

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos
del Centro de la República (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS EN QUESO TIPO MANCHEGO”

T E S I S

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

Presenta:

Q.F.B. Marco Antonio Sánchez Moguel

Santiago de Querétaro, Qro., Diciembre de 2012.



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

“EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS
ENCAPSULADOS EN QUESO TIPO MANCHEGO”

Tesis

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

Presenta:

Q.F.B. Marco Antonio Sánchez Moguel

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Co-dirigido por:

Dra. Beneranda Murúa Pagola

SINODALES

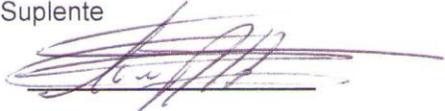
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidente

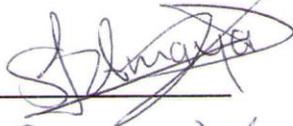
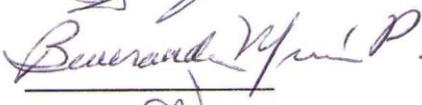
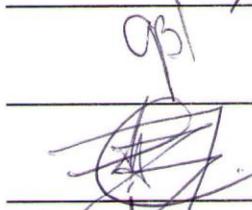
Dra. Beneranda Murúa Pagola
Secretario

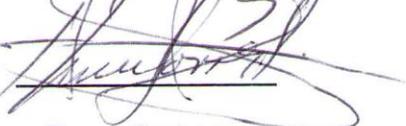
Dra. Blanca E. García Almendarez
Vocal

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente

Dr. Carlos Regalado González
Suplente


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad



Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Los alimentos funcionales probióticos son aquellos que contienen bacterias probióticas, las cuales ejercen un efecto benéfico en el consumidor cuando llegan en cantidad adecuada y viables al tracto intestinal ($>10^7$ UFC/g ó mL de producto). El queso es una alternativa de alimento probiótico que tiene ventajas sobre otros productos lácteos fermentados, como valores de pH más elevados, contenidos de grasa más altos y una consistencia más sólida. La microencapsulación mediante secado por aspersión es una tecnología que ayuda a proteger a los probióticos de las condiciones ambientales adversas y que puede escalarse a bajo costo. El objetivo de este proyecto fue estudiar la sobrevivencia de *Bifidobacterium breve*, en su forma libre y encapsulado mediante secado por aspersión en una matriz de almidón alto en amilosa fosfatado y concentrado de proteína de suero durante su almacenamiento en queso tipo Manchego a 10°C por tres semanas, así como su sobrevivencia en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Los resultados obtenidos mostraron que *B. breve* exhibió una baja sensibilidad al secado por aspersión, presentando una reducción de 0.2 log UFC/g que no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$). La viabilidad del probiótico encapsulado (QCap) adicionado al queso incrementó ligeramente (0.03 log UFC/g), mientras que en forma libre (QLib) registró una disminución (0.08 log UFC/g); en ambos casos no hubo diferencia estadística significativa ($p>0.05$). La exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal del queso tipo Manchego conteniendo bifidobacterias mostró una reducción significativa de la viabilidad al final del ensayo de 2.34 log UFC/g y 0.85 log UFC/g en las muestras QLib y QCap respectivamente. La electroforesis demostró que la adición de probióticos en forma libre y encapsulada no tuvo influencia en la proteólisis. Se realizó una evaluación sensorial de los quesos [QCap y QCtrl (queso sin probióticos)] con un queso comercial (QCom) utilizando un panel no entrenado de 120 personas y evaluando los descriptores: sabor, textura, apariencia, color y resabio; se encontró que el QCom fue mejor calificado en cuanto a la textura y apariencia, sin embargo los quesos preparados (QCap y QCtrl) no mostraron diferencias estadísticas entre los descriptores analizados ($p>0.05$).

(Palabras clave: probiótico, queso, sobrevivencia).

ABSTRACT

Probiotic functional foods are considered those containing probiotic bacteria, which exert a beneficial effect on the consumer when they reach in an adequate amount and viable to the intestinal tract ($>10^7$ UFC/g ó mL of product). Cheese is a probiotic food alternative which has advantages over other fermented milk products, such as higher pH values, higher fat content and more solid consistency. Microencapsulation by spray drying is a technology that helps to protect probiotics against adverse environmental conditions and viable to scale at low cost. The aim of this project was to study the *Bifidobacterium breve* survival, in free and encapsulated form by spray drying in a matrix conformed of high amylose starch phosphate and whey protein concentrate during storage in Manchego-type cheese at 10°C for three weeks and the survival under simulated conditions of the gastrointestinal tract. Results obtained showed that *B. breve* exhibits a low sensitivity to spray drying, showing a reduction of 0.2 log UFC/g which was not statistically significant ($p>0.05$). Encapsulated probiotic viability added to cheese (QCap) increased slightly (0.03 log UFC/g) while in free form (QLib) there was a decrease (0.08 log UFC/g); in both cases there was no statistical significance ($p>0.05$). The exposure to simulated conditions of gastrointestinal tract of Manchego-type cheese containing bifidobacteria showed a significant reduction of viability at the end of the assay of 2.34 log UFC/g and 0.85 log UFC/g of the samples QLib and QCap respectively. Electrophoresis demonstrated that the addition of probiotics in free and encapsulated form had no influence on proteolysis. A sensory evaluation of the cheeses [QCap and QCtrl (cheese without probiotic bacteria)] with a commercial cheese (QCom) was performed, using an untrained panel of 120 people and evaluating descriptors such as: flavor, texture, appearance, color and aftertaste; it was found that QCom was statistically better qualified in terms of texture and appearance, however developed cheeses (QCtrl and QCap) showed no statistical differences between the descriptors analyzed ($p>0.05$).

(Key words: probiotic, cheese, survival).

DEDICATORIAS

A mis padres *María Antonia Moguel* y *Gilberto Sánchez* quienes siempre me han apoyado en las decisiones que he tomado a lo largo de este camino recorrido, gracias por su amor y por confiar siempre en mí, todo esto es también por ustedes.

A mis hermanos Karla y Jorge, que aunque estando lejos, sé que cuento con su amor incondicional.

A mi sobrina Tami, que también me ha motivado a seguir adelante.

A mis tíos Inés Barreda y Mario Guevara quienes siempre han creído en mí, esto también ha sido gracias a su apoyo.

A la M.C. Yolanda Cocotle quién despertó en mí las ganas de emprender este camino y que siempre me ha apoyado y motivado a seguir superándome, gracias por todo lo que me ha enseñado.

A mis primos, tías, tíos, abuelitas Juana Galindo y Concepción Sánchez, que de igual forma siempre me han demostrado su cariño aunque estemos lejos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta aquí y porque siempre ha puesto en mi camino las personas correctas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la maestría y en mi estancia en la Universidad de Alberta.

A la Dra. Silvia L. Amaya, que como mi asesora siempre me apoyó en el desarrollo de mi trabajo dentro y fuera de la universidad, por dirigir mi trabajo, enriquecerlo y siempre proveer de los medios para llegar a la culminación de nuestros objetivos.

A la Dra. Beneranda Murúa quien siempre me guió y motivó a realizar cosas diferentes y novedosas dentro de mi trabajo experimental y en general. Gracias por todos sus consejos y por su constante enseñanza, en realidad he conocido pocos maestros como usted.

Al Dr. Eduardo Castaño por aceptar formar parte de mi comité de tesis y por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A la Dra. Blanca E. García por permitirme, cuando era necesario, trabajar en sus laboratorios y por sus palabras de aliento antes de realizar mi estancia.

Al Dr. Carlos Regalado por su apoyo en la parte del secado por aspersión, sus aportaciones a mi trabajo de tesis, así como por su disposición a aclarar nuestras dudas cuando era necesario.

A la maestra Bety Domínguez, que fue uno de los más grandes apoyos que recibí durante mi trabajo, por su amabilidad, muchas gracias!

Gracias a quienes también me apoyaron en el transcurso de mi trabajo experimental, las doctoras Rosalia Reynoso, Sofía Arvizú y Clara Escamilla de la UAQ, al Dr. Fernando Martínez, Ing. Eleazar Urbina y mi amiga la M.C. Nallely Falfán del Cinvestav-Qro.

Sin duda fueron mis pilares durante la maestría: Carmen González, Lilia Ortiz y Flor González, muchas gracias por su compañía y por todas las experiencias que hemos vivido, sin duda son las personas más valiosas que conocí estos dos años.

Al personal administrativo del posgrado, muchas gracias.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Alimentos funcionales	3
2.1.1 Alimentos probióticos	4
2.1.1.1 Microorganismos probióticos	5
2.1.1.1.1 Mecanismo de acción	7
2.1.1.1.2 Estabilidad y viabilidad de probióticos	7
2.1.1.1.3 Género <i>Bifidobacterium</i>	8
2.1.1.1.4 <i>Bifidobacterium breve</i>	9
2.1.1.2 Quesos probióticos	10
2.1.1.2.1 Clasificación de quesos	10
2.1.1.2.2 Incorporación de probióticos en quesos	10
2.1.2 Prebióticos	11
2.1.2.1 Almidón resistente (AR)	12
2.1.2.1.1 Funcionalidad del AR	13
2.1.2.2 Almidón de maíz alto en amilosa (AMAA)	14
2.1.2.3 Almidón de maíz alto en amilosa fosfatado	16
2.2 Microencapsulación	16
2.2.1 Secado por aspersion	18
2.2.1.1 Materiales encapsulantes	21
2.2.1.1.1 Carbohidratos	21
2.2.1.1.2 Quitosano	22
2.2.1.1.3 Gomas	22
2.2.1.1.4 Proteínas	22
2.2.2 Microencapsulación de probióticos	23
2.2.2.1 Extrusión	23
2.2.2.2 Emulsión	25

2.2.2.3 Secado por aspersion	26
2.2.3 Evaluación de las microcápsulas	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVO GENERAL	31
5.1 Objetivos específicos	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 Microorganismo	33
6.1.1 Activación de la cepa	33
6.1.2 Conteo de microorganismos	33
6.2 Caracterización del material encapsulante	33
6.2.1 Determinación del grado de sustitución	33
6.2.2 Determinación del índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) del almidón fosfatado	34
6.3 Microencapsulación de <i>Bifidobacterium breve</i>	34
6.3.1 Preparación de la cepa para su microencapsulación	34
6.3.2 Preparación de suspensiones de los materiales matriz	35
6.3.3 Microencapsulación de <i>B. breve</i> mediante secado por aspersion	35
6.4 Caracterización de microcápsulas	35
6.4.1 Determinación de la viabilidad de <i>B. breve</i> después del proceso de secado por aspersion	35
6.4.2 Determinación del contenido de humedad en las microcápsulas	36
6.4.3 Caracterización morfológica	36
6.5 Elaboración del queso probiótico tipo Manchego	36
6.5.1 Elaboración del queso tipo Manchego	36
6.6 Ensayo de sobrevivencia de <i>B. breve</i> libre y encapsulada en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal	37
6.6.1 Preparación de soluciones	37
6.6.2 Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal	38
6.7 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (UREA-PAGE)	38
6.7.1 Preparación de las muestras	38

6.7.2 UREA-PAGE	38
6.8 Evaluación sensorial	39
6.9 Diseño y Análisis estadístico	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1 Caracterización química del almidón alto en amilosa fosfatado	41
7.1.1 Grado de sustitución y porcentaje de fósforo	41
7.1.2 Índice de solubilidad en agua e índice de absorción de agua	43
7.2 Microencapsulación de <i>Bifidobacterium breve</i>	45
7.2.1 Caracterización morfológica de las cápsulas	48
7.2.2 Contenido de humedad	48
7.3 Incorporación de <i>Bifidobacterium breve</i> microencapsulado en el queso tipo Manchego	49
7.4 Supervivencia de <i>Bifidobacterium breve</i> en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal	54
7.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (Urea-PAGE)	59
7.6 Análisis Sensorial	61
8. CONCLUSIONES	64
9. LITERATURA CITADA	66
10. APÉNDICES	76

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Bacterias usadas comúnmente como probióticos	6
2. Clasificación del almidón resistente, descripción y sus fuentes	12
3. Clasificación y características de algunos métodos de encapsulación	17
4. Ventajas y desventajas de la encapsulación por secado por aspersión	18
5. Reactivos usados en la preparación de saliva artificial	37
6. Valores de fósforo y grado de sustitución del almidón alto en amilosa fosfatado	41
7. Índices del almidón alto en amilosa fosfatado	44
8. Tasa de muerte de <i>B. breve</i> durante el secado por aspersión	47
9. Sobrevivencia de <i>B. breve</i> incorporado en forma libre y encapsulada en queso tipo Manchego	52
10. Sobrevivencia de <i>B. breve</i> incorporado en forma libre y encapsulada en queso tipo Manchego durante el ensayo de TGI	57

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación esquemática de la encapsulación	17
2. Representación esquemática de un secador por aspersión	20
3. Microencapsulación de probióticos mediante extrusión	24
4. Microencapsulación de probióticos por la técnica de emulsión	25
5. Supervivencia de <i>B. breve</i> después del secado por aspersión	47
6. Microfotografías de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de la mezcla 90ACPS	48
7. Comportamiento de la supervivencia de <i>B. breve</i> incorporado en su forma libre (rojo) y encapsulada (azul) en queso tipo Manchego durante su almacenamiento	50
8. Supervivencia de <i>B. breve</i> incorporado en forma libre (I) y encapsulada (II) en queso tipo Manchego durante el ensayo de TGI	51
9. Comportamiento de la supervivencia de <i>B. breve</i> incorporado en forma libre (rojo) y encapsulada (azul) en queso tipo Manchego durante el ensayo de TGI	54
10. Supervivencia de <i>B. breve</i> incorporado en forma libre (I) y encapsulada (II) en queso tipo Manchego durante el ensayo de TGI	56
11. Urea-PAGE de los quesos tipo Manchego	60
12. Diagramas de pastel de los diferentes descriptores analizados	63
13. Curva de calibración de fósforo	76

1. INTRODUCCIÓN

Un alimento funcional es un alimento procesado que actúa benéficamente en las funciones del cuerpo, mejorando la salud al reducir el riesgo de enfermedad (Arvanitoyannis y Houwelingen, 2005; Ferrer y Dalmau, 2001). Dentro de la clasificación de los alimentos funcionales se encuentran los alimentos probióticos (Amores et al., 2004) que contienen bacterias probióticas y el consumo de éstos trae consigo beneficios a la salud como: el alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, el tratamiento de diarrea, propiedades anticancerígenas, la reducción de colesterol y el fortalecimiento del sistema inmune (Ong et al., 2006).

Los miembros del género *Bifidobacterium* se han usado ampliamente como microorganismos probióticos en alimentos funcionales y muchas de las cepas pertenecientes se han utilizado en productos lácteos (limitados a leches fermentadas y yogurt), como es el caso de *Bifidobacterium breve* (Gobbetti et al., 2001). La mayoría de los productos lácteos tienen una corta vida de anaquel, a excepción de los quesos duros; la incorporación de cultivos probióticos en quesos proporciona un potencial para mejorar su beneficio a la salud, calidad y también para ampliar el rango de alimentos probióticos (Ong et al., 2006). Para mejorar la sobrevivencia de estas bacterias se han aplicado diversas técnicas de microencapsulación entre las que se encuentra el proceso de secado por aspersión, donde hay una retención física de las células en una matriz encapsulante que los protege de factores adversos (Talwalkar et al., 2004). Es un método muy económico y se ha aplicado para preservar la viabilidad de probióticos.

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium breve* después de su microencapsulación mediante secado por aspersión en una matriz conformada por una mezcla de almidón alto en amilosa fosfatado y concentrado de proteína de suero de leche, la viabilidad durante el almacenamiento del probiótico en forma libre y microencapsulada en un queso tipo Manchego durante el periodo de maduración (3 semanas a 10°C), así como

durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después del periodo de maduración.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alimentos funcionales

El término “alimento funcional” fue introducido en Japón a mediados de los 80’s. Este tipo de alimentos son conocidos en el mercado japonés como FOSHU (*Foods for Specified Health Use* - Alimentos Para Uso Específico en la Salud). Este término actualmente se utiliza para referirse a los alimentos procesados que “actúan benéficamente sobre una o más funciones del cuerpo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedades” (Arvanitoyannis y Houwelingen, 2005; Ferrer y Dalmau, 2001). En los últimos diez años, la demanda de alimentos funcionales se ha incrementado considerablemente, debido a que los consumidores están más conscientes acerca de la influencia que tienen los alimentos en su salud (Mohammadi et al., 2011; Siró et al., 2008).

Algunos ejemplos de alimentos funcionales incluyen micronutrientes orgánicos e inorgánicos, vitaminas, anti-oxidantes, fibra dietaria, algunas proteínas (lactoferrina), ciertos péptidos bioactivos y ácidos grasos poliinsaturados (Gibson, 2007).

Dentro de la clasificación de los alimentos funcionales se encuentran aquellos a los cuales se les han adicionado bacterias vivas que tienen acción benéfica sobre el organismo y se definen como probióticos (Amores et al., 2004). Los alimentos que contienen bacterias probióticas han ganado popularidad y aceptación en la población en los últimos años. Se han reportado un gran número de beneficios a la salud atribuidos al consumo de estos productos entre los que destacan: el alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, el tratamiento de diarrea, propiedades anticancerígenas, reducción de colesterol y fortalecimiento del sistema inmune (Ong et al., 2006).

2.1.1 Alimentos probióticos

Dentro de los alimentos funcionales se encuentra un extenso grupo de alimentos denominados probióticos debido al componente activo adicionado, que le confiere dicho nombre al alimento (Guevara, 2008). De manera que los alimentos probióticos son aquellos que contienen microorganismos probióticos en número suficiente para alterar o modificar la flora intestinal y así ejercer efectos benéficos para la salud. Son productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped (Mennickent y Green, 2009).

Las bacterias probióticas adicionadas deben ser adecuadas para resistir la producción industrial a gran escala y el procesamiento del alimento, manteniendo una alta viabilidad durante el almacenamiento, ya que para que haya cierto beneficio a la salud, los probióticos deben encontrarse en una concentración superior a 10^7 células viables por gramo o mililitro de alimento al momento de su consumo (Ong et al., 2006).

Debido a que muchas bacterias probióticas son de origen intestinal y sensibles al oxígeno, calor y ácido, éstas se desarrollan pobremente en el ambiente proporcionado por muchos alimentos, particularmente alimentos fermentados, los cuales contienen concentraciones altas de ácidos orgánicos (Stanton et al., 2005).

Los requisitos que deben cumplir los alimentos probióticos fermentados son:

- Sinergismo entre los cultivos de microorganismos y los iniciadores de la fermentación para obtener un producto fermentado con óptimas características sensoriales.
- Los microorganismos probióticos deben permanecer viables y activos en el alimento y durante el tránsito por el tracto gastrointestinal, para garantizar su potencial efecto benéfico en el huésped. En este aspecto, son importantes el pH, el oxígeno disuelto (para las bifidobacterias), el antagonismo entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración de azúcares, las prácticas de inoculación del

cultivo probiótico, la temperatura y la duración de la fermentación, así como las condiciones de almacenamiento del producto (Mennickent y Green, 2009).

Los retos más importantes actualmente en cuanto al desarrollo de alimentos probióticos desde el punto de vista tecnológico son, la viabilidad y estabilidad de éstos a lo largo de la cadena de distribución, desde la producción del alimento hasta su llegada al sitio de acción, es decir hasta el intestino (Guevara, 2008; Puupponen et al., 2002).

Algunos productos funcionales desarrollados con microorganismos probióticos incluyen: yogurt, queso, margarina, bebidas, carnes frías, entre otros (Stanton et al., 2003). Los alimentos probióticos derivados de la leche se han limitado a la producción de leches fermentadas y yogurt, los cuales tienen una corta vida de anaquel en contraste con los quesos. La incorporación de cultivos probióticos en quesos proporciona un potencial no sólo para mejorar su beneficio a la salud y calidad sino también para ampliar el rango de alimentos probióticos (Ong et al., 2006).

Los quesos tienen ciertas ventajas como vehículos de probióticos sobre los productos frescos fermentados ya que permiten la liberación de bacterias de forma viable en el tracto gastrointestinal debido a una mayor consistencia, relativamente mayor contenido de grasa y la densa matriz de proteína, que hacen que en conjunto, las bacterias estén mejor protegidas durante el almacenamiento y su paso a través del tracto gastrointestinal (Boylston et al., 2004; Ong et al., 2006).

2.1.1.1 Microorganismos probióticos

Las bacterias probióticas son definidas como "microorganismos vivos, que una vez ingeridos en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos para la salud del huésped más allá de la nutrición básica (Cuadro 1) (Araya et al., 2002). Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino humano, tener un

tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino. Estos microorganismos deben ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino (Cagigas y Blanco, 2002). Es importante también que sea reconocido como GRAS (seguro), poseer perfil antibiograma (sensibilidad a antibióticos), adherente a las células del intestino humano, no inflamatorio y anticarcinogénico (Guevara, 2008).

Cuadro 1. Bacterias usadas comúnmente como probióticos.

<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus Intermedius</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gasserii</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. animalia</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Aspergillus orizae</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. sporogenes</i>		<i>Clostridium butyricum</i>
<i>L. lactus</i>		
<i>L. cellobiosus</i>		
<i>L. brevis</i>		

Tomado de: Anuradha y Rajeshwari, 2005; Senok et al., 2005.

Las bifidobacterias y lactobacilos forman parte de la flora natural del colon humano; las bifidobacterias especialmente mejoran el balance de la microflora intestinal, aumentan la respuesta inmune frente a patógenos, promueven la síntesis de vitaminas y capacidad anticarcinogénica (Lourens y Viljoen, 2001).

Los probióticos también estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Se ha demostrado que microorganismos probióticos como *Lactobacillus plantarum* 299 y *Lactobacillus rhamnosus* GG inhiben la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena, eliminando los organismos patógenos de las células epiteliales del intestino (Mack et al., 1999). También se ha encontrado que *Bifidobacterium breve* y *B. infantis* dependientemente de la dosis, inhiben la invasión de cepas de

E. coli enteropatógena, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella typhimurium* (Bernet et al., 1993).

Se ha encontrado que bacterias del género *Lactobacillus* manifiestan diferencias dependiendo de las especies y cuando se ingieren estos microorganismos hay cambios en las enzimas bacterianas en las heces, entre estas una elevación de la β -galactosidasa fecal (Szilagyi, 1999).

2.1.1.1.1 Mecanismo de acción

Los mecanismos por los cuales, los probióticos ejercen su efecto benéfico, son poco conocidos; sin embargo, como regla general se incluye:

- Adhesión y colonización del intestino.
- Supresión del crecimiento o unión al epitelio por bacterias patógenas, así como la producción de sustancias antimicrobianas.
- Mejora la función de barrera intestinal.
- Transferencia controlada de antígenos de la dieta.
- Estimulación de la inmunidad de mucosas y sistémica (Sartor, 2004).

2.1.1.1.2 Estabilidad y viabilidad de probióticos

La estabilidad de los probióticos en los alimentos es muy importante, si tomamos en cuenta que se deben consumir de forma viable; sin embargo no es fácil incorporar bacterias vivas al yogurt, algunas bebidas o alimentos en polvo y mantener un número suficiente de bacterias viables durante la vida útil del producto.

La estabilidad de los probióticos es diferente entre las cepas (Abe et al., 2009a) la cual se ve afectada por algunas características del alimento como la actividad de agua, temperatura de almacenamiento y el empaque (Abe et al., 2009b). Se ha reportado que algunos factores responsables de la pérdida de la viabilidad de los microorganismos probióticos en los alimentos son: acidez del producto, acidez producida durante el almacenamiento en refrigeración (también conocida como post-acidificación), nivel de oxígeno en los productos, permeabilidad del oxígeno a

través del empaque, sensibilidad a sustancias antimicrobianas producidas en el producto y falta de nutrientes en la leche (Shah, 2001).

Aunque gran parte de las investigaciones realizadas se ha enfocado a leches fermentadas como vehículos de probióticos, se ha observado que estos productos no son los óptimos por mantener altas concentraciones de algunos microorganismos como las *Bifidobacterias* a menos que se inmovilicen (Hughes, 1995).

2.1.1.1.3 Género *Bifidobacterium*

Las bifidobacterias son bacilos gram positivos, no formadores de esporas, no filamentosos e inmóviles. Su apariencia es muy variable y está influenciada por las condiciones de crecimiento (Tamime, 2002). Son clasificadas como anaerobios estrictos, sin embargo, el grado de tolerancia al oxígeno depende de cada especie, medio de cultivo y generalmente posee ciertas dificultades para su incorporación en productos alimenticios (Boylston et al., 2004; Stanton et al., 2003). El pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 6.5 y 7.0 sin embargo se inhibe por debajo de los 5.0 o arriba de 8.0; la temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las especies de origen humano es entre 36°C y 38°C, mientras que no hay crecimiento por debajo de los 20°C ni por arriba de los 46°C (Boylston et al., 2004).

Las diferentes especies de bifidobacterias son quimioorganotróficos, teniendo un metabolismo fermentativo capaz de utilizar carbohidratos por la vía de la fructosa-6-fosfato generando ácido acético y ácido láctico en la relación molar 3:2. No producen dióxido de carbono y el amoníaco generalmente es usado como fuente de nitrógeno. Son catalasa negativos, con algunas excepciones (*Bifidobacterium indicum* y *B. asteroides* cuando crecen en presencia de aire) (Tamime, 2002).

En la producción de alimentos lácteos los géneros bacterianos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son los más comúnmente usados como probióticos (Mohammadi et al., 2011). Cepas del género *Bifidobacterium* han sido incorporadas en productos lácteos como yogurt (Capela et al., 2006; Ramchandran y Shah, 2010), leches

fermentadas (Oliveira et al., 2011; Sendra et al., 2008), queso (Fritzen-Freire et al., 2010; Ong et al., 2006), helado (Akin et al., 2007; Turgut y Cakmakci, 2009), etcétera.

2.1.1.1.4 *Bifidobacterium breve*

Esta bacteria es anaeróbica y no móvil. Una vez establecido *B. breve* es único en su capacidad de competir con otras bacterias debido a la gran variedad de moléculas que puede metabolizar. Algunas personas tienen una gran cantidad de estas bacterias benéficas, sin embargo otras, necesitan de un suplemento para fomentar su presencia.

En estudios clínicos, enfermedades como la diarrea asociada a antibióticos, alergias y el síndrome de intestino irritable se han asociado con pacientes con escasez de esta bacteria. En los bebés que son alimentados con leche materna, se ha encontrado *B. breve* como flora bacteriana del colon; parece que a medida que el cuerpo humano envejece, se pierden una gran cantidad de bacterias correspondientes a esta especie.

El papel de *B. breve* en el tracto digestivo es fermentar azúcares para producir ácido láctico y consecuentemente ácido acético y se destaca de otras bacterias probióticas debido a su capacidad superior de hidrolizar incluso fibras vegetales que normalmente se consideran no digeribles (Swartzburg, 2011).

En un estudio con niños de 3-16 años que padecían estreñimiento infantil, se les administraron sobres de polvo conteniendo de 10^8 - 10^9 CFU de *B. breve* durante 4 semanas y se observó que se incrementó el número de deposiciones, así como mejoramiento en la consistencia de las heces y reducción del dolor abdominal (Tabbers et al., 2011).

B. breve ha sido usado ampliamente como microorganismo probiótico en alimentos funcionales de origen lácteo (Gobetti et al., 2001).

2.1.1.2 Quesos probióticos

2.1.1.2.1 Clasificación de quesos

Según la NOM-121-SSA1-1994 se entiende por quesos al producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenido por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo clasificarse por su proceso en: frescos, madurados y procesados.

Los quesos se clasifican de acuerdo a su contenido de humedad en: quesos duros (20-45% de humedad), semi duros/semi suaves (45-55% de humedad), y quesos suaves (>55% de humedad). El queso es una excelente fuente de proteínas, grasa y minerales como el calcio, hierro y fósforo, vitaminas y aminoácidos esenciales, además es un alimento importante en la dieta de jóvenes y adultos (O' Connor, 1993; García, 2006).

2.1.1.2.2 Incorporación de probióticos en quesos

Un gran número de estudios se han realizado en el desarrollo de quesos probióticos, utilizando para esto variedades de quesos como Cheddar, de cabra, Crescenza, cottage y fresco. En queso Cheddar, se estudió la incorporación de bifidobacterias y se observó que la viabilidad se mantuvo en un nivel aproximado de 2×10^7 CFU/g por más de 24 semanas sin presentarse cambios en el sabor, textura o apariencia (Dinakar y Mistry, 1994). También en queso Cheddar se investigó la incorporación de cepas como *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus salivarius* (cepas probióticas derivadas de humanos) y se encontró que *L. paracasei* mantuvo su viabilidad durante la maduración, mientras que la viabilidad de *L. salivarius* decrece (Gardiner et al., 1999b).

Gobbetti et al. (1997) probaron que en queso Crescenza la viabilidad de

Bifidobacterium bifidum, *B. longum* y *B. infantis* se mantuvo en cantidades de 10^8 , 10^7 y 10^5 CFU/g respectivamente 2 semanas después de la manufactura.

Blanchette et al. (1996) incorporaron *Bifidobacterium infantis* a queso Cottage y registraron cuentas bajas del microorganismo (1×10^3 UFC/g) después de un periodo de almacenamiento de 15 días. Jaramillo et al. (2002) incorporaron *Bifidobacterium bifidum* encapsulado con alginato de calcio a queso fresco; la viabilidad ideal (1×10^6 UFC/g) se mantuvo después de una semana en refrigeración.

Por otra parte, Gardiner et al. (1999a) incorporaron *Enterococcus faecium* a queso Cheddar, obteniendo cuentas de 4×10^8 UFC/g durante un periodo de almacenamiento de 15 meses a una temperatura de 8°C , lo que confirmó que el queso Cheddar es un excelente vehículo de microorganismos probióticos.

A un queso maduro que se le incorporó el cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC-01, se le evaluó su aceptabilidad a diferentes tiempos de maduración y se encontró un incremento significativo en los recuentos de lactobacilos para los tiempos de maduración estudiados, en otras palabras, se mantuvo la población estable (10^7 UFC/g) (Boza et al., 2010).

2.1.2 Prebióticos

Una vez ingeridos, los probióticos deben sobrevivir durante su paso por el tracto gastrointestinal y establecerse en el intestino grueso; este proceso puede ser facilitado por los prebióticos. Los prebióticos son ingredientes de los alimentos que no son digeribles y que selectivamente estimulan la proliferación y/o actividad de poblaciones de bacterias deseables que son residentes en el tracto intestinal del consumidor. La mayoría de los prebióticos identificados son carbohidratos fermentables no digeribles. En general, el consumo de una amplia variedad de prebióticos han demostrado estimular la proliferación de poblaciones intestinales de bifidobacterias (Crittenden y Playne, 2009).

Existe un gran potencial del uso de prebióticos y probióticos juntos, de manera que el efecto de ambos ingredientes es complementario y sinérgico. Los alimentos que

contienen ambos ingredientes son llamados alimentos simbióticos (Topping et al., 2003).

La mayor parte de estudios reportados y la mayor evidencia sobre los efectos de los prebióticos han sido de oligosacáridos no digeribles, los cuales incluyen fructooligosacáridos (FOS), inulina, galactooligosacáridos (GOS) y lactulosa. Existen otros oligosacáridos no digeribles a los que se han realizado menos estudios, aunque se tienen reportes de su potencial como prebióticos; estos incluyen lactosacarosa, isomaltosa y oligosacáridos de xilosa y soya (rafinosa). En algunos estudios se han encontrado evidencias del efecto prebiótico de almidón resistente, en los que se estimuló el crecimiento tanto de bifidobacterias como de lactobacilos (Crittenden y Playne, 2009).

2.1.2.1 Almidón resistente (AR)

El término “almidón resistente” fue acuñado en 1982 por Englyst et al., para describir una pequeña fracción de almidón que fue resistente a la hidrólisis exhaustiva, *in vitro*, con α -amilasa y pululanasa. El AR es ahora definido como la fracción del almidón dietario que escapa a la digestión en el intestino delgado (Sajilata et al., 2006). El AR es indigerible por las enzimas del cuerpo y se subdivide en 4 fracciones: AR₁, AR₂, AR₃ y AR₄, que también son llamados tipo I, II, III y IV (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación del almidón resistente, descripción y sus fuentes.

Tipo de AR	Descripción	Fuentes
AR1	Físicamente inaccesible a las enzimas digestivas, es estable al calor en procesos de cocción.	Granos y semillas total o parcialmente molidos, legumbres, pasta.
AR2	Representa al almidón crudo en cierta forma granular e hidrolizado lentamente por α -amilasas.	Chicharos y papas crudos, plátanos verdes, almidones altos en amilosa.
AR3	Es el almidón retrogradado (no granular) formado durante el enfriamiento del almidón gelatinizado.	Papas cocinadas y enfriadas, pan, corn flakes, etc.

AR4	Son los almidones químicamente modificados por entrecruzamiento con agentes químicos.	Alimentos en los que se han usado este tipo de almidones (pan, pasteles)
-----	---------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------

Tomado de Nugent, 2005.

2.1.2.1.1 Funcionalidad del AR

El AR tiene un tamaño de partícula pequeño, aspecto blanco, sabor suave y una baja retención de agua (Fausto et al., 1997). Sus propiedades fisicoquímicas lo hacen deseable para sustituir la harina en cierta cantidad que no afecte significativamente la reología de la masa. El AR imparte características especiales que de otro modo no se alcanzan en alimentos ricos en fibra (Tharanathan y Mahadevamma, 2003).

Entre las propiedades funcionales de los AR (II y III) podemos citar las siguientes: provienen de fuentes naturales, tienen sabor suave, color blanco, su tamaño de partícula es fino (produce menos interferencia con textura), tienen alta temperatura de gelatinización, buen manejo durante procesos de extrusión, propiedades de formación de película y retienen menor cantidad de agua que los productos con fibra tradicionales; disminuyen el valor calórico de los alimentos y son funcionales en alimentos para personas con síndrome celiaco, se utilizan como laxantes a granel y en productos para la rehidratación oral (Nugent, 2005). También, el consumo de almidón resistente reduce el riesgo de cáncer de colon debido a que forma parte de la fibra dietaria (Dimantov et al., 2004). Otro efecto prebiótico asociado al consumo de almidón resistente es la disminución de la actividad enzimática de ciertas bacterias (ejem. β -glucuronidasa) (Young y Le Lev, 2004). Debido a que el almidón resistente pasa casi completamente por el intestino delgado puede comportarse como un sustrato para promover el crecimiento de microorganismos probióticos del género *Bifidobacterium* (Brown et al., 1996).

2.1.2.2 Almidón de maíz alto en amilosa (AMAA)

El almidón alto en amilosa es obtenido de los gránulos de almidón mediante un proceso de molienda y purificación. El gránulo es un sólido parcialmente cristalino compuesto por dos distintos polisacáridos: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal con muy pocas ramificaciones compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces D-glucosídicos (α -1,4). En contraste, el polímero de amilopectina que tiene un mayor peso molecular, está altamente ramificado en las cadenas de amilosa con enlaces D-glucosídicos (α -1,6).

El almidón de maíz nativo común contiene aproximadamente 20-25% de amilosa, mientras que un almidón alto en amilosa puede contener desde 50%, 70-80%, hasta 90% de amilosa. Estos almidones altos en amilosa, combinados con modificaciones químicas o físicas amplían las propiedades y atributos funcionales del almidón en alimentos (Richardson et al., 2000).

Wang et al. (1999) reportaron la capacidad de diferentes cepas de bifidobacterias para hidrolizar almidón soluble, amilopectina de almidón de maíz granular y AMAA. En otros estudios se demostró que el AMAA incrementó la sobrevivencia de bifidobacterias a bajo pH, en bilis y durante su paso por el tracto gastrointestinal de ratones. La adhesión a los gránulos de almidón fue considerado como el posible mecanismo por el cual se incrementó esta sobrevivencia (Wang et al., 1999a).

Crittenden et al., (2001), utilizando 19 cepas del género *Bifidobacterium*, demostraron que éstas son capaces de adherirse a un tipo de almidón de maíz alto en amilosa (Hylon VII) y encontraron que entre ellas *B. adolescentis* tuvo la mayor adherencia, arriba del 90%, mientras que la menor fue para *B. longum* alrededor de un 10%. También se estudió *B. breve*, cepa que se adhirió cerca de un 40%.

En un estudio realizado por Brown et al. (1998) se midieron las tasas de crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* y *pseudolongum* usando un medio de crecimiento con 1% w/v de glucosa o de AMAA y los autores reportaron que el crecimiento de las cepas fue similar con ambas fuentes de carbono. El hecho de

que muchas especies de bifidobacterias pueden hidrolizar el almidón resistente, representa un alto potencial de actividad de este ingrediente como prebiótico para este género de bacterias.

Las fracciones ricas en almidón resistente pueden prepararse utilizando diferentes técnicas de modificación química que son aprobadas para su uso en alimentos (Brown et al., 1998) o aplicando calentamiento y posterior retrogradación sobre el almidón de maíz nativo alto en amilosa (Dimantov et al., 2003).

Fue documentado que una cepa de *Bifidobacterium* de origen humano, denominada X13, fue cultivada en un medio conteniendo 1% w/v de diferentes almidones (AMAA sin modificar, AMAA hidroxipropilado, AMAA acetilado y AMAA octenil succinatado); la capacidad de la bacteria para utilizar los diferentes almidones resistentes modificados fue significativamente diferente. Se encontró que la bifidobacteria utilizó más el almidón acetilado sobre los demás, mientras que el menos metabolizado fue el octenil succinatado (Brown et al., 1998).

Ha sido establecido que una cierta cantidad de almidón ingerido puede escapar a la digestión en el intestino delgado humano y consecuentemente es transportada al intestino grueso en donde puede servir como fuente de carbono para la fermentación de bacterias colónicas. La capacidad de *Bifidobacterium* X13 de utilizar AMAA con diferentes modificaciones químicas sugiere la posibilidad de diseñar un almidón resistente específico que se desempeñe como sustrato de fermentación y promueva el crecimiento de bacterias probióticas particulares en el intestino grueso (Brown et al., 1998).

Murúa et al. (2009) reportaron la preparación de almidón de maíz ceroso fosfatado, succinatado o acetilado, para su uso como agente encapsulante de aceite esencial de naranja. No se tienen registros sobre la preparación de almidón resistente, mediante la modificación química de AMAA con agentes fosfatantes, el cual pueda ser utilizado no solamente como prebiótico, sino como material de matriz para la inmovilización de probióticos.

2.1.2.3 Almidón de maíz alto en amilosa fosfatado

Dependiendo de la fuente, los almidones nativos generalmente contienen pequeñas cantidades (<0.1%) de fósforo. Los almidones de raíces o de tubérculos contienen fósforo unido mediante enlaces covalentes, mientras que los almidones en cereales se encuentran en éstos principalmente como fosfolípidos contaminantes (Lim y Seib, 1993).

Se ha reportado que los almidones fosfatados preparados mediante métodos químicos forman pastas translúcidas de alta consistencia y con buenas propiedades emulsificantes y de estabilidad a procesos de congelamiento-descongelamiento.

Los almidones fosfatados pueden ser agrupados en dos clases: Fosfatos de mono-almidón o fosfatos di-almidón o entrecruzados. En general los grupos monoéster son introducidos en mayor grado de sustitución en el almidón que los grupos di-éster debido a que inclusive un bajo grado de entrecruzamiento puede alterar drásticamente las propiedades de pasta y de gelificación del almidón. La preparación de fosfatos di-almidón es generalmente considerada la reacción más importante utilizada para preparar almidones modificados en alimentos.

En los Estados Unidos, pueden utilizarse oxiclورو de fósforo y tres sales de fosfatos inorgánicos (ortofosfato de sodio, tripolifosfato de sodio y trimetafosfato de sodio) para preparar fosfatos de almidón (CFR, 1991). Durante la fosfatación el pH juega un papel importante para determinar la proporción de enlaces mono o di-éster formados (Lim y Seib, 1993).

2.2 Microencapsulación

Es una técnica por la cual un material o una mezcla de materiales se recubren o son atrapadas dentro de otro material o sistema. Los material(es) cubierto(s) se conoce(n) como “material activo” y el material que recubre como “revestimiento, soporte, material de pared, acarreador o encapsulante” (Madene et al., 2006).

Se trata de un proceso utilizado para la preservación o protección de numerosos ingredientes comerciales, no sólo alimenticios, sino también farmacéuticos, químicos y cosméticos (Fuchs et al., 2006; Shu et al., 2006); se ha utilizado

también para enmascarar sabores desagradables de algunos ingredientes o simplemente para convertir líquidos en sólidos (Gouin, 2004). El objetivo de este proceso es proteger al componente activo de las condiciones del medio (temperatura, luz, oxígeno, pH, enzimas, presencia de otros nutrientes) (Chen et al., 2006). Una representación esquemática se muestra en la figura 1.

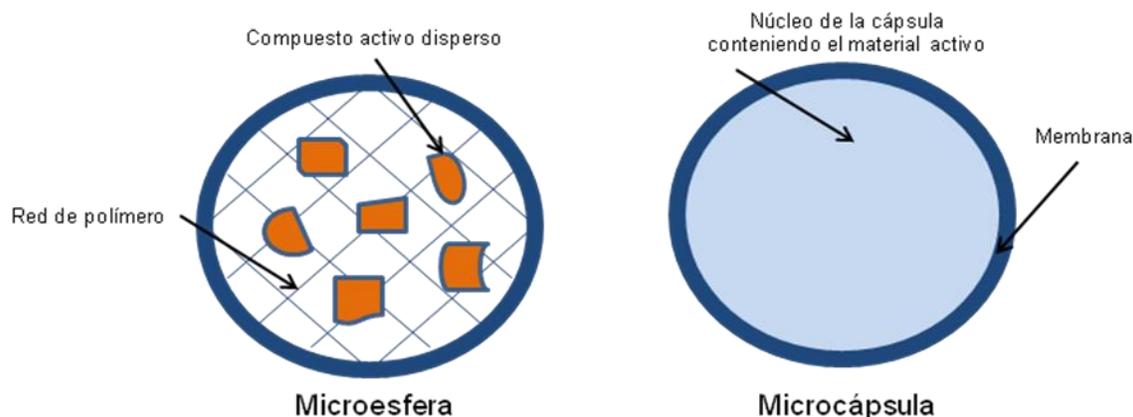


Figura 1. Representación esquemática de la encapsulación.

Tomada de: Madene et al., 2006.

De acuerdo a Madene et al., 2006, las técnicas de encapsulación se pueden dividir en mecánicas o físicas y químicas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación y características de algunos métodos de encapsulación.

Tipo de técnica	Método de encapsulación	Tamaño de partícula (μm)
Químicas	Coacervación simple	20 – 200
	Coacervación compleja	5 – 200
	Inclusión molecular	5 – 50
	Secado por aspersión	1 – 50
Mecánicas	Enfriamiento por aspersión	20 – 200
	Extrusión	200 – 2000
	Fluidización en lecho	> 100

Tomado de Madene et al., 2006.

La elección de los materiales de pared depende de ciertos factores como lo son la aplicación, la naturaleza del material activo, el proceso de encapsulación, presupuesto y si el material de pared está aprobado por la FDA (Food And Drug Administration) o la EFSA (European Food Safety Authority) (Madene et al., 2006). Es importante considerar el tamaño de cápsula dependiendo de la aplicación, de

manera que no se vea afectada la textura y el sabor propio del alimento (de Vos et al., 2010). El tamaño óptimo de las microcápsulas depende entonces, en gran medida, del tipo de alimento al que se van a adicionar. Mientras que microcápsulas con diámetros entre 2 y 3 mm no son detectadas sensorialmente en salchichas (Muthukumarasamy y Holley, 2006), éstas afectan de forma negativa las características sensoriales en yogurt y leche. Se ha observado que en alimentos lácteos un tamaño de microcápsulas de aproximadamente 100 µm de diámetro no afecta sensorialmente al alimento (Hansen et al., 2002).

2.2.1 Secado por aspersión

Se trata de una técnica que permite la transformación de los alimentos a partir de un estado líquido para formar partículas secas por acción del calor. El desarrollo de la técnica y equipos de secado por aspersión se desarrollaron durante el periodo comprendido entre la década de 1870 e inicios del siglo XX. El secado por aspersión se utilizó ampliamente durante la Segunda Guerra Mundial con la súbita necesidad de reducir el peso de los alimentos y otros materiales, facilitando con ello su transporte. El producto seco puede ser en forma de polvos, granulados o aglomerados dependiendo de las propiedades físicas y químicas de la alimentación, el diseño del secador (Figura 2) y las propiedades finales del polvo (Michael, 1993). El secado por aspersión posee algunas ventajas (Cuadro 4) como su rapidez y costo de producción relativamente bajo, alta reproducibilidad y es adecuado para diferentes aplicaciones a nivel industrial (Burgain et al., 2011).

Cuadro 4. Ventajas y desventajas de la encapsulación por secado por aspersión.

Ventajas	Desventajas
Bajo costo de operación	Falta de uniformidad de las cápsulas
Alta calidad de las cápsulas	Limitación en la elección de material encapsulante
Rápida solubilidad de las cápsulas	Producción de polvos muy finos, que necesitan un procesamiento posterior
Tamaño pequeño	No siempre óptimo para materiales sensibles al calor

Alta estabilidad de las cápsulas

Fácil escalamiento

Protege productos sensibles al calor

Tomado de Madene et al., 2006; Patel et al., 2009.

El proceso de secado por aspersion consiste principalmente en 5 pasos:

- I. Concentración: la materia prima suele concentrarse antes de introducirse en el atomizador.
- II. Atomización: esta etapa crea las condiciones óptimas para la evaporación de un producto seco que tenga características deseadas.
- III. Contacto: dentro de la cámara el líquido atomizado se encuentra en contacto con aire caliente.
- IV. Secado: resulta en la evaporación del agua en cuestión de pocos segundos (1 a 10 s).
- V. Separación: los ciclones, la bolsa de filtros y los precipitadores electrostáticos pueden ser utilizados para la etapa final de separación (Patel et al., 2009).

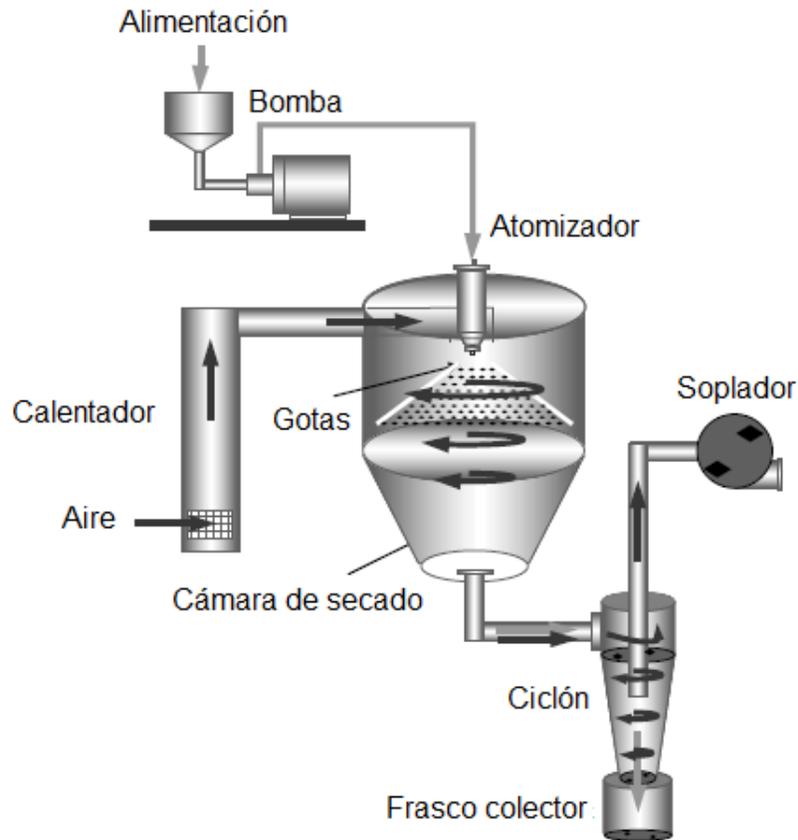


Figura 2. Representación esquemática de un secador por aspersión.
Tomado de: Furuta et al., 2010.

El secado por aspersión es uno de los procesos predominantes en la industria láctea, se pueden producir grandes cantidades de ingredientes lácteos relativamente a bajo costo; se ha estimado que el costo del secado por aspersión es seis veces menor, por kilogramo de agua removida, que el costo por liofilización (Knorr, 1998). Es bajo el costo por la transportación de los polvos obtenidos por éste método, además de que pueden ser almacenados por prolongados periodos de tiempo sin modificarse significativamente su estabilidad (Gardiner et al., 2000). La funcionalidad química, solubilidad y la difusión a través de la matriz determina el grado de retención del material a encapsular durante la preparación de microcápsulas mediante secado por aspersión. Por lo tanto, la estabilidad y eficiencia de la microencapsulación durante el almacenamiento depende del material de pared utilizado (Gharsallaoui et al., 2007).

El tamaño óptimo de las microcápsulas depende en gran medida del tipo de alimento, mientras que microcápsulas con diámetros entre 2 y 3 mm no son detectadas sensorialmente en salchichas (Muthukumarasamy y Holley, 2006), éstas afectan de forma negativa las características sensoriales en yogurt y leche. Se ha observado que en alimentos lácteos un tamaño de microcápsulas de aproximadamente 100 μ m de diámetro no afectan sensorialmente al alimento (Hansen et al., 2002).

Para actuar como cápsulas es esencial seleccionar un material adecuado que pueda ser incorporado a un alimento sin que afecte la textura y el sabor del mismo (de Vos et al., 2010).

2.2.1.1 Materiales encapsulantes

2.2.1.1.1 Carbohidratos

Los carbohidratos como los almidones o maltodextrinas son utilizados en microencapsulación de ingredientes alimenticios. Estos materiales son considerados como buenos agentes encapsulantes debido a que exhiben bajas viscosidades a altos contenidos de sólidos además de su buena solubilidad, sin embargo los materiales de pared basados en este tipo de compuestos tienen pobres propiedades interfaciales y deben ser modificados químicamente para conferirles actividad de superficie (Gharsallaoui et al., 2007).

Las maltodextrinas proveen de buena estabilidad a la oxidación en la encapsulación de aceites pero exhiben pobre capacidad emulsificante, en la estabilidad de la emulsión y baja retención de aceite (Kenyon, 1995).

La pectina es un polímero que se utiliza a bajas concentraciones para producir emulsiones estables, sus propiedades emulsificantes son debidas a los residuos de proteína presentes dentro de la cadena de pectina (Leroux et al., 2003). Una solución de pectina al 1-2% es suficiente para la preparación de una emulsión estable para ser sometida a secado por aspersion (Drusch, 2006). Se ha demostrado (Monsoor, 2005) que el secado por aspersion no tiene efecto sobre la mayoría de las propiedades funcionales de la pectina.

2.2.1.1.2 Quitosano

El biopolímero quitosano es el producto N-diacetilado del polisacárido quitina y está ganando importancia en la industria alimentaria y farmacéutica por sus propiedades únicas como su carácter catiónico, buena biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad. Con el fin de lograr mejor estabilidad, las esferas de quitosano pueden ser entrecruzadas con polifosfatos (Anal y Stevens, 2005) y alginato de sodio (Anal et al., 2003).

2.2.1.1.3. Gomas

Las gomas son usadas en microencapsulación por sus propiedades estabilizantes y de formación de películas. Entre todas las gomas, la goma acacia, comúnmente llamada goma arábiga destaca debido a sus excelentes propiedades emulsificantes que se atribuyen a su fracción proteica y es ampliamente utilizada (Dickinson, 2003). Un alto costo, fuentes limitadas y variaciones en la calidad son desventajas del uso de goma arábiga en microencapsulación (Gharsallaoui et al., 2007).

2.2.1.1.4 Proteínas

Las excelentes propiedades funcionales de las proteínas permiten que estas sean excelentes materiales de pared para la microencapsulación mediante secado por aspersión. Las proteínas tienen carácter anfipático que ofrece propiedades fisicoquímicas y funcionales aptas para encapsular materiales hidrofóbicos (Gharsallaoui et al., 2007).

Las proteínas aisladas del suero de leche han sido utilizadas como cobertura en el secado por aspersión. Este material posee alta capacidad emulsificante y genera microcápsulas de tamaño inferior a 2 micrómetros. Pueden utilizarse solas o combinadas con carbohidratos para modificar las propiedades de la pared y el tamaño de las partículas (Martín et al., 2009).

La gelatina es un material soluble en agua con capacidad de formación de pared en el secado por aspersión y esta reportado que las características y morfología

de las micropartículas de gelatina se pueden mejorar con la adición de manitol (Bruschi et al., 2003).

2.2.2 Microencapsulación de probióticos

La microencapsulación es una de las técnicas más promisorias en la preservación de la estabilidad de bacterias probióticas en productos lácteos, donde la retención física de las células en una matriz encapsulante las protege de los factores adversos (Talwalkar et al., 2004).

La gran mayoría de microcápsulas que contienen probióticos son producidas por tres métodos: la técnica de extrusión, el método de emulsión y secado por aspersion (Heidebach et al., 2003).

2.2.2.1 Extrusión

Este método involucra la preparación de una solución de hidrocoloide inoculándolo con bacterias y posteriormente extruyendo la mezcla. Una representación esquemática del proceso es como se muestra en la figura 3. En general es un método barato y simple que utiliza condiciones suaves lo que provoca daños mínimos a las bacterias y por lo tanto alta viabilidad de las mismas, así como una alta tasa de atrapamiento (Kailasapathy, 2002; Mortazavian et al., 2007).

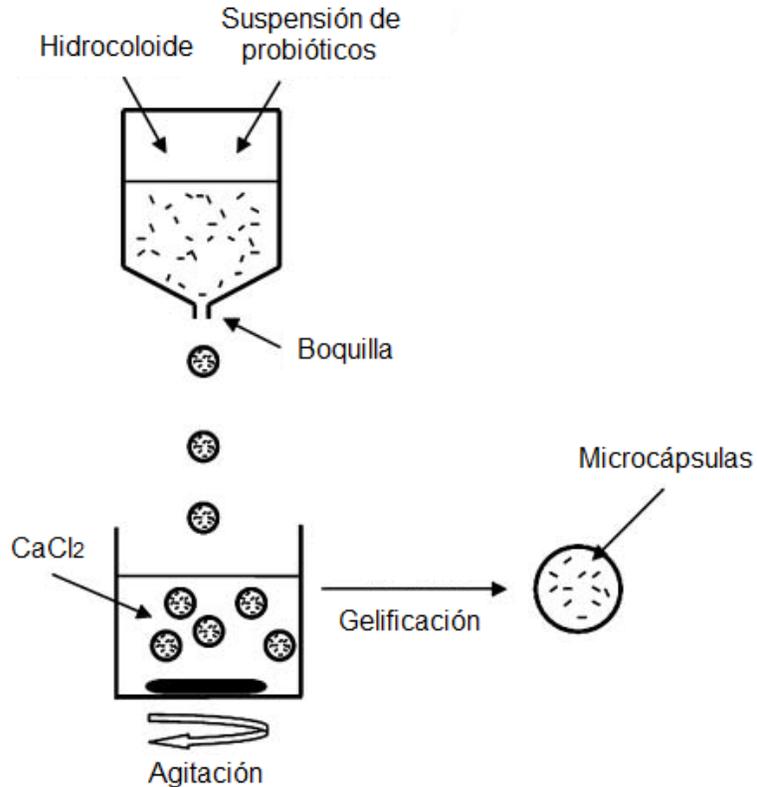


Figura 3. Microencapsulación de probióticos mediante extrusión.

Tomado de: Heidebach et al., 2010.

El material más común usado en la extrusión es el alginato de sodio (Krasaekoopt et al., 2003). Talwalkar y Kailasapathy (2003) demostraron que la encapsulación de bacterias en alginato y agregadas a leche descremada, mejora su sobrevivencia en un ciclo logarítmico cuando se compara con la sobrevivencia en forma libre por 24 horas. Lee et al. (2004) encapsularon *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 en alginato recubiertas con quitosano y expusieron las microcápsulas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, encontrando que hubo un 46% de sobrevivencia cuando se utilizó quitosano de alto peso molecular, mientras que cuando se utilizó quitosano de bajo peso molecular se registró un 36% de sobrevivencia, por otro lado, las micropartículas sin quitosano mostraron la menor protección (25%) para el lactobacilo.

También Urbanska et al. (2007) reportaron que la sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado en microcápsulas de alginato recubiertas con quitosano

es mejor comparada con la adición de la misma bacteria forma libre en yogurt después de haber sido expuestas en jugo gástrico simulado (2 h) y jugo intestinal simulado (6 h).

En contraste, Sultana et al. (2000) reportaron que la encapsulación de bacterias probióticas en esferas de alginato no es capaz de proteger efectivamente a los organismos de las condiciones ácidas.

2.2.2.2 Emulsión

Es el método más utilizado para la microencapsulación de probióticos (Krasaekoopt et al., 2003). En este método un pequeño volumen de una mezcla acuosa de un hidrocoloide (fase discontinua) es emulsificada en un volumen más grande de un aceite vegetal (fase continua) (Figura 4). Una vez que se ha formado la emulsión la mezcla debe ser insolubilizada para formar pequeñas cápsulas dentro de la fase oleosa (Krasaekoopt et al., 2003).

Para generar pequeñas microcápsulas por debajo de 100 μm a partir de hidrocoloides altamente viscosos se deben utilizar sistemas de cizalla como ultraturrax u homogenizadores, por lo que este proceso da lugar a pérdidas significativas de células vivas causadas por el estrés de las altas fuerzas de cizalla (Capela et al., 2007).

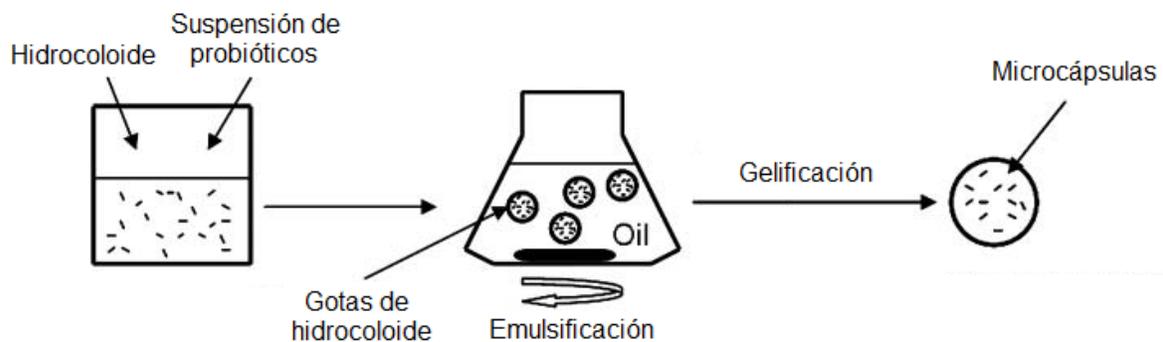


Figura 4. Microencapsulación de probióticos por la técnica de emulsión.

Tomado de: Tomado de: Heidebach et al., 2010.

La encapsulación llevada a cabo por Hou et al., (2003) de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* en emulsiones de aceite de ajonjolí mostró un incremento

significativo (aproximadamente 4 ciclos logarítmicos) de la tasa de sobrevivencia cuando se sometieron las bacterias encapsuladas a jugo gástrico simulado o a soluciones de sales biliares en comparación con las células libres.

Ding y Shah (2009) encapsularon las cepas *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* type BI-04, *B. lactis* type Bi-07, HOWARU *L. rhamnosus* y HOWARU *B. bifidum*, por el método de emulsión, en alginato, goma guar, goma xantana, goma de algarrobo y carragenina y encontraron que la encapsulación mejoró la viabilidad de las bacterias en condiciones ácidas (pH=2) con respecto a las bacterias que se expusieron en forma libre; asimismo estos autores observaron que la goma xantana y la carragenina ofrecen una protección similar y ligeramente más alta (goma xantana) que el alginato a estas condiciones, mientras que las gomas guar y de algarrobo fueron las que menor protección confirieron a las bacterias.

2.2.2.3 Secado por aspersión

El secado por aspersión puede ser utilizado para producir polvos de probióticos a gran escala, pero este proceso resulta en una exposición de las células vivas del probiótico a condiciones adversas como las altas temperaturas y deshidratación que conducen a la pérdida de la viabilidad durante el secado y el almacenamiento. Para óptimos resultados es importante considerar una gran variedad de factores entre los que se incluyen la selección de la cepa particular de probiótico, la condición fisiológica del cultivo que se alimenta al secador, el uso de materiales protectores y/o acarreadores, temperatura del aire de alimentación y de salida, así como la actividad de agua (Meng et al., 2008).

Algunos autores han estudiado materiales de pared para conferir protección a las bacterias probióticas bajo condiciones adversas, como lo son: almidón modificado (O'Riordan et al., 2001), goma acacia (Desmond et al., 2002), gelatina (Lian et al., 2003), aislado de proteína de suero (Picot y Lacroix, 2004), maltodextrina con goma arábica (Su et al., 2007), y β -ciclodextrina con goma acacia (Zhao et al.,

2008) entre otros.

Abe et al. (2009b) estudiaron la estabilidad de dos cepas de bifidobacterias en formulaciones en polvo. Los probióticos *B. longum* BB536 y *B. animalis* subsp. *lactis* fueron microencapsulados mediante secado por aspersion y se encontró que las bacterias de ambos polvos fueron estables a una actividad de agua (A_w) de 0.02; sin embargo cuando la actividad de agua incrementó a 0.13, la cuenta para *B. animalis* subsp. *lactis* disminuyó drásticamente. En particular cuando los polvos de estos probióticos fueron utilizados en fórmulas para bebés ($A_w = 0.25$), *B. longum* BB536 sobrevivió en grado similar que a baja actividad de agua, mientras que la cuenta viable de *B. animalis* subsp. *lactis* disminuyó menos de 1% después de un año de almacenamiento (Abe et al., 2009b).

O'Riordan et al. (2001) lograron encapsular satisfactoriamente células del género *Bifidobacterium* en forma de microesferas a una temperatura de entrada de 100°C y de salida de 45°C utilizando almidón gelatinizado como material de pared, obteniendo una reducción del número de bifidobacterias de 1 ciclo logarítmico. Los autores concluyeron que el secado por aspersion es un método viable para la encapsulación de bifidobacterias, aunque reportaron que el almidón utilizado como acarreador no confirió protección a las bacterias cuando éstas fueron expuestas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Picot y Lacroix (2004) observaron que la dispersión de *Bifidobacterium spp.* en una suspensión de proteína de suero/grasa de leche, térmicamente tratada, y posteriormente sometida a secado por aspersion constituye un método adecuado y económico a escala industrial para mantener la viabilidad de las células. Los autores encontraron rendimientos de encapsulación entre 0.71 y 25.7%, dependiendo de la tolerancia al calor de cada cepa, de esta forma concluyeron que el daño celular causado por la alta fuerza de cizalla y la inactivación térmica durante el secado fueron la mayor desventaja del proceso. Las cuentas viables de *Bifidobacterium breve* R070 inmovilizadas en la matriz de proteína de suero fueron significativamente mayores a las cuentas viables de células libres después de un período de almacenamiento en yogurt a una temperatura de 4°C y cuando fueron

expuestas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

En un estudio llevado a cabo por Gardiner et al. (2002) se produjeron microcápsulas mediante secado por aspersión de la cepa *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, utilizando leche descremada como material de pared y adicionándolas en queso tipo Cheddar, observando que la viabilidad se mantuvo en el producto por al menos 7 semanas.

Desmond et al. (2002) demostraron que la incorporación de goma acacia (goma arábica) en un medio a base de leche descremada antes de ser sometido a secado por aspersión, incrementó la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 durante el almacenamiento.

El secado por aspersión ofrece ventajas sobre otros métodos clásicos de encapsulación ya que se producen microcápsulas con altas tasas de sobrevivencia logradas mediante la selección de cepas resistentes al calor (Meng et al., 2008) o por el uso de solutos protectores (Santivarangkna et al., 2008) como trehalosa (Conrad et al., 2000), sólidos de leche descremada y/o adonitol (Selmer et al., 1999), factores de crecimiento, prebióticos (Desmond et al., 2002) y almidón granular (Crittenden et al., 2001).

2.2.3 Evaluación de las microcápsulas

Existen varios métodos para evaluar la calidad de las cápsulas, algunos se basan en la forma, tamaño o estructura de la partícula; para estos casos las técnicas utilizadas son la microscopía electrónica de barrido (MEB) o la microscopía electrónica de transmisión (MET) (Ann et al., 2007).

Otros métodos lo hacen evaluando la cantidad de agente activo encapsulado; por otra parte, para el caso de los microorganismos encapsulados se utiliza la medición de microorganismos sobrevivientes o viables, esto a través de recuento microbiano en placa (Muthukumarasamy et al., 2006).

3. JUSTIFICACION

El incremento en el consumo de alimentos funcionales en los últimos años se debe a que se les atribuyen distintas propiedades benéficas para la salud humana si se consumen en cantidades adecuadas (Arvanitoyannis y Houwelingen, 2005; Ferrer y Dalmau, 2001). Los alimentos probióticos, son alimentos funcionales que contienen bacterias probióticas vivas (Amores et al., 2004) y entre ellos encontramos principalmente al yogurt y leches fermentadas. Recientemente los quesos han demostrado ser buenos vehículos para la incorporación de probióticos (Boylston et al., 2004; Ong et al., 2006), a la par que su consumo ha incrementado sin importar el nivel socioeconómico (Federación Internacional de Lácteos-IDF, 2005).

Diferentes estudios han demostrado que las bacterias probióticas incorporadas a diferentes productos lácteos muestran una reducción considerable en su sobrevivencia durante los procesos de elaboración y almacenamiento debido a diferentes factores propios del mismo alimento como alta acidez y oxígeno disuelto, así como durante su paso por el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, se han propuesto algunas técnicas de microencapsulación que protejan a las células conservando su sobrevivencia en un número suficiente en el alimento hasta su consumo y establecimiento en el intestino. El secado por aspersión es un método de microencapsulación de fácil escalamiento y económico en comparación con otros métodos (Krishnan et al., 2005; Simpson et al., 2005), que se ha utilizado exitosamente para proteger a diversos microorganismos de las condiciones adversas durante el almacenamiento y tránsito por el tracto gastrointestinal.

En México la producción de quesos ha incrementado durante los últimos años (2007-2011), de igual manera su consumo también se ha incrementado a nivel mundial (2006-2012). En la primera mitad del 2012, el queso Manchego ocupó el sexto lugar en producción a nivel nacional con 13,770 ton, detrás del queso Chihuahua (17,455 ton), Panela (19,966 ton), Doble crema (20,083 ton), Fresco (20,868 ton) y Amarillo (22,015 ton) (SIAP, 2012).

De acuerdo a algunos autores los quesos tienen ciertas ventajas sobre los

productos frescos fermentados para ser utilizados como vehículos para la incorporación de probióticos, debido a que su consistencia sólida y mayor contenido de grasa confiere una mayor protección a las bacterias durante el almacenamiento y su paso a través del tracto gastrointestinal (Ong et al., 2006). Por lo tanto, en este trabajo se propone evaluar la sobrevivencia del probiótico *B. breve*, en su forma libre y microencapsulada incorporado en queso tipo Manchego, durante su elaboración, almacenamiento durante tres semanas y exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después del almacenamiento.

4. HIPÓTESIS

La sobrevivencia del probiótico *B. breve* microencapsulado mediante secado por aspersion e incorporada en queso tipo Manchego será mayor durante el almacenamiento y durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después del almacenamiento, comparado con la sobrevivencia del microorganismo incorporado en su forma libre.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium breve* después de su microencapsulación mediante secado por aspersion en una matriz conformada por una mezcla de almidón alto en amilosa fosfatado y concentrado de proteína de suero de leche, la viabilidad durante el almacenamiento del probiótico en forma libre y microencapsulada en un queso tipo Manchego durante el período de almacenamiento (3 semanas a 12°C), así como durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después del periodo de maduración.

5.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar un almidón de maíz alto en amilosa fosfatado preparado por el método convencional en suspensión.
2. Microencapsular células viables de *B. breve* mediante secado por aspersion utilizando una mezcla del almidón modificado y concentrado de proteína de suero como materiales encapsulantes.
3. Determinar la viabilidad de *B. breve* después del secado por aspersion.

4. Incorporar las microcápsulas preparadas y las bacterias en su forma libre en un queso tipo Manchego y determinar su sobrevivencia en muestras empacadas al vacío durante un período de almacenamiento de 3 semanas a 7°C.
5. Caracterizar químicamente el queso preparado al principio y final del almacenamiento.
6. Determinar la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas y en su forma libre incorporadas en el queso durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal al final del periodo de almacenamiento.
7. Conocer el perfil proteico de los diferentes quesos mediante Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (Urea-PAGE).
8. Evaluar sensorialmente los quesos después de su periodo de almacenamiento mediante una prueba de preferencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismo

Las cepas se cultivaron de rutina a partir de cultivos liofilizados de la cepa de colección ATCC 15700 de *Bifidobacterium breve*.

6.1.1 Activación de la cepa

El cultivo liofilizado de *B. breve* se activó colocando una asada del liofilizado en 3 mL de caldo MRS suplementado con 0.05% (p/v) L-cisteína-HCl (MRS-c) bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 horas.

6.1.2 Conteo de microorganismos

Se llevó a cabo el conteo de las UFC/mL de cada muestra mediante el método de siembra de extensión en superficie, colocando 100 µL de la suspensión diluida de células en una caja petri con agar MRS-c con Vancomicina (MRS-cv) y extendiendo el líquido sobre el agar con una varilla en forma de "L". El agar se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se vertió en cajas petri estériles para ser puestas en incubación a 37°C durante 48 horas en jarras anaeróbicas utilizando sobres generadores de dióxido de carbono (BD GasPak*EZ Anaerobe Container System, USA).

6.2 Caracterización del material encapsulante

El almidón alto en amilosa fue fosfatado de acuerdo a lo reportado por Castro (2010) en un trabajo anterior.

6.2.1 Determinación del grado de sustitución

El contenido de fósforo del material modificado se determinó siguiendo el método descrito por Smith y Caruso (1964). Se realizaron 3 repeticiones para cada análisis reportándose el valor promedio. El grado de sustitución se calculó con la ecuación:

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

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

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

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

6.2.2 Determinación del índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) del almidón fosfatado

Ambos índices se determinaron siguiendo el método descrito por Anderson y col. (1969) con algunas modificaciones. Para cada muestra, se pesaron 0.25 g en un tubo de ensaye y se adicionaron 3 ml de agua destilada. Los tubos se mantuvieron a 30°C y en agitación constante por 30 min. Enseguida, se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decantó en un crisol de aluminio, puesto previamente a peso constante, y se evaporó en una estufa a 105°C durante 2 h y registrándose el peso del crisol como residuo de evaporación. Por otra parte, el peso del pellet que quedó en el tubo de ensaye se registró como residuo de centrifugación.

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

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

$$\text{IAA} = \frac{\text{Peso del residuo de centrifugación}}{\text{Peso de la muestra} - \text{Peso del residuo de evaporación}} \times 100$$

6.3 Microencapsulación de *Bifidobacterium breve*

6.3.1 Preparación de la cepa para su microencapsulación

Una vez activada la cepa de *Bifidobacterium breve* en caldo MRS suplementado tras 24 horas de incubación, se inoculó en caldo MRS suplementado estéril y se incubó a 37°C por 18 horas para obtener una concentración de aproximadamente 10⁹ UFC/mL en fase logarítmica tardía. Las células fueron recuperadas y centrifugadas a 1500 g por 15 minutos y lavadas dos veces con agua peptonada

estéril al 0.1%. Después del lavado, se conservó el pellet de bacterias para ser incorporado en la suspensión de material encapsulante.

6.3.2 Preparación de suspensiones de los materiales matriz

Se utilizó una mezcla de 90% almidón alto en amilosa fosfatado y 10% de CPS para preparar una suspensión acuosa con 10% de sólidos (90ACPS). Las soluciones se homogenizaron por 5 minutos en un homogenizador a velocidad media y el pH se ajustó a 7.0 con una solución de NaOH al 2%. Las suspensiones se calentaron en baño maría por 10 minutos a 80°C y se enfriaron a temperatura ambiente antes de agregar las bacterias. En cada suspensión del material matriz se dispersaron aproximadamente 10^9 UFC/mL de células de *Bifidobacterium breve* previamente lavadas y centrifugadas. Antes de la microencapsulación por secado por aspersión se tomó una muestra de 1 mL para determinar la concentración de bacterias antes del proceso.

6.3.3 Microencapsulación de *B. breve* mediante secado por aspersión

El proceso se llevó a cabo en un secador por aspersión de laboratorio marca Büchi, modelo B-191 (Büchi, Flawil, Switzerland). Las condiciones de operación del secador fueron las siguientes: boquilla de doble flujo, un diámetro de 0.7 mm, temperatura de aire de entrada 160-170°C, capacidad de bomba de alimentación de 45%, temperatura de salida de 85-90°C y capacidad de bomba de aspiración de 90%. Las cápsulas se recuperaron del vaso colector del secador con una espátula estéril y se almacenaron en frascos de vidrio estériles cerrados herméticamente y en refrigeración a 4°C.

6.4 Caracterización de microcápsulas

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

Se suspendieron por triplicado 0.5 g de cápsulas del material en tubos con 4.5 mL de diluyente de peptona al 0.1%. Las suspensiones se agitaron en vórtex

(Thermolyne, tipo 37600 Mixer, USA) a velocidad máxima por 1 minuto.

6.4.2 Determinación del contenido de humedad en las microcápsulas

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

6.4.3 Caracterización morfológica

Se llevó a cabo la caracterización morfológica de las microcápsulas de *B. breve* en 90ACPS por microscopía electrónica de barrido utilizando un microscopio electrónico de barrido (Phillips, modelo XL30ESEM, Holanda) con espectrómetro de energía dispersiva de rayos X marca EDAX, en condiciones de bajo vacío (0.7 mBar). Las muestras fueron fijadas en portamuestras de aluminio con semicírculos de cinta adhesiva doble cara de grafito, expandidas por medio de aire comprimido y observadas a diversos aumentos.

6.5 Elaboración del queso probiótico tipo Manchego

6.5.1 Elaboración del queso tipo Manchego

Se preparó el queso tipo Manchego con leche de vaca entera y fresca. Se pasteurizó a 63°C durante 30 minutos con agitación constante y se enfrió hasta 35°C. Se adicionó una dosis apropiada del cultivo iniciador de inoculación directa para preparar Queso tipo Manchego de la marca Danisco® el cual contiene las cepas: *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis* y *Streptococcus termophilus*. Enseguida se agregó una solución de CaCl₂ al 50% y el cuajo (Marca Aqualact), de acuerdo a la recomendación del fabricante, ambos diluidos 10 veces en agua destilada estéril.

La mezcla se dejó en reposo por 45 minutos hasta que la cuajada estuviera firme, la cual se cortó con ayuda de una lira metálica pasteurizada en pequeños cubos de 1 cm² aproximadamente. Se dejó en reposo un pequeño lapso de tiempo y se procedió al trabajo de grano mediante la agitación continua del grano, durante 40 minutos, incrementando gradualmente la temperatura hasta 38-39°C para favorecer la sinéresis del suero. Posteriormente se desueró por completo, se pre-prensó la pasta y se efectuó el salado a una concentración final de 1.5%.

Se adicionó el probiótico (*B. breve*) en forma libre y encapsulada a la pasta con una población inicial de 8 log UFC/g. La pasta se moldeó en porciones de aproximadamente 600 gramos protegida con una manta pasteurizada y los quesos resultantes se prensaron por 13 horas, cumplido este tiempo se voltearon y nuevamente se prensaron por 24 horas. Los quesos ya listos para su empaçado se sumergieron en una solución acuosa de Natamicina al 0.3%, se dejaron secar en una campana de flujo laminar para posteriormente empacarlos al vacío y almacenarlos a una temperatura de 10°C.

6.6 Ensayo de sobrevivencia de *B. breve* libre y encapsulada en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Se evaluó de forma *in vitro* la sobrevivencia de *B. breve* adicionado al queso tipo Manchego bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

6.6.1 Preparación de soluciones

Saliva artificial.- se diluyeron los reactivos que se muestran en el cuadro 5, en agua destilada estéril (Castro, 2010).

Cuadro 5. Reactivos usados en la preparación de saliva artificial

Reactivo	Cantidad (g/L)
Cloruro de sodio	6.2
Cloruro de potasio	2.2
Cloruro de calcio	0.22
Bicarbonato de sodio	1.2

Jugo gástrico simulado (JGS) se preparó disolviendo 3 g de pepsina en 1 L de solución salina estéril (0.5% NaCl w/v) y a un pH de 2 ajustando con HCl 0.1 M.

Jugo intestinal simulado (JIS) se preparó disolviendo 1 g de pancreatina y 1.5 g de sales biliares en 1 L de solución salina estéril al 0.5% y a un pH de 8 ajustándolo con NaOH 0.1 M.

6.6.2 Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Se adicionaron 3 mL de saliva artificial y 24 mL de JGS a 3 g de la muestra de queso probiótico tipo Manchego, se homogenizaron las muestras manualmente por 1 minuto y se colocaron a 37°C durante 2 horas. Se monitoreó la cuenta viable recién colocadas las muestras en saliva y JGS y a las 2 horas siguientes. A continuación las mismas muestras fueron expuestas a las condiciones intestinales simuladas. Para ello se tomaron 25 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 10 000 g por 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y sobre la pastilla se adicionó 1 mL del sobrenadante recién decantado más 9 mL de JIS, las muestras se colocaron a 37°C durante 4 horas. La cuenta viable de estas suspensiones fue determinada recién agregado el JIS a las 2 y a las 4 horas de residencia.

6.7 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (UREA-PAGE)

6.7.1 Preparación de las muestras

Las proteínas de los quesos se prepararon para su análisis con una ligera modificación del método de Kuchroo y Fox (1982). 20 g de queso se homogenizaron con 40 mL de agua destilada por 5 minutos utilizando un homogenizador Ultra-Turrax T18 Basic®. Al homogenado se le ajustó el pH a 4.6 usando HCl 1 M y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos reajustando el pH en caso de ser necesario. El homogenado resultante se mantuvo a 40°C por una hora y posteriormente se centrifugó a 3000 g por 30 minutos a 4°C para recuperar el pellet el cual se sometió a liofilización para su análisis por electroforesis.

6.7.2 UREA-PAGE

Las electroforesis en gel de poliacrilamida se llevaron a cabo en una cámara vertical Mini-PROTEAN® 3 Cell marca Biorad usando una fuente de poder Amersham Biosciences EPS 301.

Los geles completos consistieron en gel concentrador a 5.7 % y separador al 10%. El gel concentrador y separador se prepararon en búffers diferentes (ver Anexo).

El búffer de electroforesis consistió en una solución de Tris-HCl 0.0 2M y glicina 0.19 M. Las corridas se realizaron a temperatura ambiente aplicando un voltaje constante de 250 V.

10 mg de muestra liofilizada y de estándar (Leche descremada Difco®) se mezclaron con 1 mL de búffer (ver Anexo) y esta solución se guardó a -10°C hasta su análisis. Este periodo no debe exceder de 20 días. Previo a la electroforesis las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su descongelamiento y se colocaron 2 µL de muestra en el gel.

La tinción de los geles se realizó directamente con una solución de azul de Coomasie G-250 (ver Anexo) y fueron desteñidos con agua.

6.8 Evaluación sensorial

Se llevó a cabo una evaluación sensorial de los quesos después de su periodo de almacenamiento a través de una prueba de preferencia utilizando un panel no entrenado de 120 personas y utilizando una escala hedónica de 7 puntos. Se compararon tres tipos de queso: Queso Manchego con *B. breve* encapsulado, Queso Manchego sin *B. breve* y un Queso Comercial.

6.10 Diseño y Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones del queso tipo Manchego, para medir la viabilidad del probiótico como variable respuesta, antes y después del secado mediante una *t* de Student. Para estimar la tendencia de la viabilidad a través del tiempo de almacenamiento en el producto terminado, los datos se analizaron mediante un diseño con mediciones repetidas.

Para la medición de la viabilidad después del ensayo de tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, se utilizó un diseño de un factor con dos niveles (factor = condición de la bacteria; niveles = 90ACPS y sin encapsular) con tres repeticiones en el queso tipo Manchego.

Para estudiar el nivel de preferencia de los descriptores estudiados en la evaluación sensorial se utilizó un análisis de contingencia de las tres muestras de

queso, como variable respuesta fue el número que le otorgaron a cada descriptor de acuerdo a la escala hedónica empleada.

Todos los datos se analizaron con el programa JMP versión 5.0.1.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización química del almidón alto en amilosa fosfatado

7.1.1 Grado de sustitución y porcentaje de fósforo

El almidón de maíz alto en amilosa fue entrecruzado por el método convencional en suspensión utilizando trimetafosfato de sodio (TMFS) como agente fosfatante, de acuerdo a lo reportado por Castro (2010) con la finalidad de preparar un almidón más estable a la temperatura y bajos valores de pH.

El porcentaje de fósforo, grado de sustitución e índices de solubilidad y absorción de agua del almidón modificado utilizado como material encapsulante se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Valores de fósforo y grado de sustitución del almidón alto en amilosa fosfatado.

	Valor
% P	0.46 ± 0.0005
GS	0.024 ± 0.01

Los valores son el promedio de tres réplicas ± error estándar.

El porcentaje de fósforo del almidón alto en amilosa fosfatado y el grado de sustitución se obtuvo mediante una curva de calibración de fósforo en forma de fosfato monobásico de potasio, la cual tuvo una $R^2 = 0.99$ (Apéndice 1).

Los valores obtenidos muestran que el porcentaje de fósforo en el almidón es más alto que el obtenido por Lim y Seib (1993), quienes por el método convencional y al mismo pH (8) fosfataron un almidón de maíz con TMFS obteniendo 0.14% de fósforo. Esta diferencia puede deberse mayormente a que en nuestro estudio utilizamos una concentración del 2.5% mientras que Lim y Seib utilizaron un 2%

de la sal fosfatante; otros factores pudieron deberse a diferencias ligeras en el procedimiento de modificación.

El contenido de fósforo es directamente proporcional a la cantidad de sal fosfatante que se utiliza en la modificación. En el estudio de Chang y Lii (1992) se prepararon almidones de maíz fosfatados por método convencional y extrusión, utilizando concentraciones de 12.6% y 4% de tripolifosfato de sodio (TPFS) para cada método respectivamente, obteniendo porcentajes de fósforo de 0.88 (convencional) y 0.74 (extrusión), valores más altos que el obtenido en este trabajo. Los grados de sustitución calculados por los autores fueron 0.048 y 0.046 del almidón modificado convencionalmente y por extrusión respectivamente. En el estudio de Chang y Lii (1992) se resalta la ventaja de utilizar la extrusión ya que se alcanza una modificación similar a la obtenida por el método convencional utilizando menor cantidad de reactivos y menor contaminación, sin embargo el porcentaje de almidón dañado fue mayor cuando se fosfató por extrusión (24.63%) comparado con el porcentaje obtenido usando el método convencional (3.49%), lo que puede reflejarse en ciertos parámetros como el ISA e IAA.

Según Liu et al., (1999) en un almidón fosfatado, los entrecruzamientos inhiben la hinchazón y la hidratación del gránulo de almidón. Cuando se lleva a cabo el entrecruzamiento con TMFS el número de grupos fosfato incorporados en el almidón es mayor que cuando se emplean otras sales, los grupos fosfato se introducen en el gránulo, mientras que con oxiclórico de fósforo (POCl_3) la fosfatación se lleva a cabo en el exterior del mismo (Carmona et al., 2009).

De acuerdo a la literatura la cantidad máxima de fósforo que debe tener un almidón fosfatado debe ser del 0.4% cuando la fosfatación se lleva a cabo con sales tales como tripolifosfato y trimetafosfato de sodio (Code of Federal Regulations, 1991; San Martín-Martínez et al., 2004). El porcentaje de fósforo del almidón modificado en este trabajo es ligeramente mayor a lo permitido. El grado

de sustitución del almidón alto en amilosa fosfatado (0.024 ± 0.01) se encuentra dentro del nivel permitido establecido en la literatura de 0.02 (San Martín-Martínez et al., 2004).

7.1.2 Índice de Solubilidad en Agua e Índice de absorción de Agua

Los valores de ISA están influenciados por diversos factores tales como: condiciones de la modificación química, tipo y concentración de la sal fosfatante utilizada, contenido de humedad, tipo de almidón y métodos de análisis en la medición de estos parámetros, entre otros.

El ISA depende de la disponibilidad de los grupos hidrofílicos que se unen a las moléculas de agua y es un parámetro que refleja la degradación de los componentes del almidón durante un proceso de modificación química, es decir, se incrementa con condiciones severas de procesamiento (Larrea et al., 2005). Harper (1992) encontró que durante un proceso de extrusión reactiva, las condiciones de trabajo provocan una excesiva dextrinización del almidón, aumentando la producción de productos solubles.

La modificación química del almidón también tiene un efecto sobre el ISA. Según Seker y Hanna (2006) en un almidón fosfatado es menor el ISA en comparación con uno nativo. De acuerdo con Rutledge et al., (1972) el efecto del entrecruzamiento del almidón de arroz provoca menor lixiviación y por lo tanto se incrementa la resistencia a la ruptura.

La fosfatación por método convencional provoca un menor daño al gránulo de almidón comparado con el proceso de extrusión, por lo cual se eligió preparar el almidón fosfatado mediante el método convencional; el valor de ISA obtenido para el AMAA fosfatado fue relativamente bajo (Cuadro 7), debido precisamente a que este parámetro está en función del entrecruzamiento del almidón y la baja degradación molecular (Seker, 2004). De acuerdo a Seker y Hanna (2006), el ISA

de un almidón fosfatado es menor en comparación con el almidón nativo. Según Rutledge et al. (1972) el efecto del entrecruzamiento del almidón de arroz incrementa la resistencia a la ruptura y provoca una menor lixiviación de las cadenas de amilosa.

Cuadro 7. Índices del almidón alto en amilosa fosfatado.

	Valor
ISA (Índice de solubilidad en agua)	2.1 ± 0.55
IAA (Índice de absorción de agua)	1.06 ± 0.04

Los valores son el promedio de tres réplicas ± error estándar.

El IAA se entiende como el volumen que ocupa el almidón después que se hincha debido a un exceso de agua y se relaciona con el grado de cocción (Masson y Hosney, 1986). El IAA es un parámetro que refleja de igual forma el efecto que tiene una modificación química sobre un almidón. Las condiciones suaves utilizadas para fosfatar por el método convencional resultaron en un valor de IAA bajo. Seker y Hanna (2006) obtuvieron un valor de IAA mayor (5.03) que el obtenido en nuestro trabajo cuando llevaron a cabo la fosfatación de almidón de maíz por extrusión con 5% TMFS, lo que se debe (Salay y Ciacco, 1990) a que los gránulos de almidón pierden su integridad durante el proceso de extrusión provocando un incremento de compuestos solubles.

Para el objetivo de este trabajo los valores obtenidos de ISA e IAA son adecuados debido a que el material encapsulante fue diseñado para exhibir baja solubilidad y absorción de agua, con la finalidad de que las microcápsula preparadas con probióticos no perdieran la integridad en el alimento vehículo (queso tipo Manchego) el cual tiene un alto contenido de humedad, liberando a las células

durante la elaboración del alimento o durante su almacenamiento.

Por otro lado, las propiedades reológicas de almidones altos en amilosa están dominados por el proceso de gelación de amilosa. Los cristales tipo B de la amilopectina en los almidones altos en amilosa provocan temperaturas de gelatinización más altas que las exhibidas por almidones de maíz nativos.

La amilopectina en almidones cerosos y normales de maíz tienen una mayor proporción de cadenas cortas y estos almidones exhiben un patrón de difracción de Rayos-X de tipo A, mientras que los almidones altos en amilosa tienen una mayor proporción de cadenas largas en las fracciones ramificadas y exhiben un patrón de difracción de Rayos-X de tipo B. Los diferentes patrones de difracción de Rayos-X indican que los almidones altos en amilopectina, almidón normal y almidón alto en amilosa tienen diferentes formas de empaquetamiento de las dobles hélices dentro del cristal, lo cual afecta las propiedades funcionales de estos almidones (Shi et al., 1998).

Los almidones altos en amilosa presentan también una reducción en el hinchamiento del gránulo debido al nivel reducido de amilopectina, que es el componente principalmente responsable de la estructura granular del almidón, así como a la posibilidad de que el polímero de amilosa restringe la absorción de agua (Richardson et al., 2000).

7.2 Microencapsulación de *Bifidobacterium breve*.

En la microencapsulación de *B. breve* se utilizó la mezcla de 90% de almidón alto en amilosa fosfatado y 10% de concentrado de proteína de suero (90ACPS) ya que Castro (2010) demostró que la combinación de un pequeño porcentaje de CPS con almidón alto en amilosa fosfatado brinda una protección similar a la protección brindada por el CPS por sí solo y éste último por sí solo es una materia prima de costo elevado.

Para el secado por aspersión se utilizaron cultivos de *B. breve* en su fase logarítmica tardía la cual se cumple entre las 15 y 20 horas según Castro (2010) después de una doble transferencia en caldo MRS-c, el cual contiene cisteína como factor de crecimiento y para disminuir el potencial redox (Poch et al., 1988; Gomes et al., 1998). Para el caso de este trabajo se utilizaron las células a un tiempo intermedio (18 hr), tiempo en el cual de acuerdo con diversos autores (Keller y Maxcy, 1984; Kolter et al., 1993) es una etapa de crecimiento donde las células se encuentran más estables y tienen mayor posibilidad de mantener su viabilidad después de un proceso como el secado por aspersión.

El contenido de sólidos utilizado para preparar las suspensiones para el proceso de secado fue de 10% de sólidos, el cual ha sido reportado por varios autores (Castro, 2001; Deesmond et al., 2002; Lian et al., 2003 y Wong et al., 2010).

La temperatura del aire de entrada durante el proceso fue de 160°C, que también ha sido usada por Wong et al., (2010), mientras que se registró una temperatura de salida de 90°C con una capacidad de bomba de aspiración 95%. Las muestras recolectadas fueron almacenados en frascos herméticos a 4°C como ha sido recomendado por diversos autores (Lian y et al., 2002 y 2003; Wong et al., 2010).

Para conocer la población viable de *B. breve*, en las cápsulas, se elaboraron las diluciones adecuadas utilizando diluyente de búffer de fosfatos a pH 7 con el fin de no estresar más las células por cambios de pH. *B. breve* es resistente a la Vancomicina, antibiótico que fue agregado al medio de cultivo para hacer un conteo selectivo de la bifidobacteria. Para conocer el efecto del secado por aspersión sobre la viabilidad del probiótico se midió la tasa de muerte de *B. breve* antes y después del proceso y se observó (Figura 5) que la reducción de la viabilidad (0.2 log UFC/g) no fue estadísticamente significativa con respecto a la población en la suspensión.

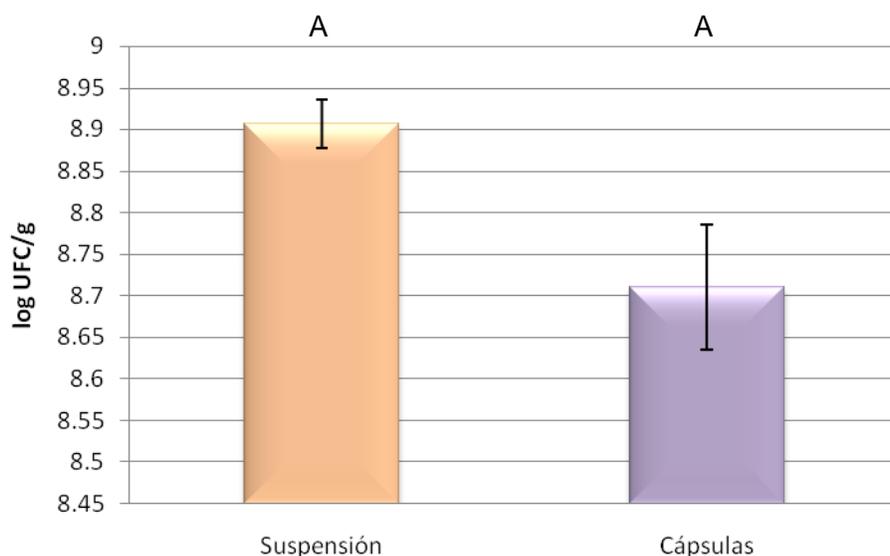


Figura 5. Supervivencia de *B. breve* después del secado por aspersión. Barras con la misma letra indica no diferencia estadística significativa con un valor de significancia de 0.05.

Cuadro 8. Tasa de muerte de *B. breve* durante el secado por aspersión.

	log UFC/g	EE
Suspensión	8.90 ^A	0.02
Cápsulas	8.70 ^A	0.07

Niveles conectados con superíndices iguales (^A) indica no diferencia estadística significativa con un valor de significancia de 0.05. EE= error estándar.

La tasa de supervivencia de *B. breve* (0.2 log UFC/g) que equivale a un 97.79 ± 0.79% después del secado por aspersión fue mayor a la que encontraron Lian et al., (2002) quienes microencapsularon bifidobacterias mediante secado por aspersión con diferentes materiales de pared como goma arábica, gelatina, almidón soluble y leche descremada (10% de sólidos cada material), para el almidón observaron que la mayor supervivencia fue para *B. longum* (29.06%) y la menor para *B. infantis* (0.92%), esto puede deberse a que *B. breve* posee intrínsecamente una menor sensibilidad al calor.

La reducción de la viabilidad de solamente 0.2 log UFC/g, es similar al obtenido por Castro (2010) (0.3 log UFC/g) utilizando la misma matriz. Por otro lado Picot y Lacroix (2004) observaron una mayor pérdida de viabilidad (1 log UFC/g) utilizando proteína de suero como material de pared en la microencapsulación de la misma bifidobacteria.

7.2.1 Caracterización morfológica de las cápsulas

En la figura 6 se muestran las microfotografías de las cápsulas de 90ACPS obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido, como se observa en la figura las cápsulas tienen forma esférica y algunas se encuentran colapsadas debido a las condiciones a las que se somete la muestra cuando es secada por aspersión.

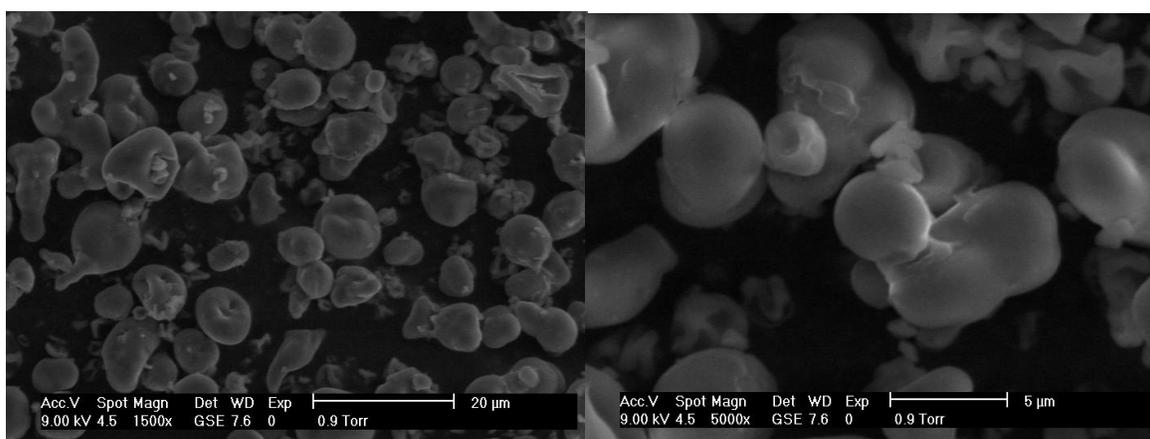


Figura 6. Microfotografías de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de la mezcla 90ACPS

7.2.2 Contenido de Humedad

Se midió el contenido de humedad de las cápsulas de 90ACPS siendo de 4.06 ± 0.14 que coincide con lo reportado por Gardiner et al., (2000) quienes obtuvieron cápsulas conteniendo probióticos con contenidos de humedad similares. Simpson et al., (2005) encapsularon *B.breve* a condiciones de secado muy similares (temperatura de entrada y salida de 170°C y 85-90°C respectivamente) usando leche descremada al 20% w/v y leche descremada al 10% w/v + 10% w/v de goma acacia como materiales de pared obtuvieron valores de humedad de 3.23 y 3.05

respectivamente, ligeramente más bajos que los obtenidos en este trabajo.

En general, un contenido de humedad <4% es una condición segura para la estabilidad de probióticos encapsulados a largo plazo (Písecký, 1997). Se ha observado que la temperatura de salida es un parámetro que afecta la humedad final del producto, Lian et al., (2002) así como Gardiner et al., (2002) encontraron que la temperatura de salida es proporcional al contenido de humedad del producto, es decir a mayor temperatura de salida, menor humedad, sin embargo altas temperaturas del aire de salida pueden afectar la viabilidad del probiótico.

7.3 Incorporación de *Bifidobacterium breve* microencapsulado en el queso tipo Manchego

Una vez manufacturados los quesos e inmediatamente después del prensado se sumergieron en una solución al 0.3% de Natamicina, que es un antifúngico comercial que inhibe el crecimiento de hongos y levaduras que pudieran interferir en los conteos para el monitoreo de la viabilidad de *B. breve* en el queso tipo Manchego, la alteración en las propiedades organolépticas y que haya bajo o nulo riesgo microbiológico de la presencia de aflatoxinas de hongos ya que las muestras fueron sometidas a un análisis sensorial.

Se monitoreó la sobrevivencia de *B. breve* microencapsulado en 90ACPS y adicionado al queso tipo Manchego en condiciones de almacenamiento (10°C y empacados al vacío) durante 3 semanas. Se analizaron las tendencias de la sobrevivencia cuando *B. breve* se adicionó en forma libre y encapsulada en el queso tipo Manchego, con base a la cantidad inicial de inóculo, la cual se consideró como un 100%. En la Figura 7 se observa que el comportamiento de la sobrevivencia a través de las tres semanas de maduración fue mayor cuando *B. breve* se encontraba en forma encapsulada, mientras que en su forma libre fue menor.

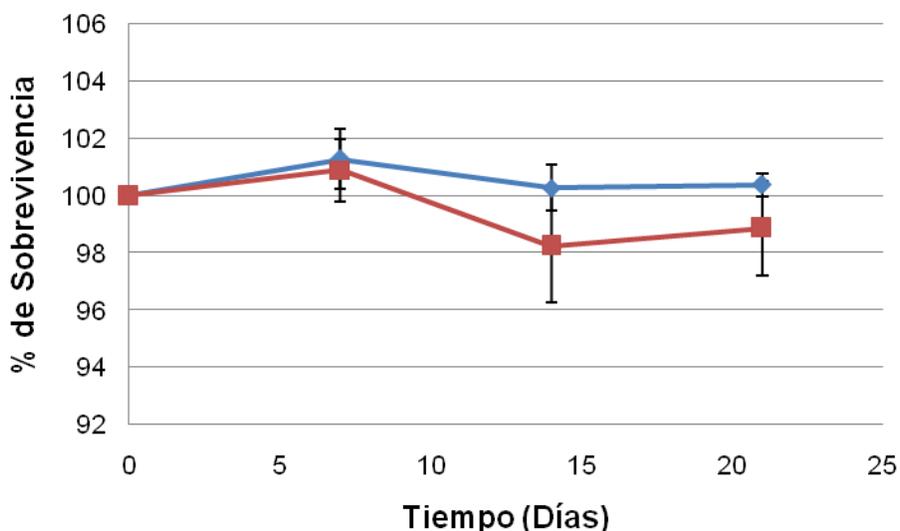


Figura 7. Comportamiento de la supervivencia de *B. breve* incorporado en forma libre (rojo) y encapsulado (azul) en queso tipo Manchego durante su almacenamiento.

Al término del monitoreo, los porcentajes de supervivencia finalizaron en 100.39% y 98.87% para *B. breve* encapsulado y libre respectivamente, que no fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p > 0.05$).

Por otro lado, hablando en términos de viabilidad neta, se observa en la Figura 8 que cuando se agregó la bifidobacteria en forma libre hubo una ligera disminución no significativa ($p > 0.05$) de la viabilidad (0.08 log UFC/g) al término del almacenamiento, en cambio, cuando se agregó la bifidobacteria en forma encapsulada se observó un ligero incremento de la viabilidad (0.03 log UFC/g) a las 3 semanas, mismo que no fue significativo ($p > 0.05$), este incremento puede deberse a la protección que le confiere la cápsula a las bacterias probióticas de los factores adversos que las rodean (Chen et al., 2006).

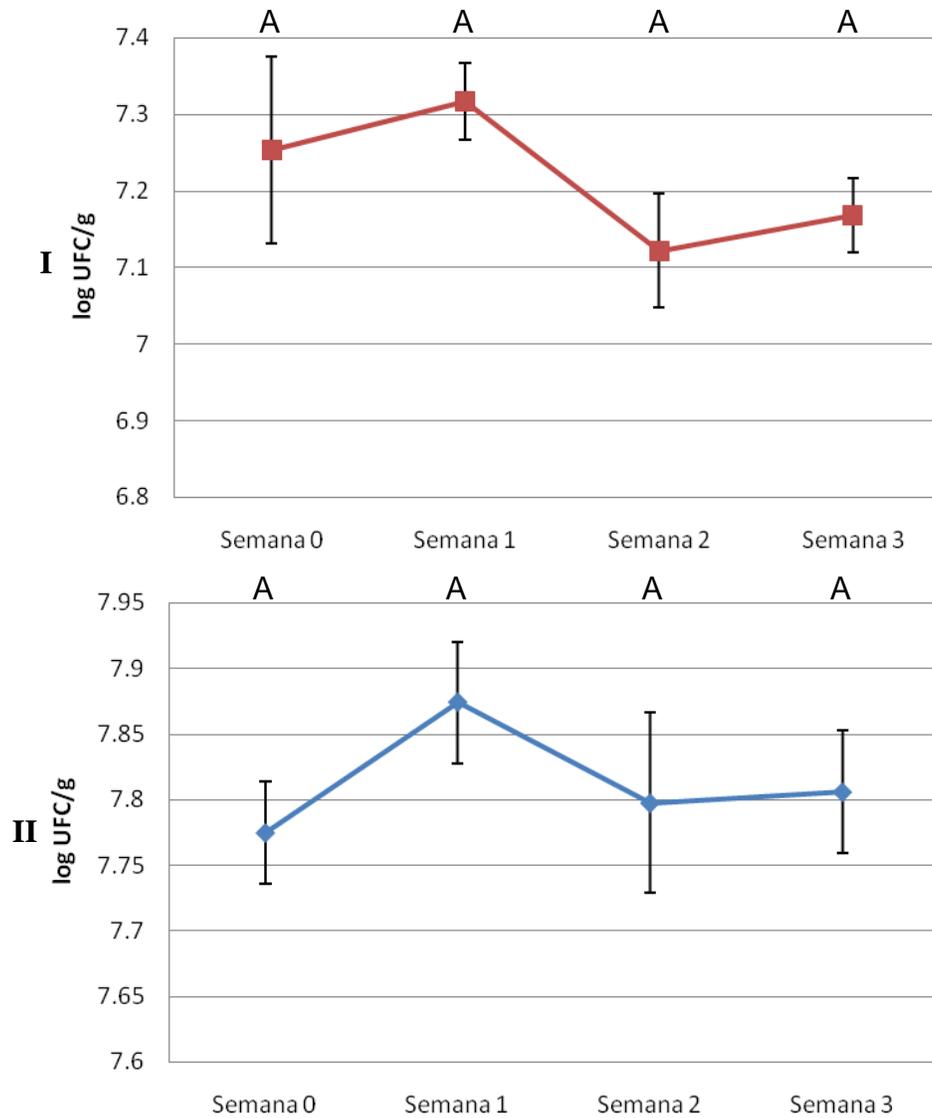


Figura 8. Sobrevivencia de *B. breve* incorporado en forma libre (I) y encapsulado (II) en queso tipo Manchego durante su almacenamiento.

Letras superiores iguales equivale a no diferencia estadística significativa con un valor de significancia de 0.05.

Cuadro 9. Supervivencia de *B. breve* incorporado en forma libre y encapsulado en queso tipo Manchego.

Tiempo (Días)	LIBRE		ENCAPSULADO	
	log UFC/g	EE	log UFC/g	EE
0	7.2530 ^A	0.1215	7.7748 ^B	0.0387
7	7.3163 ^A	0.0498	7.8739 ^B	0.0464
14	7.1216 ^A	0.0743	7.7972 ^B	0.0686
21	7.1680 ^A	0.0479	7.8056 ^B	0.0468

Conteos semanales conectados con la misma letra (^A y ^B) indica no diferencia estadística significativa con un valor de significancia de 0.05. EE= error estándar.

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Gardiner et al., (2002) quienes adicionaron una cepa de *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, resistente a rifampicina, en forma microencapsulada en queso tipo Cheddar, utilizando leche descremada como acarreador y observaron un ligero crecimiento a los 30 días de almacenamiento casi de 1 log UFC/g.

Por otro lado Kasimoglu et al., (2004) encontraron que adicionando en forma libre *Lactobacillus acidophilus* como bacteria probiótica en queso Turco blanco, madurado al vacío, la viabilidad se vio disminuida a partir de 15 días de maduración y durante los siguientes 90 días. Otro estudio realizado por Corbo et al., (2001), quienes adicionaron las bifidobacterias (*B. bifidum* y *B. longum*) en forma libre en queso Canestrato Pugliese, un queso duro italiano, encontraron que ambas especies de bifidobacterias exhibían viabilidad similar con conteos de 10^7 a través de 19 días de maduración, sin embargo a los 56 días de maduración, los conteos para *B. bifidum* cayeron hasta 10^6 , mientras que para *B. longum* de 10^5 , lo que nos demuestra que entre especies del género *Bifidobacterium* también hay diferencias en cuanto a su estabilidad en alimentos.

Según Van den Tempel et al., (2002) los quesos tienen marcadamente un pH mayor que las leches fermentadas y otros productos lácteos; el metabolismo de las bacterias en el interior de este vehículo es casi anaeróbico a las pocas

semanas de maduración, favoreciendo la sobrevivencia de las bifidobacterias. Para apreciar los efectos terapéuticos, de acuerdo con Ishibashi y Shimamura (1993), los microorganismos probióticos deben estar a concentraciones de mínimo 7 log UFC/g de producto. Todos los quesos tipo Manchego desarrollados en este trabajo cumplieron con el criterio de ser un alimento probiótico.

Existe evidencia de que *B. breve* puede utilizar almidón resistente como prebiótico y éste podría ser otro factor que ayudó a sostener una mejor sobrevivencia del probiótico durante el almacenamiento e incorporado en el queso Manchego en comparación con su incorporación en forma libre. En un trabajo previo, realizado por Escobar (2008), se evaluó la capacidad de 20 cepas de *Lactobacillus spp.* y 8 de *Bifidobacterium spp.* de utilizar almidón de haba como fuente de carbono, el cual tiene un porcentaje de almidón resistente de 2.90 y 5.84 cuando esta crudo y pasteurizado respectivamente y encontró que entre las bifidobacterias únicamente *B. breve* fue capaz de hidrolizarlo.

En otros trabajos se ha demostrado también que algunas cepas del género *Bifidobacterium* (*B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. pseudolongum* y *B. breve*) son capaces de utilizar almidón de maíz alto en amilosa como fuente de carbono (Wang et al., 1999b). En el estudio de Wang et al., (1999b), las cepas antes mencionadas y algunas otras pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, se examinaron en base a su capacidad de hidrolizar distintos tipos de almidón por el método de placa con agar (halos de inhibición) y se encontró que sólo las cepas del género *Bifidobacterium* estudiadas hidrolizaron el almidón de maíz alto en amilosa (AMAA), de entre ellas *B. breve* hidrolizó AMAA a un nivel intermedio en comparación con las otras cepas del género.

Brown et al., (1998) también reportaron que dos cepas del género *Bifidobacterium* (*bifidum* y *pseudolongum* fueron capaces de hidrolizar un almidón comercial alto

en amilosa (Culture-Pro™). Por otro lado, se ha demostrado en otros trabajos que cepas de *Bifidobacterium* fueron capaces de hidrolizar AMAA modificado químicamente. Brown et al. (1998) reportaron la capacidad de una cepa de *Bifidobacteriepum* a la que denominaron X13 de utilizar tanto AMAA sin modificar como diferentes almidones modificados (AMAA hidroxipropilado, AMAA acetilado y AMAA octenil succinatado) en medios preparados al 1% (w/v) como fuente de carbono.

7.4 Supervivencia de *Bifidobacterium breve* en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Para ejercer un efecto terapéutico las bifidobacterias, incorporadas en el alimento vehículo, deben sobrevivir a través del tracto gastrointestinal y posteriormente colonizar (Gilliland, 1989). Una vez que se cumplió el periodo de maduración los quesos conteniendo *B. breve* en forma libre y encapsulada, se sometieron a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. En la Figura 9 se observa la tendencia de la viabilidad a través de todo el ensayo, y se observó que esta fue mayor en el queso adicionado con *B. breve* en forma encapsulada.

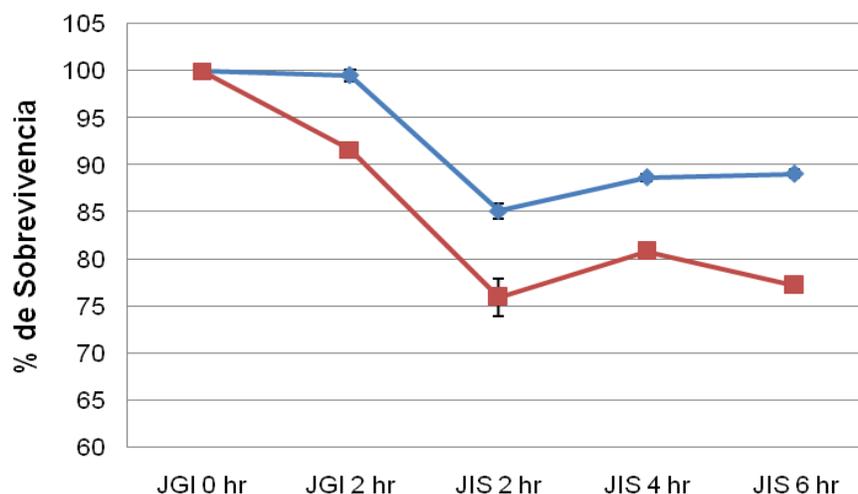


Figura 9. Comportamiento de la supervivencia de *B. breve* incorporado en forma libre (rojo) y encapsulada (azul) en queso tipo Manchego durante el ensayo de TGI.

Nuevamente se consideró un 100% de sobrevivencia al inóculo inicial en cada tipo de queso. A las dos primeras horas del ensayo, en el JGI, la reducción de la sobrevivencia no fue significativa cuando *B. breve* se encontraba en forma encapsulada en el queso, mientras que para *B. breve* en forma libre y adicionado en el queso, la reducción sí fue significativa. Durante el cambio de condiciones gástricas a intestinales la reducción de la sobrevivencia fue significativa en ambos casos, sin embargo, menor hablando en términos de la condición encapsulada y se mantuvo este comportamiento hasta el final del ensayo terminando en un porcentaje de sobrevivencia de 89.08% y 77.23% para la forma encapsulada y libre respectivamente.

Ahora, hablando en términos de viabilidad neta, el comportamiento de *B. breve* en forma libre y encapsulada incorporada en queso tipo Manchego y exhibió una mayor sobrevivencia de la bifidobacteria en forma encapsulada al término del ensayo. En este ensayo se simularon las condiciones gastrointestinales naturales; como primer paso, el alimento se puso en contacto con saliva artificial y jugo gástrico por dos horas (pH = 2), tal como sucede en el organismo humano y posteriormente se puso en contacto con jugo intestinal (pH = 8) durante 4 horas.

Durante la etapa de exposición a condiciones gástricas simuladas (de 0 a 2 hr) no hubo disminución de la población que fuera significativa en ambas muestras. Cuando las bacterias contenidas en el queso tipo Manchego se sometieron a condiciones intestinales simuladas se observó una reducción significativa de la población en ambas muestras, de 1.64 log UFC/g y 1.11 log UFC/g de células libres y células encapsuladas respectivamente (Cuadro 10). Los conteos de células viables se redujeron drásticamente con el cambio de pH del JGS al JIS; una vez en JIS la población de ambas muestras durante las 4 horas de este ensayo se mantuvo estable e incluso se registraron ligeros incrementos en ambas muestras, que fueron significativos únicamente en la población de bacterias encapsuladas ($p > 0.05$).

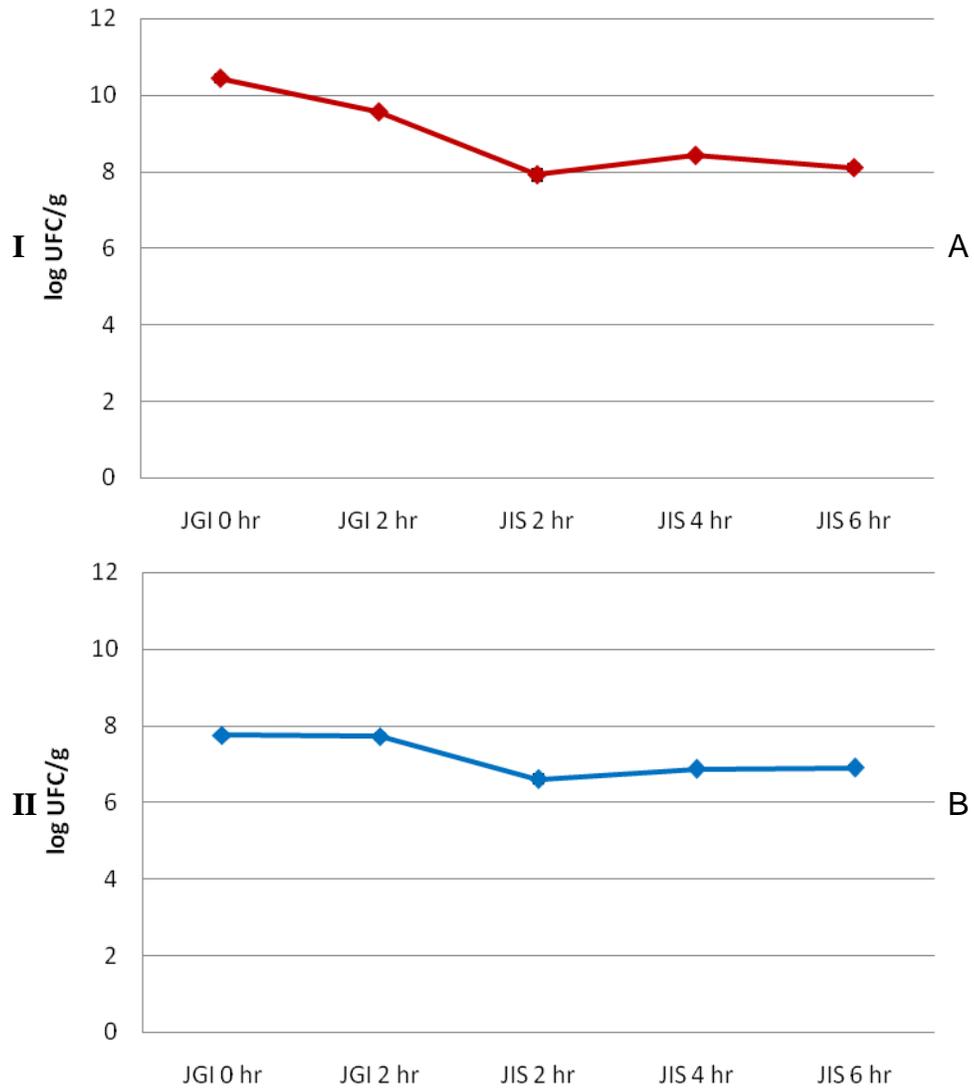


Figura 10. Sobrevivencia de *B. breve* incorporado en forma libre (I) y encapsulada (II) en queso tipo Manchego durante el ensayo de TGI.

Muestras conectadas con letra diferente equivale a diferencia estadística significativa con un valor de significancia de 0.05.

Cuadro 10. Supervivencia de *B. breve* incorporado en forma libre y encapsulado en queso tipo Manchego durante el ensayo de TGI.

	Tiempo (hr)	LIBRE		ENCAPSULADO	
		log UFC/g	EE	log UFC/g	EE
JGI	0	10.4401 ^A	0.0784	7.7532 ^A	0.0068
	2	9.5617 ^B	0.008	7.7199 ^A	0.0441
	2	7.9201 ^D	0.0873	6.6026 ^C	0.0673
JIS	4	8.4254 ^C	0.0145	6.8753 ^B	0.027
	6	8.1041 ^D	0.0485	6.9068 ^B	0.0268

Conteos conectados con diferente letra (^A, ^B, ^C y ^D) indica diferencia estadística significativa con un valor de significancia de 0.05. EE= error estándar.

Analizando las tasas de muerte de la bifidobacteria, durante todo el ensayo, se encontró que fue mayor la muerte en el queso tipo Manchego conteniendo a *B. breve* en forma libre (2.37 log UFC/g \pm 0.03) y estadísticamente menor ($p < 0.05$) cuando la bifidobacteria se encontraba en forma encapsulada (0.86 log UFC/g \pm 0.01). Una vez más en base a estos resultados podemos decir que la microencapsulación le confirió protección a *B. breve* durante su paso por los jugos gástrico e intestinal respectivamente.

Las tasas de muerte encontradas son menores a las que reportó Castro (2010) que utilizando yogurt como vehículo y adicionando *B. breve* en forma encapsulada en la misma matriz (90ACPS), lo que nos permite decir que el queso es un mejor vehículo para la incorporación de este probiótico. Por otro lado Abadía (2009) incorporó las cepas probióticas *Lactobacillus casei* y *rhamnosus* GG en queso tipo Cottage y encontró reducciones en la población de 4.2 y 4.3 log UFC/g respectivamente; estos valores son altos con respecto a los obtenidos en este trabajo, lo que pudo deberse a diferentes características de los quesos como pH y contenido de humedad y a características intrínsecas de los probióticos utilizados.

En un experimento muy similar y con la misma finalidad, Charteris et al. (1998) reportaron que las poblaciones de *B. bifidum* 1453, *B. infantis* 25926, *B. breve*

15698 y *B. adolescentis* 15703T se redujeron 3.0 log CFU/mL después de 3 h de exposición a jugo gástrico simulado (pH 2.0) utilizando solamente microcápsulas de las bacterias estudiadas (sin alimento vehículo).

Ahora bien, según Stanton et al. (1998), así como Playne (2002), han mencionado que un queso madurado como el Cheddar por tener un pH relativamente más alto (5.5), mayor capacidad búffer y mayor contenido de grasa (Vinderola et al., 2002) confieren mayor protección a las bacterias que la matriz líquida del yogurt, el cual exhibe un pH más ácido; en especial el mayor contenido de grasa protege las células de la degradación enzimática. El queso Cheddar y el queso tipo Manchego comparten ciertas características estructurales y bioquímicas como el pH. La mayor resistencia de las bacterias que se encuentran microencapsuladas ya ha sido estudiada también por Lian et al. (2003) quienes encapsularon mediante secado por aspersión células de *Bifidobacterium longum* B6 y *B. infantis* CCRC 14633 utilizando diferentes acarreadores y las expusieron en forma libre y encapsulada en jugo gástrico simulado (pH 2 y 3) y a soluciones de sales biliares, encontrando que las bacterias encapsuladas, independientemente del material acarreador, mostraban una menor reducción de su población después de la exposición a las condiciones antes mencionadas.

Nuevamente podemos decir, en base a la literatura, que otro aspecto que favoreció una menor tasa de muerte de *B. breve* encapsulado sobre su forma no encapsulada fue la capacidad de la bifidobacteria de hidrolizar almidón alto en amilosa fosfatado y utilizarlo como fuente de carbono y energía. Wang et al. (1999a) aislaron a partir de un individuo sano las cepas *Bifidobacterium* Lafti™8B y Lafti™13B, las cuales fueron inoculadas en un medio basal conteniendo 1% (w/v) de glucosa o AMAA iniciando con una población de 2 log UFC/mL y después de 48 h de incubación anaeróbica las bacterias alcanzaron conteos >8 log CFU/mL en ambos medios lo que demostró que ambas cepas fueron capaces de utilizar el AMAA como fuente de carbono y energía. También demostraron que la adición de gránulos de AMAA tiene un efecto positivo en la sobrevivencia cuando

las bacterias fueron expuestas a pH=3.5; el crecimiento en presencia de gránulos de AMAA mantuvo altos conteos a pH=3.5 sin embargo, disminuyó la viabilidad 2.5 log después de 6 h de incubación para ambas cepas en comparación con las células en glucosa, las cuales no pudieron ser contadas después de 6 h de incubación. El mismo efecto fue observado cuando se analizaron en base a su tolerancia a ácidos biliares.

7.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (Urea-PAGE).

La proteólisis primaria puede ser estudiada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Urea-PAGE) o electroforesis capilar de la fracción insoluble de los quesos (pH 4.6) por otro lado, el perfil de péptidos de la fracción soluble (pH 4.6) debe ser determinada HPLC de fase reversa (Sousa et al., 2001). De acuerdo con Kim y Jimenez (1993) las caseínas se definen mejor en urea contenida en geles de poliacrilamida (Urea-PAGE).

En la Figura 9 se muestran los patrones de proteólisis de la fracción insoluble (pH 4.6) de los quesos manufacturados con *B. breve* y un queso comercial, utilizando como estándar leche descremada. Se observan diferencias en los patrones de proteólisis entre las muestras al momento de la manufactura y al final del tiempo de maduración. El queso control (sin adición de probióticos) (QCtrl) y los que fueron adicionados con *B. breve* en forma libre (QLib) y encapsulada (QCap) se compararon con un queso tipo Manchego comercial (QCom) en el cual se encontró una menor degradación de proteínas.

Existe evidencia de que en queso Cheddar la β -caseína es más resistente a la hidrólisis que la α -caseína, ya que solo cerca del 50% es hidrolizada principalmente por la plasmina produciendo fragmentos presentes en la fracción insoluble de queso Cheddar (McSweeney et al., 1994). En el estudio de Kim y Jimenez (1993) se separaron las proteínas de la leche descremada por isoelectroenfoque y encontraron que a un pH de 8.9 (pH utilizado en nuestro trabajo) se apreciaron 3 bandas de mayor intensidad correspondientes a la α , β y

α -lactoalbúmina, de entre las cuales la que tuvo mayor movilidad electroforética fue la α -lactoalbúmina, seguida de la α -caseína y con menor movilidad la β -caseína, lo que ha sido encontrado también por otros autores (Hayaloglu et al., 2004; O'Malley et al., 2000). Es por este hallazgo que utilizamos leche descremada y comparamos los patrones de proteólisis del queso tipo Manchego al inicio y final del periodo de maduración en base a la hidrólisis.

Al final del periodo de maduración, se observó una intensificación de bandas con alta movilidad electroforética debido a la proteólisis de la α -caseína. El perfil electroforético reveló que en todos los quesos manufacturados la β -caseína no fue sometida a proteólisis tanto como la α -caseína, lo cual está ya reportado por Park (2001) y Pavia et al., (2000). En nuestro estudio la α -lactoalbúmina no apareció en los geles debido probablemente a diferencias en las condiciones de electroforesis o incluso a que esa proteína estaba a muy baja concentración en la leche descremada tomada como referencia; la cantidad de α -lactoalbúmina en leche descremada es de 0.6-1.7 g/L, mientras que para las caseínas es de 12-15 g/L, 3-4 g/L, 9.11 g/L, para la α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína y β -caseína respectivamente (Farrell et al., 2004).

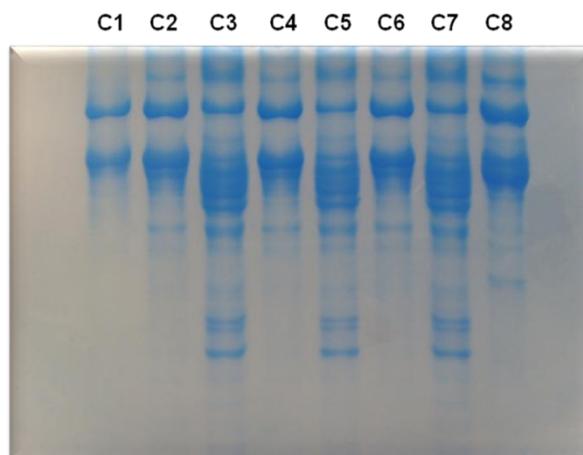


Figura 11. Urea-PAGE de los quesos tipo Manchego.

C1: leche descremada; C2: QCtrl a tiempo inicial; C3: QCtrl después de maduración; C4: QLib a tiempo inicial; C5: QLib después de maduración; C6: QCap a tiempo inicial; C7: QCap después de maduración; C8: QCom.

La similitud entre los patrones de proteólisis al final del periodo de maduración de los quesos manufacturados está en concordancia con lo reportado por O’Keeffe et al., (1976) quienes reportaron que al nivel de maduración estudiado la proteólisis es debida a la acción de la plasmina y cuajo y que no está influenciada por la actividad de la flora del queso.

7.6 Análisis Sensorial

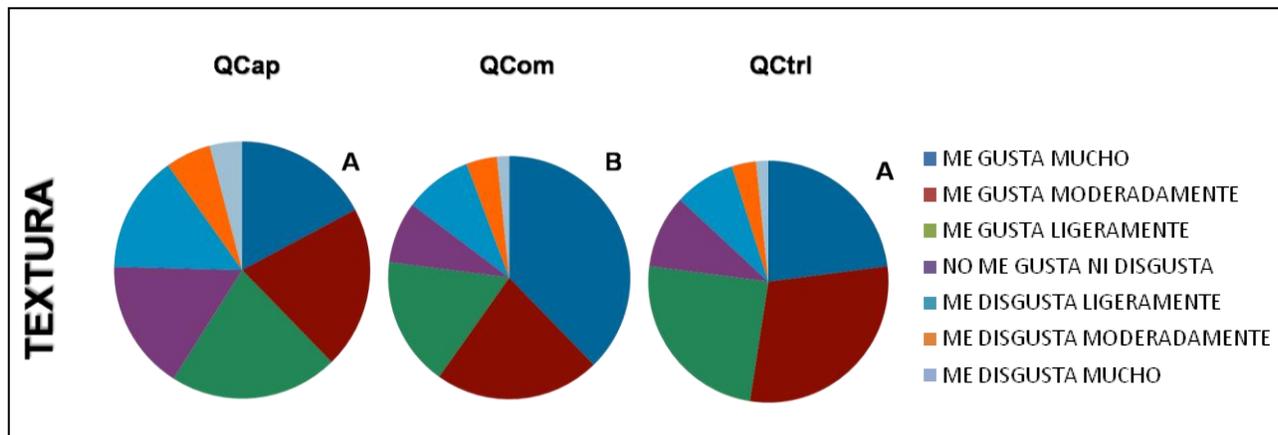
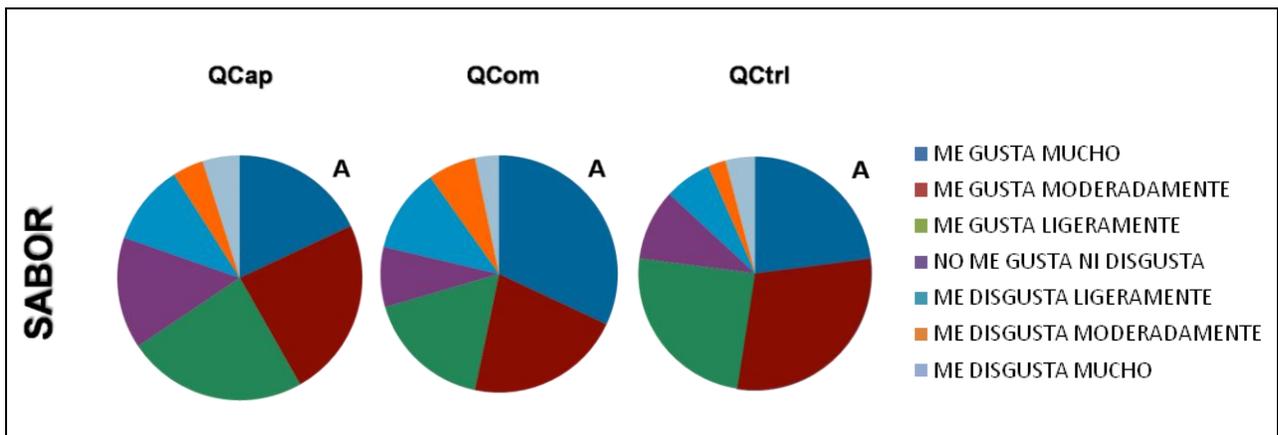
Se llevó a cabo una evaluación sensorial mediante una prueba de preferencia con un panel no entrenado de 120 personas, para ello las muestras fueron codificadas y aleatorizadas. Se utilizó una escala hedónica de siete puntos con la que se evaluaron los descriptores de sabor, textura, apariencia, color y de tres puntos para el resabio.

El análisis de contingencia reveló que para los descriptores SABOR, COLOR y RESABIO no hubo diferencia estadística significativa entre las tres muestras, mientras que para TEXTURA y APARIENCIA QCom fue diferente de los quesos manufacturados (QCtrl y QCap) (Figura 10). El motivo por el cual QCom fue mejor calificado en cuanto a la textura y apariencia puede ser debido a que por ser un queso comercial, la adición de aditivos y un proceso de elaboración estandarizado hace que en particular algunas de sus características organolépticas sean mejores que los quesos fabricados artesanalmente.

De acuerdo con diversos autores (Gobbetti et al., 1998; Ross et al., 2000; Godward y Kailasapathy, 2003; Ozer et al., 2009) la adición de bacterias probióticas no debe tener un efecto adverso en el sabor y aroma de un queso probiótico; este fenómeno fue el que se observó para las muestras manufacturadas (QCtrl y QCap) donde no hubo diferencia para ningún descriptor evaluado, lo que nos permite decir que la adición de probióticos encapsulados no tuvo efecto sobre algunas características sensoriales y bioquímicas (proteólisis).

De igual forma en un trabajo preliminar desarrollado por Liu (2012), un panel no semi-entrenado de 26 personas no encontraron diferencias significativas en los descriptores: salado, amargués, acidez, sabor y textura entre un queso Gouda (queso madurado) con probióticos encapsulados (*L. helveticus* y *B. longum*), un queso Gouda con probióticos en forma libre y un control (sin probióticos).

Algunos de los panelistas hicieron comentarios positivos con respecto al sabor de los quesos manufacturados (QCtrl y QCap), lo que indicó que los panelistas podrían considerar comprar alguno de los quesos si se encontraran disponibles en el mercado.



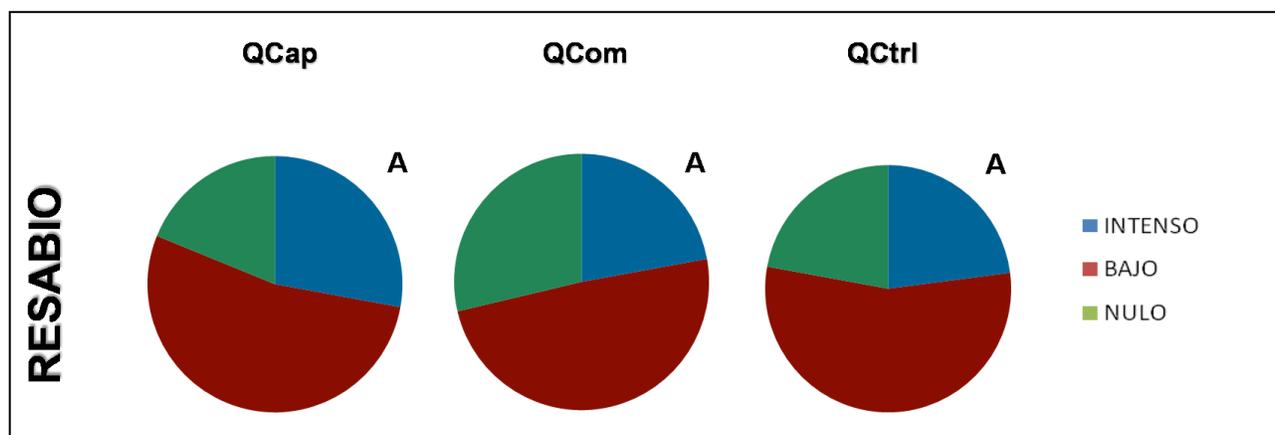
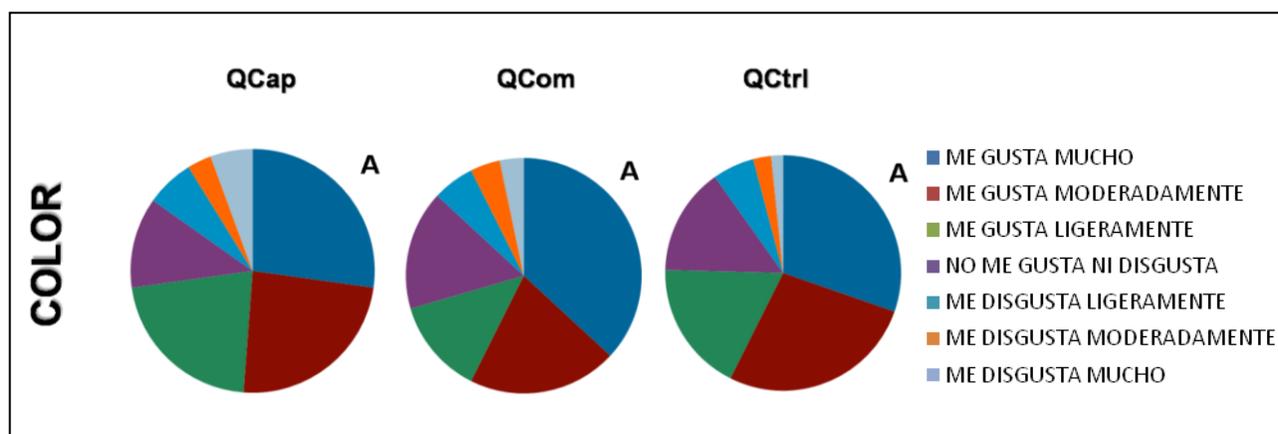
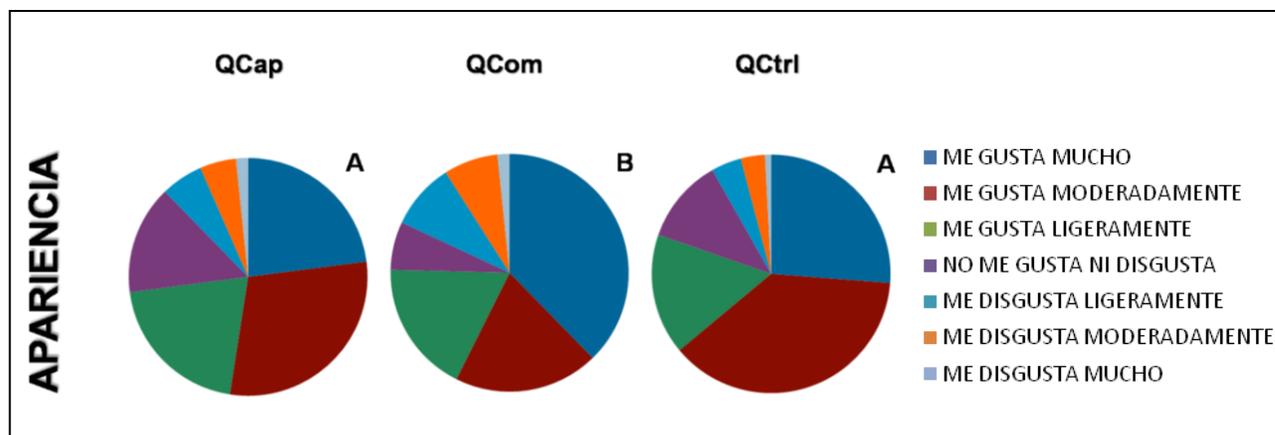


Figura 12. Diagramas de pastel de los diferentes descriptores analizados.
 Muestras conectadas con letra diferente equivale a diferencia estadística significativa con un valor de significancia de 0.05

8. CONCLUSIONES

Se caracterizó un almidón alto en amilosa fosfatado obteniéndose valores de fósforo y grado de sustitución aptos para su consumo humano.

El secado por aspersion no disminuyó significativamente la viabilidad de *Bifidobacterium breve*, siendo un proceso con el cual se obtuvieron polvos con elevadas cantidades de células viables ($>10^8$ UFC/g).

La población de *B. breve* adicionada al queso tipo Manchego en forma libre, disminuyó ligeramente al final del periodo de maduración, mientras que la bifidobacteria en forma encapsulada mostró un ligero incremento en su número; de esta manera el queso tipo Manchego desarrollado cumplió con las especificaciones de ser un alimento probiótico conteniendo arriba de 10^7 UFC/g.

Cuando las bacterias probióticas (libres y encapsuladas) contenidas en el queso tipo Manchego se expusieron a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, la reducción de la población fue significativamente menor cuando *B. breve* se encontraba en forma encapsulada, es decir, la encapsulación le confirió protección a la bifidobacteria cuando se sometió al ensayo. La sobrevivencia de *B. breve* en queso tipo Manchego fue mayor que en yogurt, por lo que concluimos que el vehículo utilizado en este trabajo favorece la sobrevivencia del probiótico.

La adición de probióticos encapsulados en queso tipo Manchego, no tuvo efecto sobre la proteólisis en los quesos, en los que fue similar al final del tiempo de maduración. Los quesos manufacturados tuvieron mayor proteólisis que un queso comercial, que se interpreta como una mayor funcionalidad.

Sólo hubo diferencia significativa en los descriptores de apariencia y textura del queso comercial con respecto a los preparados (QCtrl y QCap), por otro lado no hubo efecto de la adición de probióticos encapsulados en el queso tipo Manchego, ya que en ninguno de los descriptores estudiados fueron diferentes estadísticamente.

9. LITERATURA CITADA

- Abadía, G. L. 2009. Efecto de la adición de una cepa probiótica sobre la proliferación de *Listeria monocytogenes* y la producción de péptidos con propiedades antioxidantes en queso Cottage. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química.
- Abe, F., H. Miyauchi, A. Uchijima, K. Yaeshima y K. Iwatsuki. 2009a. Effect of storage temperature and water activity on survival of bifidobacteria in powder form. *Int. J. Dairy. Tech.* 62: 234-239.
- Abe, F., H. Miyauchi, A. Uchijima, K. Yaeshima y K. Iwatsuki. 2009b. Stability of bifidobacteria in powdered formula. *Int. J. Food. Sci. Tech.* 44: 718-724.
- Akin, M. B., M. S. Akin y Z. Kirmaci. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yoghurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chem.* 104: 93-99.
- Anal, A. K., D. Bhopatkar, S. Tokura, H. Tamura y W.F. Stevens. 2003. Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. *Drug Develop. and Ind. Pharm.* 29: 713-724.
- Anal, A. K., y W. F. Stevens. 2005. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *Int. J. of Pharmaceutics.* 290: 45-54.
- Ann, E. Y., Y. Kim, S. Oh, J. Y. Imm, D. J. Park, K. S. Han y S. H. Kim. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridization system. *Int. J. of Food Sci. & Tech.* 42: 411-19.
- Anuradha, S. y K. Rajeshwari. 2005. Probiotics in health and disease. *J. Indian Acad. Clin. Med.* 6: 67-72.
- Amores, R., A. Calvo, J. Maestre y D. Martínez. 2004. Probióticos. *Rev. Esp. de Quimioterapia.* 17 (2): 131-9.
- AOAC (2000). Official methods of analysis. 14th ed. Association of official analytical chemistry. EUA.
- Appelqvist, I. A. M., M. Golding, R. Vreeker y N. J. Zuidam. 2007. Emulsions as delivery systems in foods. En: Lakkis, J. M. (Eds.). *Encapsulation and controlled release technologies in food systems.* Blackwell Publishing, Ames.
- Araya, M., L. Morelli, G. Reid, M. E. Sanders, C. Stanton y M. Pineiro. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, ON, Canada.
- Arvanitoyannis, I. S. y M. V. Houwelingen. 2005. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Rev. in Food Sci. and Nutrition.* 45: 385-404.
- Bernet, M. F., D. Brassat, J. R. Nesser y A. L. Servin. 1993. Adhesion of human Bifidobacterial strain to cultured human intestinal epithelial cell and inhibition of Enteropatogen - cell interactions. *Appl. Env. Microbiol.* 9 (12): 4121-4128.
- Blanchette, L., D. Roy, G. Bélanger y S. F. Gauthier. 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 79: 8-15.
- Boylston, T. D., C. G. Vinderola, H. B. Ghoddusi y J. A. Reinheimer. 2004. Incorporation of

- bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.* 14 (5): 375-87.
- Boza, E., I. Morales y M. Henderson. 2010. Desarrollo de un queso maduro con adición del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC-01. *Rev. Chil. Nutr.* 37 (2): 215-223.
- Brown, I. L. 1996. Complex carbohydrates and resistant starch. *Nutr. Rev.* 54: 115-119.
- Brown, I. L., X. Wang, D. L. Topping, M. J. Playne y P. L. Conway. 1998. High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria. *Food Australia.* 50 (12): 603-610.
- Bruschi, M. L., M. L. C. Cardoso, M. B. Lucchesi y M. P. D. Gremiao. 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spraydrying technique: Preparation and characterization. *Int. J. of Pharmaceutics.* 264: 45-55.
- Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder y J. Scher. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* 104: 467-483.
- Cagigas, A. y J. Blanco. 2002. Prebióticos y simbióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment. Nutr.* 16 (1): 63-8.
- Capela, P., T. K. C. Hay y N. P. Shah. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res. Int.* 39: 203-211.
- Capela, P., T. K. C. Hay y N. P. Shah. 2007. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Res. Int.* 40 (10): 1261-1269.
- Carmona, R., M. Sanchez, G. Mendez, B. Garza y L. Bello. 2009. Effect of the cross-linked reagent type on some morphological, physicochemical and functional characteristics of banana starch (*Musa paradisiaca*). *Carbohydrate Polymers.* 76: 117-122.
- Castro, A. L. 2010. Efecto de la microencapsulación de *Bifidobacterium breve* en matrices de almidón fosfatado y proteína de suero mediante secado por aspersión, sobre su viabilidad en yogurt y en condiciones gastrointestinales simuladas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química.
- Chang, Y. O. y C. Y. Lii. 1992. Preparation of starch phosphates by extrusion. *J. of Food Sci.* 57 (1): 203-205.
- Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli y J. K. Collins. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 84: 759-768.
- Chen, L., G. E. Remondetto y M. Subirade. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Sci. & Tech.* 17 (5): 272-283.
- Code of Federal Regulations. 1991. Food starch-modified in: Food additives permitted in food for human consumption. 21CFR172.892, U.S. Govt. Printing Office, Washington, DC.
- Conrad, P. B., D. P. Miller, P. R. Cielenski y J. J de Pablo. 2000. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology.* 41: 17-24.
- Corbo, M. R., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A., Gobbetti, M. 2001. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 84: 551-561.

- Crittenden, R., A. Laitila, P. Forssell, J. Mättö, M. Saarela, T. Mattila y P. Myllärinen. 2001. Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Appl. And Environ. Microbiol.* 67 (8): 3469-3475.
- Crittenden, R. y M. Playne. 2009. Prebiotics. En: Lee, K. y Salminen (Eds.). *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. U.S.A.
- De Vos, P., M. M Faas, M. Spasojevic y J. Sikkema. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* 20: 292-302.
- Desmond, C., R. P. Ross, E. O'Callaghan, G. Fitzgerald y C. Stanton. 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J. App. Microbiol.* 93 (6): 1003-1011.
- Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids.* 17: 25-39.
- Dimantov, A, E. Kesselman y E. Shamanic. 2004. Surface characterization and dissolution properties of high amylase core starchpectin coatings. *Food Hydrocol.* 18: 29-37.
- Dimantov, A. M. Greenberg, E. Kesselman y Shamoni. 2003. Study of high amylose corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model systems. *Innov. Food Sci. Eng. Technol.* 5: 93-100.
- Dinakar, P. y V. Mistry. 1994. Growth of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 77: 2854-64.
- Ding, W. K. y N. P. Shah. 2009. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J. of Food Sci.* 74 (2): M100-M107.
- Drusch, S. 2006. Sugar beet pectin: a novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray drying. *Food Hydrocolloids.* 21 (7): 1223-1228.
- Escobar, M. C. 2008. Efecto de la incorporación de un microorganismo probiótico y de almidón de haba en la calidad de un queso fresco tipo panela. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química.
- Federación Internacional de Lácteos. 2005. The world market for cheese 1995-2004. *Boletín IDF,* 402, 5-18.
- Farrell, H. M., R. Jimenez, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Buttler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. F. Ng-Kwai-Hang y H. E. Swaisgood. 2004. Nomenclature of the proteins of cow's milk-sixth revision. *J. of Dairy Sci.* 87 (6): 1641-1674.
- Ferrer, B. y J. Dalmau. 2001. Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediatr. Esp.* 59: 150-155.
- Fritzen-Freire, C. B., C. M. O. Muller, J. B. Laurindo y E. S. Prudencio. 2010. The influence of *Bifidobacterium Bb-12* and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. *J. Food Eng.* 96: 621-627.
- Fuchs, M., C. Turchiuli, M. Bohin, M. E. Cuvelier, C. Ordonnaud, M. N. Peyrat-Maillard y E. Dumoulin. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *J. Food Eng.* 75: 27-35.

Furuta, T., A. Soottitantawat, T. L. Neoh y H. Yoshii. 2010. Effect of microencapsulation on food flavors and their releases. En: Devahastin, S. (Ed.) Physicochemical Aspects of Food Engineering and Processing. CRC Press.

García, B. 2006. Caracterización fisicoquímica de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo-Hgo, con el fin de proponer normas de calidad. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias.

Gardiner, G., Bouchier P., O' Sullivan E., Kelly J., Collins J. K., Fitzgerald G., Ross R. P. y C. Stanton. 2002. A spray dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. Int. Dairy J. 12: 749-756.

Gardiner, G., C. Stanton, P. B. Lynch, J. K. Collins, G. Fitzgerald y R. P. Ross. 1999a. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. J. Dairy Sci. (82): 1379-1387.

Gardiner, G., E. O' Sullivan, J. Kelly, M. A. E. Auty, G. Fitzgerald, J. K. Collins, R. Ross y C. Stanton. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Appl. Env. Microbiol. 66 (6): 2605-2612.

Gardiner, G., R. Ross, J. K. Collins, G. Fitzgerald y C. Stanton. 1999b. Development of a Probiotic Cheddar Cheese Containing Human-Derived *Lactobacillus paracasei* Strains. Appl. Env. Microbiol. 64 (6): 2192-2199.

Gharsallaoui, A., G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley y R. Saurel. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. Food Res. Int. 40: 1107-1121.

Gibson, G. R. 2007. Functional foods: probiotics and prebiotics. Culture. 28 (2): 1-7.

Gilliland, S. E. 1989. Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumers. J. Dairy Sci. 72: 2483-2494.

Gobbetti, M., A. Corsetti, E. Smacchi, A. Zocchetti y M. De Angelis. 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. J. of Dairy Sci. 81: 37-47.

Godward, G. y K. Kailasapathy. 2003. Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in Cheddar cheese. Milchwissenschaft-Milk Sci. Int. 58: 624-627.

Gomes, A. X. Malcata y F. Klaver. 1998. Growth Enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by Milk Hydrolyzates. J. Dairy Sci. 81: 2817-2825.

Gouin, S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in Food & Tech. 15: 330-47.

Guevara, N. A. 2008. ¿Qué son los alimentos funcionales y cuál es el papel de los probióticos en éstos alimentos? Temas selectos de ingeniería de alimentos. 8-15.

Hansen, L. T., P. M. Ian-Wojtas, Y. L. Jin y A. T. Paulson. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiol. 19 (1): 35-45.

Harper, J. 1992. Extrusion processing of starch. En: Alexander, R. J., Zobel, H. F. (Eds.). Developments in Carbohydrate Chemistry. A.A.C.C., USA.

- Hayaloglu, A. A., M. Guven, P. F. Fox, J. A. Hannon y P. L. H. McSweeney. 2004. Proteolysis in Turkish White-brined cheese made with defined strains of *Lactococcus*. *Int. Dairy J.* 14 (7): 599-610.
- Heidebach, E., E. Leeb, P. Först y U. Kulozik. 2010. Microencapsulation of probiotic cells. En: Fanun, M. (Ed.) *Colloids in Biotechnology*. CRC Press, Florida.
- Heidebach, E., P. Först y U. Kulozik. 2012. Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Revs. in Food Sci. & Nutrition*. 52 (4): 291-311.
- Hou, R. C. W., M. Y. Lin, M. M. C. Wang y J. T. C. Tzen. 2003. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. *J. Dairy Sci.* 86: 424-428.
- Hughes, D. B. y D. G. Hoover. 1995. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *J. Dairy Sci.* 78: 268-276.
- Ishibashi, N., S. Shimamura. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technol.* 46: 126-135.
- Jaramillo, M. E., M. Flores y H. Hernández. 2002. Survival of *Bifidobacterium bifidum* during the elaboration of a low-fat spreadable fresh cheese. IFT Annual Meeting Book of Abstracts. Anaheim, CA, USA.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiol.* 3 (2): 39-48.
- Kasimoglu, A., M. Göncüoglu y S. Akgün. 2004. Probiotic White cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *Int. Dairy J.* 14: 1067-1073.
- Keller, L. C. y A. B. Maxcy. 1984. Effect of physiological age on radiation resistance of some bacteria that are highly radiation resistant. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (5): 915-918.
- Kenyon, M. M. 1995. Modified starch, maltodextrin and corn syrup solids as wall materials for the food encapsulation. En: Risch, S. J. y G. A. Reineccius (Eds.). *Encapsulation and controlled release of food ingredients*
- Kim, H. Y. y R. Jimenez. 1993. Two-dimensional analysis of skim milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Food Biochem.* 16: 307-321.
- Knorr, D. 1998. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends Food Sci. Technol.* 9: 295-306.
- Kolter, R., D. A. Siegele y A. Tormo. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855-874.
- Krasaekoopt, W., B. Bhandari y H. Deeth. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probióticas for yoghurt. *Int. Dairy J.* 13: 3-13.
- Krishnan, S., A. Kshirsagar y R. Singhal. 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Pol.* 62: 309-315.
- Kuchroo, C. N. y P. F. Fox. 1982. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft.* 37: 331-335.

- Larrea, M. A., Y. K. Chang y B. F. Martínez. 2005. Some functional properties of extruded orange pulp and its effect on the quality of cookies. *LWT*. 38: 213-220.
- Lee, J. S., D. S. Cha y H. J. Park. 2004. Survival of freeze dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7300-7305.
- Leroux, J., V. Langendorff, G. Schick, V. Vaishnav y J. Mazoyer. 2003. Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*. 17: 455-462.
- Lian, W. C., H. C. Hsiao y C. C. Chou. 2002. Survival of bifidobacteria after spray drying. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 79-86.
- Lian, W. C., H. C. Hsiao y C. C. Chou. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *Int. J. Food Microbiol.* 86 (3): 293-301.
- Lim, S. y P. Seib. 1993. Preparation and pasting properties of wheat and corn starch phosphates. *Cereal Chem.* 70 (2): 137-44.
- Liu, Y.C. 2012. Effect of incorporating encapsulated and non-encapsulated probiotic cultures on culture survival and cheese quality of gouda cheese. Tesis de Maestría. Universidad de Manitoba. Department of Food Science.
- Liu, H., L. Ramsden y H. Corke. 1999. Physical properties and enzymatic digestibility of phosphorylated ae, wx, and normal maize starch prepared at different pH levels. *Cereal Chem.* 76 (6): 938-943.
- Lourens, A. y B. Viljoen. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy Sci.* 11: 1-17.
- Madene, A., M. Jacquot, J. Sher y S. Desobry. 2006. Flavour encapsulation and controlled release- a review. *Int. J. of Food Sci. & Tech.* 41: 1-21.
- Mack, D., S. Michail, S. Wei, L. McDougall y M. Hollingsworth. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by introducing intestinal mucin gene expression. *Gastroint. & Liver Physiol.* 276 (4): G941-G950.
- Martín, M. J. M. E. Morales, V. Gallardo y M. A. Ruiz. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharm.* 50 (1): 43-50.
- Masson, W. R. y R. C. Hosney. 1986. Factors affecting the viscosity of extrusion-cooked wheat starch. *Cereal Chem.* 63: 436-441.
- McSweeney, P. L. H., S. Pochet, P. F. Fox y A. Healy. 1994. Partial identification of peptides from the water-insoluble fraction of Cheddar cheese. *J. of Dairy Res.* 61: 587-590.
- Meng, X. C., C. Stanton, G. F. Fitzgerald, C. Daly y R. P. Ross. 2008. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.* 106 (4): 1406-1416.
- Mennickent, S. y K. Green. 2009. Los probióticos y su utilidad terapéutica. *Ciencia Ahora.* 24: 31-8.
- Michael, J. K. 1993. Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals. En: *Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica*. Marcel Dekker INC, NY, 14, 207-221.
- Mohammadi, R., A. M. Mortazavian, R. Khosrokhava y A. G. Cruz. 2011. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals Microbiol.* 61: 411-424.

Monsoor, M. A. 2005. Effect of drying methods on the functional properties of soy hull pectin. *Carbohydrate Polymers*. 61: 362-367.

Mortazavian, A., S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian J. Biotech*. 5 (1): 1-18.

Murúa, B., C. I. Beristain y F. Martínez. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J. Food Eng.* 91: 380-386.

Muthukumarasamy, P., P. Allan-Wojtas y R. Holley. 2006. Stability of *L. reuteri* in different types of microcapsules. *J. Food Sci.* 71 (1): 20-24.

Muthukumarasamy, P. y R. A. Holley. 2006. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *Int. J. Food Microbiol.* 111 (2): 164-169.

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

Oliveira, R. P. S., P. Perego, M. N. Oliveira y A. Converti. 2011. Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *J. Food Eng.* 107: 36-40.

Ong, L., A. Henriksson y N. P. Shah. 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J.* 16: 446-456.

O'Connor, C. B. 1993. Traditional cheesemaking manual. ILCA (International Livestock Centre for Africa), Addis Ababa, Ethiopia.

O'Keeffe, R. B., P. F. Fox y C. Daly. 1976. Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 43: 97-107.

O'Malley, A. M., D. Mulvihill y T. K. Singh. 2000. Proteolysis in rennet casein-based cheese analogues. *Int. Dairy J.* 10: 743-753.

O'Riordan, K., D. Andrews, K. Buckle y P. Conway. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *J. App. Microbiol.* 91 (6): 1059-1066.

Ozer, B., H. A. Kirmaci, E. Senel, M. Atamer y A. Hayaloglu. 2009. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *Int. Dairy J.* 19: 22-29.

Park, Y.W. 2001. Proteolysis and Lipolysis of goat milk cheese. *J. Dairy Sci.* 84 (E. Suppl.), E84-E92.

Patel, R. P., M. P. Patel y A. M. Suthar. 2009. Spray drying technology: an overview. *Indian J. of Sci. & Tech.* 2 (10): 44-47.

Pavia, M., A. J. Trujillo, B. Gusmis y V. Ferragut. 2000. Proteolysis in Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *J. Dairy Sci.* 83 (7): 1441-1447.

Picot, A. y C. Lacroix. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules

- and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *Int. Dairy J.* 14: 505-515.
- Písecký, I. J. Handbook of milk powder manufacture. Copenhagen, Dinamarca: Niro A/S. ISBN 87-986606-0-8.
- Playne. 2002. Researching, developing and commercialising probiotic cheese. *Australian Dairy Foods*. Feb. 28-30.
- Poch, M. y A. Bezkorovainy. 1988. Growth-enhancing supplements for various species of the genus *Bifidobacterium*. *J. Dairy Sci.* 71: 3214-3221.
- Poncelet, D., R. Lencki, C. Beaulieu, J. P. Halle, R. J. Neufeld y A. Fournier. 1992. Production of alginate beads by emulsification internal gelation. 1. Methodology. *App. Microbiol. & Biotech.* 38 (1): 39-45.
- Puupponen, R., A. M. Aura, K. M. Oksman, P. Millärinen, M. Saarela, T. Mattila y K. Poutanen. 2002. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Sci. & Tech.* 13: 3-11.
- Ramchandran, L. y N. P. Shah. 2010. Characterization of functional, biochemical and textural properties of symbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. *LWT - Food Sci. & Tech.* 43: 819-827.
- Richardson, P. H., Jeffcoat, R. y Shi, Y. C. 2000. High-Amylose Starches; From Biosynthesis to Their Use as Food Ingredients. *Materials Research Society Bulletin.* 25 (12): 20-24.
- Ross, R. P., C. Stanton, C. Hill, G. F. Fitzgerald y A. Coffey. 2000. Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Sci & Tech.* 11: 96-104.
- Salay, E. y C. Ciacco. 1990. Production and properties of starch phosphates produced by the extrusión process. *Starch/Stärke.* 42: 15-17.
- San Martin, E., M. A. Aguilar, T. Espinosa, R. C. Pless y Z. D. Quintana. 2004. Starch phosphate produced by extrusión: Physical properties and influence on yogurt stability. *Starch/Stärke.* 56: 199-207.
- Santivarangkna, C., B. Higl y P. Foerst. 2008. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiol.* 25 (3): 429-411.
- Sartor, R. B. 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology.* 126 (6): 1620-1633.
- Seker, M., y M. A. Hanna. 2006. Sodium hydroxide and trimetaphosphate levels affect properties of starch extrudates. *Ind. Crop. Prod.* 23 (3): 249-255.
- Selmer, E., T. Sorhaug, S. E. Birkeland y R. Pehrson. 1999. Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. *J. of Industrial Microbiol. & Biotech.* 23: 79-85.
- Sendra, E., P. Fayos, Y. Lario, J. Fernandez, E. Sayas y J. A. Perez. 2008. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiol.* 25: 13-21.
- Senok, A. C., A. Y. Ismaeel y G. A. Botta. 2005. Probiotics: facts and myths. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 958-966.
- SAGARPA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. Boletín de la leche.

- Shah, N. P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Tech.* 55 (11): 46-53.
- Shi, Y. C., T. Capitani, P. Trzasko y R. Jeffcoat. 1998. Molecular Structure of a Low-Amylopectin Starch and Other High-Amylose Maize Starches. *J. of Cereal Sci.* 27: 289-299.
- Shu B., W. Yu, Y. Zhao y X. Liu. 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J. Food Eng.* 76: 664-66.
- Simpson, P. J., C. Stanton, G. F. Fitzgerald y R. P. Ross. 2005. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J. of Appl. Microbiol.* 99: 493-501.
- Siró, I., E. Kápolna, B. Kápolna y A. Lugasi. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite.* 51: 456-467.
- Smith, R. y J. Caruso. 1964. Determination of phosphorous. En: Whistler, R. L. (Ed.). *Methods in carbohydrate chemistry.* Academic Press, New York.
- Sousa, M. J. Y. Ardö y P. L. H. McSweeney. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11: 327-345.
- Stanton, C., C. Desmond, M. Coakley, J. K. Collins, G. Fitzgerald y R. P. Ross. 2003. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. En: Farnworth, E. R. (Ed.). *Handbook of fermented functional foods.* CRC Press.
- Stanton, C., G. Gardiner, P. B. Lynch, J. K. Collins, G. Fitzgerald y R. P. Ross. 1998. Probiotic cheese. *Int. Dairy J.* 8: 491-496.
- Stanton, C., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald y D. Van Sinderen. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their iogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnol.* 16: 198-203.
- Su, L. C., C. W. Lin y M. J. Chen. 2007. Development of an oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. *Int. J. Dairy Tech.* 60 (1): 49-54.
- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peris y K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food. Microbiol.* 62: 47-55.
- Swartzburg, R. *Bifidobacterium breve*. Disponible: <http://www.probiotic.org/bifidobacterium-breve.htm>. Accesado Jul. 13, 2011.
- Szilagyi, A. 1999. Prebiotics or probiotics for lactose intolerance: a question of adaptation. *Am. J. Clin. Nut.* 70 (1): 105-106.
- Tabbers, M. M., I. Milliano, M. G. Roseboom y M. A. Benninga. 2011. Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. *Nutr. J.* 10: 1-5.
- Talwalkar, A. y K. Kailasapathy. 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian J. of Dairy Tech.* 58: 36-39.
- Talwalkar, A. y K. Kailasapathy, 2004. Comprehensive reviews. *Food Sci. & Food Safety.* 3: 117-124.

- Tamime, A. 2002. Microbiology of starter cultures. En: Robinson, R. (Ed.). Dairy Microbiology Handbook. 3a edición. New York: Wiley.
- Turgut, T. y S. Cakmakci. 2009. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. *Int. J. Dairy Tech.* 62: 444-451.
- Urbanska, A. M., J. Bhathena y S. Prakash. 2007. Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: Preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85: 884-893.
- Van den Tempel, T., J. K. Gunderse, M. S. Nielsen. 2002. The microdistribution of oxygen in Danablu cheese measured by a microsensor during ripening. *Int. J. of Food Microbiology.* 75: 157-161.
- Vinderola, C. G., P. Mocchiutti y J. A. Reinheimer. 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Sci.* 85: 721-729.
- Wang, X., I. L. Brown, A. J. Evans y P. L. Conway. 1999a. The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium spp.* in the mouse intestinal tract. *J. of App. Microbiol.* 87: 631-639.
- Wang, X., P. L. Conway, I. L. Brown y A. J. Evans. 1999b. In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (amylomaize) starch granules by human colonic bacteria. *Appl. & Environ. Microbiol.* 65: 4848-4854.
- Wong, S., B. M. Kabeir, S. Mustafa, R. Mohamad, A. S. Hussin y Y. Manap. 2010. Viability of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 after spray-drying and freeze-drying. *Microbiol. Insights.* 3: 37-43.
- Zhao, R. X., J. L. Sun, P. Torley, D. H. Wang y S. Y. Niu. 2008. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. *World J. Microbiol. Biotech.* 24 (8): 1349-1354.

10. APÉNDICES

Apéndice I. Curva de calibración de fosfato monobásico de potasio para la determinación del porcentaje de fósforo del almidón alto en amilosa fosfatado.

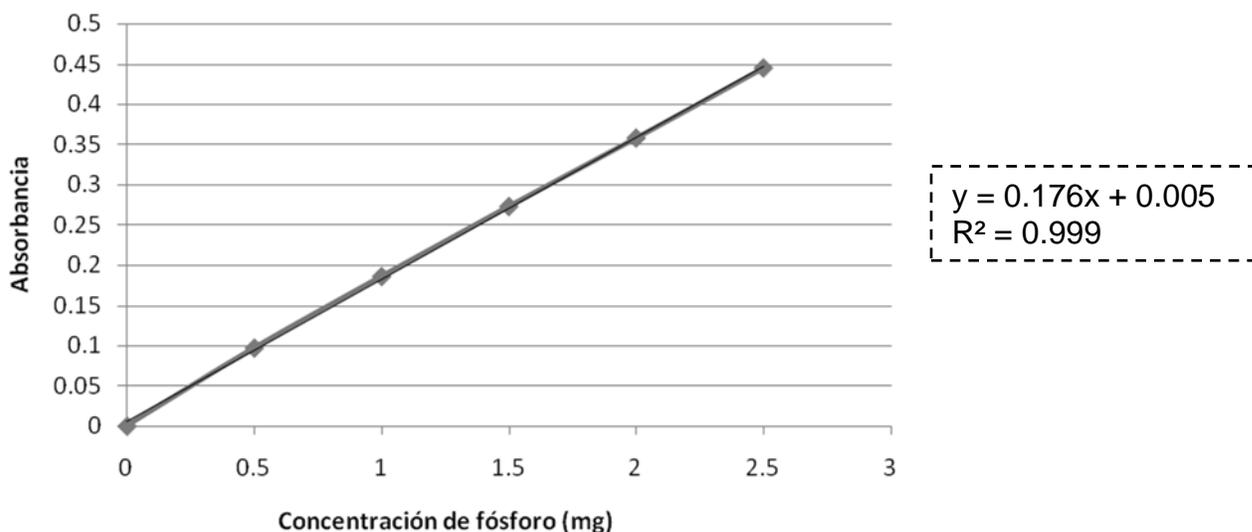


Figura 13. Curva de calibración de fósforo.

Apéndice II. Preparación de soluciones para electroforesis.

Stock de acrilamida (30%)

Reactivo	Concentración (g/100 mL)
Acrilamida	29.22
Bis-acrilamida	0.78

Nota: Debe guardarse en refrigeración y en frasco ámbar

Composición del búffer de gel concentrador

Reactivo	Concentración	pH
Tris-HCl	0.06 M	7
Urea	4.5 M	

Composición del búffer de gel separador

Reactivo	Concentración	pH
Tris-HCl	0.76 M	8.9
Urea	9 M	

Gel Separador

Reactivo	Volumen
Agua	1.8 mL
Acril:Bis	3.6 mL
Búffer de gel separador	3 mL
Persulfato de amonio 10 %	40 μ L
TEMED	5 μ L

Gel Concentrador

Reactivo	Volumen
Agua	2.72 mL
Acril:Bis	0.95 mL
Búffer de gel concentrador	1.25 mL
Persulfato de amonio 10 %	25 μ L
TEMED	5 μ L

Composición del búffer de muestra

Reactivo	Concentración
Tris-HCl	0.12 M
EDTA	2.5 mM
Urea	8.2 M
b-Mercaptoetanol	0.2 M

Azul de bromofenol	0.01 %
--------------------	--------

Composición del colorante de azul de Coomasie

Reactivo	Cantidad
Metanol	450 mL
Agua	450 mL
Ácido acético glacial	100 mL

Apéndice III. Antibiograma realizado para *Bifidobacterium breve* ATCC 15700.

Antibiótico	<i>Bifidobacterium breve</i>	
	Condición	Halo de inhibición (mm)
Penicilina (P)	S	19
Cifrofloxacino (CIP)	S	18
Ampicilina (AM)	S	22
Sulfametoxazol/ Trimetoprim (SXT)	R	-
Cloranfenicol (C)	S	22
Gentamicina (GM)	S	11
Carbenicilina (CB)	S	26
Tetraciclina (TE)	S	26
Estreptomina (S)	S	8
Cefuroxima (CXM)	S	19
Amikacina (AN)	S	9
Cefotaxima (CTX)	S	18
Nitrofurantoína (F/M)	S	20
Ceftriaxona (CRO)	S	13
Cloxacilina (CX)	R	-