., 2019). Anaya-Loyola et al. (2019) describieron que BC30 tiene la capacidad de modular el sistema inmune, alterando los niveles séricos de TNF α , CD163, G-CSF, ICAM-1, IL-6, IL-8, MCP-2, RAGE, uPAR, y disminuyendo desórdenes gastrointestinales y respiratorios en niños. Además, incrementó la utilización de proteína, ayudando en la digestión de macromoléculas a través de una variedad de enzimas digestivas producidas como lipasas, amilasas y proteasas (Keller et al., 2017; Jäger et al., 2018; Fu et al., 2019; Cao et al., 2020). Shinde et al., (2019) evaluaron las esporas de *B. coagulans* MTCC5856 y observaron que sobrevivían un 94% de las células después de un proceso de simulación gástrica de 4 h, y una capacidad de adhesión potencial para la colonización del intestino y exhibieron respuestas inmunomodulatorias y anti-inflamatorias promoviendo la secreción de citoquinas IL-8 y IL-10 en células HT-29.

El uso de bacterias formadoras de esporas con propiedades probióticas en los alimentos, por lo tanto, puede ayudar a superar diversos desafíos técnicos y ampliar la posibilidad de aplicar microorganismos probióticos a una gama más amplia de productos (Konuray y Erginkaya, 2018; Majeed et al., 2019). A pesar de mostrar mayor resistencia a factores de estrés, son afectadas por las altas temperaturas de los procesos a los que son sometidos los alimentos y

a largos periodos de exposición a pH ácido en su germinación y células viables (Keller et al., 2019; Majzoobi et al., 2019).

Según Majeed et al., (2019) el producto comercial *B. coagulans* MTCC 5856 sometido a estrés por temperaturas de hasta 80 °C y durante el proceso de elaboración de bebidas de café y té, alcanzó hasta un 94.6 % de viabilidad de sus esporas, además, observaron que su porcentaje de germinación incrementaba cuando se encontraba en presencia de azúcares como inulina o fructo oligosacáridos. Además las esporas de *B. coagulans* también han presentado porcentajes de supervivencia y almacenado superiores al 90% a procesos de elaboración de waffles, dulce de chocolate y de banana, conservas de fresa y mantequilla de cacahuete soportando temperaturas mayores a 80°C y pH de 3 (Majeed et al., 2016)

El desarrollo de nuevos productos con probióticos resulta un reto debido al ambiente al que se exponen estos microorganismos, el cual puede ser estresante y perjudicial para su sobrevivencia; las características como la humedad, Aw, pH, temperatura de almacenado promueven un efecto negativo que puede ocasionar inclusive cambios en el producto (Srisukchayakul et al., 2018; Prasanna y Charalampopoulos, 2019; Tapia et al., 2020). Debido a ello se recurre a procesos de encapsulación que permitan una mayor resistencia a factores adversos (Kim et al., 2020; Mis-Solval et al., 2019).

II.III Encapsulación y agentes encapsulantes

La encapsulación es un proceso de protección de la estabilidad, biodisponibilidad, componentes bioactivos y viabilidad de microorganismos a través de un material de recubrimiento que genera una barrera contra factores externos (Rodríguez et al., 2016). Adicionar agentes protectores promueve la resistencia de los probióticos durante la deshidratación, almacenamiento o digestión, incluso la inclusión de prebióticos alternativos como agentes protectores que crean un efecto simbiótico con el microorganismo (Cassani et al., 2019; Prasanna y Charalampopoulos, 2019).

Existe una diversidad de procesos de encapsulación con diferentes características, en general estos métodos pueden clasificarse como métodos físicos y métodos fisicoquímicos. Entre los métodos físicos se incluyen secado por aspersion, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado y extrusión; entre los métodos fisicoquímicos se encuentran inclusión molecular y atrapamiento por liposomas—(Gaudreau et al., 2016; Cassani et al., 2019; Ji et al., 2019)

Los procesos utilizados para encapsulación de probióticos comúnmente son: liofilización, y secado por aspersión. Estas técnicas involucran un factor determinante para la sobrevivencia de los microorganismos durante el proceso de encapsulación, la temperatura, que en caso de la liofilización se basa por sublimación, mientras que el secado por aspersión funciona por evaporación (Arepally y Goswami, 2019; Cassani et al., 2019; Ozkan et al., 2019).

La liofilización es un proceso de deshidratación utilizado para aumentar la vida útil de las partículas procesadas, su manejo y almacenamiento; en primer lugar se congela el producto a bajas temperaturas de forma rápida para evitar la formación de cristales, luego pasa a un proceso de secado al vacío para la evaporación y desorción del agua; está compuesto principalmente por una cámara de vacío, condensador, bomba de vacío y un sistema de control (Fonte et al., 2016). El porcentaje de compuestos encapsulados en este proceso utilizando agentes protectores como goma arábiga (GA) puede ocasionar un efecto perjudicial sobre las características de la cápsula, sin embargo, resultó ser un método más efectivo al encapsular compuestos antioxidantes comparado con el secado por aspersión (Ballesteros et al., 2017).

El secado por aspersión es la transformación de una matriz líquida a sólida, consta de tres etapas: 1- la formación de la emulsión entre el material central y el recubrimiento, 2- la homogenización y aspersión por un portador de gas caliente para lograr la evaporación del solvente, 3- recolección de partículas secas por ciclones o un filtro (Ozkan et al., 2019). Las características de los polvos obtenidos del método de aspersión están relacionadas con los factores de procesamiento, incluyendo temperatura de secado, velocidad de flujo de aire de secado, tipo de agente portador y concentración del agente portador (Arepally y Goswami, 2019; Gul y Atalar, 2019; Mis-Solval et al., 2019; Yoha et al., 2020)

En secado por aspersión utilizando temperaturas de 160 °C de aire de entrada y un flujo de aire de 601 L/h en *L. casei* Shirota provocó una reducción de 0.43- 1.62 ciclos logarítmicos, mientras que al ser encapsulado por liofilización con condiciones de 50-60 mTorr de presión y temperatura de -85 °C causó una reducción de 0.02- 0.69 ciclos logarítmicos de la viabilidad de las células utilizando una variedad de agentes encapsulantes como goma arábiga, suero de leche reconstituido y maltodextrina (Gul y Atalar, 2019). Yoha et al., (2020) observaron que utilizar temperaturas de entrada en el secado por aspersión de $110 \pm$

5°C, y de salida de $62 \pm 5^\circ\text{C}$ y un atomizador de 1.45 mm de diámetro generó una eficiencia de encapsulación cercana al 90% utilizando *L. plantarum* encapsulado con fructooligosacáridos, maltodextrina y proteína de suero, además, se obtuvieron tamaños de partícula menores comparados con un proceso de liofilización. Obtener tamaños de partícula reducidos, baja actividad de agua y el contenido de humedad incrementa la supervivencia de células de *L. plantarum* (Mis-Solval et al., 2019). Se ha observado que las altas temperaturas puede generar burbujas de vapor dentro de la matriz pared (Alves et al., 2017). El proceso de encapsulación elegido y sus condiciones de trabajo, aunado al material encapsulante pueden generar partículas de tamaño variable que logren afectar el desempeño o las características del producto (Pourjafar et al., 2020)

Aumentando la temperatura de entrada (130-150 °C) del proceso se reduce la A_w y el contenido de humedad del polvo, incrementando la concentración del encapsulante (goma arábiga 10%), estas características se reducen aún más, sin embargo, aumentar la temperatura también redujo la eficiencia de encapsulación en *L. acidophilus* (Arepally y Goswami, 2019). En *B. coagulans* se observó que aumentar la temperatura de entrada manteniendo un flujo de 1.2 mL/ min el porcentaje de células viables disminuía utilizando diferentes materiales encapsulantes (Pandey y Vakil, 2017)

Se han realizado diversos estudios en la evaluación de secado por aspersión y liofilización para la encapsulación de células, en el que se ha establecido que el material pared o encapsulante juega un papel importante en el la eficiencia de encapsulación, el tamaño de partícula, y su desempeño a factores de estrés como pH, temperatura y almacenamiento (Archacka et al., 2019; Arepally y Goswami, 2019; Yoha et al., 2020; Gul y Atalar, 2019). La formulación del recubrimiento por sí mismo es el factor más determinante; existe una variedad de recubrimientos como goma arábiga, alginato de sodio, maltodextrina entre otros compuestos, que han sido reportados como materiales de pared adecuados para un proceso de encapsulación (Rodríguez et al., 2016; Cassani et al., 2019). Se ha observado que la utilización de goma arábiga, un polisacárido obtenido de resinas de algunas plantas, como encapsulante de *L. acidophilus* en concentraciones de 2 a 10 % p/v en combinación con 20% de maltodextrina en secado por aspersión, resultaron en un contenido de humedad, A_w y

eficiencia de encapsulación adecuados, a una temperatura de 150°C de entrada de aire (Arepally y Goswami, 2019).

Maltodextrina (MD) es una mezcla polímeros de glucosa comúnmente utilizado como material encapsulante, combinada con fructooligosacaridos y que fue utilizada para encapsular *L. plantarum*, lo que generó un mayor contenido de humedad y A_w en relación 2:1, sin embargo, cuando se incluyó proteína de suero en relación 2:0.5:0.5 las cápsulas obtenidas presentaron un menor contenido de agua A_w , la eficiencia de encapsulación aumentó un 5% y su viabilidad a pH 3.2 durante 1 h se redujo 1 ciclo logarítmico, a diferencia de una célula no encapsulada cuya viabilidad se redujo 4 ciclos logarítmicos (Yoha et al., 2020). En un estudio similar Gul y Atalar (2019), utilizaron una solución al 30% p/v de MD, GA y suero de leche reconstituido (SLR) y la mezcla de éstos para encapsular *L. casei* Shirota; los autores observaron que utilizando SLR y GA en una relación 1:1 generaba una mayor cantidad de células viables después del encapsulado, promovía la resistencia a exposición por temperaturas de 72 °C durante 1 min, y las cápsulas con MD y MD:GA se mostraron susceptibles al interactuar en un pH 2 durante 2 h.

En un estudio utilizando proteína de soya y calcio, para encapsular *L. plantarum* por el método secado por aspersion se obtuvieron partículas de 10 µm con una relación 35:1, pero aumentar la relación a 122:1 generó partículas más grandes (100 µm) e irregulares, las cápsulas expuestas a 80 °C durante un minuto no se vieron afectadas con respecto a la cuenta inicial a diferencia de células liofilizadas que mostraron una reducción de hasta 2 ciclos logarítmicos (González-Ferrero, et al., 2020).

Hernández-Barrueta et al. (2020) utilizaron soluciones de proteína de suero (7.5 % p/v) y almidón de huazontle modificado (20 % p/v) para la encapsulación de *L. rhamnosus* GG a través de secado por aspersion utilizando una temperatura de entrada de 140 °C y flujo de 7.5 mL/min; terminado el proceso de encapsulación presentó una pérdida de 0.96 log CFU/g, un bajo contenido de humedad (2.13), A_w (0.04) y un tamaño de partícula de 13.05 µm, características que mostraron ser funcionales para la protección y estabilización de componentes en una matriz alimentaria como el té negro.

Se ha observado que la utilización de quitosano combinado con otros agentes encapsulantes, como goma xantana o alginato de sodio, para una doble encapsulación de *L. acidophilus* presentó un mayor número de células viables después de 2 h de exposición a fluidos gástricos e intestinales simulados comparados con las cápsulas sin doble encapsulación y las células libres, en concentraciones máximas de 1% de estos agentes, permitiéndoles mantener células viables (De Araujo et al., 2016; Shu et al., 2018). Otro estudio realizado por Jantarathin et al. (2017) utilizando una doble encapsulación con 3 % de alginato de sodio y 0.8% de quitosano e inulina para *L. acidophilus*, observaron que un 60 % de células sobrevivían después de exponer las cápsulas a 70 °C durante 60 min y 90 °C durante 5 min. En *L. plantarum* y *L. casei* en concentración de 3 % promovió resistencia en las células durante la exposición por temperaturas de hasta 75 °C durante 1 min y por 10 min a temperatura de 65 °C (Rather et al., 2017). Se evaluó la encapsulación de *L. casei* en alginato de calcio (AgCa) y proteína de suero concentrado (PS) a una concentración de 2% p/v para cada uno, donde se observó que AgCa generó un menor tamaño de partícula (716 um), una eficiencia de encapsulación del 96%, comparado con 94% de PS; la cuenta de células viables mantenía un mejor comportamiento utilizando AgCa en condiciones de pH 3 y después de 80 días de almacenamiento en helado de crema (Afzaal et al., 2020). De igual manera se evaluó la sobrevivencia de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* microencapsuladas por extrusión utilizando alginato de sodio, las cuales presentaron una mayor viabilidad al paso de 42 días con respecto a las células libres (Pourjafar et al., 2020).

Afzaal et al., (2019) mencionan que la utilización de 2 % alginato de sodio alcanzó una eficiencia de 98% de encapsulación, sin embargo, cuando se utilizó una matriz alterna, como el carragenano, se obtuvo un 96%, presentando ambas cápsulas valores de resistencia al pH 2 durante 120 min con una reducción de 4 ciclos logarítmicos con respecto a las células libres que fue de 8 ciclos logarítmicos, durante un tiempo de almacenado de 21 días en yogurts similares. La mezcla con fibras puede aumentar la viscosidad del fluido y reducir la eficiencia del encapsulado, una alternativa a esto es el uso de sustancias como polivinil alcohol y polietilenglicol, que utilizándolos con extractos de chicoria de 1% y alginato-Ca 1.5%, proporciona un desempeño adecuado a condiciones de pH y una liberación gradual potencial de las células en el intestino (Kim et al., 2020). Un agente encapsulante de interés en los últimos años es la inulina, un carbohidrato polimérico complejo, hidrófilo y natural,

aunado a sus propiedades prebióticas y de mitigar la inflamación intestinal, propiedades inhibitoras de crecimiento tumorales, aumentar la absorción de calcio, entre otros (Wilson y Whelan, 2017; Gupta et al., 2019). La elaboración de encapsulados simbióticos permite un mejor establecimiento del microorganismo al ser protegido en mayor medida y por ser capaz de aprovechar los componentes de la cápsula para su desarrollo (Rosolen et al., 2019). La inclusión de inulina como pared en los probióticos ha permitido observar que permite una eficiencia de encapsulamiento de hasta 86% a 120 °C en *L. acidophilus* y una mayor resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas de pH 2 de hasta 80% de sobrevivencia, hasta un 30% mayor comparado con cápsulas sin la presencia de inulina (Dos Santos et al., 2018). González et al., 2017 mencionan que la mejora de la viabilidad de *L. acidophilus* en presencia de los ácidos gastrointestinales, podría deberse a la baja penetración de éstos en el núcleo de la microcápsula, al tener una estructura más estable con la presencia del prebiótico. Además, la inclusión de éste prebiótico no afecta la forma ni el tamaño de las micro cápsulas, permitiendo sus propiedades originales pero con una mejora estructural y de desarrollo (Qaziyani et al., 2019).

La utilización de inulina en combinación con otros agentes encapsulantes como proteína de suero ha mostrado una eficiencia de encapsulación mayor a 89%, también mejora significativamente la sobrevivencia de los probióticos durante el paso de condiciones gastrointestinales simuladas por el sinergismo de esta (Maleki et al., 2020). Cuando se utiliza alginato de sodio (AgNa) con inulina en concentraciones de hasta 1.5%, los encapsulados soportan el estrés gástrico de pH 2 durante 2 horas con una reducción de 1 ciclos logarítmicos, además, de que disminuye la velocidad de acidificación comparado con células libres en yogurt, en un tiempo 4 semanas (Prasanna y Charalampopoulos, 2019). En *L. lactis* se ha obtenido hasta un 94% de eficiencia de encapsulación con un 10% de inulina y 12% de proteína de suero en la suspensión, con resultados positivos en la resistencia a pH gástrico de 2 y su estabilidad al ser expuestas en diferentes tiempos de almacenamiento, mostrando que después de 64 días aún mantenía una estabilidad estructural que le permitió a *L. lactis* una sobrevivencia mayor que las células no encapsuladas, asimismo también observaron que no se veía afectada significativamente expuesta hasta 65 °C durante un periodo de 30 min (Rosolen et al., 2019). La inclusión de 10% de inulina con un 82% de aspiración y un flujo de 10 mL/ min en *L. acidophilus* a 120°C permite obtener un 86% de eficiencia de

encapsulado; en condiciones gastrointestinales cuando se incorporó la inulina promovía una mejora en la supervivencia de éstas, comparado con las células libres que después de 30min expuestas se reducían más del 95% de ellas en la fase gástrica (Dos Santos et al., 2018). Actualmente no existen reportes sobre encapsulamiento de *Bacillus coagulans* con inulina, ya que este microorganismo ha presentado buen desempeño en la sobrevivencia a factores de temperatura en los alimentos, pero este microorganismo al encontrarse en un medio con prebióticos como fructooligosáridos y azúcares simples se permite un mayor porcentaje de germinación (Majeed et al., 2018; Majeed et al., 2020)

II.IV Efecto en vida de anaquel

La inclusión de probióticos encapsulados con células libres afecta las características fisicoquímicas (disminución de pH, aumento de viscosidad y acidez) y sensoriales de productos como el helado. Es importante la eficiencia del encapsulación y la no actividad de microorganismos libres para evitar cambios indeseados en el producto por lo que es recomendable utilizar sólo células encapsuladas para promover una mayor estabilidad de las características sensoriales (Afzaal et al., 2020; Pourjafar et al., 2020).

Al utilizar otros agentes que ayuden a una mayor estabilidad de la cápsula como malto dextrina y oligo-fructosa enriquecida con inulina se mantuvo una cantidad de células viables óptima entre 100-150 días al realizarse el proceso de encapsulación por liofilización, mientras que por secado por aspersión se vio afectada a 60 días en almacenamiento a 25 °C y 60% humedad relativa en *L. plantarum* CECT 220 (González-Ferrero et al., 2020).

La microencapsulación de *L. acidophilus* con pectina + salvado de arroz permitió mantener la viabilidad de la células con 0.2 de Aw durante 120 días de almacenamiento a 7 °C, sin embargo, a temperaturas de -18 °C o 25 °C se vio afectado a los 90 días con una reducción de hasta 2 ciclos logarítmicos (Raddatz et al., 2020). Gul y Atalar (2019) reportaron que en liofilizados de proteína de suero:goma arábica con *L. casei* Shirota no afectó el pH en postres almacenados durante 14 días a 4 °C. El almacenamiento de bebidas de té verde con probióticos encapsulados a temperaturas de refrigeración con periodos de luz y oscuridad no afectó las características sensoriales, presentando estabilidad en polifenoles y color durante 5 semanas (Hernández-Barrueta et al., 2020). El almacenamiento de polvos con probióticos depende principalmente de la humedad y de la temperatura, la actividad de agua (Aw) puede

generar aglomeración de partículas y actividad físico-química como promover actividad enzimática y reducir pH (Vivek et al., 2020).

Almacenar a 25 °C representa una ventaja para los productos por el gasto energético, en polvos de banana con cápsulas de *L. acidophilus* y *L. casei* se mantuvieron estables las condiciones físico-químicas de Aw, humedad y pH y aceptabilidad del producto a temperatura ambiente con una humedad inicial del 5% (Bora et al., 2019).

Alves et al. (2017) describen que mantener la humedad en el producto entre 1.7% y 2.6% mejora la viabilidad de las células. La presencia de 20 equivalentes de maltodextrina, en el cápsulas de *L. casei* NRRL B-442 obtenidas por secado por aspersión, con un flujo de aire de entrada de hasta 90°C promovió una baja absorción de agua en un polvo y estabilidad de células viables durante 5 semanas, el flujo de aire de entrada a 70°C generó una mayor sobrevivencia de células encapsuladas y menores cambios en el contenido de humedad. Se observó que esporas de *B. coagulans* se mantuvieron estables hasta por 24 meses en el café y el té a temperaturas de 25 °C y 60 +/- 5 % HR sin alterar las características sensoriales del producto (Majeed et al., 2019).

Majeed et al. (2016) observaron que las esporas de este *Bacillus coagulans* mantuvieron un porcentaje de viabilidad superior al 97%, almacenada durante 12 meses en productos como conserva de fresa y aceite vegetal de cocina, además, presentaron un 99% de viabilidad en jugo de manzana a pH de 3.5 durante 6 meses en condiciones de refrigeración.

III. Justificación

Actualmente hay una preocupación progresiva sobre los alimentos y el cuidado de la salud, es por eso que las industrias han buscado las aplicaciones de probióticos, prebióticos, y otras sustancias en estos productos para satisfacer esas necesidades, y ayudar en el reciente problema de salud (como obesidad, cáncer de colon) por una mala alimentación. Entre los que destacan géneros como *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Bacillus*. *Bacillus coagulans* es el microorganismo que en los últimos años ha incrementado su uso ya que, al ser un probiótico formador de esporas, le permite ser más resistente a factores de estrés que la mayoría.

Sin embargo, la inclusión de este tipo de sustancias en los alimentos a veces no resulta eficiente, debido a que son susceptibles al proceso gástrico que es principalmente pH y enzimas, resultando en una pérdida de viabilidad o funcionalidad, debido a este problema se ha recurrido a procesos de encapsulación. Que es un método por el cual se recubre la célula o sustancia con un material pared, que le permitirán resistir las condiciones de estrés generadas en el alimento, al consumo o durante la digestión.

El uso de los probióticos encapsulados es una alternativa para incrementar la sobrevivencia y controlar la microbiota de éste, así como mejorar el funcionamiento del metabolismo humano o prevención de enfermedades. La encapsulación en la actualidad se aplica para preservar o proteger una amplia gama de productos como enzimas, sabores, microorganismos entre otras más. Lo cual permite que en ciertos alimentos mantengan los beneficios que poseen.

El proceso más utilizado para encapsular es por secado por aspersión, que involucra altas temperaturas que evaporan la humedad, y genera un producto estable y duradero debido a su baja humedad, A_w y tamaño de partícula. Aunado a ello, dicho factor es perjudicial para los probióticos, ya que puede reducir o eliminar la concentración de éstos durante este proceso, debido a ello, estos microorganismos se colocan en matrices o materiales pared para su protección y permitan una mayor sobrevivencia de éstos, además de otorgarle características a las cápsulas que le permiten una mayor estabilidad a diversos factores.

Existe una diversidad de materiales pared usados para encapsular, recientemente ha surgido una alternativa de éstas, que es la utilización de prebióticos, que son moléculas que

generalmente el sistema digestivo humano no digiere, y que se caracteriza por ser alimento directo para la microbiota, denominándose así como alimentos simbióticos. Entre este tipo destaca la inulina, capaz de funcionar como un excelente material pared aumentando la sobrevivencia en la digestión, estimulando el establecimiento y desarrollo de los probióticos.

Sin embargo, al incluirse en vehículos alimenticios es de vital importancia que estos materiales pared no genere un cambio en las propiedades del alimento. Generalmente se utilizan alimentos de gran consumo o con intereses particulares para ser de selectos para ser alimentos con estas cápsulas. A nivel mundial la bebida de café es la más importante después del agua, esta se consume generalmente con azúcar y cremas o sustitutos de crema. Estos sustitutos de crema son un vehículo potencial para encapsulados simbióticos de manera industrial debido a que son generados por el mismo proceso (secado por aspersion), siendo así un producto muy estable y viable de acuerdo a la preferencia del consumidor de ingerirlo. Por esta razón, este trabajo fue realizado para evaluar el encapsulamiento de microorganismos probióticos para obtener un alimento que ofrezca no solamente las ventajas de un alimento de alta calidad, sino también un producto con las ventajas de tener probióticos y prebióticos incorporados.

IV. Objetivos

General

- Desarrollar una formulación de un sustituto de crema con prebiótico para café con el probiótico *Bacillus coagulans* incorporado y evaluar su sobrevivencia durante el almacenado, digestión *in vitro* y elaboración de la bebida de café.

Específicos

- Desarrollar y caracterizar un sustituto de crema para café potencial con prebiótico incorporado para ser vehículo de *B. coagulans* obtenida por secado por aspersión.
- Evaluar la sobrevivencia del probiótico encapsulado adicionado en el sustituto de crema durante el proceso de elaboración de la bebida del café.
- Evaluar la viabilidad *in vitro* de *B. coagulans* adicionado en el sustituto de crema, en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.
- Evaluar las características sensoriales del sustituto de crema con inulina y *Bacillus coagulans* en consumidores
- Evaluar la vida de anaquel del probiótico encapsulado, en el sustituto de crema para café.

V. Material y Métodos o Metodología.

Desarrollo del sustituto de crema

Se usaron los siguientes componentes en la formulación del sustituto de crema: sólidos de jarabe de maíz, dióxido de silicio, fosfato dibásico de potasio, diacetyl tartésteres de ácido arico demono-y diglicérido (datem), mono y diglicéridos, caseinato de sodio, carragenina, tripolifosfato de sodio, inulina, aceite de soya (Nutrioli.) y sabor artificial. Otros ingredientes como café comercial (Los portales®), crema de café comercial (Coffee mate®), y azúcar (Zulka®) se compró del supermercado local (Querétaro, México).

Preparación de crema

Las emulsiones del sustituto de crema se elaboraron de acuerdo con un método descrito por Hedayatnia y Mirhosseini (2016) con algunas modificaciones. En el Cuadro 1 se muestran las formulaciones de las cremas elaboradas. Se realizó en dos fases, oleosa (dispersa) y acuosa. La fase oleosa contenía el aceite de soya (12- 25% p / p), mono y diglicéridos (emulsionante, 2.5 % p / p), y Datem (blanqueador, 1 % p / p) se mezcló en un vaso de precipitado de 100 mL y se mantuvo en un baño de agua termocontrolado (70 ° C y agitación a 100 rpm durante 20 min). La fase acuosa que consistió en caseinato de sodio (5- 10 % p / p), dióxido de silicio (1,0% p / p), fosfato de hidrógeno dipotásico (2.5% p / p), tripolifosfato de sodio (2 % p / p), saborizante (1% p / p), sólidos de jarabe de maíz (60% p / p) e inulina (0 al 8% de inclusión p/ p), se dispersó gradualmente ocupando el 40% (p/ v) en agua destilada caliente (80 ± 5 ° C) y se agitó a 100 rpm durante 5 min. Posteriormente la fase oleosa se agregó gradualmente a la fase acuosa. Luego, la mezcla se agitó suavemente durante 10 minutos para preparar la emulsión de crema. La emulsión de crema se homogeneizó utilizando un homogeneizador (Armfield, FT9) de alta presión (a una presión de 1500 psi durante 3 ciclos) antes del proceso de secado. Todas las cremas formuladas se prepararon bajo las mismas condiciones de secado.

Cuadro 1. Diseño de formulación del sustituto de crema g/100

Formulas/ ingredientes	Aceite de soya	Caseinato de sodio	Inulina
F1	25	5	0
F2	20	10	0
F3	21	5	4
F4	16	10	4
F5	17	5	8
F6	12	10	8

Valores fijos en el sustituto de crema: Jarabe de maíz 60 g/ 100; mono y di glicéridos 2.5 g/ 100; Dióxido de silicio 1 g/ 100; Sabor artificial 1 g/ 100; Fosfato di básico de potasio 2.5 g/ 100; Datem 1 g/ 100; Tripolifosfato 2 g/ 100.

Secado por aspersión del sustituto de crema

La emulsión de crema homogenizada se alimentó a un secador por pulverización a escala de laboratorio (modelo BÜCHI B-290, Flawil, Suiza). Las muestras se atomizaron con un atomizador en la cámara de secado. El procedimiento de secado por pulverización se estableció en las siguientes condiciones: temperatura de entrada, 180 ± 5 ° C; temperatura de salida, 80 ± 5 ° C; y velocidad de alimentación, 10 mL / min.

Contenido de humedad.

El contenido de humedad de los sustitutos de crema se midió de acuerdo con al método establecido por la NMX-F-083-1986. El contenido de humedad se determinó por triplicado para cada muestra y el resultado se expresó en base húmeda.

Actividad de agua

La actividad del agua (a_w) de todas las cremas regulares e instantáneas se midió por triplicado utilizando un medidor de actividad de agua AquaLab (Serie 3TE, Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EE. UU.) Con ± 0.001 sensibilidad a 21 ° C.

Viscosidad aparente

La viscosidad aparente de todas las cremas se midió con un reómetro (BROOKFIELD) a temperatura ambiente (25 ± 1 ° C). El experimento se realizó reconstituyendo 20 g de crema en 100 mL de café preparado (70 ± 5 ° C). Se tomaron 25 mL de las muestras y se agitaron con un agitador de vidrio antes del análisis. Antes de la prueba, todas las muestras se dejaron reposar 5 minutos para alcanzar la condición de equilibrio a 25 ± 1 °C. La viscosidad aparente se midió por triplicado para cada muestra según Hedayatnia and Hamed Mirhosseini (2016).

Índice de solubilidad en agua (ISA)

Se determinó según lo descrito por Jafari et al., (2017). Para determinar ISA, se suspendieron 2,5 g de polvo en 30 mL de agua destilada a temperatura ambiente en un tubo de centrifuga tarado. La suspensión se agitó en un vortex durante 1 minuto, se colocó en un baño de agua (Fater Electric, Irán) a 37 ° C durante 30 min, y luego se centrifugó a 3500 rpm y 4 ° C durante 20 minutos. El sobrenadante líquido se vertió en un crisol previamente pesado y se secó a 105 ° C hasta un peso constante. ISA fue calculado mediante la siguiente ecuación (Ec):

$$ISA \% = \frac{\text{Peso sobrenadante seco}}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Proceso de encapsulación de GanedenBC³⁰ con sustituto de crema.

Inicialmente se colocó 1 gramo del producto en polvo GanedenBC³⁰ (esporas no encapsuladas de *B. coagulans*) en 50 mL de agua peptonada esterilizada se agitó durante 5 min. Se transfirió 1.0 mL de la suspensión obtenida a 9.0 mL de agua peptonada esterilizada en un tubo de ensayo y se mezcló con el equipo Vortex durante 10 segundos. Se realizó este último paso 6- 7 veces para obtener una dilución de 10^{7-8} por duplicado.

La cuantificación se realizó por el método de conteo en placa, en medio agar extracto de levadura y glucosa (Ver Anexo 2), se tomó 1.0 mL de cada uno de los 3 últimos tubos de dilución y se colocó en las placas Petri por triplicado, luego se agregó de 15 a 20 mL de medio fundido a una temperatura aproximada de 50°C en cada una de ellas, y se agitaron de acuerdo y en contra a las manecillas del reloj. Una vez solidificadas, las placas se incubaron en una posición invertida a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Se utilizó un control negativo para

asegurar la eficiencia del proceso. Posteriormente se cuantificó el número de colonias por placa multiplicando por el inverso del factor de dilución.

Se tomaron 3 formulaciones potenciales para ser utilizadas con la inclusión del probiótico con diferencias en solubilidad y viscosidad. Se elaboraron las mezclas como previamente se describieron, se pasteurizaron durante 5 min a 70°C y se dejaron enfriar, alcanzando 40 °C se procedió a agregar 1 gramo del probiótico comercial por cada 200 mL de mezcla. Posteriormente se mezcló durante 10-15 min a 100 rpm. La encapsulación de probióticos se realizó siguiendo las mismas condiciones con las que se elaboraron los sustitutos de crema. Los polvos fueron recolectados en un recipiente de recolección usando un separador ciclónico y almacenado en bolsas de polipropileno estéril para estudios posteriores.

Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE) de *B. coagulans*.

La muestra (polvo probiótico secado por aspersion) se suspendió en 0,1% de solución peptonada estéril (1:10 p/v), Para la disolución completa de los polvos, la suspensión se mezcló con un vórtex durante 3 minutos a temperatura ambiente.

El recuento se realizó mediante diluciones en serie de la suspensión inicial y se sembró en placas de agar extracto de levadura y glucosa por triplicado. La incubación se realizó a temperatura de 40 ± 2 ° C durante 48 h. Placas que contenían 30–300 colonias fueron elegidas para contar las células viables y expresado como log UFC / g. La eficiencia de encapsulación se expresó como:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde N y N0 son log UFC / g después y antes de la encapsulación, respectivamente.

Evaluación de la sobrevivencia de *B. coagulans* durante la elaboración de la bebida de café.

Para medir la tolerancia de *B. coagulans* encapsulado al estrés durante la elaboración de la bebida, se realizaron tratamientos con niveles de temperatura de 65°C y 82°C, permanecieron expuestas durante 10 min según Majeed et al., (2019) y Kulkani et al., (2018). 100 mL de café reconstituido fueron preparados mezclando 5 g de café liofilizado y café molido tostado en 100 mL de agua de los diferentes tratamientos. Posteriormente se

añadieron 3 g de la crema formulada con cápsulas, se mezcló con un agitador de vidrio durante 1 min. Una vez elaborada la bebida, se tomaron datos del volumen total, peso exacto de la crema y se recogieron alícuotas de 100 µL para la cuantificación, el contenido se enfrió a temperatura ambiente después del tratamiento térmico, la cuantificación se realizó por el método de conteo en placa en medio agar extracto de levadura y glucosa (ver Anexo 1). La supervivencia de las células se expresó tanto en encapsulados como en células libres de acuerdo con la ecuación:

$$\% \text{ de supervivencia} = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde N es el número de células viables (UFC / mL, g) después de la exposición a la bebida caliente y N₀ es el número de células viables (UFC / mL, g) antes de la exposición a afecciones gastrointestinales

Evaluación de las cápsulas en condiciones gastrointestinales *in vitro*

Para la evaluación de *B. coagulans* en el sustituto de crema se siguió la metodología reportada por Araújo et al. (2016) con algunas modificaciones. Se mezclaron 0.1 g de crema con *B. coagulans* en 1M HCl pH 1.8, pepsina 3 g L⁻¹ (pepsina de mucosa gástrica porcina P7000, Sigma Aldrich) y se incubaron a 37 ° C bajo continua agitación por 2 h. Posteriormente, el pH de las muestras se ajustó a 5.0 y se añadió bilis 1 g L⁻¹ (bilis bovina B3883-25G, Sigma Aldrich) y pancreatina 1 g L⁻¹ (pancreatina del páncreas porcino P3292, Sigma Aldrich) respectivamente, incubando nuevamente a 37 ° C durante 2 h. Finalmente, el pH se ajustó a 7.5 manteniendo las concentraciones de la bilis y la pancreatina. Las muestras fueron incubadas a 37 ° C durante 2 h bajo agitación continua hasta un total de 6 h de análisis. Los recuentos se realizaron al inicio y final de cada etapa de incubación.

El porcentaje de supervivencia de *B. coagulans* se determinó según Gandomi et al., (2016) tomando 1 mL de muestra de las células en los tiempos de toma de muestra establecidos, el recuento celular se llevó a cabo utilizando el método de recuento de placa descrito anteriormente. La tasa de supervivencia (%) de bacterias se calculó usando la ecuación:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

Donde N es el número de células viables (UFC / cm³, g) después de la exposición a condiciones gastrointestinales y N_0 es el número de células viables (UFC / cm³, g) antes de la exposición gastrointestinal.

Evaluación sensorial

Para la elección del sabor del sustituto de crema desarrollado se eligió la muestra elaborada con 8% de inulina de la cual se prepararon 3 sustitutos de crema con sabor a vainilla, leche y crema. Se realizó a través de un diseño de mezclas (Ver Cuadro 3), se eligieron 3 mezclas (3, 7 y 9) que involucraron los 3 sabores para generar percepciones no tan marcadas en el producto, y una crema comercial como control en la evaluación sensorial de acuerdo a la NOM-251-SSA1-2009. La prueba hedónica (Ver Anexo 2) fue realizada por 35 panelistas no entrenados (consumidores) de diferentes edades (mayor a 18) en el comedor de posgrado de la Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) entre las 8 am-1 pm. Fueron invitadas personas consumidoras de café a través de un poster (Ver Anexo 3). Los panelistas fueron colocados en la sala de evaluación, en ausencia de ruido, bajo luz blanca y sin la interacción de los demás participantes. Se proporcionó agua a libre acceso, para limpiar el paladar después de cada evaluación. Inicialmente, 100 mL de café reconstituido fue preparado mezclando 5 g de café instantáneo en 100 mL de agua caliente. Posteriormente se añadieron 3 g de la crema formulada y la crema comercial a la bebida de café reconstituido. Para cada panel, se sirvieron bebidas (20 mL) que contenían sustituto de crema formulada y el comercial en vasos de codificados con tres números de dígitos aleatorios. Los panelistas calificaron el sabor, aroma, color y aceptabilidad general de ambas muestras en una escala hedónica de nueve puntos, escala que va desde "no me gusta extremadamente, 1" hasta "me gusta extremadamente, 9".

Evaluación de la vida de anaquel del sustituto de crema probióticos encapsulados.

Para la prueba de estabilidad durante el almacenamiento el sustituto de crema con probióticos, se almacenó en bolsas metalizadas a 25 ° C durante 3 meses. La viabilidad de células se determinó mediante conteo en placa en agar extracto de levadura y glucosa a 0, 15, 30, 45, 60, y 90 días.

Para la prueba acelerada el producto se sometió a diferentes temperaturas y tiempos de almacenado 80 °C durante 32 h, 90 °C durante 12 h y 100 °C durante 12 h, las muestras fueron recolectadas en los minutos 0, 60, 120, 240, 480, 960 y 1920 para 80 °C; 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 720 min para 90° °C y 0, 15, 30, 60, 90, 120, 240 y 720 para 100 °C; la viabilidad de células se determinó mediante conteo en placa en agar extracto de levadura y glucosa.

Basados en las curvas de sobrevivencia (log vs tiempo), el modelo de Weibull fue usado para modelar la sobrevivencia del probiótico durante las condiciones de estrés por temperatura en las condiciones aceleradas a través de la siguiente ecuación:

$$UFC = c + (d - c)exp^{(-exp(b(\log(tiempo) - \log(e)))} \quad \text{Ec. 5}$$

donde d es la asíntota superior, c la asíntota inferior, e es el valor del tiempo (min) que produce una respuesta media entre d y c, mientras que b es la pendiente alrededor del punto de inflexión. El parámetro b puede ser positivo o negativo y, consecuentemente, las UFC puede crecer o decrecer a medida que el tiempo incrementa.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico Statgraphics (software versión 3.6). Las comparaciones fueron realizadas mediante un análisis de varianza factorial (ANOVA) y Tukey para determinar si hay un efecto en las características fisicoquímicas, y ANOVA simple para evaluar las características de eficiencia y sobrevivencia a la temperatura de consumo. Un valor $P < 0.05$ se consideró que denota significancia estadística para nuestros criterios, independientemente de la insignificancia estadística.

VI. Resultados y discusión

Características fisicoquímicas

Las características de las cremas obtenidas se observan en el cuadro 1. Se prepararon 6 mezclas diferentes con requisitos necesarios para cumplir con la NOM-051-SCFI SSA1 2010. Según Hedayatnia y Mirhosseini (2016), la reducción de grasas y energía con inulina en sustituto de crema es posible sin generar efectos adversos.

Humedad y actividad de agua

El contenido de A_w obtenido en los polvos fue entre 0.21 y 0.16, y de humedad alrededor de 1.2 % respectivamente, no se encontraron diferencias significativas, esto fue debido principalmente al uso de las mismas condiciones y el pequeño cambio en las formulaciones. Según O'Sullivan et al. (2019), la inclusión de inulina y la disminución de aceite no produce un cambio en estas características, dado que el proceso de secado por aspersion se encarga de eliminar la cantidad de agua en el producto a través de altas temperaturas utilizadas. Ya que la cantidad de agua depende de la temperatura utilizada, la temperatura de salida, velocidad de flujo y sistema de aspersor (Jafari et al., 2017).

Cuadro 2. Características fisicoquímicas de sustitutos de crema

Sustituto de crema	Humedad (%)	Actividad de agua	Solubilidad (%)	Viscosidad (cpi)
F1	1.21	0.2±0.01	80.77±2.06	2.76±0.23
F2	1.18	0.18±0.005	84±1.01	3.03±0.24
F1	1.19	0.16±0.006	93.4±0.84	3.21±0.21
F4	1.21	0.21±0.01	94.26±0.27	3.36±0.12
F5	1.19	0.18±0.02	94.21±0.78	3.26±0.05
F6	1.25	0.15±0.002	96.26±0.38	3.40±0.15
Valor p	0.9929	0.3285	0.0000	0.0138

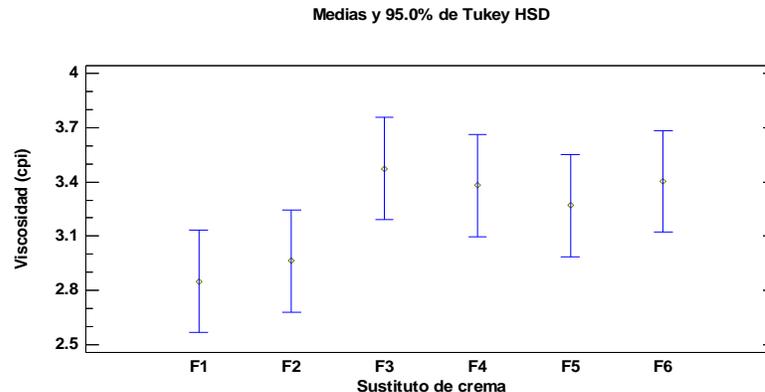
Las actividades de agua obtenidas en las formulaciones son comparables a los productos comerciales actualmente en el mercado, ya que se requiere un periodo extenso de almacenado para asegurar la estabilidad del producto. Las formulaciones presentaron valores menores a 0.3, asegurando estabilidad ante cambios fisicoquímicos, por enzimas o por reacciones de oxidación, mientras más alta sea la A_w y más se acerque a 1.0, que es la del agua pura, mayor será su inestabilidad. Por el contrario, los alimentos que son bajos en A_w , son menos susceptibles ante reacciones químicas y/o enzimáticas que ocurren en los

alimentos (oscurecimiento, rancidez, etcétera) durante el almacenamiento, así como en el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias (Badui, 2013).

Viscosidad aparente

La viscosidad presentó diferencias relativamente significativas ($p= 0.0138$) entre los sustitutos de crema, siendo las mezclas con inulina las que presentan mayores valores de viscosidad (3.4 centipoise) con respecto a las mezclas no adicionadas con inulina (2.8 centipoise), debido a que después de la hidratación, forma dispersiones coloidales viscosas o geles, además, la inulina cuando presenta cadenas largas muestra una alta viscosidad en agua, a diferencia de cuando son cortas que tienen una fuerte interacción con las moléculas de agua por su carácter altamente hidrofílico (Gupta et al., 2019). La temperatura de entrada al secador aplicada de 180 °C pudo haber ocasionado que la presencia de inulina no presentara tanta variabilidad en la viscosidad entre las muestras que la contienen, ya que Bohm et al., (2005) observaron que temperaturas de entrada de 165 °C provoca el rompimiento de las cadenas largas de inulina, lo que implica menor viscosidad.

Figura 2. Viscosidad aparente de sustitutos de crema

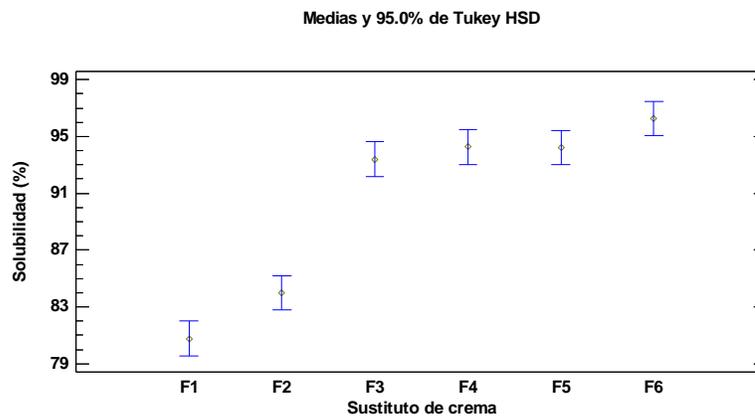


Índice de solubilidad en agua (ISA)

La solubilidad del sustituto de crema formulado presentó valores mayores (p valor=0.000) en presencia de inulina de entre 93- 96% de solubilidad, con respecto a los sustitutos sin el prebiótico 80-84 %, generalmente los sustitutos de crema comerciales oscilan en un mínimo de 70% de solubilidad, en este trabajo se obtuvieron valores superiores en todos los sustitutos. El secado por aspersión genera cambios estructurales en la inulina, estos cambios

dependen de tres parámetros principalmente: peso molecular, tamaño de cadena y temperatura de secado (Gupta et al., 2019), esto influye en su solubilidad, ya que depende de la mezcla de moléculas presentes, las moléculas más pequeñas se incorporan primero y al final las grandes como complemento estructural. La temperatura en el proceso de secado por aspersion es capaz de generar cadenas cortas de inulina (fructooligosacáridos) que favorezcan a una mayor interacción entre las moléculas con el agua (Beccard et al., 2018). Además, estos residuos de fructooligosacáridos (FOS) forman estructuras con los demás ingredientes y generan una mayor solubilidad. Como la temperatura al momento de consumo es alta, los vacíos intermoleculares del agua también aumentan debido al aumento de la energía cinética de las moléculas de agua y con ello aumenta las condiciones de solubilidad (Chikkerur et al., 2019).

Figura 3. Índice de solubilidad de sustitutos de crema

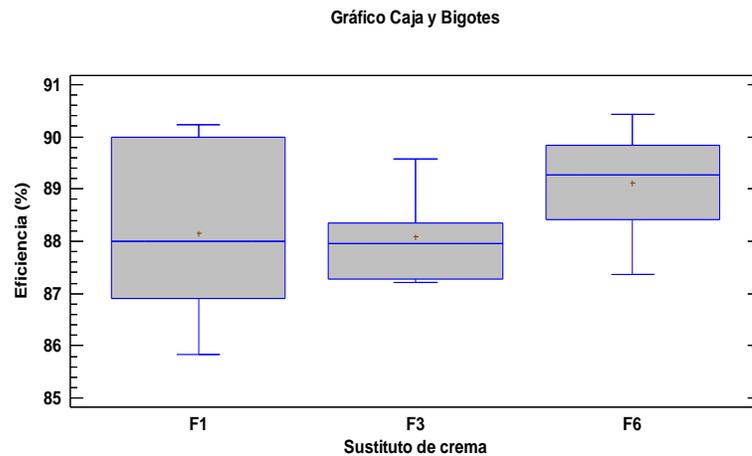


Eficiencia de encapsulación (EE) de *B. coagulans*.

En este trabajo evaluando las 3 formulaciones con diferencias fisicoquímicas (F1, F3 y F6), la eficiencia no se vio afectada por la presencia de inulina en las mezclas, este prebiótico tiene un efecto protector más influyente en otros probióticos que son más sensibles a temperaturas (Shinde et al., 2020; Lachowicz et al., 2020). Para elaboración de los sustitutos de crema, con un alto número del probiótico *B. coagulans*, los microorganismos deben resistir la alta temperatura que se aplica durante el secado por aspersion. Debido a que las esporas tienen paredes gruesas, se ha demostrado que pueden soportar altas temperaturas, humedad baja y otras condiciones como luz, nutrientes, etcétera (Haldar, L. y Gandhi, D. N. 2020). Las esporas de este probiótico han mostrado resistencia hasta temperaturas de 260 °

C durante 5 minutos, como reporta Majeed et al (2021) con 73% de viabilidad. En este trabajo se utilizaron 180°C, una temperatura menor a la reportada y en las muestras evaluadas se encontró una sobrevivencia entre un 85% a 90%, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos a través del ANOVA ($P = 0.1710$). Es posible que la estructura de la inulina se modificara formando cadenas largas a cadenas cortas que se hidrolizaron a causa de las altas temperaturas durante el secado por aspersión, lo cual podría influir más en las características de funcionalidad del producto y que no se reflejara en un efecto protector a las esporas (Beccard et al., 2018).

Figura 4. Eficiencia de encapsulación de *Bacillus coagulans* en sustituto de crema.



Evaluación de la sobrevivencia de *B. coagulans* durante la elaboración de la bebida de café.

Se realizó el desafío de incorporación del sustituto de crema probiótico con 0, 4 y 8% de inulina a las bebidas de café utilizando café soluble y café en grano tostado, molido y percolado. No se encontraron diferencias con respecto al tipo de café utilizado, sin embargo, a la temperatura de 82 °C sí se encontró una disminución hasta de 1.2 % en el sustituto con 8 % de inulina (Figura 5 y 6), en la viabilidad del microorganismo utilizando café tostado. Este efecto puede atribuirse a la composición del café ya que se sabe que el efecto antimicrobiano de los extractos de café tostado se debe principalmente a la acción de las melanoïdinas, producto de las reacciones de Maillard y la caramelización que se producen al tostar el café y los compuestos fenólicos (Mesías y Delgado, 2017).

Figura 5. Viabilidad a temperatura de consumo en café tostado a 65 ° C

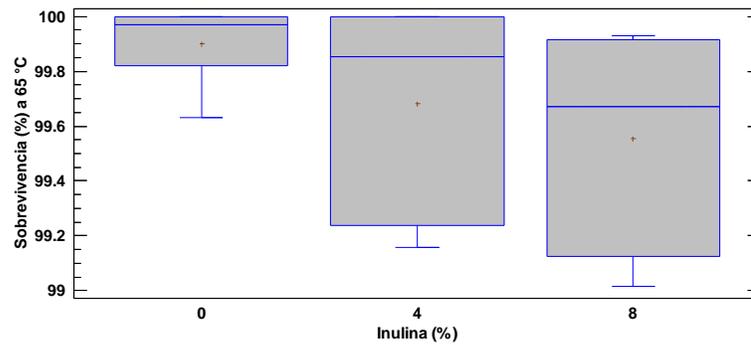
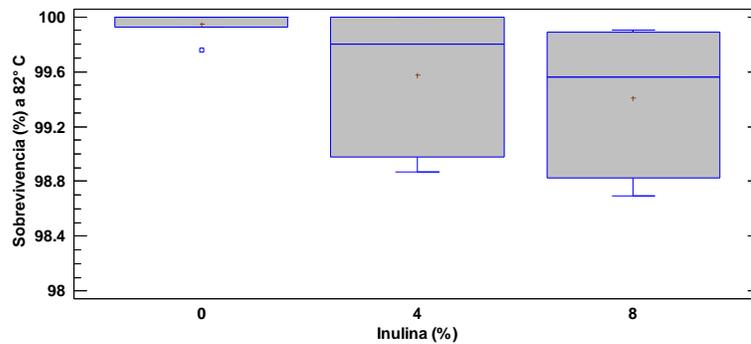


Figura 6. Viabilidad a temperatura de consumo en café tostado a 82 ° C

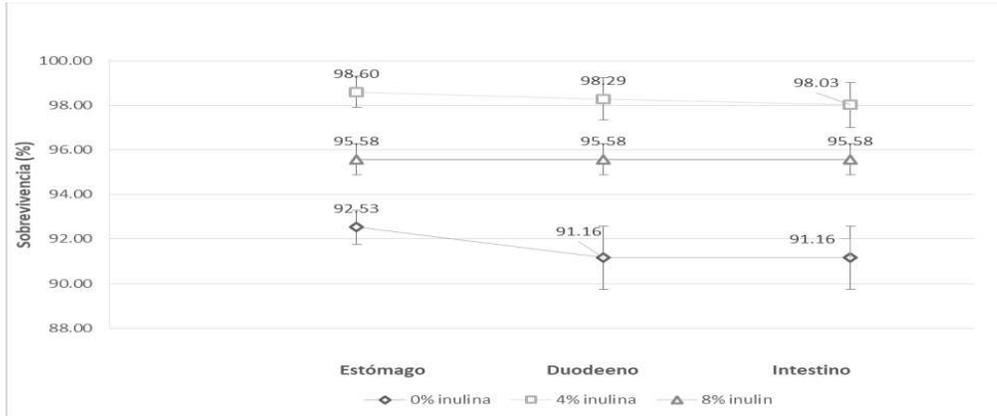


En el café soluble (Figura 7 y 8) no presentó ningún efecto significativo en la sobrevivencia del microorganismo, manteniéndose prácticamente el 100% de sobrevivencia después de la exposición en temperatura de 82 °C ($p= 0.4831$) y de 65 °C ($p=0.4641$) durante 10 minutos. La temperatura de la bebida de café al interactuar con el probiótico no juega un papel importante en el momento del consumo, pero sí la matriz en la que se consume, ya que es posible que otra variedad de café puede causar un mayor efecto en su sobrevivencia. Por otro lado, el proceso por el cual se elabora el café soluble (por liofilización) genera un producto menos variable en composición, en comparación con el tostado debido a los cambios fisicoquímicos que provoca anteriormente mencionados (Gloria et al., 2019).

Evaluación en condiciones gastrointestinales *in vitro*

Se evaluó con la finalidad de conocer la respuesta del probiótico en estas condiciones, ya que este punto es clave para que un producto probiótico sea viable para consumo, debido al pH y enzimas que intervienen en el proceso de digestión y generan un daño en estos. Las esporas de *B. coagulans* mostraron una alta resistencia en el proceso de digestión simulado. El efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* mostró diferencias significativas según el tipo de mezcla estudiada (Figura 9), la mezcla F1 presentó un valor menor en la tasa de supervivencia del 92% al final de los 180 min de digestión, ($p=0,000$). Las formulaciones en las cuales se adicionó inulina mostraron un efecto protector (formulación 4 y 8), ya que se presentó una tasa de supervivencia entre el 95 y el 98%. La resistencia al proceso de digestión es crucial ya que asegura que la dosis ingerida llegue realmente al tracto gastrointestinal (TGI) donde esencialmente ejerce su efecto. Dos Santos et al. (2018) menciona que en contraste con la temperatura en donde *Bacillus coagulans* presenta alta resistencia, el pH y las enzimas gastrointestinales pueden generar un efecto negativo en la sobrevivencia, sin embargo, debido a la lenta degradación de las microcápsulas de inulina en condiciones ácidas, resultó en un bajo impacto de la supervivencia de los probióticos. En base a estos resultados, la incorporación de prebióticos como la inulina puede ser una alternativa para mejorar la supervivencia de los probióticos a través del tracto gastrointestinal (Rosolen et al., 2019). Además, la supervivencia de las células probióticas microencapsuladas en este paso se puede atribuir a que la inulina resiste la hidrólisis por enzimas gastrointestinales, a una mayor estructuración de la cápsula con la inulina y a la rehidratación más lenta del polvo (Gupta et al., 2019). Además, la presencia de sólidos de jarabe se ha observado que también es viable para utilizarlo como encapsulante, si bien a no tan altas temperaturas en otros microorganismos, es posible que junto a la inulina jueguen un papel sinérgico para una mejor estructuración de la cápsula que permite una mayor sobrevivencia ante estas condiciones (Jantarathin et al. 2017, Mis-Solval et al., 2019).

Figura 9. Viabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas



En este trabajo se observó que el probiótico tiene una tolerancia natural a los ácidos gástricos y biliares, así como una resistencia suficiente frente a las enzimas digestivas que permiten su supervivencia durante el paso por el estómago y el tracto intestinal superior coincidiendo con Keller et al.(2019) y Behbahan et al.(2019). La fase estomacal fue la que generó una reducción significativa ($p = 0.000$) en la supervivencia (Figura 7). Según Venema et al. (2019) las esporas no germinan adecuadamente cuando entran en contacto con el pH ácido menor a 2 del estómago, mostrando un estado de latencia. En esta etapa hubo una reducción de hasta un 8% del total de células probióticas viables en la mezcla sin inulina. Hay varios compuestos en el jugo gástrico que pueden contribuir a la actividad bactericida, siendo el más importante el ácido clorhídrico que proporciona el pH bajo. La mayoría de los estudios han informado que un $pH < 2.0$ podría destruir las bacterias, y sin embargo, estos datos son generalmente relacionados con probióticos no formadores de esporas, ya que las esporas probióticas se desempeñan de mejor manera en cuanto a supervivencia en este medio ácido (Keller et al., 2019). La pepsina es una enzima digestiva que se produce en el estómago y descompone las proteínas en péptidos más pequeños. La pepsina en el estómago facilita la destrucción de bacterias; por lo tanto, es necesario investigar el efecto simulado de la pepsina y el pH en la cepa (Dettmar, 2019).

La estadía duodenal e intestinal no generó un efecto significativo en la supervivencia, ya que, a diferencia del estómago, tienen un pH más adecuado para su desarrollo sin provocar estrés, hidrólisis o efectos adversos en las células. Según Pacheco et al., (2018) la presencia de prebióticos como la inulina mejora la supervivencia de los probióticos ya que es una

fuente de alimento que permite un rápido establecimiento cuando se encuentran las condiciones ideales. En las esporas se ha demostrado que cepas del género *Bacillus* se adhieren en el intestino y posteriormente germinan, la espora germina en presencia de nutrientes o no nutrientes y otras condiciones ambientales favorables, estos nutrientes activan los receptores germinantes provocando la liberación de iones, incluidos Ca^{2+} y DPA, del núcleo de las esporas (Bernardeau et al., 2017).

Evaluación sensorial

En la evaluación sensorial realizada en los sustitutos de crema se utilizaron los sabores de crema, vainilla y leche. Se evaluaron mezclas de los sabores por un panel de 40 consumidores mayores de 18 años, en los que se observó que la mayoría de los sustitutos de crema fue calificada como “me agrada o me agrada mucho”, oscilando la mayoría de los valores entre 7 y 8 similar al control. Estadísticamente no se encontraron diferencias en sabor ($P=0.0577$), olor ($P=0.4725$), color ($P=0.7569$) y aceptabilidad general ($P=0.1933$) respectivamente, sin embargo, la mayor media en aceptabilidad general fue obtenida por el sustituto de crema sabor vainilla. Según un estudio realizado por Liu et al. (2021) los impulsores universales del gusto por algunas bebidas incluyen sabores cocidos / lechosos y caramelizados, sabor dulce y viscosidad, mientras que los de disgusto son los relacionados con los granos/ cereales y astringentes. Es posible que la percepción positiva mayor en la aceptabilidad general en el sustituto de crema sabor vainilla, se deba a que según Wang et al. (2018) este sabor tiene una interacción directa en la percepción del dulzor, y a su vez esta característica mostró sinergismo entre el sabor y aroma percibido en leche desnatada, siempre y cuando sea suministra en dosis bajas o medias, la vainilla incluso puede sustituir la percepción del dulzor en productos con menos cantidad de azúcar en el alimento.

Cuadro 3. Diseño de mezclas para el establecimiento de sabor en el sustituto de crema

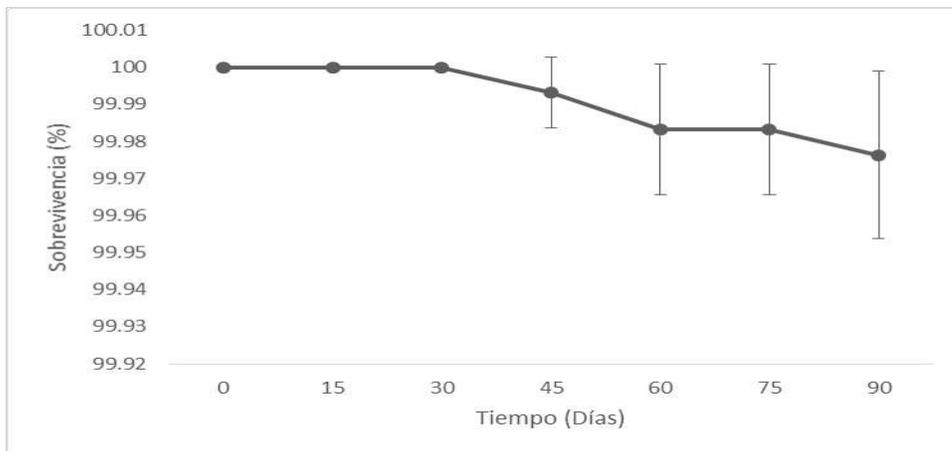
Mezcla	Sabor vainilla	Sabor crema	Sabor leche
1	0	0.50	0.50
2	0.50	0	0.50
3	0.17	0.67	0.17
4	0	0	1
5	0.33	0.33	0.33

6	0.5	0.50	0
7	0.67	0.17	0.17
8	1	0	0
9	0.17	0.17	0.67
10	0	1	0

Evaluación de la vida de anaquel del sustituto de crema con probióticos

La sobrevivencia de *Bacillus* durante los 3 meses en almacenamiento a temperatura ambiente no mostró un cambio drástico en la cuenta inicial y final de los muestreos (Ver Figura 8) manteniéndose en un 99.98 % de UFC, este dato era esperado ya que Majeed et al. (2018), mencionan que *coagulans* en productos con baja cantidad de humedad y actividad de agua puede permanecer hasta por al menos 24 meses, esto es debido a su estructura en forma de spora que puede permanecer en estado de latencia hasta encontrar condiciones óptimas para germinar.

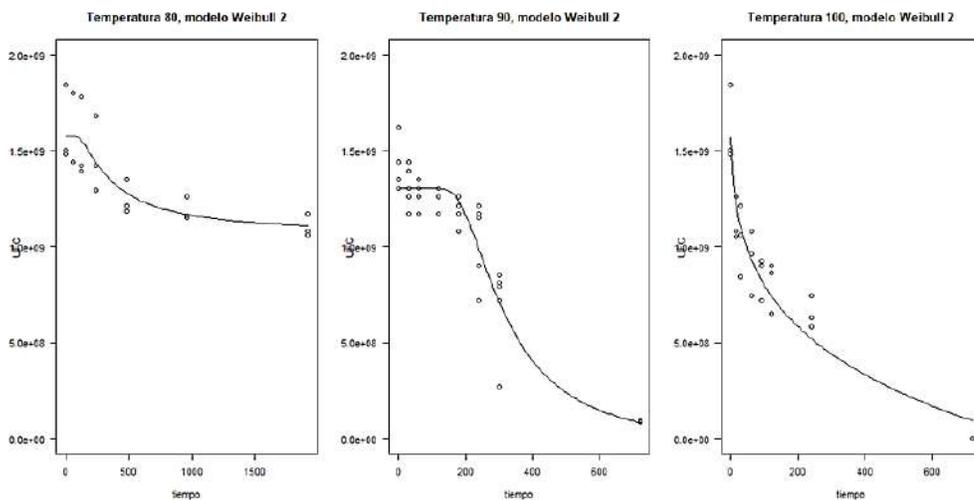
Figura 10. Viabilidad en anaquel en condición normal



En la figura 9 se observa que después de un tiempo expuesto a dichas condiciones no genera un cambio drástico en la sobrevivencia en condiciones aceleradas a 80°C, con respecto a la temperatura de 90°C y 100 °C, los valores encontrados en las asíntotas inferiores después de realizar Weibull fueron 1.0619e+09, -2.7819e+07, -1.1591e+10 respectivamente, en las temperaturas de 90 °C y 100 °C utilizadas en este experimento generó un mayor cambio en el comportamiento de la viabilidad, comparada con la temperatura a 80 °C, Majeed et al.

(2018) observaron que a expuesto a 82 °C en agua caliente no generaba un daño significativo en la viabilidad, y si su germinación se encontraba en presencia de prebióticos, la cantidad de células aumentaba con respecto al tiempo de germinación. Se desconoce con exactitud el comportamiento del porqué a ciertas temperaturas altas aún mantiene su integridad, pero está directamente relacionada con su estructura de espora y la protección extra que le otorga la inulina como pared. Para la temperatura a 80 °C la asíntota mantuvo un valor positivo y no llegó a cero como las demás, esto quiere decir que permanece de una manera estable sin mostrar indicios de que a temperatura menor, este microorganismo no resulte afectado a través del tiempo. El rendimiento de la esporulación suele ser máximo a la temperatura de crecimiento, pH o aw óptimos, y disminuye a medida que la temperatura, el pH o aw se desvían del óptimo. Las pequeñas proteínas solubles en ácido que se unen al ADN son una de las principales causas de la resistencia al calor seco de este probiótico (Bressuire-Isoard et al., 2018). Las proteínas de la capa de esporas que tienen un papel en la germinación son CotE, SpoIVA, SpoVM, SpoVID y SafA (permitiendo el paso de germinantes); aunado a 5 grupos de moléculas clasificadas como biotinas, piridoxinas, riboflavinas, tiaminas y folatos (Secaira-Morocho et al., 2020; Kapse et al., 2019, Cho y Chung, 2020). En este estudio no se apreció un efecto drástico en condiciones de 80°C por lo que realizar una predicción a través del tiempo resulta poco práctico, ya que a temperatura ambiente el periodo de viabilidad sería extremadamente largo, además, que hay reportes de 2 años, aunado a 3 meses expuesta a condiciones normales sin cambios aparentes en su viabilidad es en este trabajo.

Figura 11. Distribución Weibull de muerte microbiana en distintas temperaturas



VII. Conclusiones

Se desarrolló un sustituto de crema con inulina potencial para ser vehículo de *Bacillus coagulans* a través del secado por aspersión, con una solubilidad mayor al 90% y baja humedad (1% aprox.) y actividad de agua (0.2).

El probiótico expuesto a la temperatura de consumo de la bebida de café hasta de 85 °C durante 10min, no presentó disminución en la sobrevivencia café en grano molido como liofilizado.

La sobrevivencia de *Bacillus* en el ensayo gastrointestinal fue de aproximadamente 95.5- 98 % en los sustitutos con inulina, mientras que sin el prebiótico alcanzaba un 91 %, siendo la etapa del estómago la de mayor efecto sobre esta.

El estudio sensorial, mostró que el sustituto con sabor a vainilla fue preferido en cuanto a aceptabilidad general por los consumidores, sin embargo, no observaron diferencias estadísticas entre el sustituto de crema desarrollado en este trabajo y el comercial.

Bacillus coagulans mostró estabilidad en almacenamiento normal capaz de mantenerse prácticamente intacto en su cuenta microbiana después 3 meses, y del estrés por almacenamiento acelerado por temperatura de 80°C no generó un cambio en el, por lo que resulta innecesario la predicción ya que se prolongaría por años a condiciones normales.

VIII. Bibliografía

Aditya, N. P., Espinosa, Y. G., & Norton, I. T. (2017). Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. *Biotechnology advances*, 35(4), 450-457.

Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Ahmed, A., Ahmad, M. H., Maan, A. Faqir, M. A., Hussain, S. (2019). Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *Food Science & Nutrition*, 7(12), 3931-3940.

Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Arshad, M. S., Khan, M. A., Saeed, M., Ateeq, H., Faqir M. A., Tufail, T. (2020). Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1649-1656.

Ahmed, W., & Rashid, S. (2019). Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(1), 1-13.

Akombi, B. J., Agho, K. E., Merom, D., Renzaho, A. M., & Hall, J. J. (2017). Child malnutrition in sub-Saharan Africa: A meta-analysis of demographic and health surveys (2006-2016). *PloS one*, 12(5).

Al-Tawaha, R., & Meng, C. (2018). Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Adv Environ Biol*, 12, 16-27.

Alves, N. N., de Oliveira Sancho, S., da Silva, A. R. A., Desobry, S., da Costa, J. M. C., & Rodrigues, S. (2017). Spouted bed as an efficient processing for probiotic orange juice drying. *Food Research International*, 101, 54-60.

Amoah, K., Huang, Q. C., Tan, B. P., Zhang, S., Chi, S. Y., Yang, Q. H., Liu, H. Y., Dong, X. H. (2019). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 87, 796-808.

Anaya-Loyola, M. A., Enciso-Moreno, J. A., López-Ramos, J. E., García-Marín, G., Álvarez, M. Y. O., Vega-García, A. M., Mosqueda, J., García-Gutiérrez, D. G., Keller D., Pérez-Ramírez, I. F. (2019). *Bacillus coagulans* GBI-30, 6068 decreases upper respiratory and gastrointestinal tract symptoms in healthy Mexican scholar-aged children by modulating immune-related proteins. *Food research international*, 125, 108567.

Archacka, M., Białas, W., Dembczyński, R., Olejnik, A., Sip, A., Szymanowska, D., Celińska, E., Jankowski, T., Olejnik, A., Rogodzińska, M. (2019). Method of preservation

and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. *Food chemistry*, 274, 733-742.

Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *Food Science and Technology*, 99, 583-593.

Artica Mallqui, L. (2014). Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos. Libros y editoriales TEIA

Bagchi, D. (Ed.). (2019). Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world. Academic press. *In nutraceuticals and functional foods: innovation, insulation, evangelism, and evidence*. 3-6.

Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food chemistry*, 237, 623-631.

Barba-Vidal, E., Castillejos, L., Roll, V. F., Cifuentes-Orjuela, G., Moreno Muñoz, J. A., & Martín-Orúe, S. M. (2017). The probiotic combination of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BPL6 reduces pathogen loads and improves gut health of weaned piglets orally challenged with *Salmonella Typhimurium*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1570.

Barbosa, J., & Teixeira, P. (2017). Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: A review. *Food Reviews International*, 33(4), 335-358.

Beccard, S., Bernard, J., Wouters, R., Gehrich, K., Zielbauer, B., Mezger, M., & Vilgis, T. A. (2019). Alteration of the structural properties of inulin gels. *Food Hydrocolloids*, 89, 302-310

Behbahani, B. A., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15. *Microbial Pathogenesis*, 103677. doi:10.1016/j.micpath.2019.103677

Bello, B., Mustafa, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Tam, Y. J., Ariff, A. B., Manap, M. Y., Abbasiliasi, S. (2018). Evaluation of the effect of soluble polysaccharides of palm kernel cake as a potential prebiotic on the growth of probiotics. *3 Biotech*, 8(8), 346.

Bernardeau, M., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D., & Nurminen, P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of food science and technology*, 54(8), 2570-2584.

- Bernardeau, M., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D., & Nurminen, P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2570-2584.
- Blasco, T. B. (2017). Alimentación y nutrición: fundamentos y nuevos criterios. *In* Alimentos: Complejidad química. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas.
- Böhm, A., Kleessen, B., & Henle, T. (2006). Effect of dry heated inulin on selected intestinal bacteria. *European Food Research and Technology*, 222(5), 737-740.
- Boon, E. A., Croft, K. D., Shinde, S., Hodgson, J. M., & Ward, N. C. (2017). The acute effect of coffee on endothelial function and glucose metabolism following a glucose load in healthy human volunteers. *Food & function*, 8(9), 3366-3373.
- Bora, A. F. M., Li, X., Zhu, Y., & Du, L. (2019). Improved viability of microencapsulated probiotics in a freeze-dried banana powder during storage and under simulated gastrointestinal tract. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(4), 1330-1339.
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., & Carlin, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS microbiology reviews*, 42(5), 614-626.
- Cao, J., Yu, Z., Liu, W., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, 64, 103643.
- Cassani, L., Gomez-Zavaglia, A., & Simal-Gandara, J. (2019). Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: from food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. *Food Research International*. Artículo entregado para la publicación
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). (2018). El café en México diagnóstico y perspectiva.
- Chikkerur, J., Samanta, A. K., Kolte, A. P., Dhali, A., & Roy, S. (2019). Production of short chain fructo-oligosaccharides from inulin of chicory root using fungal endoinulinase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-21.
- Cho, W. I., & Chung, M. S. (2020). *Bacillus* spores: A review of their properties and inactivation processing technologies. *Food Science and Biotechnology*, 1-15.
- Colombo, M., Todorov, S. D., Eller, M., & Nero, L. A. (2018). The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. *Journal of Dairy Research*, 85(4), 487-496.

- De Araújo Etchepare, M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, É. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S. Grosso, C. R., de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 511-517.
- De Paulo Farias, D., de Araújo, F. F., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2019). Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science & Technology*.
- Den Besten, H. M., Berendsen, E. M., Wells-Bennik, M. H., Straatsma, H., & Zwietering, M. H. (2017). Two complementary approaches to quantify variability in heat resistance of spores of *Bacillus subtilis*. *International journal of food microbiology*, 253, 48-53.
- Dettmar, P. W. (2019). Damage to the Upper Gastrointestinal Tract-The Role of Pepsin. *EC Gastroenterology and Digestive System*, 6, 427-438.
- Dos Santos, D. X., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Bedani, R., Saad, S. M. I., & Perego, P. (2019). Improved probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. *Lwt*, 99, 404-410.
- Fernández-Tomé, S., Marin, A. C., Ortega Moreno, L., Baldan-Martin, M., Mora-Gutiérrez, I., Lanas-Gimeno, A., Moreno-Monteagudo, J. A., Santander, C., Sánchez, B., Chaparro, M., Gisbert, J. P. (2019). Immunomodulatory Effect of Gut Microbiota-Derived Bioactive Peptides on Human Immune System from Healthy Controls and Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*, 11(11), 2605.
- Fonte, P., Reis, S., & Sarmiento, B. (2016). Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of controlled release*, 225, 75-86.
- Fu, R., Chen, D., Tian, G., Zheng, P., Mao, X., Yu, J., ... & Yu, B. (2019). Effect of dietary supplementation of *Bacillus coagulans* or yeast hydrolysates on growth performance, antioxidant activity, cytokines and intestinal microflora of growing-finishing pigs. *Animal Nutrition*, 5(4), 366-372.
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *Food Science and Technology*, 69, 365-371.
- Garcia, C., Guérin, M., Souidi, K., & Remize, F. (2020). Lactic Fermented Fruit or Vegetable Juices: Past, Present and Future. *Beverages*, 6(1), 8.

- Gatej, S. M., Bright, R., Weyrich, L. S., Marino, V., Christophersen, C. T., Gibson, R. J., Gully, N., Zilm, P., Bartold, P. M. (2020). Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* GG Protects Against *P. Gingivalis* And *F. Nucleatum* Gut Dysbiosis. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 22(2), 18-27.
- Gaudreau, H., Champagne, C. P., Remondetto, G. E., Gomaa, A., & Subirade, M. (2016). Co-encapsulation of *Lactobacillus helveticus* cells and green tea extract: Influence on cell survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 26, 451-459.
- Ghoshal, G. (2019). Beverages: A Potential Delivery System for Nutraceuticals. In *Nutrients in Beverages* (pp. 111-142). Panjab University, Chandigarh, India. Academic Press.
- Gloria, M. B. A., Almeida, A. A. P., & Engeseth, N. (2019). Antimicrobial activity of coffee. In *Coffee* (pp. 234-254).
- González-Cuello, R. E., Colpas-Castillo, F., & Tarón-Dunoyer, A. (2017). Protection of *Lactobacillus acidophilus* under *in vitro* gastrointestinal conditions employing binary microcapsules containing inulin. *African Journal of Biotechnology*, 16(3), 132-138.
- González-Ferrero, C., Irache, J. M., Marín-Calvo, B., Ortiz-Romero, L., Virto-Resano, R., & González-Navarro, C. J. (2020). Encapsulation of probiotics in soybean protein-based microparticles preserves viable cell concentration in foods all along the production and storage processes. *Journal of Microencapsulation*, 1-12.
- Gul, L. B., Gul, O., Yilmaz, M. T., Dertli, E., & Con, A. H. (2020). Optimization of cryoprotectant formulation to enhance the viability of *Lactobacillus brevis* ED25: Determination of storage stability and acidification kinetics in sourdough. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(4), e14400.
- Gul, O., & Atalar, I. (2019). Different stress tolerance of spray and freeze dried *Lactobacillus casei* Shirota microcapsules with different encapsulating agents. *Food science and biotechnology*, 28(3), 807-816.
- Gupta, N., Jangid, A. K., Pooja, D., & Kulhari, H. (2019). Inulin: A novel and stretchy polysaccharide tool for biomedical and nutritional applications. *International journal of biological macromolecules*, 132, 852-863.
- Haldar, L., & Gandhi, D. N. (2020). Development of vacuum-dried probiotic milk powder with *Bacillus coagulans*. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 283-291.
- Hedayatnia, S., & Mirhosseini, H. (2018). Quality of Reduced-Fat Dairy Coffee Creamer: Affected by Different Fat Replacer and Drying Methods. *Descriptive Food Science*, 115.
- Hernández-Barrueta, T., Martínez-Bustos, F., Castaño-Tostado, E., Lee, Y., Miller, M. J., & Amaya-Llano, S. L. (2020). Encapsulation of probiotics in whey protein isolate and modified

huauzontle's starch: An approach to avoid fermentation and stabilize polyphenol compounds in a ready-to-drink probiotic green tea. *LWT*, 124, 109131.

Holguín, L. D., García, A. M., Lemus, K., Ramos, A., Sierra, G. J., & Jiménez, M. G. (2017). Microbiota intestinal y sus generalidades en el organismo del ser humano. *Biociencias*, 1(2).

Hosseini, S. S., Mohammadian, T., Abbaspour, M. R., & Alishahi, M. (2018). The effect of microencapsulation with alginate/chitosan on survival of probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) in the simulated condition of stomach and intestines in Huso. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 27(2), 161-172.

Hudson, J. L., Zhou, J., Kim, J. E., & Campbell, W. W. (2020). Incorporating Milk Protein Isolate into an Energy-Restricted Western-Style Eating Pattern Augments Improvements in Blood Pressure and Triglycerides, but Not Body Composition Changes in Adults Classified as Overweight or Obese: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*, 12(3), 851.

Jafari, S. M., Ghaleñoi, M. G., & Dehnad, D. (2017). Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder technology*, 311, 59-65.

Jäger, R., Purpura, M., Farmer, S., Cash, H. A., & Keller, D. (2018). Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 improves protein absorption and utilization. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 611-615.

Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeekul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4(5), 6166-6172.

Jeon, H. L., Lee, N. K., Yang, S. J., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2017). Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. *Food science and biotechnology*, 26(6), 1641-1648.

Ji, R., Wu, J., Zhang, J., Wang, T., Zhang, X., Shao, L., ... & Wang, J. (2019). Extending Viability of *Bifidobacterium longum* in Chitosan-Coated Alginate Microcapsules Using Emulsification and Internal Gelation Encapsulation Technology. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1389

Kantachote, D., Ratanaburee, A., Hayisama-ae, W., Sukhoom, A., & Nunkaew, T. (2017). The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. *Journal of Functional Foods*, 32, 401-408.

Kapse, N. G., Engineer, A. S., Gowdaman, V., Wagh, S., & Dhakephalkar, P. K. (2019). Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans* HS243. *Genomics*, 111(4), 921-929.

- Keller, D., Van Dinter, R., Cash, H., Farmer, S., & Venema, K. (2017). *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 increases plant protein digestion in a dynamic, computer-controlled *in vitro* model of the small intestine (TIM-1). *Beneficial Microbes*, 8(3), 491-496.
- Keller, D., Verbruggen, S., Cash, H., Farmer, S., & Venema, K. (2019). Spores of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 show high germination, survival and enzyme activity in a dynamic, computer-controlled *in vitro* model of the gastrointestinal tract. *Beneficial Microbes*, 1–12. doi:10.3920/bm2018.0037
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 927-939.
- Kim, C. S., Cha, L., Sim, M., Jung, S., Chun, W. Y., Baik, H. W., & Shin, D. M. (2020). Probiotic supplementation improves cognitive function and mood with changes in gut microbiota in community-dwelling elderly: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *The Journals of Gerontology: Series A*. Artículo entregado para la publicación.
- Kim, M., Nam, D. G., Im, P., Choe, J. S., & Choi, A. J. (2020). Optimal conditions for the encapsulation of *Weissella cibaria* JW15 using alginate and chicory root and evaluation of capsule stability in a simulated gastrointestinal system. *Journal of Food Science*, 85(2), 394-403.
- Konar, N., Palabiyik, I., Toker, O. S., Polat, D. G., Kelleci, E., Pirouzian, H. R., Akcicek, A., Sagdic, O. (2018). Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. *Journal of Functional Foods*, 43, 206-213.
- Konuray, G., & Erginkaya, Z. (2018). Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. *Foods*, 7(6), 92.
- Kulkarni, S., Haq, S. F., Samant, S., & Sukumaran, S. (2018). Adaptation of *Lactobacillus acidophilus* to thermal stress yields a thermotolerant variant which also exhibits improved survival at pH 2. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 717-727.
- Lachowicz, S., Michalska-Ciechanowska, A., & Oszmiański, J. (2020). The Impact of Maltodextrin and Inulin on the Protection of Natural Antioxidants in Powders Made of Saskatoon Berry Fruit, Juice, and Pomace as Functional Food Ingredients. *Molecules*, 25(8), 1805.
- Lee, M. C., Hsu, Y. J., Ho, H. H., Hsieh, S. H., Kuo, Y. W., Sung, H. C., & Huang, C. C. (2020). *Lactobacillus salivarius* Subspecies *salicinius* SA-03 is a New Probiotic Capable of Enhancing Exercise Performance and Decreasing Fatigue. *Microorganisms*, 8(4), 545.

- Lee, N. K., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food science and biotechnology*, 28(5), 1297-1305.
- Li, Q., Tao, Q., Teixeira, J. S., Su, M. S. W., & Gänzle, M. G. (2020). Contribution of glutaminases to glutamine metabolism and acid resistance in *Lactobacillus reuteri* and other vertebrate host adapted lactobacilli. *Food microbiology*. Artículo entregado para la publicación.
- Liu, Y., Toro-Gipson, R. S. D., & Drake, M. (2021). Sensory properties and consumer acceptance of ready-to-drink vanilla protein beverages. *Journal of Sensory Studies*. doi:10.1111/joss.12704
- Looi, Y. F., Ong, S. P., Julkifle, A., & Alias, M. S. (2019). Effects of pretreatment and spray drying on the physicochemical properties and probiotics viability of Moringa (*Moringa oleifera* Lam) leaf juice powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(4), e13915.
- López C. L. M. (2017). Incorporación de *Bacillus coagulans* a productos derivados de cereales.
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., & Ali, F. (2019). Evaluation of probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 viability after tea and coffee brewing and its growth in GIT hostile environment. *Food research international*, 121, 497-505.
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., & Ali, F. (2016). Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(4), 894-901.
- Majzoobi, M., Aghdam, M. B. K., Eskandari, M. H., & Farahnaky, A. (2019). Quality and microbial properties of symbiotic bread produced by straight dough and frozen part-baking methods. *Journal of texture studies*, 50(2), 165-171.
- Maleki, O., Khaledabad, M. A., Amiri, S., Asl, A. K., & Makouie, S. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in whey protein isolate-crystalline nanocellulose-inulin composite enhanced gastrointestinal survivability. *LWT*, 109224. doi:10.1016/j.lwt.2020.109224
- Mazkour, S., Shekarforoush, S. S., & Basiri, S. (2019). The effects of supplementation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* spores on the intestinal microflora and growth performance in rat. *Iranian journal of microbiology*, 11(3), 260.

Mesías, M., & Delgado-Andrade, C. (2017). Melanoidins as a potential functional food ingredient. *Current Opinion in Food Science*, 14, 37-42.

Michalska-Ciechanowska, A., Majerska, J., Brzezowska, J., Wojdyło, A., & Figiel, A. (2020). The influence of maltodextrin and inulin on the physico-chemical properties of cranberry juice powders. *ChemEngineering*, 4(1), 12.

Mis-Solval, K. E., Jiang, N., Yuan, M., Joo, K. H., Cavender, G. A. (2019). The Effect of the Ultra-High-Pressure Homogenization of Protein Encapsulants on the Survivability of Probiotic Cultures after Spray Drying. *Foods*, 8(12), 689.

Mohanty, D., Misra, S., Mohapatra, S., & Sahu, P. S. (2018). Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Bioscience*.

Molina, A. (2019). Probiotics and their mechanism of action in animal feed. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 601-611.

Nam, B., Kim, S. A., Park, S. D., Kim, H. J., Kim, J. S., Bae, C. H., Kim, J. Y., Lee, J. I., Sim, J. H. (2020). Regulatory effects of *Lactobacillus plantarum* HY7714 on skin health by improving intestinal condition. *PloS one*, 15(4), e0231268.

Ney, D. M., & Etzel, M. R. (2017). Designing medical foods for inherited metabolic disorders: Why intact protein is superior to amino acids. *Current opinion in biotechnology*, 44, 39-45.

NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS. FOODS. MOISTURE IN FOOD PRODUCTS DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

NOM-051-SCFI/SSA1-2010, ESPECIFICACIONES GENERALES DE ETIQUETADO PARA ALIMENTOS Y BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS PREENVASADOS - INFORMACIÓN COMERCIAL Y SANITARIA. NORMA OFICIAL MEXICANA

NOM-111-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS. NORMA OFICIAL MEXICANA.

NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA. NORMA OFICIAL MEXICANA

NOM-130-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. ALIMENTOS ENVASADOS EN RECIPIENTES DE CIERRE HERMÉTICO Y SOMETIDOS A TRATAMIENTO TÉRMICO. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS. NORMA OFICIAL MEXICANA

NOM-210-SSA1-2014, PRODUCTOS Y SERVICIOS. MÉTODOS DE PRUEBA MICROBIOLÓGICOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS. NORMA OFICIAL MEXICANA.

NOM-251-SSA1-2009, PRÁCTICAS DE HIGIENE PARA EL PROCESO DE ALIMENTOS, BEBIDAS O SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS. NORMA OFICIAL MEXICANA.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

Ogden, C. L., Fryar, C. D., Hales, C. M., Carroll, M. D., Aoki, Y., & Freedman, D. S. (2018). Differences in obesity prevalence by demographics and urbanization in US children and adolescents, 2013-2016. *Jama*, 319(23), 2410-2418.

O'Sullivan, J. J., Norwood, E. A., O'Mahony, J. A., & Kelly, A. L. (2019). Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. *Journal of food engineering*, 243, 57-69.

Oteng, A. B., & Kersten, S. (2020). Mechanisms of action of trans fatty acids. *Advances in Nutrition*, 11(3), 697-708.

Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food chemistry*, 272, 494-506.

Pacheco, C., González, E., Robert, P., & Parada, J. (2018). Retention and pre-colon bioaccessibility of oleuropein in starchy food matrices, and the effect of microencapsulation by using inulin. *Journal of Functional Foods*, 41, 112-117.

Pandey, K. R., & Vakil, B. V. (2017). Encapsulation of probiotic *Bacillus coagulans* for enhanced shelf life. *J Appl Biol Biotechnol*, 5, 57-65.

Pinto-Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., Cominetti, O., Welsh, C., Rieder, A., Traynor, J., Gregory, C., De Palma, G., Pigrau, M., Ford, A., Macri, J., Bercik, P. (2017). Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 153(2), 448-459.

Pourjafar, H., Noori, N., Gandomi, H., Basti, A. A., & Ansari, F. (2020). Viability of microencapsulated and non-microencapsulated *Lactobacilli* in a commercial beverage. *Biotechnology Reports*, 25, e00432.

- Prasanna, P.P. H., & Charalampopoulos, D. (2019). Encapsulation in an alginate–goats' milk–inulin matrix improves survival of probiotic *Bifidobacterium* in simulated gastrointestinal conditions and goats' milk yoghurt. *International journal of dairy technology*, 72(1), 132-141.
- Preston, K., Krumian, R., Hattner, J., de Montigny, D., Stewart, M., & Gaddam, S. (2018). *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Beneficial Microbes*, 9(5), 697-706.
- Qaziyani, S. D., Pourfarzad, A., Gheibi, S., & Nasiraie, L. R. (2019). Effect of encapsulation and wall material on the probiotic survival and physicochemical properties of synbiotic chewing gum: study with univariate and multivariate analyses. *Heliyon*, 5(7), e02144.
- Raddatz, G. C., Poletto, G., de Deus, C., Codevilla, C. F., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Muller, E.I., Moraes-Flores, E. M., Almeida-Esmerino, E., de Menezes, C. R. (2020). Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying. *Food Research International*. Artículo entregado para la publicación.
- Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on *in vitro* digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *Lactobacillus casei* NCDC297. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 50-58.
- Rätsep, M., Sepp, E., Smidt, I., Truusalu, K., Songisepp, E., Stsepetova, J., Naaber, P., Mikelsaar, R.H., Mikelsaar, M. (2017). A combination of the probiotic and prebiotic product can prevent the germination of *Clostridium difficile* spores and infection. *Anaerobe*, 47, 94-103.
- Ray, M., Ghosh, K., Har, P. K., Singh, S. N., & Mondal, K. C. (2017). Fortification of rice gruel into functional beverage and establishment as a carrier of newly isolated *Bifidobacterium* sp. MKK4. *Research Journal of Microbiology*, 12, 102-117.
- Rodríguez, Y. A., Rojas, A. F., & Rodríguez, S. (2016). Encapsulation of Probiotics for Food Applications. *Biosalud*, 15(2), 106-115.
- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Carmen-Limon, M., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palouck, A., Ribot, J., Rodrigo, M. J., Zacarias, L., Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in lipid research*, 70, 62-93.

- Rosolen, M. D., Bordini, F. W., de Oliveira, P. D., Conceição, F. R., Pohndorf, R. S., Fiorentini, Â. M., Padilhada, W. S., Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. *Lwt*, 115, 108411.
- Sawada, D., Sugawara, T., Ishida, Y., Aihara, K., Aoki, Y., Takehara, I., Takano, K., Fujiwara, S. (2016). Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasserii* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. *Food Research International*, 79, 33-39.
- Secaira-Morocho, H., Castillo, J. A., & Driks, A. (2020). Diversity and evolutionary dynamics of spore-coat proteins in spore-forming species of Bacillales. *Microbial genomics*, 6(11).
- Sharif, K., Watad, A., Bragazzi, N. L., Adawi, M., Amital, H., & Shoenfeld, Y. (2017). Coffee and autoimmunity: More than a mere hot beverage!. *Autoimmunity reviews*, 16(7), 712-721.
- Shinde, T., Vemuri, R., Shastri, M. D., Perera, A. P., Tristram, S., Stanley, R., & Eri, R. (2019). Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. *Journal of Functional Foods*, 52, 100-108.
- Shonyela, S. M., Feng, B., Yang, W., Yang, G., & Wang, C. (2020). The regulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* GakoG on T lymphocyte and the development of intestinal villi in piglets of different periods. *AMB Express*, 10(1), 1-11.
- Shu, G., He, Y., Chen, L., Song, Y., Cao, J., & Chen, H. (2018). Effect of xanthan–Chitosan microencapsulation on the survival of *Lactobacillus acidophilus* in simulated gastrointestinal fluid and dairy beverage. *Polymers*, 10(6), 588.
- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Bhutani, T., Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of translational medicine*, 15(1), 73.
- Soares, M. B., Martinez, R. C., Pereira, E. P., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S., & Sant'Ana, A. S. (2019). The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food research international*, 125, 108542.
- Souza, F. P., Balthazar, C. F., Guimarães, J. T., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Raices, R. S. L., Márcia C. Silva, M. C., Cruz, A. G. (2019). The addition of xyloligosaccharide in strawberry-flavored whey beverage. *LWT*, 109, 118-122.

- Srisukchayakul, P., Charalampopoulos, D., & Karatzas, K. A. (2018). Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in low pH fruit juices during refrigerated storage. *Food Research International*, 111, 198-204.
- Srisukchayakul, P., Charalampopoulos, D., Karatzas, K. A. (2018). Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in low pH fruit juices during refrigerated storage. *Food Research International*, 111, 198-204.
- Tan, L. J., Jeon, H. J., Park, S., Kim, S. A., Lim, K., Chung, S., ... & Shin, S. (2021). Association of coffee consumption and its types according to addition of sugar and creamer with metabolic syndrome incidence in a Korean population from the health examinees (Hexa) study. *Nutrients*, 13(3), 920.
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M., & Chirife, J. (2020). Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. *Water activity in foods: Fundamentals and applications*, 323-355.
- Thakkar, S., Anklam, E., Xu, A., Ulberth, F., Li, J., Li, B., Hugas, M., Sarma, N., Crerar, S., Swift, S., Hakamatsuka, T., Curtui, V., Yan, W., Geng, X., Slikker, W., WeidaTong. (2020). Regulatory landscape of dietary supplements and herbal medicines from a global perspective. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 104647.
- Tsai, T. Y., Leong, I. L., Shiao, L. R., Wong, K. L., Shao, L., Chan, P., & Leung, Y. M. (2020). Tannic acid, a vasodilator present in wines and beverages, stimulates Ca²⁺ influx via TRP channels in bEND.3 endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Venema, K., Verhoeven, J., Verbruggen, S., Espinosa, L., & Courau, S. (2019). Probiotic survival during a multilayered tablet development as tested in a dynamic, computer-controlled *in vitro* model of the stomach and small intestine (TIM-1). *Letters in Applied Microbiology*. doi:10.1111/lam.13211
- Vitaglione, P., Mazzone, G., Lembo, V., D'Argenio, G., Rossi, A., Guido, M., ... & Ercolini, D. (2019). Coffee prevents fatty liver disease induced by a high-fat diet by modulating pathways of the gut–liver axis. *Journal of nutritional science*, 8.
- Vitellio, P., Celano, G., Bonfrate, L., Gobbetti, M., Portincasa, P., & De Angelis, M. (2019). Effects of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus* on gut microbiota in patients with lactose intolerance and persisting functional gastrointestinal symptoms: A randomised, double-blind, cross-over study. *Nutrients*, 11(4), 886.

- Vivek, K., Mishra, S., & Pradhan, R. C. (2020). Characterization of spray dried probiotic Sohiong fruit powder with *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Technology*, 117, 108699.
- Wang, G., Hayes, J., Ziegler, G., Roberts, R., & Hopfer, H. (2018). Dose-Response Relationships for Vanilla Flavor and Sucrose in Skim Milk: Evidence of Synergy. *Beverages*, 4(4), 73. doi:10.3390/beverages4040073
- Wang, M., Yang, J., Li, M., Wang, Y., Wu, H., Xiong, L., & Sun, Q. (2019). Enhanced viability of layer-by-layer encapsulated *Lactobacillus pentosus* using chitosan and sodium phytate. *Food chemistry*, 285, 260-265.
- Wegh, C. A., Benninga, M. A., & Tabbers, M. M. (2018). Effectiveness of probiotics in children with functional abdominal pain disorders and functional constipation: a systematic review. *Journal of clinical gastroenterology*, 52, S10-S26.
- Wen, Y., Wen, P., Hu, T. G., Linhardt, R. J., Zong, M. H., Wu, H., & Chen, Z. Y. (2020). Encapsulation of phycocyanin by prebiotics and polysaccharides-based electrospun fibers and improved colon cancer prevention effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 672-681.
- Wilson, B., & Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 32, 64-68.
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Bae, J., Jang, W. J., Lee, S., & Bai, S. C. (2020). Evaluation of Potential Probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on Growth Performance, Immune Response, Gut Histology and Immune-Related Genes in Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*, 8(2), 281.
- Xavier dos Santos, D., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Bedani, R., Saad, S. M. I., & Perego, P. (2018). Improved probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. *LWT*. doi:10.1016/j.lwt.2018.10.010
- Xing, S. C., Mi, J. D., Chen, J. Y., Hu, J. X., & Liao, X. D. (2020). Metabolic activity of *Bacillus coagulans* R11 and the health benefits of and potential pathogen inhibition by this species in the intestines of laying hens under lead exposure. *Science of The Total Environment*, 709, 134507.
- Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamkrishnan, C. (2020). Effect of encapsulation methods on the physicochemical properties and the stability of *Lactobacillus plantarum* (NCIM, 2083) in synbiotic powders and in-vitro digestion conditions. *Journal of Food Engineering*, 110033.

Anexos

Anexo 1

Diluyente (0,1% de agua peptona)

Preparación

El agua peptonizada es preparada disolviendo 1 gramo de peptona (ex: Bacto Peptona) en 1.000mL de agua dionizada. Se debe ajustar el PH a 7.0 con ácido láctico. La solución es esterilizada al vapor a 15 PSI durante 15 minutos para luego enfriarla.

Preparación de la solución de Rastreo de Minerales

NaCl	500 mg.	-----
FeSO4 . 7H2O	900 mg.	-----
MnSO4 . H2O	800 mg.	-----
ZnSO4 . 7H2O	80 mg.	-----
-		
CuSO4 . 5H2O	80 mg.	-----
-		
DI Agua	50 mL.	

Levadura, glucosa, extracto de agar medio

Extracto de levadura en polvo	5,0 g.
Peptona	5,0 g.
D-glucosa	5,0 g.
K2HPO4	0,5 g.
KH2PO4	0,5 g.
MgSO4	0,3 g.
Solución de Rastero de Minerales	1,0 mL.
Agua DI	1000,0 mL.
Agar (se añadirán después del ajuste del pH).....	15 g.

Combinar los ingredientes juntos y mezclarlos bien. Ajustar el PH del medio a 6.3 con acido HCl. Luego de ajustar el PH, agregar el Agar y traer el medio a hervir. Luego de que el Agar se haya disuelto por completo colocarlo en el Autoclave y esterilizarlo a 121°C (250°F) durante ≥ 15 minutos.

Anexo 2

Evaluación sensorial del sustituto de crema para café

Muestra: _____

Fecha: _____

Nombre: _____

Edad: _____

Para cada uno de los atributos a continuación evalúe la intensidad percibida, encerrando en un círculo el número que crea clasificar su preferencia.

Sabor 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Color 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Olor 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Textura 1 2 3 4 5 6 7 8 9

¿Consumiría este producto? Si No

Observaciones _____

¡MUCHAS GRACIAS!



¿Te gusta café con crema?

Te invito uno

Participa en nuestra
evaluación sensorial de un
sustituto de crema para
café con probióticos



Edad: 18- 50 años

Si tomas decisiones, también puedes
tomarte un café con crema

9181110954

alejandro.rajr@gmail.com

Luis Alejandro Ramón Javier

Lugar: Sala de evaluación sensorial CAIDEP, facultad de química, UAQ

Fecha: 22 marzo- 2 abril

Horario: 7 am- 10 am