



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
EN ALIMENTOS

DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**Evaluación del uso de almidón modificado de haba en la
microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GG para su
incorporación en salchicha cocida**

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ciencia de los Alimentos**

Presenta

M. en C. Mayra Esthela González Mendoza

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Co-dirigido por:

Dr. Fernando Martínez Bustos

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre de 2023
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación del uso de almidón modificado de haba en
la microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GG
para su incorporación en salchicha cocida

por

Mayra Esthela González Mendoza

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

Clave RI: FQDCC-144974



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN
ALIMENTOS

DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**Evaluación del uso de almidón modificado de haba en la microencapsulación
de *Lactobacillus rhamnosus* GG para su incorporación en salchicha cocida**
TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ciencia de los Alimentos

Presenta

M. en C. Mayra Esthela González Mendoza

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Co-dirigido por:

Dr. Fernando Martínez Bustos

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Presidente

Dr. Fernando Martínez Bustos
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente

Dra. Edith Ponce Alquicira
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre de 2023
México

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico, con todo mi amor y cariño:

A ti Dios por darme una oportunidad en la vida, por darme una familia maravillosa y por traerme a este momento tan importante en mi formación profesional.

A mis padres, con toda mi admiración, amor y respeto. Gracias por apoyarme siempre en mis aventuras, creer en mí y ser el apoyo más importante de mi vida. Los amo con todo mi corazón.

A César Felipe, por siempre estar en todos los caminos de mi vida, gracias por ser mi mayor amor y por motivarme en todo aspecto; cada meta y sueño que tenemos lo vamos cumpliendo juntos.

A mis hijas Regina Aryam y Sara Victoria que cambiaron mi vida por completo, ahora todo lo que hago es por y para ustedes.

Al Dr. José Antonio Cuarón Ibarquengoytia, por siempre creer en mí y motivarme a crecer profesionalmente. Un abrazo hasta el cielo.

“En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.”

Lee Smolin

AGRADECIMIENTOS

☯ A la Dra. Silvia Amaya, por darme la oportunidad de laborar en su grupo de trabajo, por creer en mí y dejarme crecer profesionalmente. Gracias por apoyarme en todo aspecto.

☯ Al Dr. Fernando Martínez Bustos y Dr. Eduardo Castaño Tostado por su apoyo, sus valiosas contribuciones y comentarios para el comienzo, desarrollo y mejora de este trabajo.

☯ A la Dra. Rosalía Reynoso y Dra. Edith Ponce por su apoyo y comentarios para mejorar este trabajo.

☯ A mis estudiantes Diego Marcos Palomares, Montserrat Escobar Garcés y Andrea Hernández Ledesma que siempre me apoyaron, por los buenos momentos que pasamos y porque siempre estaremos en el camino para ayudarnos.

☯ A la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, por generar posgrados de calidad.

☯ Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV Unidad Querétaro), por su apoyo en el uso de su infraestructura que fue esencial para la conducción del trabajo experimental.

☯ Al CONAHCYT, por el apoyo económico brindado.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
Índice de cuadros	5
Índice de figuras	6
Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción	11
II. Antecedentes.....	13
2.1. Consumo de productos cárnicos en México	13
2.1.1. Salchicha	13
2.2. Probióticos	15
2.2.1. Generalidades.....	15
2.2.2. Beneficios a la salud	15
2.2.3. Uso de probióticos en la industria alimentaria	16
2.2.3.1. Uso de probióticos en productos cárnicos emulsionados.....	17
2.2.4. Efecto del pH y temperatura sobre la viabilidad de los probióticos.....	19
2.2.4.1. <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	20
2.3. Microencapsulación de probióticos	21
2.3.1. Métodos de encapsulación	22
2.3.1.1. Secado por aspersion	24
2.3.2. Materiales encapsulantes	25
2.3.2.1. Uso de carbohidratos en la encapsulación	25
2.3.2.1.1. Almidón de fuentes no convencionales	30
2.3.2.1.1.1. Almidón de haba	31
2.3.2.2. Modificaciones de los almidones	31
2.3.2.2.1. Almidones succinatados.....	32
2.3.2.3. Energía de microondas para la obtención de almidón modificado.....	34
III. Justificación	36
IV. Hipótesis.....	37
V. Objetivos.....	38

5.1. Objetivo general	38
5.2. Objetivos específicos.....	38
VI. Metodología.....	39
6.1. Extracción del almidón de haba.....	39
6.1.1. Caracterización del almidón de haba	40
6.1.1.1. Análisis proximal	40
6.1.1.2. Contenido de almidón resistente.....	40
6.1.1.3. Contenido de amilosa y amilopectina	40
6.1.1.4. Perfil de viscosidad	40
6.1.1.5. Microscopía electrónica de barrido	40
6.1.1.6. Calorimetría diferencial de barrido	41
6.2 Energía de microondas para la modificación del almidón de haba.....	41
6.2.1. Caracterización del almidón hidrolizado y modificado.....	43
6.2.1.1. Concentración de almidón resistente.....	43
6.2.1.2. Perfil de viscosidad	43
6.2.1.3. Espectroscopia de transmisión de infrarrojo	43
6.2.1.4. Calorimetría diferencial de barrido	44
6.2.1.5. Grado de sustitución	44
6.3. Encapsulación mediante secado por aspersion	44
6.3.1. Recuento de bacterias y eficiencia de encapsulación.....	45
6.3.2. Caracterización de las microcápsulas.....	45
6.3.2.1. Actividad de agua	45
6.3.2.2. Microscopía electrónica de barrido	45
6.3.2.3. Calorimetría diferencial de barrido	46
6.4. Formulación y elaboración de salchicha tipo Viena.....	46
6.4.1. Determinaciones en la salchicha tipo Viena.....	47
6.4.1.1. Análisis proximal	47
6.4.1.2. Color y pH.....	47
6.4.1.3. Textura.....	47
6.4.1.4. Concentración de nitritos	47
6.4.1.5. Análisis microbiológico.....	48
6.4.1.6. Sobrevivencia a digestión <i>in vitro</i>	48

6.5.	Evaluación sensorial.....	49
6.6.	Vida de anaquel instrumental	49
6.6.1.	Determinaciones	49
6.6.1.1.	Color, pH y temperatura.....	49
6.6.1.2.	Textura.....	49
6.6.1.3.	Concentración de nitritos	50
6.6.1.4.	Análisis microbiológico.....	50
6.6.1.5.	Oxidación lipídica.....	50
6.7.	Análisis estadístico	50
VII.	Resultados y discusión	51
7.1	Composición del almidón nativo de haba	51
7.2	Caracterización del almidón nativo de haba y productos hidrolizados	52
7.2.1	Perfil de viscosidad del almidón nativo de haba y productos hidrolizados	58
7.2.2	Calorimetría diferencial de barrido del almidón nativo de haba y productos hidrolizados	61
7.2.3	Difracción de rayos X del almidón nativo de haba y productos hidrolizados	63
7.2.4	Espectroscopía infrarroja del almidón nativo de haba y productos hidrolizados	67
7.2.5	Microscopía electrónica de barrido del almidón nativo de haba y productos hidrolizados	69
7.3	Caracterización de los almidones modificados.....	72
7.3.1	Perfil de viscosidad de los almidones modificados	74
7.3.2	Espectroscopía de los almidones modificados.....	76
7.4	Microencapsulación mediante secado por aspersión	78
7.4.1	Recuento de bacterias y eficiencia de encapsulación	80
7.4.2	Caracterización de las microcápsulas	80
7.4.3	Microscopía electrónica de barrido de las microcápsulas	81
7.4.4	Calorimetría diferencial de barrido de las microcápsulas	82
7.5	Formulación y elaboración de salchicha tipo Viena.....	84
7.5.1	Evaluación sensorial	85
7.5.2	Sobrevivencia a digestión <i>in vitro</i>	86
7.5.3	Microscopía electrónica de barrido de las salchichas	88
7.6	Vida de anaquel instrumental	89

7.6.1	Color, pH y temperatura	89
7.6.2	Textura	92
7.6.3	Concentración de nitritos.....	93
7.6.4	Análisis microbiológico	94
7.6.5	Oxidación lipídica	96
VIII.	Conclusiones	98
IX.	Referencias	100
X.	Anexos.....	114

Índice de cuadros

Cuadro 1. Microorganismos utilizados como probióticos en la industria de alimentos.	17
Cuadro 2. Rangos de tolerancia de pH y temperatura para algunas bacterias.	20
Cuadro 3. Métodos y materiales de pared utilizados para encapsular <i>L. rhamnosus</i> GG.....	23
Cuadro 4. Composición del almidón y gránulos de algunas leguminosas.....	30
Cuadro 5. Modificaciones físicas y químicas del almidón.	32
Cuadro 6. Matriz de diseño correspondiente al diseño factorial fraccional 2^{4-1} para la hidrólisis ácida del almidón por microondas.	42
Cuadro 7. Matriz de diseño correspondiente al diseño factorial fraccional 2^3 para la modificación química del almidón por microondas.	43
Cuadro 8. Ingredientes que se emplearon en la elaboración de salchicha de cerdo tipo Viena.	46
Cuadro 9. Composición proximal del almidón nativo de haba*.	52
Cuadro 10. Caracterización del almidón nativo de haba y productos hidrolizados.	56
Cuadro 11. Parámetros de pasting del almidón nativo de haba y productos hidrolizados.	61
Cuadro 12. Propiedades térmicas del almidón nativo de haba, almidón hidrolizado convencionalmente y productos hidrolizados seleccionados.	63
Cuadro 13. Caracterización de los almidones esterificados por el método convencional y mediante energía de microondas.	72
Cuadro 14. Caracterización de los almidones esterificados por el método convencional y mediante energía de microondas.	74
Cuadro 15. Rendimiento del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG usando almidón modificado de haba.	79
Cuadro 16. Evaluación de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG usando almidón modificado de haba.	80
Cuadro 17. Evaluación de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG usando almidón modificado de haba.	81
Cuadro 18. Formulación de la salchicha tipo Viena.	84

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de elaboración de una salchicha cocida (Información de Totosaus, 2007).	14
Figura 2. Beneficios para la salud de los probióticos (Adaptada de Anandharaj <i>et al.</i> 2014).	16
Figura 3. Métodos de encapsulación utilizados comúnmente en la industria de alimentos (Modificada de Krokida, 2018).	22
Figura 4. Estructura básica de unidades de glucosa, amilosa y amilopectina (Modificada de Alcázar-Alay & Meireles, 2015).	26
Figura 5. Formación de microcápsulas mediante secado por aspersion de gránulos de almidón (Modificada de Hoyos-Leyva <i>et al.</i> , 2016).	27
Figura 6. Diferentes tamaños de almidón y su mecanismo de retención hipotético (Modificada de Hoyos-Leyva <i>et al.</i> 2016).	28
Figura 7. Interacciones moleculares de los materiales encapsulantes (Modificada de McClements, 2014).	29
Figura 8. Diagrama de trabajo.	39
Figura 9. Gráficos de interacción de humedad (M) con concentración de ácido (A), humedad (M) con tiempo (T) y humedad (M) con nivel de potencia (P). Interacciones para amilosa (A-1, 2 y 3); Interacciones para almidón resistente (B-1, 2 y 3); Interacciones para índice de solubilidad en agua (C-1, 2 y 3); Interacciones para índice de absorción de agua (D-1, 2 y 3); Interacciones para azúcares reductores (E-1, 2 y 3).	57
Figura 10. Perfil de viscosidad del almidón nativo de haba y productos hidrolizados. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS1- 20%H/2%A/30T/2P; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS3- 20%H/4%A/30T/6P; HFBS4- 40%H/4%A/30T/2P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS6- 40%H/2%A/60T/2P; HFBS7- 20%H/4%A/60T/2P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P.	60
Figura 11. Difracción de rayos X. (A) Patrones de almidón nativo y productos hidrolizados; (B) Cristalinidad relativa, regiones resaltadas en color son los picos afectados. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P.	66
Figura 12. Espectroscopía FTIR. (A) Patrones de almidón nativo y productos hidrolizados; (B) Picos característicos de la huella digital. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P... ..	68

Figura 13. Micrografías SEM del almidón nativo de haba y productos hidrolizados. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P.	71
Figura 14. Perfil de viscosidad de los almidones esterificados por el método convencional y mediante energía de microondas. MCFBS, esterificación convencional; MFBS, almidones esterificados por microondas; N-LOK®, almidón esterificado comercial.....	76
Figura 15. Espectroscopía FTIR. HFBS, almidón hidrolizado por microondas; MCFBS, esterificación convencional; MFBS, almidones esterificados por microondas.....	77
Figura 16. Espectroscopía FTIR. HFBS, almidón hidrolizado por microondas; MCFBS, esterificación convencional; MFBS, almidones esterificados por microondas.....	78
Figura 17. Micrografías SEM de las microcápsulas de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG usando almidón modificado de haba. MCLGG, microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión.	82
Figura 18. Termograma de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG usando almidón modificado de haba. LGGNE, <i>L. rhamnosus</i> GG no encapsulado; MCLGG, microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión.	83
Figura 19. Gráfico radial de los atributos calificados en la evaluación sensorial de la salchicha sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas.....	86
Figura 20. Supervivencia a digestión <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Microcápsulas en salchicha, línea negra y microcápsulas libres, línea roja (MCLGG-MFBS6).....	87
Figura 21. Micrografías SEM de las salchichas con y sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas.....	88
Figura 22. Temperatura y pH de salchichas con y sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C. ■, Control y ●, Probióticos.	90
Figura 23. Luminosidad (L), índice rojo-verde (a) e índice amarillo-azul (b) de salchichas con y sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Almacenamiento en	

refrigeración a 4 °C. ■, Control y ●, Probióticos. HunterLab MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Inc.) iluminante D65/10°.....	91
Figura 24. Imágenes de las muestras de salchicha con y sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Control (C) y Probióticos (P). 0, 10, 20 y 30 indican el tiempo de almacenamiento en días. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C.	91
Figura 25. Gráficos de perfil de textura de salchichas con y sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. A) Dureza, B) Cohesividad, C) Elasticidad y D) Masticación. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C. ■ Control, línea negra y ● Probióticos, línea roja.....	93
Figura 26. Concentración de nitritos en salchicha con y sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas y almacenada a 4 °C.	94
Figura 27. Sobrevivencia de <i>Lactobacillus</i> en muestras de salchicha con y sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C.....	95
Figura 28. Concentración de especies reactivas al ácido 2-tiobarbiturico en salchicha con y sin la adición de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas y almacenada a 4 °C.....	97

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Resumen

Los microorganismos probióticos presentan beneficios a la salud. Sin embargo, su aplicación comercial en productos cocidos todavía sigue siendo un reto debido a su baja sobrevivencia. No obstante, el proceso de microencapsulación con adecuado material de pared puede protegerlos. Los almidones son un buen material porque son de bajo costo y altamente versátiles. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue obtener un material encapsulante a partir de almidón de haba modificado por energía de microondas, que provea protección al microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), para su incorporación a un producto cárnico cocido. La extracción de almidón se realizó mediante el método húmedo y se utilizó energía de microondas (EM) para hidrolizar con ácido mediante un diseño factorial 2^{4-1} , donde los factores evaluados fueron humedad (20 y 40%), concentración de ácido (2 y 4%), tiempo (30 y 60s) y potencia (2 y 6). Los mejores tratamientos (HFBS2 y HFBS8) fueron sometidos a EM para su modificación con anhídrido octenil succínico, evaluándose un diseño factorial 2^3 , los factores evaluados fueron almidón hidrolizado (HFBS2 y HFBS8), tiempo (30 y 60s) y potencia (2 y 10). El mejor tratamiento (MFBS6) se usó en la microencapsulación y elaboración de la salchicha. La aplicación de EM condujo a la obtención de almidón hidrolizado en tiempos muy cortos en comparación con la hidrólisis convencional. El material succinatado mediante EM presentó un aumento de la concentración de amilosa, solubilidad en agua, azúcares reductores y almidón resistente en comparación con el almidón nativo e hidrolizados de haba. La microencapsulación mediante secado por aspersion de LGG usando MFBS6 presentó un alto rendimiento (>50%) y sobrevivencia (>80%). Las microcápsulas resultantes presentaron propiedades similares a las obtenidas a partir de almidón comercial. La salchicha probiótica producida por tecnología de microencapsulación obtuvo buena aceptación sensorial, así como alta tasa de supervivencia después de la digestión *in vitro* y almacenamiento a 4°C. Incluso después de 30 días de almacenamiento, su evaluación de vida útil mostró buena textura, color, sobrevivencia de LGG y baja oxidación lipídica.

Palabras clave. Probiótico, microencapsulación, producto cárnico cocido.

Abstract

Probiotic microorganisms have health benefits. However, the commercial application of probiotics in cooked products still remains a challenge due to their low survival. Nevertheless, the process of microencapsulation with suitable wall material can protect them. Starches being a good alternative as they present low cost and are highly versatile. Therefore, the objective of the present work was to obtain an encapsulating material from faba bean starch modified by microwave energy, which provides protection to the microorganism *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), for its incorporation into a cooked meat product. Starch extraction was performed using the wet method and microwave energy (ME) was used to hydrolyze with acid using a 2^{4-1} factorial design, where the factors evaluated were moisture (20 and 40%), acid concentration (2 and 4%), time (30 and 60s) and power (2 and 6). The best treatments (HFBS2 and HFBS8) were subjected to ME for modification with octenyl succinic anhydride, evaluating a 2^3 factorial design, the factors evaluated were hydrolyzed starch (HFBS2 and HFBS8), time (30 and 60s) and power (2 and 10). The best treatment (MFBS6) was used in microencapsulation and sausage production. The application of ME led to obtaining hydrolyzed starch in very short times compared to conventional hydrolysis. The material succinated by ME showed increased concentration of amylose, water solubility, reducing sugars and resistant starch compared to native and hydrolyzed faba bean starch. Microencapsulation by spray drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG using MFBS6 had high yield (>50%) and survival (>80%). The resulting microcapsules had properties similar to those obtained from commercial starch. Probiotic sausage produced by microencapsulation technology obtained good sensory acceptance, as well as high survival rate after *in vitro* digestion and storage at 4°C. Even after 30 days of storage, its shelf life evaluation showed good texture, color, LGG survival and low lipid oxidation.

Keywords. Probiotic, microencapsulation, cooked meat products.

I. Introducción

En los últimos años el consumo de productos cárnicos ha aumentado considerablemente, siendo la salchicha uno de los productos emulsionados de mayor consumo. Por lo que se han buscado estrategias para mejorar su calidad nutricional y funcional, por ejemplo, la adición de compuestos biológicamente activos, como los probióticos. Los probióticos pueden desempeñar un papel benéfico en la salud del huésped, y se utilizan en la industria alimentaria, principalmente en la láctea. La mayoría de los probióticos para el consumo humano son bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, su aplicación en el desarrollo de nuevos productos está limitada por la selección del microorganismo. *Lactobacillus rhamnosus* GG es un probiótico aerotolerante Gram-positivo, el cual se ha demostrado que tiene beneficios sobre diversos trastornos gastrointestinales.

El uso de probióticos en productos cárnicos cocidos ha sido reportado por algunos autores. Sin embargo, el desarrollo de un producto probiótico aún no se ha logrado, ya que los conteos reportados son menores a 10^6 - 10^7 células vivas, siendo esta la concentración necesaria para ser considerado un producto probiótico. Proteger la viabilidad de los probióticos es una de las etapas más importantes para su aplicación en productos alimenticios y para ello, se han desarrollado diversos métodos de encapsulación. El secado por aspersion es uno de los métodos que se usa con mayor frecuencia, ya que es económico y flexible; la composición de la solución de encapsulación puede definir el nivel de protección brindada al microorganismo y actualmente existe interés en identificar nuevos agentes de encapsulación. Los almidones de fuentes no convencionales, por ejemplo, almidón de leguminosas, podrían ser una alternativa. El almidón de haba tiene alto contenido de almidón resistente, mayor proporción de amilosa respecto a otras leguminosas y tamaño de gránulo pequeño, por lo que podría ser utilizado como material de pared, sin embargo, el uso de almidones nativos presenta limitaciones funcionales. Para mejorar sus propiedades se pueden realizar modificaciones utilizando métodos químicos, físicos y enzimáticos. La succinación para la obtención de almidón con octenilsuccinato (almidón OSA) es

una de las modificaciones químicas más comunes, y actualmente se busca el uso de tecnologías emergentes para mejorar el proceso de obtención de este tipo de almidones y mejorar sus características funcionales.

Por lo tanto, se propone la obtención de un material encapsulante a partir de almidón de haba modificado por energía de microondas para la microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* GG y su aplicación en un producto cárnico cocido.

II. Antecedentes

2.1. Consumo de productos cárnicos en México

En México, la carne constituye uno de los elementos principales en la dieta, debido a que es una fuente de proteínas de alta calidad (aminoácidos esenciales), así como de minerales (fósforo, selenio, sodio, zinc, potasio, cobre, hierro y magnesio) y vitaminas (B6, B12, tiamina, niacina, riboflavina y ácido pantoténico) de elevada biodisponibilidad, esenciales para el desarrollo humano (FAO, 2019).

En los últimos años el consumo de productos cárnicos ha incrementado y todas las proyecciones aseguran que la demanda aumentará en los próximos años. Cabe señalar que la proteína más consumida es la de pollo, seguida del cerdo, bovino y carnes frías. Respecto a carnes frías el consumo *per cápita* 2022 fue de 8.28 kg y se registró un crecimiento del 3.8% en la producción de dichos productos del 2020 al 2021, siendo la salchicha el producto con mayor demanda (Consejo Mexicano de la Carne, 2022).

2.1.1. Salchicha

Las salchichas son productos alimenticios clasificados como embutidos escaldados, de pasta semifirme de color característico (rosado), elaboradas con una mezcla de carnes (60% mínimo) y grasas, adicionada de condimentos, especias y aditivos para alimentos. De acuerdo con la norma mexicana, el producto debe tener un contenido mínimo de 9.5% de proteína y un máximo de 30% de grasa (NMX-F-065-1984).

Las propiedades funcionales del sistema de emulsificación de la carne se basan en un equilibrio en la interacción de las proteínas miofibrilares con el agua, la grasa y entre sí en términos de disolución, emulsificación y gelificación, respectivamente. El proceso de elaboración de las salchichas se muestra en la Figura 1, siendo la temperatura el factor más importante para obtener una emulsión estable, antes del cocimiento para lograr la formación de una adecuada emulsión y, durante el cocimiento para la gelificación (Totosaus, 2007).

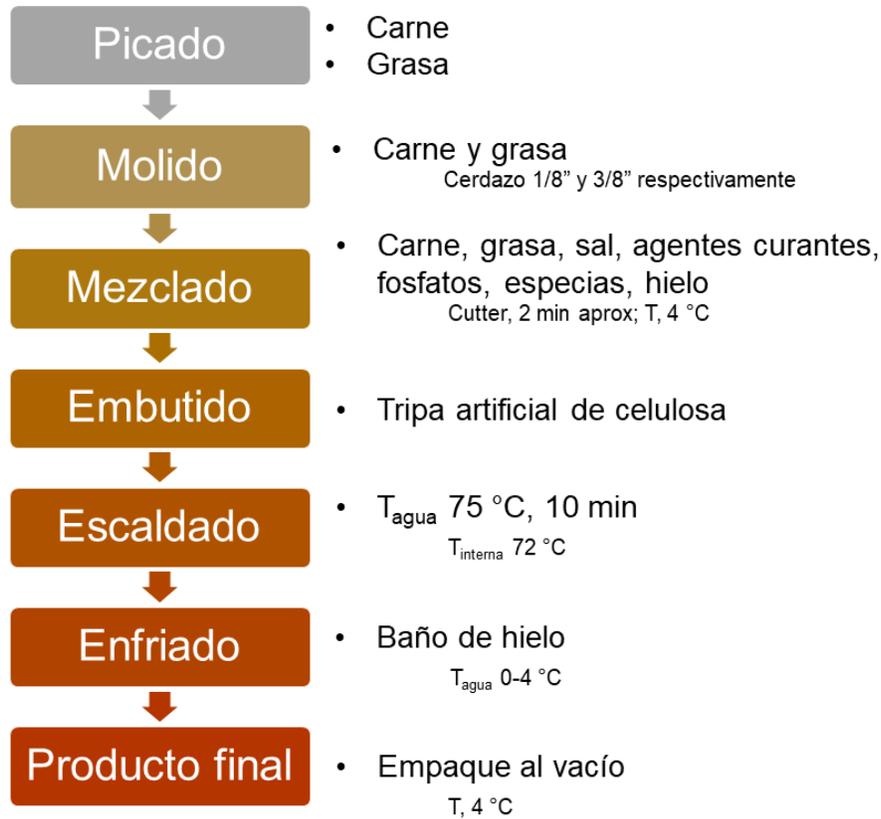


Figura 1. Proceso de elaboración de una salchicha cocida (Información de Totosaus, 2007).

De acuerdo a un estudio realizado por PROFECO en el 2014, el consumo “*per cápita*” de salchichas fue de 3.91 kg, y se menciona que 3 de cada 10 personas comen salchichas 2 o 3 veces por semana, siendo los niños la población (54%) que más consume dicho producto (Encuesta PROFECO, 2010).

Al ser la salchicha un producto cárnico de alto consumo, se han buscado estrategias para mejorar su calidad nutricional, entre ellas, se encuentra la formulación de salchichas con menor contenido de grasa, sal y nitratos, así como el desarrollo de nuevos productos, con la adición de compuestos biológicamente activos que proporcionen beneficio a la salud, como por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados, antioxidantes y probióticos (Neffe-Skocińska *et al.*, 2018; Panghal *et al.*, 2018; Shahidi, 2010).

2.2. Probióticos

2.2.1. Generalidades

En la actualidad, los microorganismos probióticos poseen gran importancia a nivel mundial, debido a los numerosos efectos favorables sobre la salud humana (Muhammad *et al.*, 2017). La FAO/OMS (2002) define a los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades suficientes, brindan beneficios para la salud (Neffe-Skocińska *et al.*, 2018).

2.2.2. Beneficios a la salud

Los probióticos pueden desempeñar un papel benéfico en varias afecciones médicas incluidas, diarrea, gastroenteritis, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria del intestino, cáncer, alergias infantiles, entre otras (Plaza-Diaz *et al.*, 2019; Syngai *et al.*, 2016; Anandharaj *et al.*, 2014; Bansal & Garg, 2008). Así como, la reducción de la intolerancia a la lactosa, resistencia a patógenos entéricos, prevención de trastornos gastrointestinales y modulación de la respuesta inmunológica del huésped (Bustamante *et al.*, 2017; Lapsiri *et al.*, 2012) (Figura 2).

Además, la mayoría de las afecciones pueden causar disbiosis. La disbiosis intestinal se refiere a la alteración de la composición de la microbiota intestinal y al consiguiente falló del sistema inmunológico. Se han utilizado de manera eficaz probióticos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* para restaurar la composición de la microbiota; éstas bacterias contribuyen positivamente con la modificación y mejora de la microbiota intestinal, estimulando la función de la barrera epitelial y equilibrando el balance en la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Principi *et al.*, 2017).

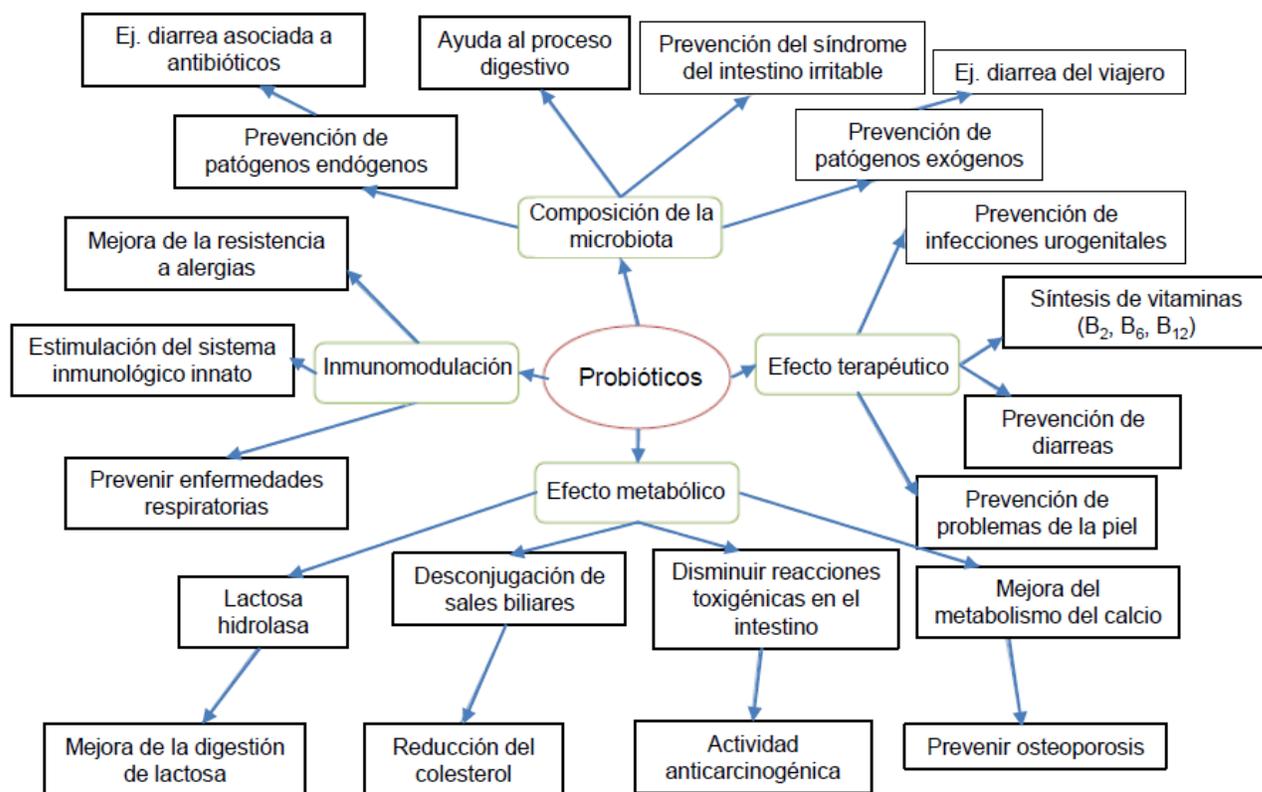


Figura 2. Beneficios para la salud de los probióticos (Adaptada de Anandharaj et al. 2014).

2.2.3. Uso de probióticos en la industria alimentaria

La mayoría de los probióticos para el consumo humano son bacterias ácido lácticas (BAL), residentes habituales del tracto gastrointestinal, pero también se emplean otros géneros. En el Cuadro 1, se muestra una lista de diferentes especies bacterianas que se utilizan activamente como probióticos, siendo las bacterias representativas las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Kerry et al., 2018; Panghal et al., 2018; Arihara & Ohata, 2011). Los alimentos probióticos exhiben sus efectos benéficos cuando los microorganismos están vivos y contienen un número adecuado de bacterias, se ha sugerido una dosis diaria de al menos 10^6 - 10^7 células vivas para asegurar efectos relevantes para la salud (Lapsiri et al., 2012).

Cuadro 1. Microorganismos utilizados como probióticos en la industria de alimentos.

Género	Especie
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>B. uniformis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

(Modificado de Kerry *et al.*, 2018).

2.2.3.1. Uso de probióticos en productos cárnicos emulsionados

El uso de probióticos es un enfoque atractivo para el desarrollo de productos cárnicos cocidos con propiedades benéficas para la salud. En este aspecto se han reportado algunos estudios realizados en salchicha cocida (Bilenler *et al.*, 2017; Pérez-Chabela *et al.*, 2013a; Pérez-Chabela *et al.*, 2013b) y jamón (Pereira *et al.*, 2018), algunos de ellos serán discutidos a continuación.

Pérez-Chabela *et al.* (2008), utilizaron cepas de bacterias ácido lácticas termotolerantes aisladas de salchichas comerciales (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilacti*). Las cepas fueron inoculadas en la etapa de mezclado previo a la cocción para la elaboración de salchicha, en el estudio no se detectó ningún efecto en los parámetros de color, textura y aceptación sensorial ($P > 0.05$) en las salchichas

inoculadas con *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilacti*. Mientras que cuando se utilizó *Lactobacillus curvatus* las salchichas presentaron una textura más suave y por lo tanto baja aceptación sensorial ($P < 0.05$). También se evaluó la sobrevivencia de los microorganismos al día 1 y 12 de almacenamiento a 4 °C, observándose una disminución de la sobrevivencia de los microorganismos *Lactobacillus curvatus* (4.67 vs. 2.55 UFC/g), *Pediococcus pentosaceus* (4.30 vs. 3.05 UFC/g) y *Pediococcus acidilacti* (4.13 vs. 3.25 UFC/g) excepto para la salchicha inoculada con *Lactobacillus plantarum* (3.40 vs. 3.50 UFC/g).

Pérez-Chabela *et al.* (2013a), inocularon cuatro cepas de bacterias ácido lácticas termotolerantes aisladas de salchichas comerciales (*Pediococcus acidilacti* UAM15c, *Lactobacillus plantarum* UAM10a, *Pediococcus pentosaceus* UAM17, y *Lactobacillus curvatus* UAM18) en dos formulaciones de salchichas cocidas (una convencional y una reducida en grasa y sodio). La inoculación mejoró la estabilidad y redujo la liberación de agua en ambas formulaciones, además las salchichas inoculadas presentaron una textura más suave y cohesiva ($P < 0.05$). La evaluación mediante microscopia mostró que UAM15c y UAM10a secretaban exopolisacáridos probablemente relacionados con una alta estabilidad a la humedad y mejores propiedades de textura, en comparación con muestras no inoculadas ($P < 0.05$).

Pérez-Chabela *et al.* (2013b), usaron cuatro bacterias termotolerantes aisladas de salchichas comerciales (*Aerococcus viridans* UAM21, *Enterococcus faecium* UAM10a, *Lactobacillus plantarum* UAM17 y *Pediococcus pentosaceus* UAM11). Las bacterias fueron encapsuladas con goma acacia por secado por aspersion; se reportaron diferencias significativas en las variables de humedad, actividad de agua, liberación de grasa, luminosidad, enrojecimiento y cohesividad ($P < 0.05$). Teniendo un impacto negativo la adición de este tipo de probióticos microencapsulados con goma acacia. Sin embargo, se mostró un efecto positivo por la disminución de enterobacterias ($P < 0.05$). También se evaluó la sobrevivencia de los microorganismos al día 1, 4 y 8 de almacenamiento a 4 °C,

observando un aumento en el número de los microorganismos, siendo las cuentas finales de 5.22 – 7.32 log UFC/g.

Bilenler *et al.* (2017), utilizaron cultivos iniciadores de *Lactobacillus plantarum* y *Staphylococcus xylosum* encapsulados mediante emulsión utilizando una mezcla de alginato-almidón en salchichas cocidas. Estos investigadores observaron que la encapsulación protegió a los cultivos iniciadores contra el tratamiento térmico y que no se presentaron diferencias en las características fisicoquímicas de la salchicha. Se evaluó la sobrevivencia de los microorganismos durante 45 días de almacenamiento a 4 °C, tomando muestras a los 0, 14, 30 y 45 días. Se observó un ligero incremento de bacterias ácido lácticas ($P < 0.05$), sin llegar a los conteos sugeridos para un producto probiótico.

Con todo lo anteriormente planteado, existen suficientes evidencias que demuestran la incorporación de bacterias probióticas a productos cárnicos cocidos. Sin embargo, el desarrollo de un producto probiótico aún no se ha logrado, ya que los conteos reportados son menores a 10^6 - 10^7 células vivas. Pérez-Chabela *et al.* (2013b) utilizando bacterias termotolerantes microencapsuladas lograron producir salchichas con conteos de 7 log UFC/g de los microorganismos *Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecium*, y *Lactobacillus plantarum* después de 8 días de almacenamiento. Sin embargo, en dicho artículo no se evaluó la vida de anaquel del producto y se presentaron aumentos considerables en las cuentas del día 1 al 8. Por lo tanto, el efecto deteriorador que pudieran tener los microorganismos si se almacenan las salchichas por más tiempo es desconocido, y esto es de gran interés ya que este tipo de productos tienen una vida de anaquel mayor a 30 días. Por lo que aún existen áreas de oportunidad para el desarrollo y evaluación de un producto cárnico probiótico.

2.2.4. Efecto del pH y temperatura sobre la viabilidad de los probióticos

Para el desarrollo de nuevos productos es importante considerar que los probióticos presentan distinta tolerancia a diversas matrices (Neffe-Skocińska *et al.*, 2018; Tripathi & Giri, 2014) y su viabilidad se ve afectada durante el procesamiento y almacenamiento de dichos productos (Panghal *et al.*, 2018). Dentro de las variables más importantes a considerar para la elección del

microorganismo probiótico se encuentran la temperatura y el pH. En el Cuadro 2, se presentan los rangos de pH y temperatura que algunos microorganismos probióticos pueden sobrevivir.

Cuadro 2. Rangos de tolerancia de pH y temperatura para algunas bacterias.

Género <i>Lactobacillus</i> spp.	pH	T (°C)
<i>L. acidophilus</i>	≤ 5	37 - 45
<i>L. lactis</i>	≤ 5	40 - 45
<i>L. bulgaricus</i>	5 - 6	45 - 115
<i>L. rhamnosus</i>	3 - 7	15 - 45
<i>L. casei</i>	3 - 7	10 - 45
<i>L. paracasei</i>	4 - 5	10 - 37
<i>L. reuteri</i>	≤ 5	15 - 45
<i>L. helveticus</i>	4 - 7	35 - 45
<i>L. plantarum</i>	4 - 9	10 - 45
Género <i>Bifidobacterium</i> spp.		
<i>B. bifidum</i>	6.5 - 7	36 - 42
<i>B. longum</i>	7	37
<i>B. infantis</i>	6 - 7	37
<i>B. breve</i>	7	37
<i>B. animalis (lactis)</i>	4.5 - 7	25 - 45

(Modificado de Parra *et al.*, 2010).

2.2.4.1. ***Lactobacillus rhamnosus* GG**

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) es una bacteria aerotolerante Gram-positiva con metabolismo homofermentativo. LGG puede fermentar algunos azúcares como la fructosa, glucosa, manitol, manosa, sorbitol, trehalosa entre otros. No

fermenta azúcares como lactosa, maltosa o sacarosa, arabinosa, eritritol, inositol (Gorbach *et al.*, 2017; Doron *et al.*, 2005).

LGG cumple con las propiedades necesarias de un probiótico ideal: la resistencia al ácido y la bilis, le permite sobrevivir en el tracto gastrointestinal, es capaz de implantarse en las células epiteliales intestinales, colonizar el tracto intestinal, producir sustancias antimicrobianas, crecer rápidamente y tener un efecto beneficioso para la salud (Gorbach *et al.*, 2017; Yan & Polk, 2012). Esta bacteria es un organismo considerado como GRAS (Generally Recognized As Safe), que se aisló del tracto gastrointestinal humano.

Estudios clínicos han demostrado la eficacia de las cepas de LGG en el tratamiento o la prevención de trastornos gastrointestinales, incluido enfermedades diarreicas, prevención y tratamiento de alergias (Dogan *et al.*, 2019; Doron *et al.*, 2005). Además, tiene la capacidad de impedir el crecimiento de bacterias que causan enfermedades digestivas, LGG produce una sustancia inhibidora, probablemente un ácido graso de cadena corta, con actividad contra una variedad de especies bacterianas, incluidas las bacterias anaerobias (*Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Salmonella* (Doron *et al.*, 2005).

2.3. Microencapsulación de probióticos

Proteger la viabilidad de los probióticos es una de las etapas más importantes para su aplicación en productos alimenticios y para ello se han desarrollado diversos métodos de encapsulación (Bartkiene *et al.*, 2018; Khem *et al.*, 2015). La microencapsulación se describe como el método más eficaz para mantener la viabilidad y la estabilidad de los probióticos durante el procesamiento, almacenamiento y tránsito gastrointestinal (Bilenler *et al.*, 2017; Martín *et al.*, 2014). Además, permite la liberación de los compuestos activos durante largos períodos de tiempo (Eckert *et al.*, 2017).

El tamaño de las microcápsulas varía de partículas submicrométricas hasta varios milímetros y pueden tener una gran variedad de formas, dependiendo de los materiales y métodos utilizados (Huertas, 2011).

2.3.1. Métodos de encapsulación

El proceso de encapsulación se puede dividir en químico y físico (o mecánicos). Algunos ejemplos de procesos químicos son la coacervación, co-cristalización, gelificación iónica, polimerización interfacial, incompatibilidad polimérica, inclusión molecular entre otras; el proceso físico incluye métodos como el secado por aspersión, secado por congelamiento/enfriamiento, extrusión, entre otros (Mishra & Mishra, 2012). Dentro de los métodos más utilizados en la industria se encuentran los que podemos ver en la Figura 3. Se aprecia que son tanto químicos como físicos, siendo el secado por aspersión (método físico) el más usado (Krokida, 2018).

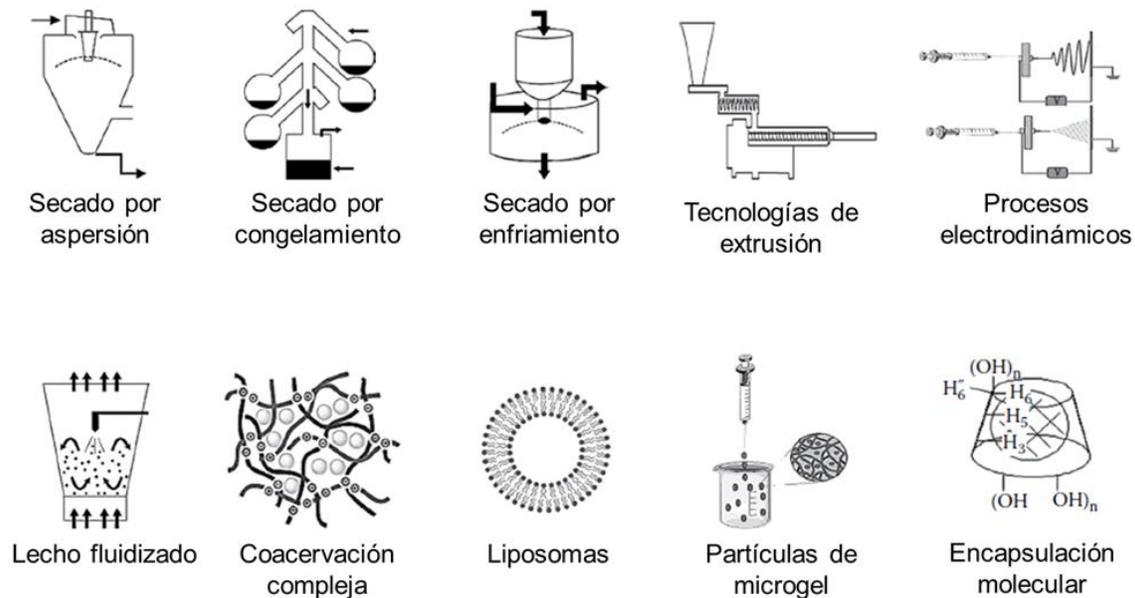


Figura 3. Métodos de encapsulación utilizados comúnmente en la industria de alimentos (Modificada de Krokida, 2018).

Por sus efectos benéficos a la salud y resistencia al tracto gastrointestinal, LGG ha sido utilizado en diversas técnicas de microencapsulación para su aplicación en productos alimenticios, algunos de los métodos y materiales de pared utilizados se encuentran enlistados en el Cuadro 3, siendo el secado por aspersión el método con más estudios reportados. Esto pudiera ser debido a que es un proceso con

altos rendimientos, bajo costo y, además, tiene una gran versatilidad, ya que se pueden utilizar diversos materiales para encapsular.

En la encapsulación de LGG por secado por aspersión se han reportado materiales de pared como almidón de arroz y maíz, almidón resistente, maltodextrina, proteína de suero de leche, leche descremada, alginato, pectina, goma arábiga, entre otros (Cuadro 3).

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

Método	Material	Referencia
Electrospray	Aislado de proteína de suero de leche, inulina, goma persian	Moayyedi <i>et al.</i> , 2018
Congelación por aspersión	Aislado de proteína de suero de leche, inulina, goma persian	Moayyedi <i>et al.</i> , 2018
Emulsión	Caseína, proteínas de suero de leche, proteínas de suero de leche desnaturalizadas, suero dulce, isomaltooligosacáridos	Pimentel-González <i>et al.</i> , 2009; Burgain <i>et al.</i> , 2013; Liu <i>et al.</i> , 2017
Gelificación iónica	Alginato, goma de algarrobo, goma xantana, almidón de maíz con alto contenido de amilosa, almidón de maíz modificado (OSA), mucílago de semilla de membrillo, quitosano, pectina, leche descremada, bagazo de caña	Cheow <i>et al.</i> , 2014; Shaharuddin <i>et al.</i> , 2015; Pirarat <i>et al.</i> , 2015; Cheow <i>et al.</i> , 2016; Li <i>et al.</i> , 2016; Gandomi <i>et al.</i> , 2016; Farias <i>et al.</i> , 2018; Dokoohaki <i>et al.</i> , 2019; Ningtyas <i>et al.</i> , 2019; Hugues-Ayala <i>et al.</i> , 2020
Secado por aspersión	Aislado de proteína de suero de leche, caseína, inulina, goma persian, trehalosa, lactosa, glucosa, manitol, dextrano, almidón de arroz, vinilpirrolidona, gelatina de pescado, almidón alto en amilosa, estereoisómero de glucosa	Ying <i>et al.</i> , 2012; Ying <i>et al.</i> , 2013; Zhu <i>et al.</i> , 2013; Avila-Reyes <i>et al.</i> , 2014; Broeckx <i>et al.</i> , 2017; Guerin <i>et al.</i> , 2017; Agudelo <i>et at.</i> , 2017; Moayyedi <i>et al.</i> , 2018; Liu <i>et al.</i> , 2018; Su <i>et al.</i> , 2018; Akanny <i>et al.</i> , 2020; Jiang <i>et al.</i> , 2020; Hernández-Barrueta <i>et al.</i> , 2020

2.3.1.1. Secado por aspersión

El método de secado por aspersión es el proceso más utilizado en la fabricación de micropartículas en la industria de alimentos, ya que es económico, flexible y genera productos en polvo de alta calidad (Muhammad *et al.*, 2017). Además, se pueden producir grandes cantidades de producto en un procesamiento simple y continuo. Sin embargo, los desafíos asociados con la microencapsulación de probióticos por secado por aspersión son la reducción de la sobrevivencia de las células bacterianas debido a la deshidratación y el estrés térmico simultáneos (Anal & Singh *et al.*, 2007). La sobrevivencia y la viabilidad de los probióticos se pueden mejorar al optimizar las condiciones de secado y la composición del material encapsulante (Fritzen-Freire *et al.*, 2012). Mientras que las ventajas del secado por aspersión son la capacidad de controlar el tamaño de las partículas, el secado rápido, la fácil ampliación y la producción continua (Ananta *et al.*, 2005).

En la microencapsulación mediante secado por aspersión, la biomasa se homogeneiza formando una emulsión con el material encapsulante, luego, la mezcla se alimenta a un secador por aspersión y se atomiza con una boquilla o una rueda giratoria, el agua se evapora y las microcápsulas se recolectan después de que caen al fondo del secador. Las condiciones de operación del secador, y también de la alimentación, influyen en la calidad del producto final; dentro de los parámetros del proceso que tienen gran relevancia se encuentran el flujo de aire, la presión de la boquilla, el tiempo de residencia, la velocidad de alimentación y la temperatura del aire (Bustos & Bórquez, 2013).

De todo lo anteriormente mencionado, se ha reportado que la temperatura del aire es el parámetro que más afecta la viabilidad de los microorganismos (Bustos & Bórquez, 2013). Sin embargo, la temperatura del aire en un rango de 110 a 180 °C es necesaria para promover la evaporación del agua de las cápsulas durante el proceso, para que alcancen una humedad de 4 a 7%, manteniendo así la estabilidad de las bacterias encapsuladas (Jantzen *et al.*, 2013). Agudelo *et al.* (2017) y Ying *et al.* (2013) demostraron una alta viabilidad y tasa de sobrevivencia de *L. rhamnosus* GG utilizando una temperatura constante del aire de entrada de

160 °C y una temperatura de salida de 62 - 65 °C. Los estudios más recientes muestran que la composición del material encapsulante puede mejorar la supervivencia de las células probióticas durante el proceso de secado por aspersión y durante el almacenamiento de los microorganismos encapsulados (Eckert *et al.*, 2018).

2.3.2. Materiales encapsulantes

La composición de la solución de encapsulación puede determinar el nivel de protección contra el oxígeno, el pH o la alta concentración de sal y puede reducir hasta cierto punto los efectos de algún tratamiento con calor al mejorar la supervivencia durante el secado y durante el almacenamiento (Eckert *et al.*, 2018). Los materiales más utilizados en los sistemas de microencapsulación son proteínas (por ejemplo, gluten, proteínas de suero, aislados), lípidos (por ejemplo, glicéridos, fosfolípidos, ceras) o carbohidratos (almidón y sus derivados, celulosa y sus derivados, entre otros) (Hoyos-Leyva *et al.*, 2016). Varios agentes de encapsulación (maltodextrina, proteínas, leche descremada reconstituida, inulina, almidón modificado, entre otros) se han utilizado para proteger a los probióticos de la deshidratación y daño térmico durante el secado por aspersión (Lapsiri *et al.*, 2012; Rajam *et al.*, 2012).

Actualmente existe interés en identificar nuevos agentes de encapsulación con propiedades físico-químicas similares o mejores (Bustamante *et al.*, 2017), una alternativa podría ser el uso de polisacáridos, por ejemplo, almidón de fuentes no convencionales.

2.3.2.1. Uso de carbohidratos en la encapsulación

Los carbohidratos o sacáridos se han utilizado ampliamente como materiales encapsulantes y su acción protectora se describe a continuación.

El almidón es un polisacárido formado principalmente por dos polímeros, amilosa y amilopectina constituidos por unidades de glucosa. La amilosa, un polímero lineal unido por un enlace glucosídico α -(1-4) y amilopectina, un polímero ramificado de glucosa unido por un enlace glucosídico α -(1-4) y un enlace glucosídico α -(1-6) en sus puntos de ramificación (Figura 4). El almidón resistente es el almidón que no es digerido por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado, y por

lo tanto llega al colon donde puede ser utilizado por las bacterias (Burgain *et al.*, 2011). Además, es una superficie ideal para la adhesión de células probióticas a gránulos de almidón, lo que puede mejorar la entrega de probióticos al tracto intestinal en un estado viable y metabólicamente activo (Anal & Singh *et al.*, 2007). El almidón resistente se subdivide en cinco tipos, los cuales se describen a continuación. El tipo 1, que consiste en gránulos de almidón rodeados por una matriz no digerible, es un almidón físicamente no disponible; almidón tipo 2 caracterizado por gránulos de almidón que son resistentes a la digestión enzimática, debido a que su estructura compacta de gránulo (crudo) limita su disponibilidad a las enzimas digestivas; almidón tipo 3, es almidón retrogradado, formado durante el enfriamiento del almidón procesado. La formación de este almidón se debe principalmente a la reorganización de la amilosa proveniente de un proceso de gelatinización (amilosa retrogradada); al almidón modificado químicamente es del tipo 4, donde se forman nuevos enlaces químicos como resultado de la esterificación, eterificación, entrecruzamiento, entre otros, y no pueden degradarse porque el proceso de modificación hace que la estructura no sea digerible por las amilasas; Finalmente, el almidón resistente tipo 5, que consiste en complejos de lípido-amilosa formados cuando la amilosa interactúa con los ácidos grasos (Villaruel *et al.*, 2018; Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2010).

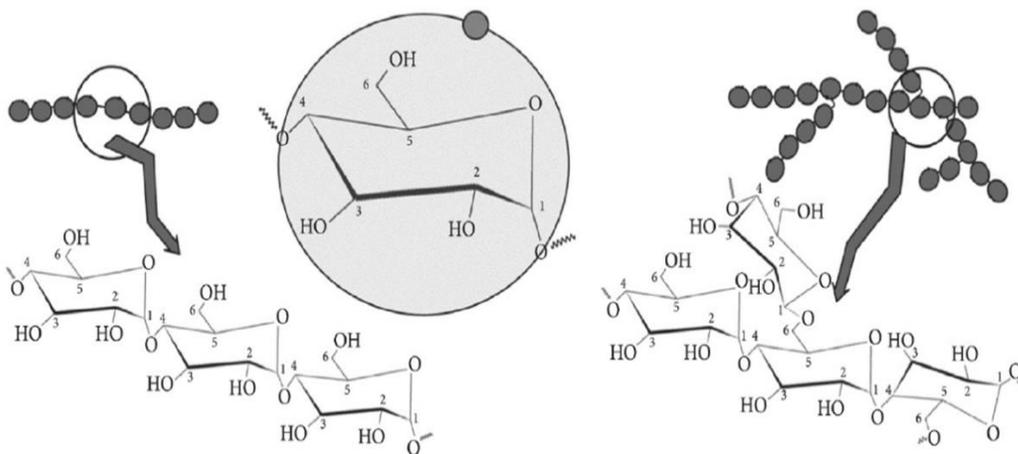


Figura 4. Estructura básica de unidades de glucosa, amilosa y amilopectina (Modificada de Alcázar-Alay & Meireles, 2015).

El almidón (biopolímero) se ha utilizado como material de encapsulación para proteger compuestos como vitaminas, lípidos, aceites esenciales, sabores, fármacos, pigmentos, polifenoles, herbicidas, proteínas, microorganismos y probióticos. El uso extendido de almidón para microencapsulación se basa en su alta disponibilidad, bajo costo y sus diversas funcionalidades (por ejemplo, retención de agua y modificación de la viscosidad). Se han reportado varios procesos para la microencapsulación con almidón, incluido el secado por aspersión, la extrusión, el secado por congelación, la coacervación, el revestimiento de lecho fluidizado y la inclusión molecular, siendo el secado por aspersión el proceso más común (Figura 5) (Hoyos-Leyva *et al.*, 2016).

Además, el almidón resistente se ha utilizado eficientemente para la protección de microorganismos contra condiciones extremas de procesamiento, como por ejemplo altas temperaturas y choque térmico, con buenos resultados en la viabilidad de las células (Nunes *et al.*, 2018; Ashwar *et al.*, 2018; Muhammad *et al.*, 2017).

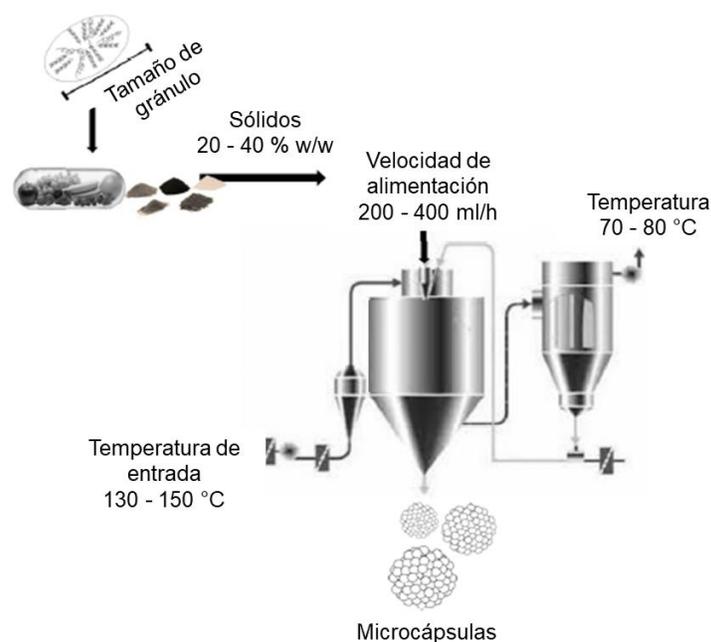


Figura 5. Formación de microcápsulas mediante secado por aspersión de granulos de almidón (Modificada de Hoyos-Leyva *et al.*, 2016).

En términos de los mecanismos asociados con la encapsulación de ingredientes activos en gránulos de almidón, una serie de factores contribuirán a la asociación y liberación. Éstos incluyen, el tipo de almidón: origen botánico, tamaño y forma de los gránulos, porosidad y composición (especialmente la proporción de amilosa-amilopectina y contenido de lípidos) (Qi & Tester, 2019). El tamaño de los gránulos de almidón tiene impacto en la formación de la microcápsula, entre más pequeño permite un empaque compacto, convirtiéndose en una estructura optimizada para maximizar la retención de compuestos activos, así como para minimizar el ablandamiento y la ruptura durante el procesamiento (Figura 6) (Hoyos-Leyva *et al.*, 2016).

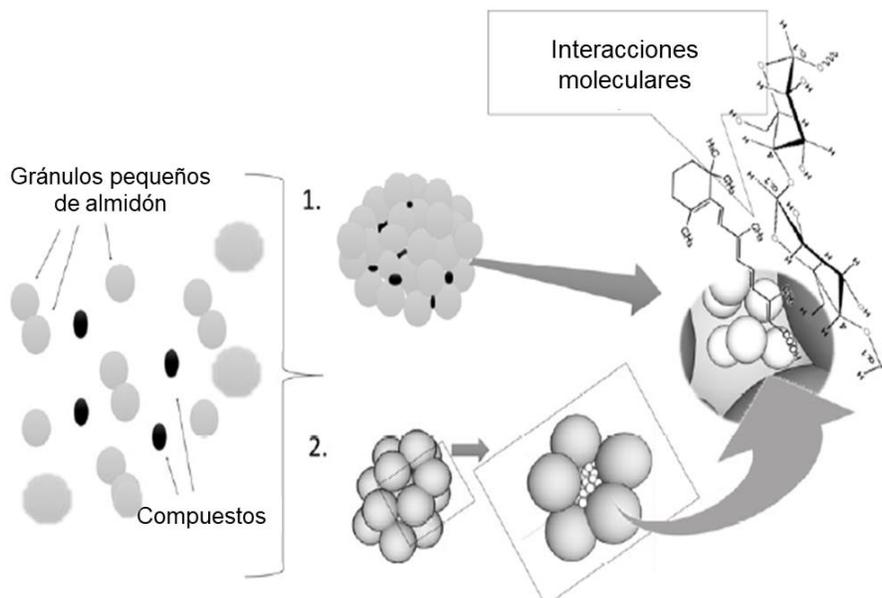


Figura 6. Diferentes tamaños de almidón y su mecanismo de retención hipotético (Modificada de Hoyos-Leyva *et al.* 2016).

Para la formación de la microcápsula, las moléculas interactúan entre sí y con otras moléculas a través de una variedad de interacciones físicas y químicas (Figura 7). Estas interacciones son responsables de mantener unidos los sistemas basados en biopolímeros y determinar la forma en que responden a los cambios en las condiciones ambientales y de la solución, por ejemplo, si las estructuras permanecen intactas, se hinchan, contraen, erosionan o se desintegran.

Comprender la naturaleza de estas interacciones y los factores que las afectan es esencial para diseñar sistemas con atributos funcionales específicos (McClements, 2014).

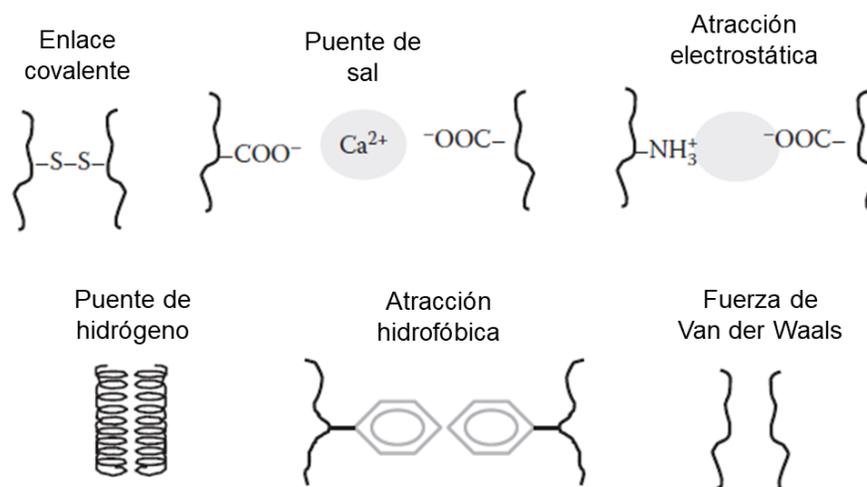


Figura 7. Interacciones moleculares de los materiales encapsulantes (Modificada de McClements, 2014).

Los almidones disponibles comercialmente, por ejemplo, de maíz, papa, trigo y arroz se han utilizado como material de pared para la microencapsulación, siendo los más utilizados en la industria los provenientes de maíz y papa. Además, se han propuesto para la microencapsulación de varios compuestos bioactivos otras fuentes de almidón no convencionales como almidón de amaranto, quinoa, tapioca, entre otros (Santana *et al.*, 2014).

Por otro lado, los sacáridos de bajo peso molecular también proveen protección a los microorganismos. De acuerdo a la teoría de reemplazo y ligación del agua, mono y disacáridos interactúan con las cabezas de los fosfolípidos, como la manosa y trehalosa; polisacáridos de bajo peso con estructura rígida, como las dextrinas, interactúan con los fosfolípidos sin entrar entre las cabezas de los mismos; y polisacáridos de bajo peso con estructura flexible, pueden interactuar con los fosfolípidos e incluso ocupar espacios entre ellos, como la inulina. Los mecanismos pueden deberse a la exclusión estérica: el soluto ocupa más espacio que una molécula de agua y tiene un ajuste geométrico más pobre que el agua en

las superficies de proteínas o membranas, o a la estructuración del agua: el soluto se une mejor al agua que a otros solutos, y mejora la unión de hidrógeno agua-agua más allá de la capa de hidratación inmediata del soluto, modificando la temperatura de transición de la membrana (Burgain *et al.*, 2011; Santivarangkna *et al.*, 2008).

2.3.2.1.1. Almidón de fuentes no convencionales

El almidón representa una fracción significativa en una gran variedad de cultivos. Las legumbres como el garbanzo, frijol, chícharo y haba tienen un contenido de almidón de 25 a 50% y son consideradas como alternativas no convencionales (Santana *et al.*, 2014). Los almidones de diferentes fuentes botánicas varían en el tamaño del gránulo y composición (porcentaje de almidón resistente, amilosa y amilopectina), y estos factores influyen en las propiedades físicas y usos finales de los diferentes almidones (Qi & Tester, 2019). El Cuadro 4, muestra la composición de algunas leguminosas, en donde se puede observar que el almidón de haba destaca por su mayor contenido de almidón resistente, mayor contenido de amilosa y pequeño tamaño de gránulo, por lo que podría ser utilizado como material de pared en la microencapsulación como alternativa no convencional.

Cuadro 4. Composición del almidón y gránulos de algunas leguminosas.

Leguminosa	Almidón,%	Almidón resistente, %	Amilosa, %	Amilopectina,%	Tamaño de gránulo, µm
Lenteja (<i>Lens culinaris</i>)	52	7-10	33	67	14-32
Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	50	6	41	59	17-28
Haba (<i>Vicia faba L.</i>)	35-45	12	40	60	16-22
Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	35	6	25	75	-
Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	20-40	7-8	27-36	64-73	12-45

Jeong *et al.* (2019); Chávez-Murillo *et al.* (2018); Ma *et al.* (2018); Karaman *et al.* (2017); Santana *et al.* (2014); Joshi *et al.* (2013).

2.3.2.1.1.1. Almidón de haba

Las habas tienen un contenido de 45 a 55% (peso seco) de carbohidratos, siendo el almidón el componente principal de esta fracción (35 - 45%, peso seco). El almidón de haba contiene más amilosa con relación a los cereales, siendo esta la razón de sus propiedades fisicoquímicas (naturalmente más resistentes, a factores como temperatura o la digestión, baja viscosidad, entre otros). Además, el almidón de haba contiene pequeñas cantidades de nitrógeno, compuestos minerales, y de lípidos. Presenta una temperatura más alta de gelatinización en comparación con el almidón de trigo o papa, la solubilidad y el poder de hinchamiento a 95 °C es mayor que el del trigo o el almidón de maíz (Fornal *et al.*, 1985).

Debido a que el uso de almidones nativos presenta limitaciones funcionales, una solución es modificar los almidones utilizando métodos químicos, físicos y/o enzimáticos para mejorar sus propiedades (Li *et al.*, 2019).

2.3.2.2. Modificaciones de los almidones

Una modificación es el resultado de un tratamiento usado para cambiar una o más propiedades del almidón nativo. Puede modificarse utilizando métodos químicos o físicos (Cuadro 5). Dichas modificaciones mejoran su funcionalidad (como la capacidad de hinchamiento, viscosidad, solubilidad y temperatura de gelatinización) e incrementan los rendimientos en la microencapsulación de compuestos (Sjöö & Nilsson, 2017). Las modificaciones químicas incluyen procesos como la conversión, ligaciones cruzadas o sustitución y este tipo de almidones son usados en la estabilización de emulsiones y encapsulación, siendo la succinatación para la obtención de almidón octenilsuccinato (almidón OSA), una de las modificaciones químicas más comunes. Los almidones OSA pueden retener y encapsular microorganismos, pigmentos, proteínas, sabores, entre otros compuestos (Hoyos-Leyva *et al.*, 2016). Además, tienen grandes ventajas ya que presentan alta capacidad emulsionante y espesante, buena tolerancia a condiciones ambientales adversas a través de la estabilización estérica, y puede proteger ingredientes naturales contra la oxidación y el proceso de digestión. Y otra ventaja del almidón OSA es que puede usarse directamente como material de pared para la encapsulación de compuestos bioactivos (Fang *et al.*, 2019).

Cuadro 5. Modificaciones físicas y químicas del almidón.

Modificación	
Física	Química
Gelatinización	Conversión
Tratamiento por humedad y calor	Sustitución
Tratamiento de presión osmótica	Ligaciones cruzadas
Tratamiento ultrasónico	
Tratamiento de altas presiones	
Campo eléctrico pulsado	
Extrusión	
Microondas	
Congelación y descongelación	

Modificado de Sjöö & Nilsson (2017).

2.3.2.2.1. Almidones succinatados

Los ésteres de almidón succinato (almidones OSA) se obtienen por reacción alcalina de anhídridos alquenilsuccínicos con almidón granulado en suspensión acuosa. El almidón modificado con OSA obtiene una actividad superficial específica incorporando los grupos alquenilo lipófilos de OSA en la molécula de almidón hidrófilo, que es la porción lineal de la amilosa y la porción ramificada de la amilopectina. Por lo tanto, la modificación del almidón con OSA da como resultado propiedades estabilizadoras, interfaciales, térmicas, reológicas, y puede usarse en la encapsulación como material de pared (García-Gurrola *et al.*, 2019; No & Shin, 2019).

El almidón OSA proporciona una alta estabilidad de la emulsión producida por la formación de una película fuerte en la interfaz aceite-agua, y evita la aglomeración de gotas de aceite. A diferencia de los emulsionantes comunes, el almidón OSA está compuesto de gránulos de color blanco sin sabor, y su capacidad como estabilizador de emulsión no afecta la concentración de iones de hidrógeno y la fuerza iónica del medio dispersado (García-Gurrola *et al.*, 2019; No & Shin, 2019).

Se han utilizado soluciones acuosas de almidón OSA para estabilizar concentrados de sabor en bebidas, salsas de aceite y encapsular sabor, aroma y vitaminas en formulaciones secadas por aspersion. La Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) ha permitido el tratamiento con un máximo de 3% de almidón OSA para aplicaciones alimentarias (grado de sustitución 0.02) (Ovando-Martinez *et al.*, 2017).

Algunos de los almidones que han sido utilizados para la obtención de almidones OSA son los siguientes: maíz (nativo, alto en amilosa, alto en amilopectina), trigo, papa, cebada, arroz, plátano verde, amaranto, quinoa, lenteja, frijol entre otros (Zhu, 2017; Sweedman *et al.*, 2013).

Bao *et al.* (2003) estudiaron las propiedades físicas de los almidones OSA obtenidos a partir de almidones de arroz, trigo y papa. Los almidones OSA de arroz y trigo presentaron un pico de viscosidad más alto, en relación con el almidón nativo. La temperatura de gelatinización se comportó de manera diferente para cada fuente de almidón (para el almidón OSA de arroz fue menor cuando menor era el grado de sustitución; para el almidón OSA de trigo la temperatura fue ligeramente más baja incluso con un grado de sustitución alto, y el almidón OSA de papa presentó una temperatura mayor que el almidón nativo). La entalpía de todos los almidones OSA disminuyó gradualmente con el aumento del grado de sustitución. Ovando-Martinez *et al.* (2017) y Simsek *et al.* (2015) evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los almidones OSA de maíz, tapioca, arroz, papa y trigo, encontrando que sus características de emulsificación, digestibilidad, microestructura, tamaño de partícula, potencial zeta (ζ), capacidad de hinchamiento, textura y propiedades térmicas difieren para cada fuente botánica. Estos estudios mostraron que la magnitud de los cambios en las propiedades físicas de los almidones modificados con OSA dependía no solo del grado de sustitución, sino también del origen de donde sea extraído el almidón nativo. Por lo que es importante determinar el efecto de este tipo de modificación en los almidones de diferentes fuentes, ya que cada tipo de almidón tiene diferentes propiedades morfológicas, estructurales y fisicoquímicas.

2.3.2.3. Energía de microondas para la obtención de almidón modificado

Las microondas son ondas electromagnéticas con frecuencias en el rango de 300 MHz a 300 GHz y longitudes de onda en el rango de 1 mm a 1 m. El tratamiento con microondas es un método de calentamiento térmico ampliamente utilizado en la industria alimentaria a una frecuencia de 915 MHz o 2450 MHz (Tao *et al.*, 2020). El campo eléctrico de radiación de microondas vibra alrededor de 4.9×10^9 veces por segundo, lo que hace que las moléculas polares y los iones se reorganicen continuamente, se friccionen y colisionen con las moléculas circundantes a través de inducción electromagnética y, por lo tanto, generen energía térmica (Tao *et al.*, 2020; Lewicka *et al.*, 2015; Braşoveanu & Nemţanu, 2013).

El almidón es un polímero macromolecular y su respuesta principal a las microondas es la polarización dipolar. Debido a la estructura molecular de cadena larga y la estructura espacial del almidón, el fenómeno de polarización del almidón es indistinto, lo que lleva a parámetros dieléctricos extremadamente bajos del almidón con bajo contenido de humedad. Cuando el almidón se mezcla con pequeñas moléculas polares como el agua, el mecanismo de polarización de la suspensión del almidón puede cambiar, dando como resultado variaciones en las propiedades dieléctricas (Tao *et al.*, 2020). En comparación con el calentamiento tradicional por conducción, muestras de almidón sometidas a calentamiento por microondas tuvieron una respuesta dieléctrica más fuerte y por ende calentamiento rápido (Fan *et al.*, 2017), lo que demuestra que existe una alta interacción entre las microondas y muestras de almidón. El calentamiento por microondas puede traer cambios significativos en las propiedades reológicas del almidón, especialmente, reduciendo su viscosidad (Lewicka *et al.*, 2015).

Por otro lado, la energía de microondas se ha utilizado para modificar almidones nativos, para mejorar sus características funcionales. Los almidones modificados por diversos métodos (físicos, químicos o enzimáticos) se utilizan ampliamente en la industria alimentaria como espesantes, estabilizadores y otros tipos de aditivos alimentarios. La energía de microondas se ha usado para hidrolizar almidón de diferentes fuentes, por ejemplo, almidón de maíz (Zhong *et al.*, 2019; Wang *et al.*,

2019), arroz (Guo *et al.*, 2019), papa (Kumar *et al.*, 2020), lenteja (González & Pérez, 2002), chícharo (Zhou *et al.*, 2019), entre otros. También, esta tecnología se ha usado para la esterificación mediante anhídrido octenil succínico de almidón de maíz (Tong *et al.*, 2019) y almidón de yuca (Jyothi *et al.*, 2005), así como para esterificación y acetilación de almidón de maíz (Lu *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2018; Shogren & Biswas, 2006).

La respuesta de microondas de un sistema de almidón está relacionada principalmente con la energía de microondas de entrada y las propiedades dieléctricas del sistema. Debido a los bajos parámetros dieléctricos del almidón nativo como se mencionó anteriormente (<10% de humedad), las microondas tienen poco efecto directo sobre la estructura del almidón a través de su acción sobre el propio almidón. La única excepción es el uso de irradiación a largo plazo de alta potencia mediante microondas fuertes, que puede provocar un sobrecalentamiento local y, por lo tanto, la carbonización del almidón nativo, lo que da como resultado la generación de radicales y escisiones de cadenas moleculares. Sin embargo, existen factores como el tipo de almidón, el contenido de humedad (actividad del agua, distribución del agua) y la temperatura que afectarán conjuntamente las propiedades dieléctricas del sistema (Braşoveanu & Nemţanu, 2013). Debido a los efectos sinérgicos de estos factores, las microondas pueden inducir indirectamente una serie de cambios en la morfología y estructuras internas de los gránulos de almidón. Por lo que, mediante la aplicación de esta tecnología se pretende obtener un material compuesto de almidón resistente-OSA, mono y oligosacáridos. Los cuales proveerán protección térmica al microorganismo probiótico, por su interacción con la membrana y pared celular así como formación de una cápsula de almidón resistente.

III. Justificación

La demanda de alimentos ha cambiado de una dieta que proporcionaba energía a una dieta con un perfil de nutrientes equilibrado y que confiera beneficios a la salud, dentro de ellos se encuentran los alimentos probióticos. Éstos pueden mejorar diferentes afecciones como disbiosis, resistencia a patógenos, prevención de trastornos gastrointestinales y modulación de la respuesta inmunológica. La incorporación de probióticos en diferentes matrices de alimentos podría representar un gran desafío ya que diferentes especies muestran distintas sensibilidades a la acidez, temperatura, humedad, entre otras.

Por otro lado, el consumo de productos cárnicos cocidos como la salchicha ha incrementado en los últimos años, por lo que es de gran interés el desarrollo de un producto cárnico probiótico de este tipo. La temperatura de cocción en el proceso de elaboración de una salchicha es el punto crítico para la elección del microorganismo.

Lactobacillus rhamnosus GG es uno de los microorganismos probióticos que tienen gran relevancia en la industria de alimentos debido a sus efectos benéficos a la salud. Sin embargo, para asegurar su sobrevivencia se pueden utilizar métodos de encapsulación con materiales que provean protección para aumentar su viabilidad, en este contexto, el uso de biopolímeros como el almidón es común en las tecnologías de encapsulación. Actualmente se buscan nuevas alternativas de fuentes de almidón que provean las características necesarias para llevar a cabo de manera efectiva la encapsulación. El almidón de haba es una fuente con alto potencial para ser utilizada por su composición rica en amilosa, contenido de almidón resistente y tamaño de gránulo. Además, para mejorar sus características fisicoquímicas, se pueden realizar modificaciones al almidón nativo usando tecnologías emergentes. El uso de energía de microondas permitirá la obtención de un material con características anfífilas y de baja viscosidad, mejorando sus propiedades de pared. Por lo que la encapsulación con almidón modificado de haba proveerá protección al microorganismo probiótico para su aplicación en la elaboración de una salchicha.

IV. Hipótesis

El uso de energía de microondas en almidón bajo condiciones ácidas permitirá la obtención de un material altamente hidrolizado en un periodo corto de tiempo, debido a que cuando el almidón se mezcla con moléculas polares, como el agua y el ácido, las propiedades dieléctricas del sistema cambian, provocando movimiento en las moléculas que presentan dipolo eléctrico y por fricción generan calor rápidamente; este incremento de temperatura y presencia de un ácido fuerte acelera la hidrólisis del almidón. Además, mediante la energía de microondas se llevará a cabo la esterificación del almidón hidrolizado con anhídrido octenil succínico, esto permitirá la obtención de un material con mayor estabilidad, debido a los enlaces éster formados, así como la presencia de compuestos remanentes derivados de la hidrólisis del almidón (azúcares reductores). El material de microencapsulación proveerá mayor protección al microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* GG, favoreciendo su sobrevivencia en salchicha cocida.

V. Objetivos

5.1. Objetivo general

Obtener un material encapsulante a partir de almidón de haba modificado por energía de microondas que provea protección térmica al microorganismo *Lactobacillus rhamnosus GG* para su incorporación en un producto cárnico cocido (salchicha).

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar las propiedades funcionales del almidón de haba hidrolizado y esterificado usando la tecnología de microondas.
- Evaluar la aplicación del almidón modificado por microondas en la encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus GG* mediante secado por aspersión.
- Desarrollar un producto cárnico cocido (salchicha) con la adición de *Lactobacillus rhamnosus GG* encapsulado con almidón modificado de haba.
- Evaluar *in vitro* la sobrevivencia al tracto gastrointestinal de *Lactobacillus rhamnosus GG* incorporado en salchicha.
- Evaluar la vida de anaquel de la salchicha con la adición de *Lactobacillus rhamnosus GG* encapsulado con almidón modificado de haba.

VI. Metodología

A continuación, se muestra un diagrama general de trabajo, el cual se describirá en los puntos siguientes (Figura 8).

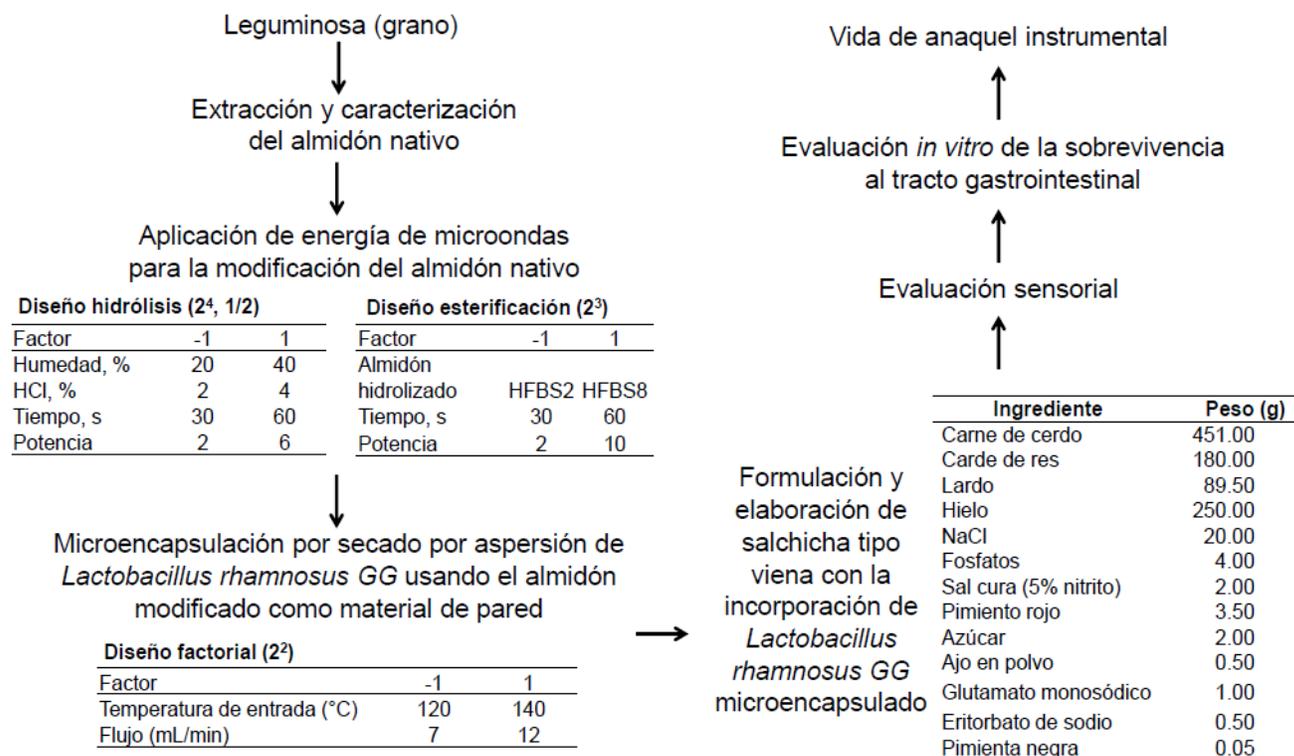


Figura 8. Diagrama de trabajo.

6.1. Extracción del almidón de haba

Los granos de leguminosa se molieron en un molino granulador con sistema de cuchillas y malla integrada para la obtención de un polvo fino (harina). La extracción del almidón se realizó mediante lo descrito por Li *et al.* (2019) con algunas modificaciones. La harina (~ 300 g) se suspendió en 750 mL de agua destilada y se agitó durante 1 h. Después, el sobrenadante fue decantado cuidadosamente, la capa de proteína en la parte superior del precipitado se eliminó manualmente con una espátula, esta etapa de eliminación de proteínas se repitió dos veces. El sedimento se resuspendió en 600 mL de agua destilada, seguido de la adición de NaOH 0.5 M y agitación durante 1 h para solubilizar las proteínas restantes. La suspensión se dejó reposar 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una molienda húmeda con un molino de piedras

(FUMASA), la suspensión obtenida fue tamizada en mallas de 30, 100 y 200 standard sieve (U.S.) y los residuos retenidos en cada malla se lavaron con agua para recuperar la mayor parte de almidón, en esta etapa se logró la separación de fibra y proteínas solubles. El almidón se dejó reposar toda la noche a 5 °C con bisulfito de sodio al 0.2 %, se retiró el sobrenadante y se secó el residuo (almidón nativo) a 40 °C en un horno de convección durante 24 h. El almidón seco se molió y tamizó en malla 100 (U.S.).

6.1.1. Caracterización del almidón de haba

6.1.1.1. Análisis proximal

Las determinaciones de humedad (925.09), proteína (979.09), grasa (923.05) y cenizas (923.03) se realizaron de acuerdo a lo descrito en la AOAC (2000).

6.1.1.2. Contenido de almidón resistente

La concentración de almidón resistente se realizó mediante un kit enzimático de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Megazyme K-RSTAR).

6.1.1.3. Contenido de amilosa y amilopectina

El contenido de amilosa y amilopectina se realizó mediante un kit enzimático de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Megazyme K-AMYL).

6.1.1.4. Perfil de viscosidad

El perfil de viscosidad se evaluó usando un equipo Rapid Visco Analyzer (RVA) modelo Super 4 (Newport Scientific PTY Ltd., Sydney, Australia). Pesar 2 g de muestra (BS) y añadir 28 mL de agua destilada. Las mediciones se realizaron según las especificaciones del método AACC 61-02 (1999). La temperatura inicial (50 °C) se mantuvo durante 1 min y luego se aumentó a 92 °C a una velocidad de calentamiento de 5.5 °C/min. Cuando se alcanza la temperatura especificada, esta temperatura permanece constante durante 5 minutos; el enfriamiento se realizó a la misma velocidad de calentamiento hasta alcanzar una temperatura final de 50 °C, mantenida durante 2 min. La duración total de corrida fue de 23 min. Los resultados obtenidos del equipo se expresaron en unidades de viscosidad (cP).

6.1.1.5. Microscopía electrónica de barrido

La morfología de los gránulos de almidón se analizó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM, S-4700, Hitachi, Japón). Se

montó una gota de polvo en una oblea de silicio y se dejó secar en un desecador; posteriormente, la oblea se montó con cinta adhesiva doble cara de grafito y se recubrió con oro por pulverización catódica a un tiempo de exposición de 60s antes de la observación a diversos aumentos.

6.1.1.6. Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas se realizaron mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC Mettler Toledo, modelo 821). Pesar 3 mg de muestra molida con un tamaño de partícula de 250 μm (tamiz de malla 60) y agregar 7 mg de agua destilada en un crisol de aluminio de 40 μL , luego se sellaron herméticamente. Se colocó el crisol sobre el aparato y la muestra se calentó de 30 $^{\circ}\text{C}$ a 100 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A partir del gráfico de calor obtenido, se pudieron determinar los siguientes parámetros: temperatura inicial (T_0), temperatura final (T_c), temperatura más alta (T_p), así como entalpía de gelatinización (ΔH_G) (Narváez *et al.*, 2007).

6.2 Energía de microondas para la modificación del almidón de haba

La hidrólisis del almidón se llevó a cabo de la siguiente manera. Se utilizó un horno de microondas convencional (Panasonic NN-SB646S, China), la frecuencia de trabajo fue de 2450 MHz y la potencia eléctrica máxima fue de 1100 W. Se evaluó un diseño factorial fraccional (2^{4-1}) para la hidrólisis ácida. Los factores y niveles (nivel bajo, -1 y nivel alto, +1) utilizados fueron: humedad (M), 20 y 40%; concentración de ácido clorhídrico (A), 2 y 4%; tiempo (T), 30 y 60 s; y nivel de potencia (P), 2 y 6. El almidón nativo de haba se acondicionó a un contenido de humedad y concentración de HCl de acuerdo con la matriz de diseño (Cuadro 6), posteriormente se estabilizó por 12 h a 4 $^{\circ}\text{C}$. Las muestras de almidón se sometieron a los tratamientos de microondas mostrados en el Cuadro 6, se dejaron enfriar y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH al 2%, luego se secaron a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h, para ser procesadas en un molino (Krupps GX4100, Ciudad de México, México) y tamizadas con una malla 60 para obtener los almidones hidrolizados de haba (HFBS). Como control se realizó la hidrólisis mediante el método convencional de acuerdo a lo descrito por Murúa-Pagola *et al.* (2009). La muestra

hidrolizada se molió (Krups GX4100, Ciudad de México, México) y tamizó con una malla 60 para obtener el almidón hidrolizado por método convencional (CFBS).

Cuadro 6. Matriz de diseño correspondiente al diseño factorial fraccional 2^{4-1} para la hidrólisis ácida del almidón por microondas.

Tratamientos	Humedad (M)	Concentración de ácido (A)	Tiempo (T)	Potencia (P)
HFBS1 20%M/2%A/30T/2P	-1	-1	-1	-1
HFBS2 40%M/2%A/30T/6P	1	-1	-1	1
HFBS3 20%M/4%A/30T/6P	-1	1	-1	1
HFBS4 40%M/4%A/30T/2P	1	1	-1	-1
HFBS5 20%M/2%A/60T/6P	-1	-1	1	1
HFBS6 40%M/2%A/60T/2P	1	-1	1	-1
HFBS7 20%M/4%A/60T/2P	-1	1	1	-1
HFBS8 40%M/4%A/60T/6P	1	1	1	1

Una vez determinado el mejor tratamiento para la hidrólisis del almidón, este material se sometió a la modificación química por microondas de acuerdo a la siguiente metodología. Se evaluó un diseño factorial fraccional (2^3) para la esterificación. Los factores y niveles (nivel bajo, -1 y nivel alto, +1) utilizados fueron: almidón HFBS2 y HFBS8; tiempo (T), 30 y 60 s; y nivel de potencia (P), 2 y 10. El almidón hidrolizado se solubilizó y se adicionó una concentración de 3% de reactivo anhídrido octenil succínico (OSA, base seca), posteriormente el pH se ajustó a 8.5 con una solución al 1% de NaOH. Las muestras de almidón se sometieron a los tratamientos de microondas de acuerdo a lo mostrado en el Cuadro 7, se dejaron enfriar y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH al 2%, luego se

secaron a 40 °C por 24 h, para ser procesadas en un molino (Krups GX4100, Ciudad de México, México) y tamizadas con una malla 60 para obtener los almidones modificados de haba (MFBS).

Cuadro 7. Matriz de diseño correspondiente al diseño factorial fraccional 2^3 para la modificación química del almidón por microondas.

Tratamientos	Almidón (HFBS)	Tiempo (T)	Potencia (P)
MFBS1	-1	-1	-1
MFBS2	1	-1	-1
MFBS3	-1	1	-1
MFBS4	1	1	-1
MFBS5	-1	-1	1
MFBS6	1	-1	1
MFBS7	-1	1	1
MFBS8	1	1	1

6.2.1. Caracterización del almidón hidrolizado y modificado

6.2.1.1. Concentración de almidón resistente

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.1.1.2.

6.2.1.2. Perfil de viscosidad

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.1.1.4.

6.2.1.3. Espectroscopia de transmisión de infrarrojo

Los espectros obtenidos mediante espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se realizaron con un espectrómetro Spectrum GX

(Perkin Elmer, MA, EE. UU.), con un accesorio de reflectancia difusa (modelo Pike Technology). Las muestras se prepararon moliéndolas finamente con KBr en una proporción de 1:100 (w/w) y se escanearon en un rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

6.2.1.4. Calorimetría diferencial de barrido

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.1.1.6.

6.2.1.5. Grado de sustitución

El grado de sustitución se determinó de acuerdo al método descrito por Kweon *et al.* (2001). La muestra de almidón-OSA (5 g, peso seco) se pesó y se le añadieron 25 mL de una solución 2.5 M HCl en alcohol isopropílico, la solución se dispersó con precisión agitando durante 30 min. Posteriormente se añadieron 100 mL de una solución acuosa de alcohol isopropílico al 90 % (v/v) y la suspensión se agitó durante 10 min adicionales. La suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y el residuo se lavó con una solución de alcohol isopropílico al 90 % hasta que ya no se pudo detectar Cl^- (usando una solución 0.1 M de AgNO_3). El almidón se volvió a dispersar en 300 mL de agua destilada, y luego la dispersión se llevó a ebullición durante 20 min. La solución de almidón se tituló con solución de NaOH estándar 0.1 M, usando fenolftaleína como indicador. Se valoró simultáneamente un blanco de almidón nativo. El grado de sustitución (GS) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de sustitución} = \frac{0.162 (V \times M) / W}{1 - (0.210 \times (V \times M) / W)}$$

Donde V es el volumen de la solución acuosa de hidróxido de sodio utilizado durante la titulación, M es la molaridad de la solución acuosa de hidróxido de sodio y W es el peso de la muestra.

La eficiencia de reacción (ER) se calculó mediante la siguiente ecuación: (GS obtenido/ GS teórico) x 100.

6.3. Encapsulación mediante secado por aspersión

La cepa de *L. rhamnosus* GG se resuspendió en 100 mL de caldo MRS y se incubó (Felisa®) a 37 °C durante el tiempo necesario hasta obtener una densidad óptica de aproximadamente 1 a una $\lambda = 600 \text{ nm}$, correspondiente a 10 logaritmos

de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (Log UFC/mL) de concentración. La microencapsulación se realizó utilizando un secador por aspersión (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290®). Cada suspensión bacteriana se centrifugó a 10,000 g durante 10 min, se realizaron dos lavados de peptona (0.5 %), finalmente el sedimento se resuspendió en 100 mL de una solución que contuviera el almidón-OSA, y se homogeneizó a 7,000 rpm durante 1 min (IKA® T18 digital ULTRA TURRAX®) (Murúa-Pagola *et al.*, 2009; Pérez-Chabela *et al.*, 2013a; Pérez-Chabela *et al.*, 2013b; de Mantos y *et al.*, 2019), como control se utilizó almidón modificado N-LOK® (Ingredión®). Se evaluó un diseño factorial (2²) para la microencapsulación del microorganismo. Los factores y niveles (nivel bajo, -1 y nivel alto, +1) utilizados fueron: Temperatura de entrada, 120 y 140 °C; y flujo, 7 y 12 mL/min. El diámetro de boquilla de la tobera fue de 0.7 mm, y la suspensión de sólidos fue del 30 %. Los criterios de respuesta para la elección del mejor tratamiento fueron rendimiento y sobrevivencia. El porcentaje de rendimiento se calculó tomándose en cuenta los sólidos de la suspensión y los obtenidos después del secado por aspersión.

6.3.1. Recuento de bacterias y eficiencia de encapsulación

Para determinar la viabilidad celular, las células se liberaron completamente de las microcápsulas, rehidratando 1 g de las células encapsuladas en 9 mL de caldo MRS y utilizando un vortex. Se llevaron a cabo las diluciones pertinentes para el recuento en placa de agar MRS (incubadas a 37 °C durante 24 h, bajo condiciones de anaerobiosis), reportando las unidades formadoras de colonias por mililitro (Gómez-Mascaraque *et al.*, 2017; Pérez-Chabela *et al.*, 2013a). El número de células viables antes (N₀) y después del secado (N) se evaluó y expresó como eficiencia de encapsulación (EE): % EE= (N/N₀) x 100 (Rajam *et al.*, 2015).

6.3.2. Caracterización de las microcápsulas

6.3.2.1. Actividad de agua

El contenido de agua de las microcápsulas se determinó utilizando un instrumento de actividad de agua (AquaLab, Pawkit, Decagon®).

6.3.2.2. Microscopía electrónica de barrido

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.1.1.5.

6.3.2.3. Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas se realizaron mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC Mettler Toledo, modelo 821). Pesar 3 mg de muestra y 7 mg de agua destilada en un crisol de aluminio de 40 μ L y luego sellar herméticamente. Se colocó el crisol sobre el equipo; la muestra se calentó de 30 a 200 °C, a una velocidad de 10 °C/min. Del termograma obtenido se determinó la temperatura de fusión de las microcápsulas (T_f).

6.4. Formulación y elaboración de salchicha tipo Viena

La elaboración de la salchicha se realizó a partir de una formulación tradicional de salchicha tipo Viena (Cuadro 8). Se compró carne de res y cerdo magra, eliminando la grasa visible y el tejido conjuntivo. La carne se molió a través de una placa de 0.42 cm en una picadora de carne Torrey y se mezcló con NaCl, sal de curado (nitrito de sodio, 5% de NaNO_2) y una mezcla comercial de fosfatos (McCormick PESA), con la mitad del hielo total, durante 1 min. Se añadió el resto del hielo y la grasa congelada hasta la incorporación total de los ingredientes (1 min), controlando la temperatura de la mezcla por debajo de 12 °C, transcurrido el tiempo se añadieron los probióticos microencapsulados a la masa cárnica a una concentración de aproximadamente 10^8 UFC/mL y se mezcló durante un minuto. Se usó un lote sin la adición de probióticos como control. Las masas cárnicas se embutieron en envolturas de celulosa de 20 mm de diámetro y se cocinaron en baño de agua caliente (75 °C) hasta alcanzar una temperatura interna de 72 °C, posteriormente se enfriaron en baño de hielo, se desfundaron y empacaron al vacío con empaques semipermeables al oxígeno. Las salchichas se almacenaron a 4 ± 2 °C hasta su posterior análisis (Pérez-Chabela *et al.*, 2008).

Cuadro 8. Ingredientes que se emplearon en la elaboración de salchicha de cerdo tipo Viena.

Ingrediente	Peso (g)
Carne de cerdo	451.00
Carde de res	180.00
Lardo	89.50

Hielo	250.00
NaCl	20.00
Fosfatos	4.00
Sal cura (5% nitrito)	2.00
Pimiento rojo	3.50
Azúcar	2.00
Ajo en polvo	0.50
Glutamato monosódico	1.00
Eritorbato de sodio	0.50
Pimienta negra	0.05

6.4.1. Determinaciones en la salchicha tipo Viena

6.4.1.1. Análisis proximal

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.1.1.1.

6.4.1.2. Color y pH

Los parámetros de luminosidad (L^*), índice rojo-verde (a^*) e índice amarillo-azul (b^*) se midieron con un espectrocolorímetro MiniScan HunterLab (con Iluminante D65 a 10° del observador, tamaño de puerto de 31.8 mm y área de observación de 25 mm). Las muestras fueron molidas y la pasta se colocó en un vaso de vidrio (HunterLab Glass Sample) para su medición (AMSA, 2012). El pH y temperatura se determinó usando un potenciómetro HI 99163 (HANNA instruments Inc). Medidor calibrado a dos puntos, 4 y 7.

6.4.1.3. Textura

La muestra de salchicha se cortó en trozos 2 cm para realizar el análisis de perfil de textura mediante un texturómetro TA.XT-Plus (Texture Analyser®). Se usaron dos ciclos consecutivos de compresión (50%) con una sonda acrílica de 40 mm de diámetro a una velocidad de 1 mm/s con un periodo de espera de 5 s (Barragán *et al.*, 2019). Con las curvas obtenidas se calcularon los parámetros de dureza, cohesión y elasticidad.

6.4.1.4. Concentración de nitritos

La determinación de nitritos se realizó de acuerdo con lo especificado por la AOAC, método 973.31-1996.

6.4.1.5. Análisis microbiológico

Para los recuentos microbiológicos, se homogeneizaron asépticamente 10 g de muestra de salchicha en un recipiente estéril con 90 mL de agua con peptona (0.5 %) y se realizó la homogenización de la muestra mediante un equipo Stomacher (BagMixer®). Después se realizaron diluciones decimales pertinentes y se realizó recuento en placa, número más probable o presencia/ausencia con los medios correspondientes según sea el caso: mesófilos aerobios, agar para cuenta estándar (extracto de levadura, triptona, dextrosa, agar y agua) a $31 \pm 1^\circ\text{C}$; *Escherichia coli*, caldo bilis verde brillante y agar eosina azul de metileno a $37 \pm 1^\circ\text{C}$; *Listeria monocytogenes*, agar oxford y agar PALCAM a $37 \pm 1^\circ\text{C}$; *Salmonella* spp, caldo RVS, caldo MKTTn, agar XLD, agar ASB y agar verde brillante a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ y, lactobacilos, agar MRS a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (NOM-213-SSA1-2018).

6.4.1.6. Sobrevivencia a digestión *in vitro*

La simulación de las condiciones gastrointestinales se realizó de acuerdo con los métodos propuestos por Madureira *et al.* (2011), Falfán-Cortés *et al.* (2014), Kim *et al.* (2018), Poletto *et al.* (2019), de Mantos *et al.* (2019) y Hugues-Ayala *et al.* (2019), en donde las células libres o muestra de salchicha se sometieron a diferentes condiciones, simulando las secciones del tracto gastrointestinal: boca, 1 g de muestra se homogeneizó en 5 mL de saliva artificial (1.7 mL de NaCl (175 g/L), 290 mg de α -amilasa, 0.22 g/L CaCl_2 manteniendo un pH de 6.8) y se homogeneizó con un Stomacher (BagMixer®) durante 1 min para simular la masticación, se dejó a 37°C con agitación constante durante 4 min; esófago/estómago, a la muestra anterior se le añadieron 10 mL de fluido gástrico (18 mL de CaCl_2 di hidratado (22.2 g/L), 6.5 mL de HCl y 2.5 g de pepsina) ajustando el pH a 2 con HCl 1 M o NaOH 1 M, la muestra se agitó y se mantuvo a 37°C con agitación constante durante 90 min; duodeno: al medio anterior se le adicionó 10 mL de jugo intestinal (9 mL de CaCl_2 di hidratado (22.2 g/L), 6.3 mL KCl (89.6 g/L) y 9 g de pancreatina) y 5 mL de jugo biliar (68.3 mL de NaHCO_3 (84.7 g/L) y 15 g de bilis bovina) ajustando el pH a 5 con NaHCO_3 1 M o HCl 1 M, las muestras se agitaron y mantuvieron a 37°C con agitación constante durante 20 min; íleon: el pH fue ajustado a 7 con NaHCO_3 0.1 M y se incubó a 37°C con

agitación constante durante 90 min. Se realizó la toma de muestras para evaluar la sobrevivencia a los tiempos 0, 90 min (estómago), 110 min (duodeno) y 200 min (íleon), mediante el método de recuento en placa.

6.5. Evaluación sensorial

Se realizó el análisis sensorial (Categoría A: sin riesgo) con panelistas no entrenados (n=45) donde se evaluaron los siguientes atributos del producto: sabor, jugosidad, textura, cohesividad y apariencia general, mediante una escala hedónica de 9 puntos (Anexo I). Se reclutaron panelistas de una edad de 18 a 60 años de edad (hombres y mujeres) en la Universidad Autónoma de Querétaro que consumen regularmente productos cárnicos embutidos, se usaron posters para ayudar a reclutar a los panelistas (Anexo II). Antes de la evaluación se les proporcionó una carta de consentimiento informado (Anexo III).

Se garantizó la inocuidad del producto mediante análisis microbiológico (de acuerdo a la sección 6.4.1.5). Las muestras evaluadas se cortaron en trozos de aproximadamente 3 cm, se calentaron por 2 min y se presentaron sobre platos de unicel, cada panelista recibió las muestras, agua y una galleta sin sal. Si la salchicha no tenía buenas calificaciones se procedería a la reformulación.

También, se realizó una prueba triangular acorde a lo descrito por British Standard (BS ISO 4120:2004) para determinar si existía similitud entre las muestras de salchicha que tenían probióticos y la salchicha control que no tenían probióticos.

6.6. Vida de anaquel instrumental

Para la evaluación de la vida de anaquel las muestras recién preparadas fueron empacadas al vacío con un empaque no permeable al oxígeno, se mantuvieron en almacenamiento bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C por un periodo de 30 días. Se tomaron muestras a los días 0, 10, 20 y 30 días para su análisis.

6.6.1. Determinaciones

6.6.1.1. Color, pH y temperatura

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.4.1.2.

6.6.1.2. Textura

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.4.1.3.

6.6.1.3. Concentración de nitritos

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.4.1.4.

6.6.1.4. Análisis microbiológico

La metodología se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.4.1.5.

6.6.1.5. Oxidación lipídica

Para la determinación de la oxidación lipídica se pesaron 5 g de muestra, los cuales se homogenizaron en un baño de hielo mediante un homogeneizador IKA T25 Ultra Turrax (Alemania) con 20 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA), al 5% w/v durante 1 min. El homogenizado se centrifugó durante 20 min a 10,000 rpm, 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante se filtró con papel filtro Whatman No. 4, el filtrado se colectó en tubos protegidos de la luz y se almacenó a -20 °C, para su posterior análisis. La determinación de las especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) se realizó tomando 1 mL del extracto y se le adicionó 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 80 mM, se agitó y se sometió a un tratamiento térmico a 95 °C durante 30 min, se enfrió con baño de hielo y posteriormente se registró la absorbancia a 530 nm (Raharjo *et al.*, 1993). Los resultados fueron expresados como mg de malondialdehído (mg MDA)/kg de muestra, calculados a partir de una curva de calibración utilizando como estándar malondialdehído.

6.7. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados de acuerdo a las restricciones de los diseños. Para las variables que sigan una distribución normal se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, mientras que las variables que no siguieron una distribución normal fueron analizadas por medio de pruebas no paramétricas.

VII. Resultados y discusión

7.1 Composición del almidón nativo de haba

El rendimiento de extracción de almidón de las semillas de haba (*Vicia faba L.*) fue de 30-33%, similar a lo encontrado por Ambigaipalan *et al.* (2011) donde los autores reportan un rendimiento del 33%. Debido a la presencia de proteínas insolubles, fibra y minerales dentro de los gránulos de almidón, es difícil obtener almidón puro de las leguminosas. La pureza del almidón generalmente está influenciada por el método de extracción, en el presente trabajo se utilizó el método húmedo, el cual presenta un menor rendimiento, sin embargo, se logran obtener almidones con un mayor grado de pureza (Li *et al.*, 2019).

Los datos de la composición proximal del almidón nativo de haba (NFBS) se presentan en el Cuadro 9. En el contenido de humedad se obtuvo un valor de 8.3%, el cual está dentro del intervalo (7 - 15%) obtenido por almidones nativos de leguminosas. Así mismo, el contenido de cenizas fue 0.07% similar a lo reportado por Zhang *et al.* (2019) para semilla de haba. El contenido de proteína fue de 0.85% el cual está por arriba de lo reportado por Haasen & Shi (1991, 0.16 - 0.30%), Ambigaipalan *et al.* (2011, 0.38%) y Zhang *et al.* (2019, 0.30%) para haba. Otros autores como Hoover *et al.* (2010) reportan valores similares de proteína (0.33-0.83%) a los obtenidos en este trabajo para la misma leguminosa. Estas diferencias pueden deberse al método de extracción del almidón usado. Sin embargo, el alto contenido de proteína no afecta de manera negativa el uso del almidón nativo de haba. El valor relativamente alto de proteína de este trabajo podría ser importante debido a la posibilidad de formar complejos proteína - almidón lo cual tiene un efecto sobre la formación de almidón resistente (Sajilata *et al.*, 2006). Con relación al contenido de lípidos en este trabajo, se encontró que el almidón nativo tiene 2.04%, siendo más alto que lo reportado por Hoover *et al.* (2010, 0.08 - 1.40%). El contenido de lípidos en el almidón es de gran importancia debido a que se puede llevar a cabo la formación de un complejo amilosa - lípido

(almidón resistente tipo 5), y por lo tanto incrementarse el contenido de almidón resistente (Sajilata *et al.*, 2006). De manera general, el grado de pureza del almidón se califica de acuerdo a su composición de cenizas y proteína, almidones de alta pureza contienen solo 0.04-0.50% de proteína y 0.01–0.20% de cenizas (Li *et al.*, 2019); los resultados indican que el almidón obtenido de la semilla de haba tiene un grado de pureza alto, similar al de otras leguminosas.

Cuadro 9. Composición proximal del almidón nativo de haba*.

Almidón	Humedad, %	Cenizas, %	Grasa, %	Proteína, %
Haba (<i>Vicia faba L.</i>)	8.25±0.146	0.07±0.029	2.04±0.032	0.85±0.012

*Los resultados se expresan como la media ± DE, n= 3 replicaciones, base húmeda.

7.2 Caracterización del almidón nativo de haba y productos hidrolizados

La caracterización de NFBS, CFBS y HFBS se presenta en el Cuadro 10. Los resultados de NFBS fueron similares a los ya reportados anteriormente (Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Piecyk & Domian, 2021). Los contenidos de amilosa y almidón resistente mostraron valores de 38.3 y 12.8%, respectivamente. Se han reportado valores más bajos (de 25.8 a 33.6%) para amilosa y más altos para el almidón resistente (de 8.1 a 15.0%) en almidones aislados de diferentes cultivares de haba (Ambigaipalan *et al.*, 2011). Todos los ensayos realizados empleando energía de microondas (EM) y ácido clorhídrico (AC), incluido el CFBS, presentaron valores más bajos de amilosa y almidón resistente que el almidón nativo. El contenido de amilosa resultante tras la hidrólisis del almidón varía de acuerdo con la fuente de almidón y las condiciones de hidrólisis. Los conocimientos existentes sobre el tratamiento con microondas de almidones con contenidos de amilosa completamente diferentes al del presente trabajo, sugieren que la EM se transmite preferentemente a la región amorfa del gránulo de

almidón, y las regiones cristalinas se ven afectadas posteriormente (Wang & Copeland, 2015).

Las condiciones de hidrólisis del almidón de haba disminuyeron ligeramente la liberación de amilosa, aunque la aplicación de condiciones severas de humedad, concentración de ácido y energía de microondas (HFBS8) dio como resultado el mayor contenido de amilosa y menor almidón resistente. La hidrólisis ácida disminuye la viscosidad y aumenta la solubilidad. Además, cuando se aumenta el tiempo de reacción de la hidrólisis en almidón de maíz, la cristalinidad del almidón aumenta relativamente mientras que su contenido de amilosa disminuye (Atichokudomchai, Shobsngob, & Varavinit, 2000). El tratamiento hidroliza las zonas amorfas del almidón y existe un aumento relativo de las zonas cristalinas formadas mayoritariamente por amilopectina. El tratamiento con microondas redujo el grado de ramificación de la amilopectina en el almidón de semilla de loto, lo que condujo a la degradación de las cadenas lineales y a la reducción de las regiones cristalinas, lo que promovió aún más la formación de almidón resistente durante el enfriamiento (Zeng *et al.*, 2016). Amaya-Llano, Martínez-Bustos, Martínez Alegría, & Zazueta-Morales (2011) reportaron que la concentración de ácido de 1-3% redujo el contenido de amilosa de los almidones de jícama y maíz, sin embargo, un gran incremento (3-5%) eleva el contenido de amilosa de ambos almidones. Este aumento de amilosa se atribuyó al rápido grado de despolimerización de la amilopectina. Se observó que no hay diferencias significativas entre NFBS y CFBS en los índices de solubilidad y absorción, similar a lo reportado por Cruz-Benítez *et al.* (2019) para el almidón de yuca.

El tratamiento HFBS8 mostró las mayores diferencias debido a la clara despolimerización de los gránulos. Así, la solubilidad en agua se incrementó de 2.5 a 49.5%, lo que también puede ser corroborado por el aumento de los azúcares reductores hasta 4.7 g/L. Este comportamiento fue similar al reportado por González & Pérez (2002) en almidón de lenteja modificado por irradiación de microondas. El tratamiento HFBS8 fue capaz de retener el agua dentro de su estructura, tal vez debido al proceso de recristalización. Sin embargo, otra

posibilidad podría ser que este intenso tratamiento provocara cambios estructurales en las moléculas de amilopectina, lo que dio lugar a la formación de cadenas de amilopectina más largas debido a la fusión de los gránulos y expuso más grupos hidroxilos, aumentando así el poder de hinchamiento (Deka & Sit, 2016).

Para comprender el mecanismo del fenómeno de hidrólisis ácida mediante energía de microondas, se interpretan los resultados de las interacciones entre los factores para cada variable. Todos los efectos de las interacciones fueron estadísticamente significativos para cada variable de respuesta, excepto para almidón resistente e índice de absorción de agua en la interacción humedad con ácido (Figura 9, B-1 y D-1). Los efectos de las interacciones sobre la concentración de amilosa (Figura 9. A-1, 2 y 3), solubilidad (Figura 9. C-1, 2 y 3) y azúcares reductores (Figura 9. E-1, 2 y 3) muestran que sólo con una baja concentración de ácido, poco tiempo de tratamiento y un bajo nivel de potencia, cuando se modifica la humedad del 20 al 40%, no se produce un cambio estadístico. Este comportamiento podría deberse a que, a estos niveles, las moléculas no alcanzan un estado de excitación suficiente para modificar en gran medida la estructura del almidón (Kumar *et al.*, 2020). Mientras que, para niveles altos de cada factor, se observa que se produce una fuerte hidrólisis y, por tanto, un aumento de la amilosa, de la solubilidad y de los azúcares reductores.

Para los efectos de las interacciones significativas sobre almidón resistente (Figura 9. B-2 y 3), se observa que la humedad afecta su concentración sólo cuando $T= 60$ o $P= 2$. Se ha reportado que el contenido de almidón resistente disminuye dependiendo del grado de hidrólisis ácida y sus condiciones, es decir, temperatura, tiempo, tipo de ácido y concentración (Espinosa-Solis, Sánchez-Ambriz, Hamaker, & Bello-Pérez, 2011; Sajilata *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2019).

La interacción no significativa entre humedad y concentración de ácido (Figura 9. B-1) muestra que la concentración de almidón resistente disminuye cuando la humedad aumenta. Esta reducción es independiente del valor de la concentración de ácido, probablemente porque ambos factores pueden modificar el almidón. La

humedad mejora el movimiento molecular en condiciones de EM, escindiendo las cadenas de amilopectina y amilosa (Yang *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2019), mientras que el ácido puede modificar por sí mismo el almidón por la acción de los iones de hidrógeno que reaccionan con el átomo de oxígeno del enlace glicosídico α -(1,4) o α -(1,6) (Li *et al.*, 2017). Por lo tanto, ambos factores disminuyeron aditivamente el contenido de almidón resistente. Los niveles altos produjeron materiales con menor concentración, tal vez debido a la hidrólisis severa.

En cuanto a los efectos significativos de la interacción sobre la absorción de agua (Figura 9. D-2 y 3), se puede observar que cuando el contenido de humedad aumenta del 20 al 40%, la absorción de agua siempre aumenta, especialmente cuando T= 60 o P= 6. El efecto de interacción no significativo, correspondiente a humedad con ácido (Figura 9, D-1), muestra que la absorción de agua aumenta cuando se incrementa la humedad. Este aumento es independiente del valor de la concentración de ácido, probablemente debido a la ruptura de los gránulos de almidón causada por la modificación de ambos factores, lo que resulta en la exposición de más grupos hidroxilo que pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua, similar a lo observado por Li *et al.* (2019a).

Los almidones pueden presentar un patrón de hidrólisis en dos etapas: una tasa inicial rápida seguida de una tasa posterior más lenta. La tasa inicial relativamente rápida corresponde a la hidrólisis de las zonas amorfas dentro de los gránulos de almidón, mientras que el proceso lento se atribuye a la hidrólisis concomitante de las regiones amorfas y cristalinas. El primer paso de la hidrólisis está influenciado por el tamaño de las partículas, la porosidad de la superficie, el contenido de amilosa y el número de cadenas de amilosa-lípido. La segunda etapa de hidrólisis está influenciada por el contenido de amilopectina, la distribución de cadenas α -(1, 6) entre las láminas amorfas y cristalinas, y el grado de empaquetamiento de las dobles hélices dentro de los cristalitos (Wang & Copeland, 2015). Los resultados sugieren que con niveles bajos en cada factor se inicia la hidrólisis de las partes amorfas, mientras que, con niveles altos, puede ocurrir la hidrólisis de las regiones

amorfos y cristalinos. Algo similar se informó para el almidón de papa hidrolizado utilizando campo eléctrico inducido y HCl (Li *et al.*, 2017).

Cuadro 10. Caracterización del almidón nativo de haba y productos hidrolizados*.

Muestra	Amilosa, %	Almidón resistente, %	Índice de solubilidad en agua, %	Índice de absorción en agua, %	Azúcares reductores, g/L
NFBS	38.3 ± 2.63 ^b	12.8 ± 0.57 ^a	1.9 ± 0.36 ^f	2.5 ± 0.22 ^d	0.03 ± 0.020 ^e
CFBS	34.6 ± 0.68 ^{bc}	10.6 ± 1.21 ^{ab}	2.1 ± 0.09 ^f	2.7 ± 0.05 ^{cd}	0.09 ± 0.010 ^{de}
HFBS1	22.8 ± 3.04 ^f	11.8 ± 0.40 ^a	2.5 ± 0.13 ^{ef}	2.8 ± 0.16 ^{cd}	0.06 ± 0.025 ^e
HFBS2	31.1 ± 4.16 ^{cd}	8.6 ± 0.17 ^{bc}	8.3 ± 0.29 ^b	3.6 ± 0.48 ^b	0.58 ± 0.066 ^b
HFBS3	30.1 ± 1.99 ^{cde}	7.5 ± 1.27 ^{cd}	3.4 ± 0.75 ^{def}	2.8 ± 0.13 ^{cd}	0.33 ± 0.144 ^{cd}
HFBS4	27.3 ± 1.56 ^{def}	7.4 ± 0.70 ^{cd}	5.0 ± 0.52 ^{cd}	3.4 ± 0.15 ^{bc}	0.11 ± 0.031 ^{de}
HFBS5	31.4 ± 1.04 ^{cd}	8.7 ± 0.40 ^{bc}	4.1 ± 0.82 ^{cde}	2.7 ± 0.13 ^{cd}	0.23 ± 0.060 ^{de}
HFBS6	25.5 ± 0.70 ^{def}	6.1 ± 0.06 ^{de}	5.5 ± 0.58 ^c	3.5 ± 0.37 ^b	0.52 ± 0.113 ^{bc}
HFBS7	24.5 ± 1.66 ^{ef}	11.0 ± 1.44 ^a	3.0 ± 0.98 ^{ef}	2.8 ± 0.17 ^{cd}	0.13 ± 0.020 ^{de}
HFBS8	82.0 ± 2.05 ^a	4.7 ± 0.31 ^e	49.5 ± 0.93 ^a	4.3 ± 0.18 ^a	4.73 ± 0.147 ^a

NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS1- 20%H/2%A/30T/2P; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS3- 20%H/4%A/30T/6P; HFBS4- 40%H/4%A/30T/2P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS6- 40%H/2%A/60T/2P; HFBS7- 20%H/4%A/60T/2P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P. n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$). *Datos publicados en González-Mendoza *et al.*, 2022.

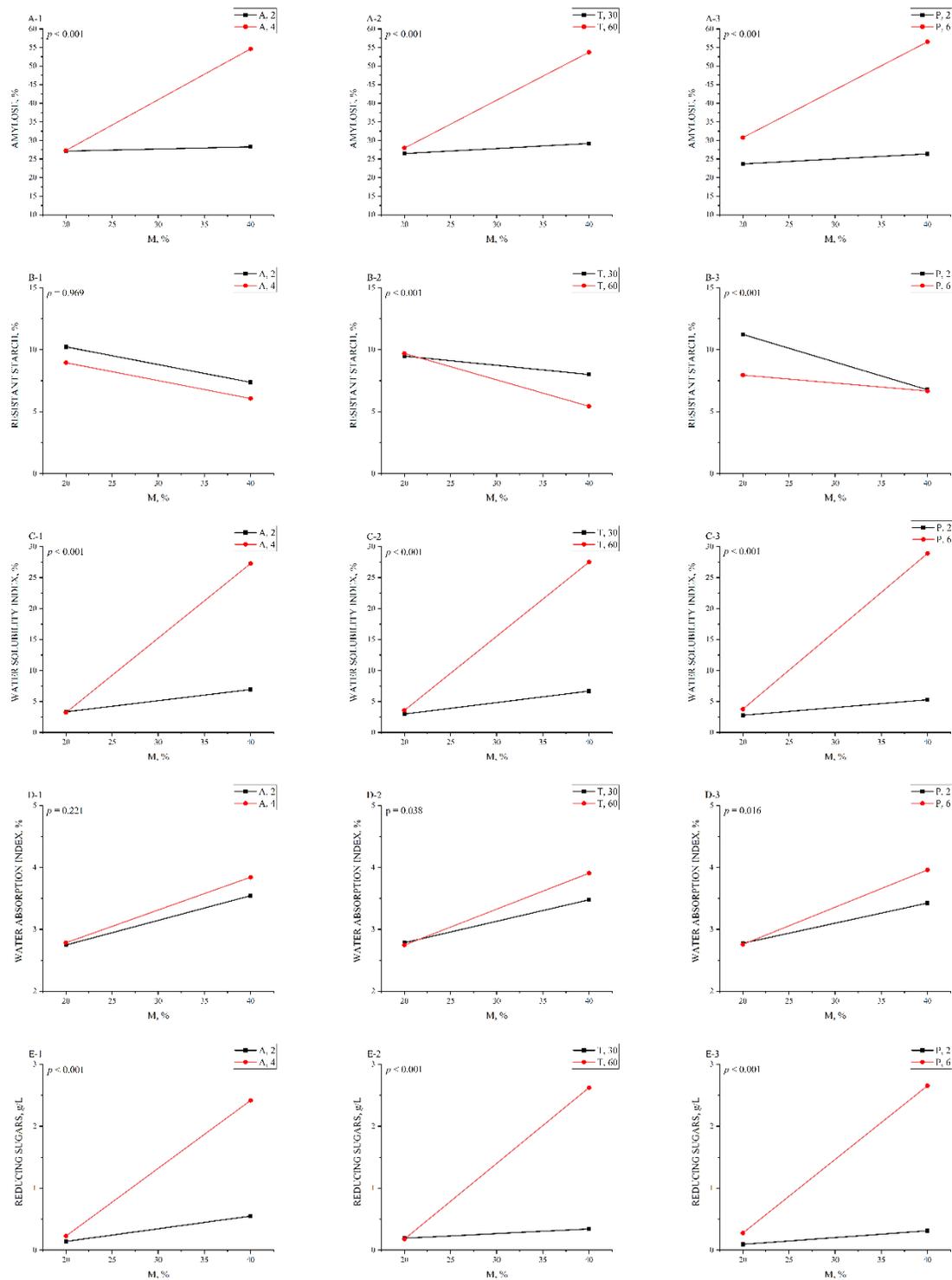


Figura 9. Gráficos de interacción de humedad (M) con concentración de ácido (A), humedad (M) con tiempo (T) y humedad (M) con nivel de potencia (P). Interacciones para amilosa (A-1, 2 y 3); Interacciones para almidón resistente (B-1,

2 y 3); Interacciones para índice de solubilidad en agua (C-1, 2 y 3); Interacciones para índice de absorción de agua (D-1, 2 y 3); Interacciones para azúcares reductores (E-1, 2 y 3).

7.2.1 Perfil de viscosidad del almidón nativo de haba y productos hidrolizados

El perfil de viscosidad de NFBS, CFBS y HFBS se muestra en la Figura 10 y los parámetros de pasta o de viscosidad en el Cuadro 11. En general, el almidón es hidrofílico en su estado inicial, poco soluble en agua fría y forma una pasta muy viscosa cuando se suspende en agua caliente. Cuando se aplican tratamientos hidrotérmicos a los almidones se pueden presentar fenómenos como la gelatinización, gelación y retrogradación. La gelatinización del almidón es la alteración del orden molecular que provoca cambios irreversibles en las propiedades, como la fusión de las regiones cristalinas, la pérdida de la birrefringencia y la disolución de las moléculas que forman el almidón. Después de la gelatinización, la amilosa y amilopectina pueden considerarse disueltas, durante el enfriamiento las moléculas tienden a reorganizarse e incrementar la rigidez de la solución, formando una red tridimensional mediante enlaces intermoleculares, este fenómeno se conoce como gelación. Es decir, la gelatinización debe anteceder a la gelificación. Finalmente, la retrogradación es la re-cristalización de las cadenas de amilosa y amilopectina dando lugar a un gel viscoelástico, firme y rígido, debido al reacomodo de las cadenas lineales de amilosa, y cuando el reposo es prolongado las cadenas de amilopectina también tenderán a alinearse (Sajilata *et al.*, 2006).

Los resultados de NFBS fueron similares a los reportados anteriormente por Ambigaipalan *et al.* (2011) para almidón de haba. Los parámetros de viscosidad de CFBS y HFBS con diversas condiciones de humedad, concentración de ácido y energía de microondas disminuyeron estadísticamente con respecto a NFBS. Los valores de viscosidad más bajos correspondieron a los almidones con la combinación de condiciones más severas de concentración de ácido y EM. El uso de EM en condiciones ácidas permitió la obtención de almidones con

características diferentes a otros almidones tratados con EM (Kumar *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2019a; Yang *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2019). Según Luo, He, Fu, Luo & Gao (2006), los patrones de viscosidad de los almidones cerosos y normales permanecieron inalterados, mientras que los almidones amilomaize V cambiaron en el tratamiento con microondas. Tras la irradiación con microondas, se observó un aumento de la temperatura de viscosidad y una disminución de la viscosidad de los tres almidones.

En un campo de microondas, los compuestos polares como las moléculas de agua y el HCl, vibran a muy alta frecuencia, y entonces la rápida fricción, colisión y vibración entre las moléculas de agua y los gránulos de almidón generan calor durante un corto período, lo que puede causar el daño físico de los gránulos de almidón y la degradación de las estructuras en un tiempo más corto (Li *et al.*, 2019a). Los materiales utilizados como encapsulantes para alimentos deben tener ciertas características, como biocompatibilidad, solubilidad en agua, propiedades emulsionantes, formación de película, y baja viscosidad a altas concentraciones. Asimismo, el uso de almidones con otras características deseables incluye alta amilosa y almidón resistente. La energía de microondas modificó las propiedades de viscosidad de los almidones de arroz cerosos y no cerosos que contenían un 20% de humedad (Anderson & Guraya, 2006).

En este trabajo, todos los almidones procesados con humedad, concentración de ácido y energía de microondas, disminuyeron sus propiedades de viscosidad, lo que indica que la severidad de los parámetros de procesamiento combinados dio lugar a una baja reagregación de los gránulos de almidón. Asimismo, los valores de caída disminuyeron, y el tratamiento HFBS8 mostró parámetros de viscosidad indetectables por RVA. Las variables de respuesta óptimas para el uso potencial como material de pared para la encapsulación por secado por aspersión fueron los almidones con el mayor índice de solubilidad, la menor viscosidad final y los almidones con diferente contenido de amilosa. El almidón con alto contenido de amilosa puede presentar un comportamiento de baja liberación, y el almidón con alto contenido de amilopectina puede ofrecer una alta estabilidad y protección del

material del núcleo (Hoyos-Leyva *et al.*, 2017). Por lo tanto, para el análisis posterior, los tratamientos HFBS2, HFBS5 y HFBS8 pueden considerarse como potencialmente buenos para su modificación y uso como materiales de pared mediante secado por aspersión.

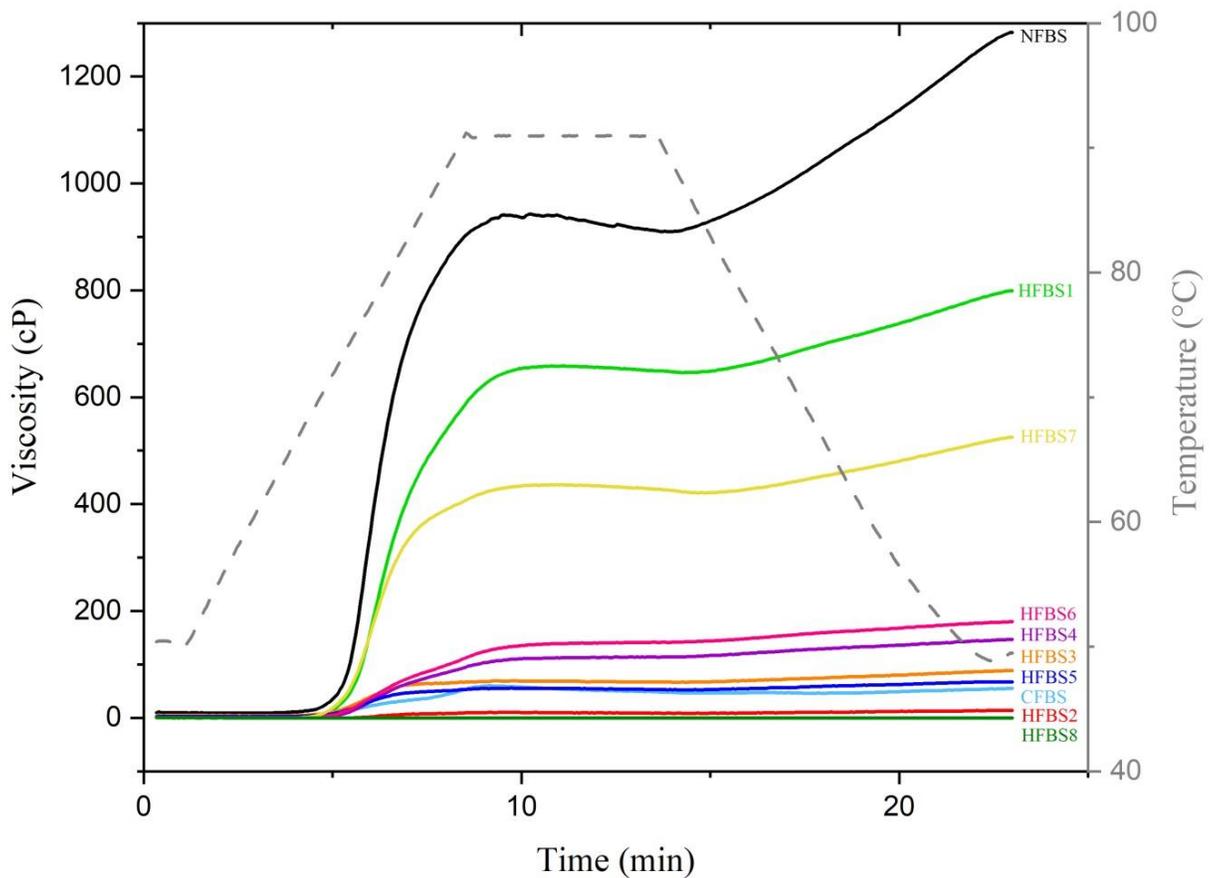


Figura 10. Perfil de viscosidad del almidón nativo de haba y productos hidrolizados. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS1- 20%H/2%A/30T/2P; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS3- 20%H/4%A/30T/6P; HFBS4- 40%H/4%A/30T/2P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS6- 40%H/2%A/60T/2P; HFBS7- 20%H/4%A/60T/2P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P.

Cuadro 11. Parámetros de pasting del almidón nativo de haba y productos hidrolizados*.

Muestra	T _{ps} (°C)	η _{pk} (cP)	Δη _{bd} (cP)	Δη _{sb} (cP)	η _f (cP)
NFBS	72.5 ± 0.69 ^{ab}	975.7 ± 24.58 ^a	35.3 ± 5.51 ^a	401.0 ± 15.62 ^a	1341.3 ± 44.24 ^a
CFBS	70.2 ± 2.84 ^b	53.3 ± 40.72 ^{ef}	8.7 ± 10.01 ^b	7.7 ± 1.53 ^{de}	52.3 ± 32.01 ^{fg}
HFBS1	70.8 ± 1.27 ^b	655.3 ± 30.55 ^b	6.3 ± 5.77 ^b	149.3 ± 15.04 ^b	798.3 ± 17.79 ^b
HFBS2	75.1 ± 0.37 ^a	11.3 ± 8.08 ^f	2.0 ± 1.73 ^b	4.7 ± 1.15 ^{de}	14.0 ± 9.64 ^{fg}
HFBS3	69.8 ± 2.34 ^b	68.3 ± 11.02 ^{def}	1.7 ± 1.15 ^b	21.7 ± 7.02 ^{de}	88.3 ± 17.93 ^{def}
HFBS4	70.7 ± 1.61 ^b	112.0 ± 27.78 ^{de}	1.0 ± 0.05 ^b	35.7 ± 3.06 ^d	146.7 ± 38.55 ^{de}
HFBS5	70.6 ± 1.07 ^b	54.0 ± 13.23 ^{ef}	1.7 ± 1.15 ^b	15.3 ± 10.78 ^{de}	67.7 ± 16.07 ^{efg}
HFBS6	70.2 ± 0.43 ^b	143.3 ± 49.89 ^d	2.3 ± 1.53 ^b	31.0 ± 10.53 ^{de}	172.0 ± 41.62 ^d
HFBS7	68.9 ± 1.22 ^b	446.3 ± 19.55 ^c	11.7 ± 6.66 ^b	102.7 ± 23.69 ^c	537.3 ± 41.48 ^c
HFBS8	0.0 ± 0.00 ^c	0.0 ± 0.00 ^f	0.0 ± 0.00 ^b	0.0 ± 0.00 ^e	0.0 ± 0.00 ^g

T_{ps}, temperatura de pasta; η_{pk}, viscosidad máxima; Δη_{bd}, caída; Δη_{sb}, retrogradación; η_f, viscosidad final. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS1- 20%H/2%A/30T/2P; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS3- 20%H/4%A/30T/6P; HFBS4- 40%H/4%A/30T/2P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS6- 40%H/2%A/60T/2P; HFBS7- 20%H/4%A/60T/2P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P. n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa (α= 0.05). *Datos publicados en González-Mendoza *et al.*, 2022.

7.2.2 Calorimetría diferencial de barrido del almidón nativo de haba y productos hidrolizados

En el Cuadro 12, se presentan los parámetros térmicos del almidón nativo y productos hidrolizados. Los resultados de NFBS fueron similares a los reportados anteriormente por Ambigaipalan *et al.* (2011), Li *et al.* (2019b), y Piecyk & Domian (2021). Las temperaturas de gelatinización aumentaron en los almidones

hidrolizados (CFBS, HFBS2, HFBS5 y HFBS8) en comparación con NFBS. La energía de microondas pudo fundir los cristales débiles y se formaron cristales fuertes, aumentando la T_o , T_p y T_f (Li *et al.*, 2019a). Se considera que este cambio refleja un aumento en la temperatura de gelatinización como resultado del aumento del orden molecular en el almidón hidrolizado con ácido.

Otras interpretaciones incluyen que la hidrólisis preferencial atenúa el efecto desestabilizador del hinchamiento en regiones amorfas sobre la fusión de los cristales en estas regiones, o que se pueden formar dobles hélices de amilopectina más largas como resultado de la eliminación de los puntos de ramificación (Wang & Copeland, 2015). Además, la entalpía de gelatinización (ΔH) de CFBS no fue significativamente diferente de la de NFBS, similar a lo reportado por Atichokudomchai & Varavinit (2003) en el almidón de yuca, hidrolizado por HCl a temperatura ambiente durante 192 h.

Se sugiere que la amilosa parcialmente hidrolizada se retrogradó, nivelando el contenido de doble hélice (que de otra manera disminuiría con la hidrólisis), por lo que ΔH no disminuyó. Incluso cuando podría haber alguna hidrólisis del dominio cristalino, las entalpías de fusión no disminuyeron. La ΔH de las muestras HFBS2 y HFBS8 disminuyeron en un 76.4% y un 94.5%, respectivamente. La modificación de la entalpía refleja principalmente la pérdida de las dobles hélices y el orden molecular en la región cristalina, una ΔH inferior sugiere un mal ordenamiento de la región cristalina, y una menor estabilidad de las regiones cristalinas y amorfas (Li *et al.*, 2019a).

Por lo tanto, los resultados sugieren que las condiciones de contenido de humedad (40%) y nivel de potencia (6) en HFBS2 y HFBS8 fueron suficientes para perder el orden molecular del almidón. La diferencia de entalpía entre ellos se debe a la concentración de ácido y al tiempo de exposición a la energía de microondas. En el tratamiento HFBS2, los niveles de estos factores fueron de 2% de ácido y 30 segundos, mientras que para el HFBS8 fueron de 4% y 60 segundos, respectivamente. Las moléculas polares y los iones vibran con la aplicación de la EM, generando energía térmica (Tao *et al.*, 2020). Por lo tanto,

como había más moléculas polares en el medio y el tiempo era mayor, la temperatura aumentó y la modificación del almidón también (HFBS8 > HFBS2). Finalmente, para el HFBS5, no se observaron cambios estadísticos porque la humedad (20%) del tratamiento no fue suficiente para modificar el orden molecular en la región cristalina, de forma similar a lo reportado por Li *et al.* (2019a).

Cuadro 12. Propiedades térmicas del almidón nativo de haba, almidón hidrolizado convencionalmente y productos hidrolizados seleccionados.

Muestra	T _o (°C)	T _p (°C)	T _f (°C)	ΔH (J/g)
NFBS	62.5 ± 2.14 ^b	68.0 ± 0.48 ^c	73.8 ± 0.78 ^c	10.9 ± 0.75 ^a
CFBS	64.1 ± 0.17 ^b	71.5 ± 0.45 ^b	80.0 ± 0.19 ^b	12.3 ± 0.77 ^a
HFBS2	74.1 ± 1.12 ^a	79.4 ± 1.86 ^a	86.1 ± 0.95 ^a	2.6 ± 1.28 ^b
HFBS5	63.3 ± 0.07 ^b	71.1 ± 0.11 ^{bc}	80.4 ± 0.28 ^b	11.0 ± 0.77 ^a
HFBS8	65.4 ± 1.79 ^b	70.7 ± 1.96 ^{bc}	79.5 ± 0.54 ^b	0.6 ± 0.11 ^b

T_o, temperatura de inicio; T_p, pico de temperatura; T_f, temperatura final; ΔH, entalpía de gelatinización. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P. n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$).

7.2.3 Difracción de rayos X del almidón nativo de haba y productos hidrolizados

Los arreglos de las estructuras cristalinas se analizaron mediante un difractómetro de rayos X, que es una herramienta útil para estudiar los cambios estructurales inducidos por un tratamiento específico. Por lo general, hay almidones de tipo A, tipo B y tipo C de acuerdo con los espectros de rayos X. En el almidón tipo A, hay una fuerte reflexión a 2θ aproximadamente a 15° y 23° y un doblete no bien

definido a aproximadamente 17° y 18° ; sin embargo, en el almidón de tipo B, el pico de difracción fuerte está presente a 17° y algunos picos pequeños alrededor de 15° , 20° , 22° y 24° , además de un pico característico alrededor de 5.6° a 2θ . Por otro lado, el almidón tipo C es una mezcla de polimorfos de tipo A y B (Zhang *et al.*, 2019).

En la Figura 11A se muestran los espectros de rayos X del almidón nativo de haba, hidrólisis convencional y tratado con energía de microondas en condiciones ácidas. NFBS exhibió los patrones característicos de rayos X "tipo C" que ya habían sido reportados anteriormente (Ambigaipalan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019). La modificación ácida no cambia las características cristalinas de los almidones de tipo A y B, y se usa comúnmente para investigar la distribución cristalina del almidón de tipo C (Wang, *et al.*, 2009). Los espectros de rayos X de los almidones hidrolizados (CFBS, HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P y HFBS5-20%H/2%A/60T/6P) mostraron que el pico a 5.6° 2θ se redujo en intensidad y el pico a 17° , 18° y 23° 2θ se afinó (Figura 11A), similar a lo reportado en almidón de haba hidrolizado por α -amilasa-HCl (Cai, *et al.*, 2014). Li *et al.* (2017) hidrolizaron almidón de papa utilizando campo eléctrico inducido-HCl, el tratamiento no provocó variación del tipo cristalino. Sin embargo, en HFBS8 (40%H/4%A/60T/6P) el pico a 5.6° 2θ desapareció y los picos a 17° , 18° , 22.5° y 24° 2θ se afinaron (Figura 11A).

Estos resultados mostraron un patrón de almidón tipo B, esto está en concordancia con los resultados reportados por Polesi & Sarmiento (2011) para almidón retrogradado de garbanzo. La retrogradación a baja temperatura conduce a la formación de cristalinidad tipo B y como se mencionó anteriormente en HFBS8 las condiciones de humedad y temperatura eran adecuadas para la gelatinización del almidón, y por lo tanto su posterior recristalización. La transición de C a A o C a B podría atribuirse predominantemente a la hidrólisis preferencial de uno de los polimorfismos seguida de una posible reordenación de dobles hélices (Wang & Copeland, 2015). La cristalinidad relativa (CR) de NFBS fue del 27.7% y los almidones hidrolizados en el rango de 26.8-28.8% (Figura 11B).

Ambigaipalan *et al.* (2011) reportaron que el almidón nativo de haba tiene un 20.2-21.9% de CR, inferior a nuestros resultados, sin embargo, los valores están dentro del rango (17.0-34.0%) reportado para otros almidones de leguminosas (Hoover *et al.*, 2010). La cristalinidad relativa en CFBS aumentó un poco (de 27.7 a 28.8%). La diferencia en la CR podría atribuirse al tamaño del cristal y a la orientación de la doble hélice (Hoover & Ratnayake, 2002). Se encontró una correlación significativa entre el grado de retrogradación y la cristalinidad, atribuida al desarrollo de un estado más ordenado o cristalino formado durante la retrogradación (Xie *et al.*, 2014).

Cuando los gránulos de almidón son sometidos a hidrólisis ácida, la cristalinidad relativa incrementa y los picos en la región 15-30° 2 θ se intensifican. Se han propuesto varias hipótesis para el aumento de la cristalinidad en las etapas iniciales de la hidrólisis ácida. En primer lugar, la escisión de algunas de las cadenas de amilosa que atraviesan las regiones amorfas puede permitir el reordenamiento de los extremos de la cadena recién liberados en una estructura más cristalina. En segundo lugar, el reordenamiento de la estructura cristalina durante la hidrólisis ácida daría como resultado un aumento de la cristalinidad mediante el llenado parcial de las cavidades en las dobles hélices. Y en tercer lugar, el aumento de la cristalinidad también puede resultar de la retrogradación de la amilosa libre, que se reorganiza en regiones cristalinas (Wang & Copeland, 2015). La CR más baja fue de 26.8% para HFBS8 (40%H/4%A/60T/6P), probablemente debido a la ruptura más intensa del almidón gelatinizado por la acción del ácido. Se han reportado resultados similares para el almidón de garbanzo retrógrado y gelatinizado por hidrólisis ácida (Polesi & Sarmiento, 2011). Kumar *et al.* (2020) también reportaron la pérdida progresiva de la cristalinidad del almidón al aumentar la duración de tratamiento con microondas, debido a la capacidad de las microondas para dañar directamente la disposición laminar de los cristales de amilopectina mediante la resonancia de las moléculas de agua, y en este trabajo también podría atribuirse a las moléculas de HCl.

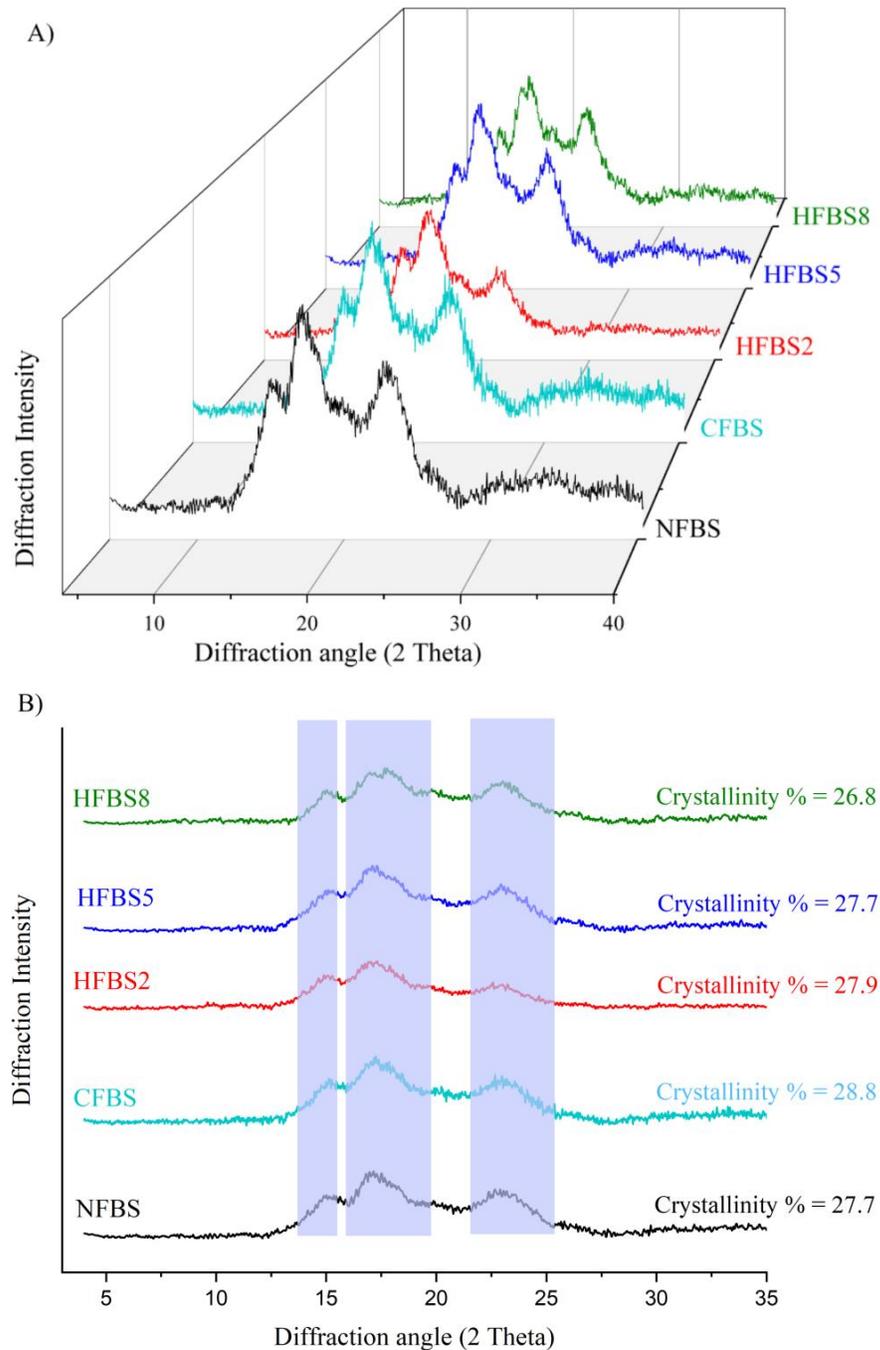


Figura 11. Difracción de rayos X. (A) Patrones de almidón nativo y productos hidrolizados; (B) Cristalinidad relativa, regiones resaltadas en color son los picos afectados. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P.

7.2.4 Espectroscopía infrarroja del almidón nativo de haba y productos hidrolizados

FTIR es una herramienta que proporciona información sobre la estructura molecular y los enlaces, midiendo las transiciones entre los niveles de energía vibratoria molecular debido a la absorción de radiación. Los espectros FTIR del almidón nativo de haba, hidrólisis convencional y tratado con energía de microondas en condiciones ácidas se muestran en la Figura 12A. Se registraron picos amplios a aproximadamente 3325 cm^{-1} , indicando la presencia de grupos hidroxilos (O–H). También en los espectros FTIR se observaron picos a 2935 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} que representan la vibración de estiramiento C–H y el agua ligada presente en el almidón, respectivamente. La región de huellas digitales de los espectros del almidón (Figura 12B) tiene cinco picos característicos entre 800 y 1200 cm^{-1} , atribuidos al estiramiento del enlace C–O. El pico en 996 cm^{-1} es atribuido a los enlaces C–O del enlace C–O–C en el polisacárido; los picos cercanos a 1078 y 1150 cm^{-1} son característicos del estiramiento C–O del anillo de anhidroglucosa; el pico cerca de 930 cm^{-1} es atribuido a la vibración del enlace glucosídico α -(1–4); mientras que el pico cerca de 860 cm^{-1} corresponde a las deformaciones C–H y CH_2 (Simsek *et al.*, 2015). No surgió un nuevo pico, ni una pérdida, lo que sugiere que no hay nueva formación o pérdida de enlaces químicos, lo que indica que el tratamiento con microondas no cambió el enlace químico de las moléculas de almidón, similar a lo reportado por Li *et al.* (2019a).

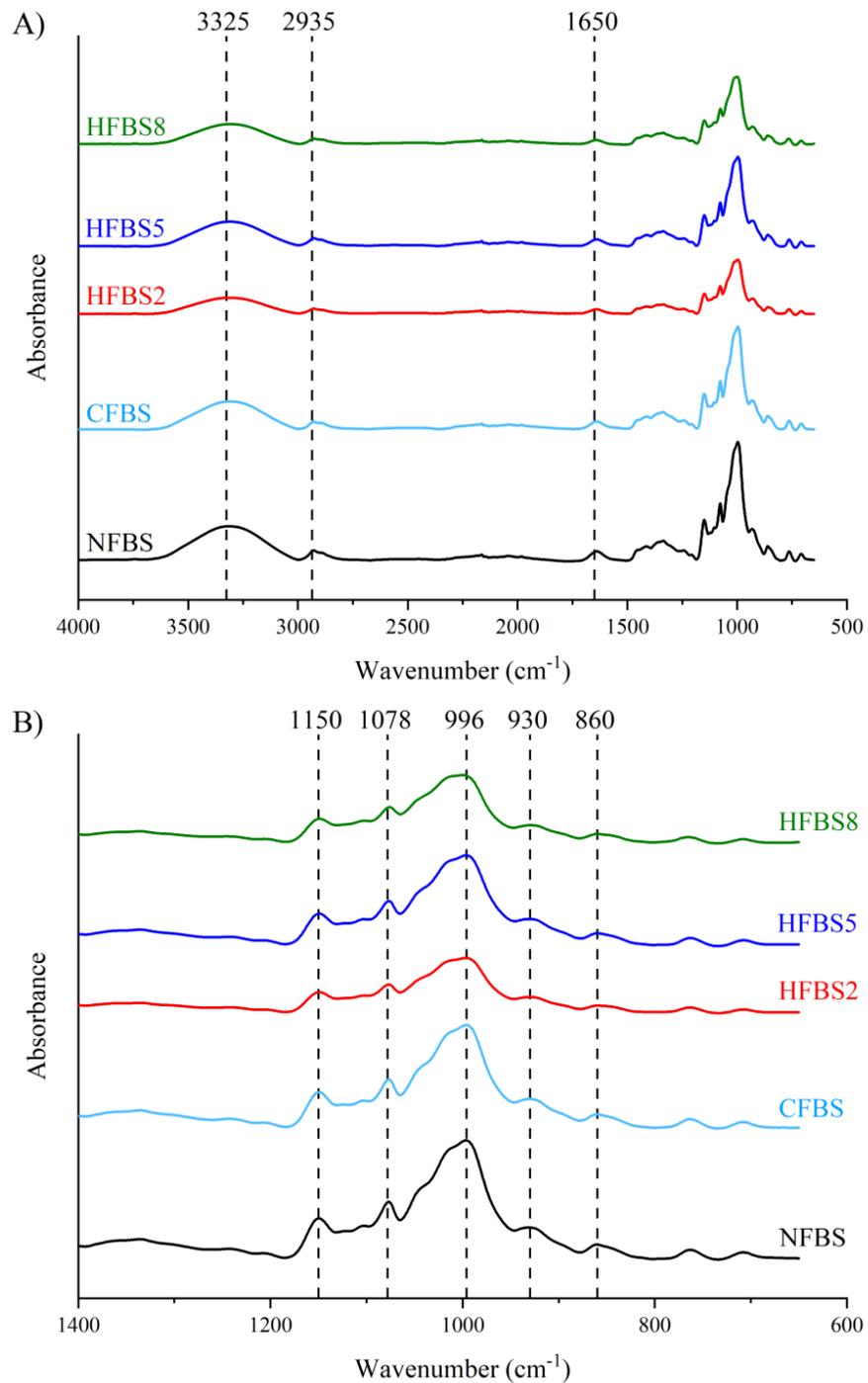


Figura 12. Espectroscopía FTIR. (A) Patrones de almidón nativo y productos hidrolizados; (B) Picos característicos de la huella digital. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P.

7.2.5 Microscopía electrónica de barrido del almidón nativo de haba y productos hidrolizados

El almidón aislado de diversas fuentes vegetales presenta una morfología granular característica, incluida una forma diferente (redonda, ovalada, poliédrica), una distribución de tamaño de partícula variada y rasgos en la superficie del gránulo, como los poros (Wang & Copeland, 2015). En la Figura 13 se presentan las micrografías SEM de NFBS, CFBS y HFBS. Los gránulos de NFBS presentaron formas redondas, elípticas y ovaladas, y había algunos dañados, esto podría deberse al método de extracción utilizado que puede dañar los gránulos por la molienda en seco y en húmedo. El tamaño de los gránulos de NFBS fue de $28.2 \pm 6.68 \mu\text{m}$ de longitud y de ancho, $17.7 \pm 3.92 \mu\text{m}$, estos resultados concuerdan con los de otros autores para el almidón de haba (Karaman *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). La estructura del gránulo de almidón de las muestras CFBS y HFBS5 (20%H/2%A/60T/6P) no se destruyó por completo y se mantuvo el aspecto original de los gránulos, aunque presentó algunas aglomeraciones, características de los almidones que han sido hidrolizados.

Los gránulos de almidón con bajo grado de hidrólisis aún permanecen intactos, aunque la superficie exterior se vuelve rugosa y puede presentar algunas aglomeraciones (Wang & Copeland, 2015). Los sistemas de almidón con bajo contenido de humedad (< 30%) tienen poca capacidad de absorción y conversión, lo que permite que la morfología de los gránulos de almidón permanezca completamente intacta con el tratamiento controlado de microondas (Tao *et al.*, 2020). Esto se observó en el HFBS5 con 20% de humedad. La superficie rugosa y las aglomeraciones observadas podrían deberse al efecto del ácido en el medio. El tamaño de los gránulos de CFBS y HFBS5 fue de 30.2 ± 10.36 y $27.0 \pm 9.35 \mu\text{m}$ de longitud, y 19.4 ± 6.38 y $17.9 \pm 8.41 \mu\text{m}$ de ancho, respectivamente. Era obvio que el grado de daño a la estructura del almidón era mayor con el aumento del contenido de humedad tratado con energía de microondas.

Para HFBS2 (40%H/2%A/30T/6P), la superficie se volvió rugosa con grietas anchas y se aglomeraron para formar partículas de almidón más grandes, el

tamaño de gránulo fue de $63.5 \pm 20.65 \mu\text{m}$ de longitud y $43.5 \pm 13.75 \mu\text{m}$ de ancho. Este daño podría explicarse por las altas presiones internas de vapor formadas por el agua que se calienta rápidamente, lo que también sugiere que la estructura interna del almidón se desintegró (Li *et al.* 2019a). Parece que los gránulos de almidón se fusionaron con los gránulos adyacentes después del tratamiento con microondas. Para HFBS8 (40%H/4%A/60T/6P), las formas redondas, elípticas y ovaladas del gránulo de almidón desaparecieron por completo y se formaron bloques grandes, con un tamaño de $40.5 \pm 14.82 \mu\text{m}$ de longitud y $24.8 \pm 7.53 \mu\text{m}$ de ancho. Indicando que cuando el contenido de humedad es del 40%, el exceso de agua y la alta temperatura pueden gelatinizar el almidón, similar a lo reportado por Li *et al.* (2019a). También, este tratamiento tuvo una alta concentración de ácido (4%) y el tiempo de exposición a la energía de microondas más largo (60s), contribuyendo a la rápida hidrólisis del almidón y gelatinización. Vale la pena señalar que la superficie de los bloques era muy irregular pero no rugosa, las moléculas pudieron reorganizarse en una estructura ordenada.

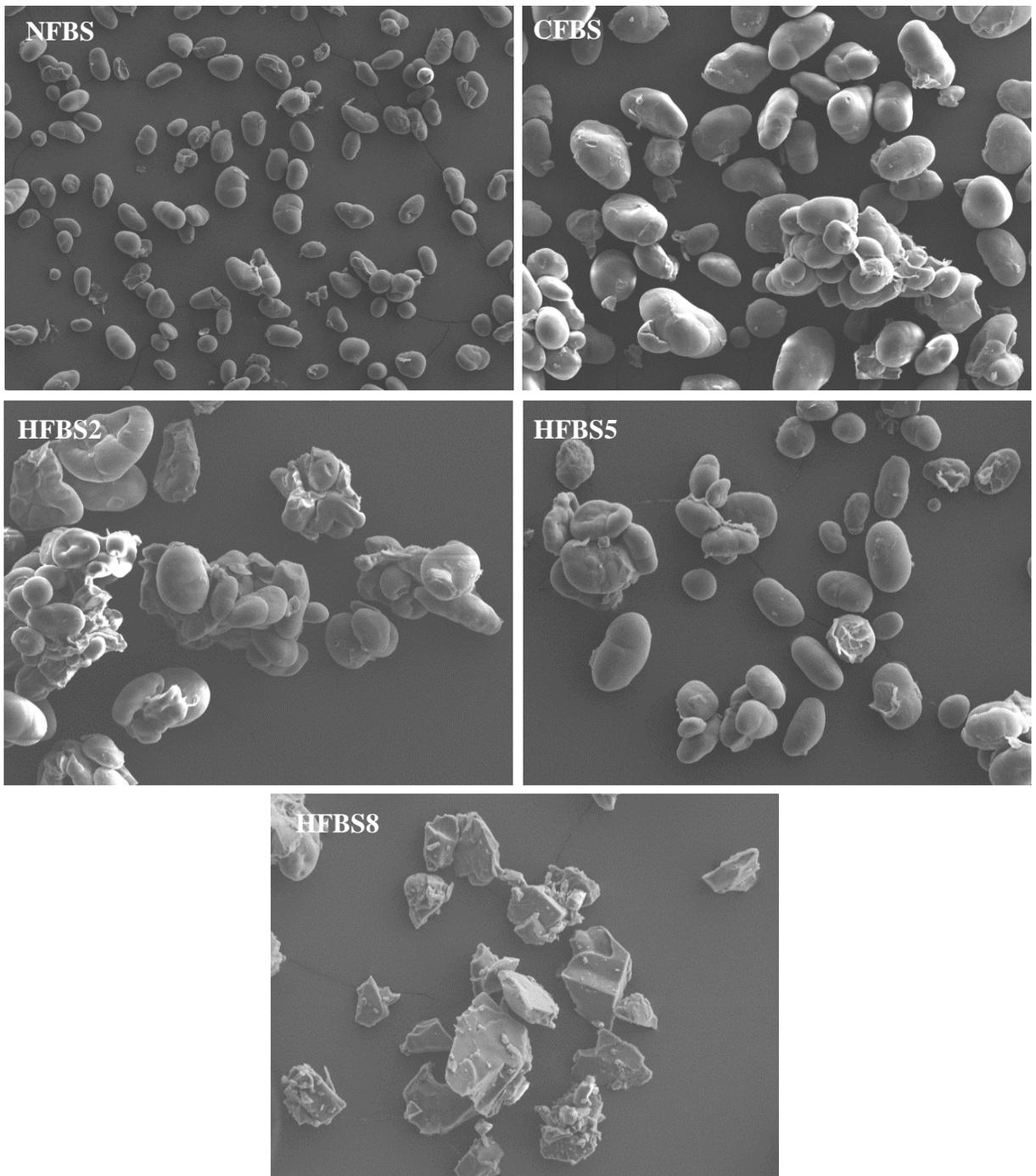


Figura 13. Micrografías SEM del almidón nativo de haba y productos hidrolizados. NFBS, almidón nativo de haba; CFBS, almidón hidrolizado por método convencional; HFBS2- 40%H/2%A/30T/6P; HFBS5- 20%H/2%A/60T/6P; HFBS8- 40%H/4%A/60T/6P.

7.3 Caracterización de los almidones modificados

La caracterización de los almidones modificados (MFBS) se presenta en el Cuadro 13 y 14. La aplicación de energía de microondas para la modificación del material aumentó la solubilidad y la concentración de azúcares reductores. El tratamiento que tenía como factor al almidón HFBS8 mostró las mayores diferencias debido a la clara despolimerización de los gránulos que ya se había dado en la hidrólisis del material. Así, la solubilidad en agua se incrementó hasta un 70%, lo que también puede ser corroborado por el aumento de los azúcares reductores. Este comportamiento fue similar al reportado por González & Pérez (2002) en almidón de lenteja modificado por irradiación de microondas.

Cuadro 13. Caracterización de los almidones esterificados por el método convencional y mediante energía de microondas.

Muestra	Factor			Índice de solubilidad en agua, %	Índice de absorción en agua, %	Azúcares reductores, g/L
	Almidón	Tiempo	Potencia			
MCFBS	.	.	.	3.20 ± 0.10 ^d	2.9 ± 0.10 ^a	0.05 ± 0.004 ^b
MFBS1	HFBS2	30	2	18.8 ± 2.78 ^c	4.0 ± 0.15 ^a	0.89 ± 0.227 ^b
MFBS2	HFBS8	30	2	62.5 ± 2.28 ^b	6.5 ± 2.74 ^a	15.43 ± 0.908 ^a
MFBS3	HFBS2	60	2	21.9 ± 3.58 ^c	5.1 ± 1.90 ^a	1.43 ± 0.394 ^b
MFBS4	HFBS8	60	2	63.0 ± 0.90 ^b	5.2 ± 0.15 ^a	15.11 ± 0.613 ^a
MFBS5	HFBS2	30	10	16.3 ± 1.03 ^c	5.7 ± 0.52 ^a	1.07 ± 0.476 ^b
MFBS6	HFBS8	30	10	71.2 ± 1.91 ^a	6.0 ± 0.38 ^a	15.06 ± 0.774 ^a
MFBS7	HFBS2	60	10	22.2 ± 2.24 ^c	6.4 ± 2.17 ^a	1.25 ± 0.031 ^b
MFBS8	HFBS8	60	10	70.7 ± 2.99 ^a	5.8 ± 0.10 ^a	14.26 ± 0.993 ^a

MCFBS, almidón esterificado por método convencional; MFBS, almidones esterificados por microondas. n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$).

Cuando se realizó la hidrólisis ácida usando EM, el contenido de almidón resistente disminuyó debido a la intensa ruptura de los enlaces que se obtuvo

después del tratamiento. Al realizar la esterificación del material se esperaba que el contenido de almidón resistente incrementara, como se puede apreciar en el Cuadro 14. Los tratamientos que partieron del factor HFBS2 presentaron mayor contenido de almidón resistente, esto puede ser debido a que su contenido inicial de almidón resistente era mayor (8.6%) que para el factor HFBS8 (4.7%). Tomando en cuenta este hecho, el incremento de almidón resistente para los tratamientos que provenían de HFBS2 fue de 39% y para HFBS8 de 104%. Esto pudiera deberse a que la muestra HFBS8 tenía más grupos hidroxilo expuestos para su modificación o que su alto contenido de amilosa pudo retrogradar y formar más almidón resistente.

En el presente trabajo se utilizó anhídrido octenil succínico (OSA). La Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) permite el tratamiento con un máximo de 3 % de almidón OSA para aplicaciones alimentarias, teniéndose así un grado de sustitución teórico de 0.0231 (Ovando-Martinez *et al.*, 2017). El número promedio de grupos hidroxilo sustituidos por unidad de glucosa se le denomina grado de sustitución (GS). Algunos tratamientos con alto contenido de almidón resistente no presentaron altos grados de sustitución, lo que nuevamente puede ser atribuido a la amilosa retrogradada. Similar a lo obtenido por Han *et al.* (2019) para almidón de maíz tratado por ultrasonido.

Finalmente, el contenido de amilosa resultante tras la esterificación del almidón varió de acuerdo con el tratamiento previo que se le dió y para cada caso hubo un incremento debido a la acción de la modificación por energía de microondas. Los almidones resistentes se han utilizado en aplicaciones de microencapsulación debido a su resistencia a la digestión en el intestino delgado de personas sanas, así como su facilidad de ser transportadas hacia el intestino grueso. Por esta razón, se han utilizado almidones resistentes para preparar microcápsulas con buenas propiedades de entrega entérica (liberación de células bacterianas encapsuladas en el intestino grueso). Además, los almidones resistentes presentan funcionalidad prebiótica donde pueden ser utilizados por las bacterias probióticas que residen en el intestino grueso (Vandamme *et al.*, 2016).

Cuadro 14. Caracterización de los almidones esterificados por el método convencional y mediante energía de microondas.

Muestra	Factor			Almidón resistente, %	Grado de sustitución	Amilosa, %
	Almidón	Tiempo	Potencia			
MCFBS	.	.	.	11.8 ± 1.42 ^{ab}	0.020 ± 0.0040 ^{ab}	23.3 ± 1.26 ^c
MFBS1	HFBS2	30	2	11.8 ± 0.96 ^{ab}	0.015 ± 0.0075 ^{abc}	38.4 ± 2.89 ^b
MFBS2	HFBS8	30	2	9.6 ± 1.13 ^{ab}	0.023 ± 0.0005 ^a	89.1 ± 4.40 ^a
MFBS3	HFBS2	60	2	11.6 ± 1.11 ^{ab}	0.013 ± 0.0050 ^{abc}	37.8 ± 1.92 ^b
MFBS4	HFBS8	60	2	9.6 ± 1.50 ^b	0.022 ± 0.0017 ^{ab}	84.3 ± 4.47 ^a
MFBS5	HFBS2	30	10	13.3 ± 1.01 ^a	0.005 ± 0.0059 ^c	36.9 ± 2.25 ^b
MFBS6	HFBS8	30	10	9.5 ± 1.89 ^b	0.015 ± 0.0071 ^{abc}	84.3 ± 4.21 ^a
MFBS7	HFBS2	60	10	12.2 ± 1.46 ^{ab}	0.003 ± 0.0029 ^c	31.6 ± 1.87 ^{bc}
MFBS8	HFBS8	60	10	9.5 ± 0.95 ^b	0.009 ± 0.0055 ^{bc}	84.6 ± 4.84 ^a

MCFBS, almidón esterificado por método convencional; MFBS, almidones esterificados por microondas. n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$).

7.3.1 Perfil de viscosidad de los almidones modificados

El perfil de viscosidad de los almidones modificados se muestra en la Figura 14. Se puede apreciar que hubo una clara reducción de la viscosidad. Como se observó anteriormente la viscosidad máxima del almidón nativo de haba fue de 976 cP y después del tratamiento de esterificación por microondas se obtuvieron viscosidades menores a 15 cP. Los almidones modificados por el método convencional presentaron una viscosidad mayor respecto al almidón comercial y los almidones modificados por EM. Por el contrario, se observó que NLOK® tiene una viscosidad muy baja (9.9 ± 1.00 cP) y no presenta tendencia a formar geles firmes, por lo que es estable bajo condiciones de calentamiento y enfriamiento. En la fabricación de almidón modificado generalmente se usan métodos que implican hidrólisis ácida parcial y tratamientos hidrotérmicos o enzimáticos, los cuales

permiten la obtención de un material con alto grado de hidrólisis, por lo que son estables y presentan baja viscosidad.

Algunos tratamientos presentaron características similares al almidón comercial lo cuales los hacen de mucho interés para su posterior evaluación. Los valores de viscosidad más bajos correspondieron a los almidones que partieron del factor HFBS8. El uso de EM en la esterificación mediante OSA, permitió la obtención de almidones con características deseables para ser usados como materiales de pared en la encapsulación por secado por aspersion. Las características más importantes en la elección de un material son la solubilidad en agua, sus propiedades emulsionantes, y baja viscosidad a altas concentraciones. El tratamiento MFBS6 y MFBS8 pueden considerarse como potencialmente buenos para su uso como material de pared debido a que, presentan la menor viscosidad y acorde al Cuadro 13, un alto grado de solubilidad.

Tomando en cuenta que los dos provienen del HFBS8 y potencia 10, el tiempo de proceso en el microondas es lo que determinó la elección del tratamiento. Por lo tanto, para el análisis posterior y continuación del proyecto, se decidió usar el tratamiento MFBS6. Este tipo de material (alto en amilosa y almidón resistente), también se puede usar en una mezcla de alginato y puede producir cápsulas con alta viabilidad celular, como resultado del efecto prebiótico del almidón y la fuerza adicional que pueda proporcionar a la cápsula (Vandamme *et al.*, 2016).

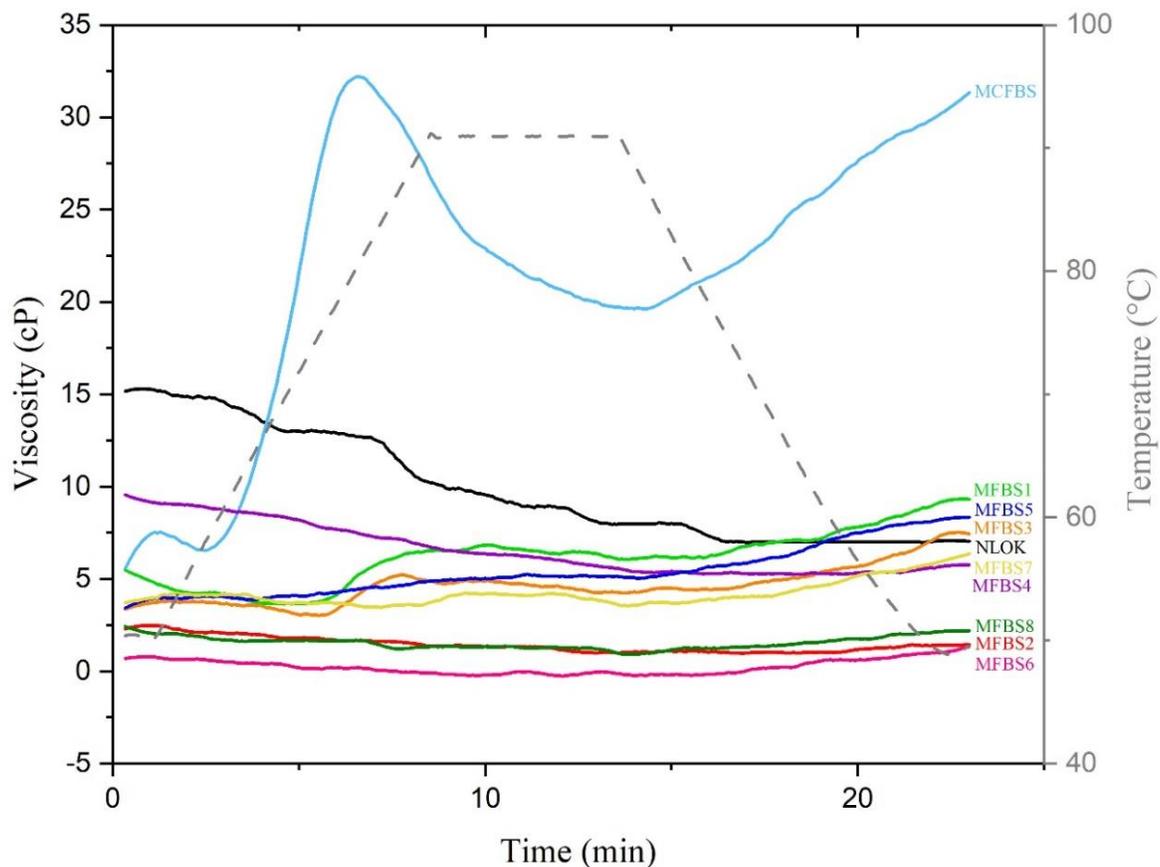


Figura 14. Perfil de viscosidad de los almidones esterificados por el método convencional y mediante energía de microondas. MCFBS, esterificación convencional; MFBS, almidones esterificados por microondas; N-LOK®, almidón esterificado comercial.

7.3.2 Espectroscopía de los almidones modificados

Para comprobar los datos obtenidos del grado de sustitución y asegurar que el almidón ha sido modificado, se realizó espectroscopía de transmisión de infrarrojo (FTIR). Los espectros FTIR del almidón hidrolizado por microondas, esterificación convencional y almidones esterificados por microondas se presentan en la Figura 15, donde se puede observar que tuvieron perfiles similares. En comparación con el almidón sin esterificar (HFBS), los espectros infrarrojos de los almidones modificados (MCFBS y MFBS) presentaron nuevos picos a aproximadamente a

1729 cm^{-1} y 1566 cm^{-1} (Figura 16). Estos resultados son similares a lo reportado por Simsek *et al.* (2015); 1750 cm^{-1} y 1570 cm^{-1} , respectivamente y Zhang *et al.* (2017); 1724 cm^{-1} y 1572 cm^{-1} , respectivamente. El pico a 1729 cm^{-1} se atribuye a la vibración característica de estiramiento C=O, lo que sugiere la formación de grupos éster carbonilo; mientras que el pico a 1566 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento asimétrica del carboxilato RCOO^- . Estos resultados indican que los grupos hidroxilo en el almidón fueron sustituidos formándose enlaces tipo éster.

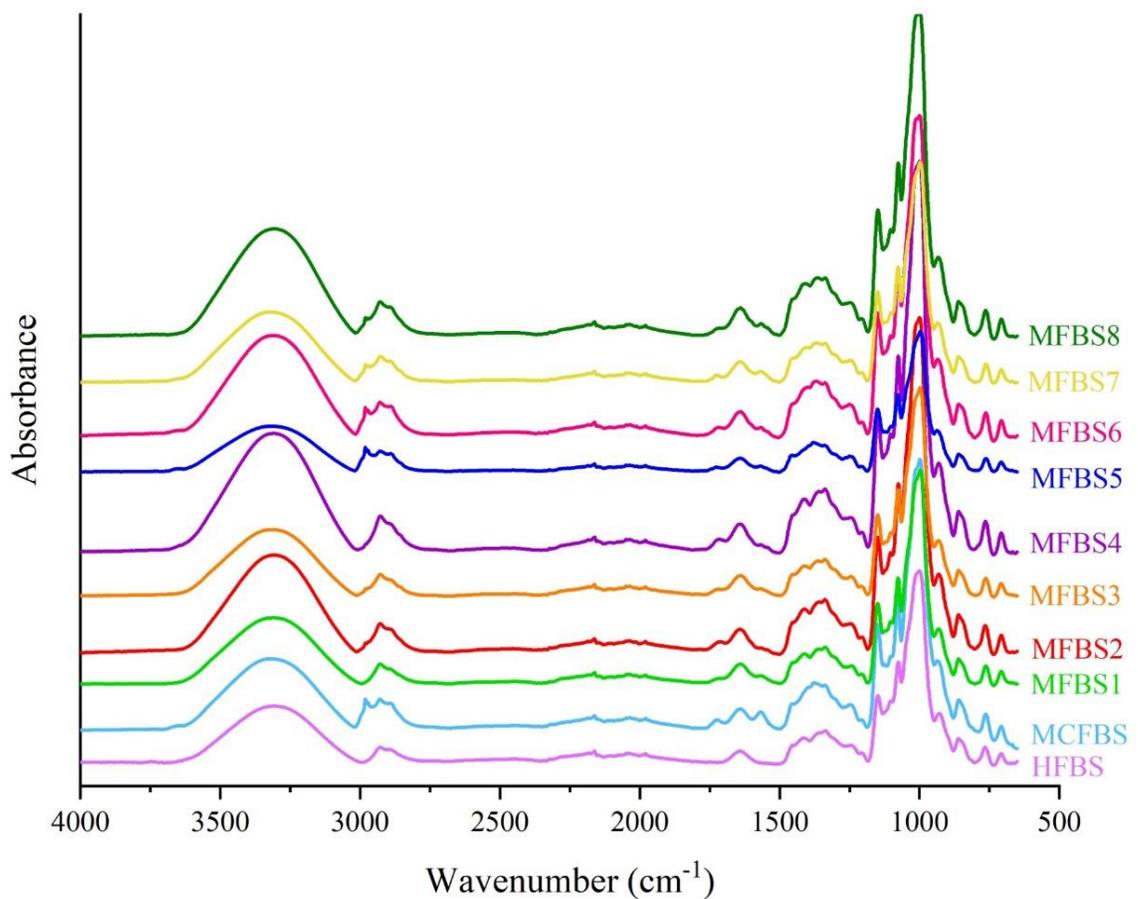


Figura 15. Espectroscopía FTIR. HFBS, almidón hidrolizado por microondas; MCFBS, esterificación convencional; MFBS, almidones esterificados por microondas.

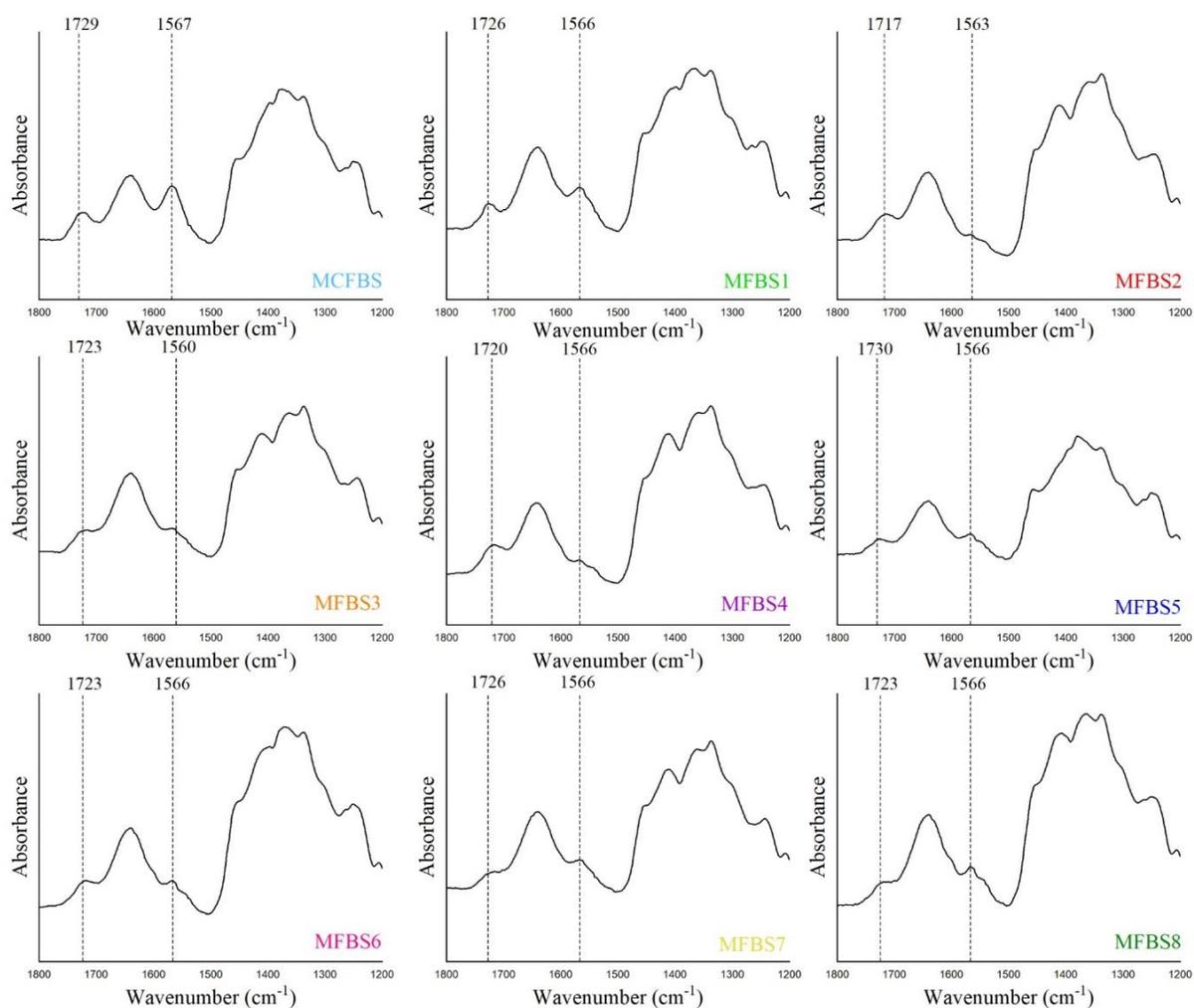


Figura 16. Espectroscopía FTIR. HFBS, almidón hidrolizado por microondas; MCFBS, esterificación convencional; MFBS, almidones esterificados por microondas.

7.4 Microencapsulación mediante secado por aspersión

Se evaluó un diseño factorial 2^2 para la microencapsulación del microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* GG usando como material de pared el mejor tratamiento obtenido en la modificación usando energía de microondas (MFBS6). Los factores y niveles utilizados fueron: temperatura de entrada, 120 y 140 °C; y flujo, 7 y 12

mL/min. Se puede observar en el Cuadro 15, que los tratamientos con temperatura de entrada más alta presentaron mayor temperatura de salida, y que se obtuvieron rendimientos del 45 al 51%, sin diferencias significativas entre tratamientos. En la microencapsulación de probióticos se han obtenido rendimientos que oscilan del 5% usando goma arábica y aislado de proteína de soya (Rodríguez-Restrepo *et al.*, 2017) hasta el 80% usando leche descremada y goma arábica (Tao *et al.*, 2019) como materiales de pared. Usando un material similar al de este trabajo se han logrado obtener rendimientos de hasta 50% (Arslan *et al.*, 2015). Las condiciones de operación del secador influyen en el producto final; dentro de los parámetros del proceso que tienen gran relevancia se encuentran el flujo de aire, la velocidad de alimentación y la temperatura (Bustos & Bórquez, 2013). El rendimiento, sobrevivencia y viabilidad de los probióticos se pueden mejorar al optimizar las condiciones de secado y la composición del material encapsulante (Bustamante *et al.*, 2017; Fritzen-Freire *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las características del material encapsulante y los parámetros usados en el equipo, son propicios para la obtención de buenos rendimientos (>50%).

Cuadro 15. Rendimiento del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión de *Lactobacillus rhamnosus* GG usando almidón modificado de haba.

Tratamiento	Factor		T salida, °C	Rendimiento, %
	T entrada, °C	Flujo, mL/min		
MCLGG1	120	7	86 ± 4.0 ^{ab}	45 ± 2.9 ^a
MCLGG2	140	7	97 ± 6.9 ^a	51 ± 1.7 ^a
MCLGG3	120	12	84 ± 3.5 ^b	46 ± 3.7 ^a
MCLGG4	140	12	92 ± 2.5 ^{ab}	48 ± 1.2 ^a

MCLGG, microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión. n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$).

7.4.1 Recuento de bacterias y eficiencia de encapsulación

En el Cuadro 16, se presenta la evaluación de la sobrevivencia del microorganismo al proceso de secado por aspersión. Se puede observar que no hay diferencias significativas para los tratamientos en cada variable. La eficiencia fue mayor al 80% y se perdió alrededor de 1 Log de viabilidad después de ser sometidos al secado por aspersión, similar a lo observado por Arslan *et al.* (2015).

Cuadro 16. Evaluación de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de *Lactobacillus rhamnosus* GG usando almidón modificado de haba.

Tratamiento	Factor		Eficiencia (%)	Suspensión celular Células viables totales (Log UFC)	Después de la encapsulación Células viables totales (Log UFC)
	T entrada, °C	Flujo, mL/min			
MCLGG1	120	7	86 ± 3.7 ^{ab}	10.5 ± 0.03 ^a	9.0 ± 0.35 ^a
MCLGG2	140	7	81 ± 1.7 ^b	10.5 ± 0.04 ^a	8.5 ± 0.17 ^a
MCLGG3	120	12	90 ± 2.6 ^a	10.4 ± 0.10 ^a	9.3 ± 0.17 ^a
MCLGG4	140	12	84 ± 1.2 ^{ab}	10.5 ± 0.03 ^a	8.8 ± 0.12 ^a

MCLGG, microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión. n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$).

7.4.2 Caracterización de las microcápsulas

En el Cuadro 17, se presentan los resultados de actividad de agua de las microcápsulas. No se presentaron diferencias significativas para esta variable, esto pudo ser debido a que se usó el mismo material encapsulante en todos los tratamientos, sin embargo, los valores son ideales para este tipo de polvos, siendo menores a 0.25. En general, los polvos con una actividad de agua igual o inferior a 0.6 se consideran generalmente seguros de los aspectos microbiológicos y bioquímicos (Arepally & Goswami, 2019).

Cuadro 17. Evaluación de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de *Lactobacillus rhamnosus* GG usando almidón modificado de haba.

Tratamiento	Factor		Actividad de agua
	T entrada, °C	Flujo, mL/min	
MCLGG1	120	7	0.19 ± 0.031 ^a
MCLGG2	140	7	0.15 ± 0.020 ^a
MCLGG3	120	12	0.20 ± 0.023 ^a
MCLGG4	140	12	0.21 ± 0.055 ^a

MCLGG, microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión. n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$).

7.4.3 Microscopía electrónica de barrido de las microcápsulas

Se usó microscopía electrónica de barrido para verificar si se lograban obtener microcápsulas de buena calidad con el material de pared utilizado (almidón modificado de haba-MFBS6). En general, se puede ver en la Figura 17 que las microcápsulas obtenidas tienen una estructura superficial lisa en forma esférica irregular con muescas, aunque no hay poros ni grietas. Se observó que, durante el secado y enfriamiento, las partículas se contraen formando depresiones. Las propiedades físicas de la emulsión (viscosidad y concentración de sólidos) y los parámetros operativos durante el proceso de secado (temperatura, tamaño de la boquilla y presión) determinan el tamaño de partícula de las microcápsulas (Assadpour & Jafari, 2019). Se obtuvieron para todos los tratamientos tamaños que van desde aproximadamente 5 μm hasta 20 μm . Falfán-Cortés *et al.* (2014) reportaron morfología y tamaño similares a los encontrados en este trabajo para microcápsulas de *Bifidobacterium breve* obtenidas mediante secado por aspersión y utilizando almidón de amaranto modificado como material de pared. Resultados similares han sido reportados por otros autores (Arslan *et al.*, 2015; Rodríguez-Restrepo *et al.*, 2016; Muhammad *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2017; Tao *et al.*, 2019).

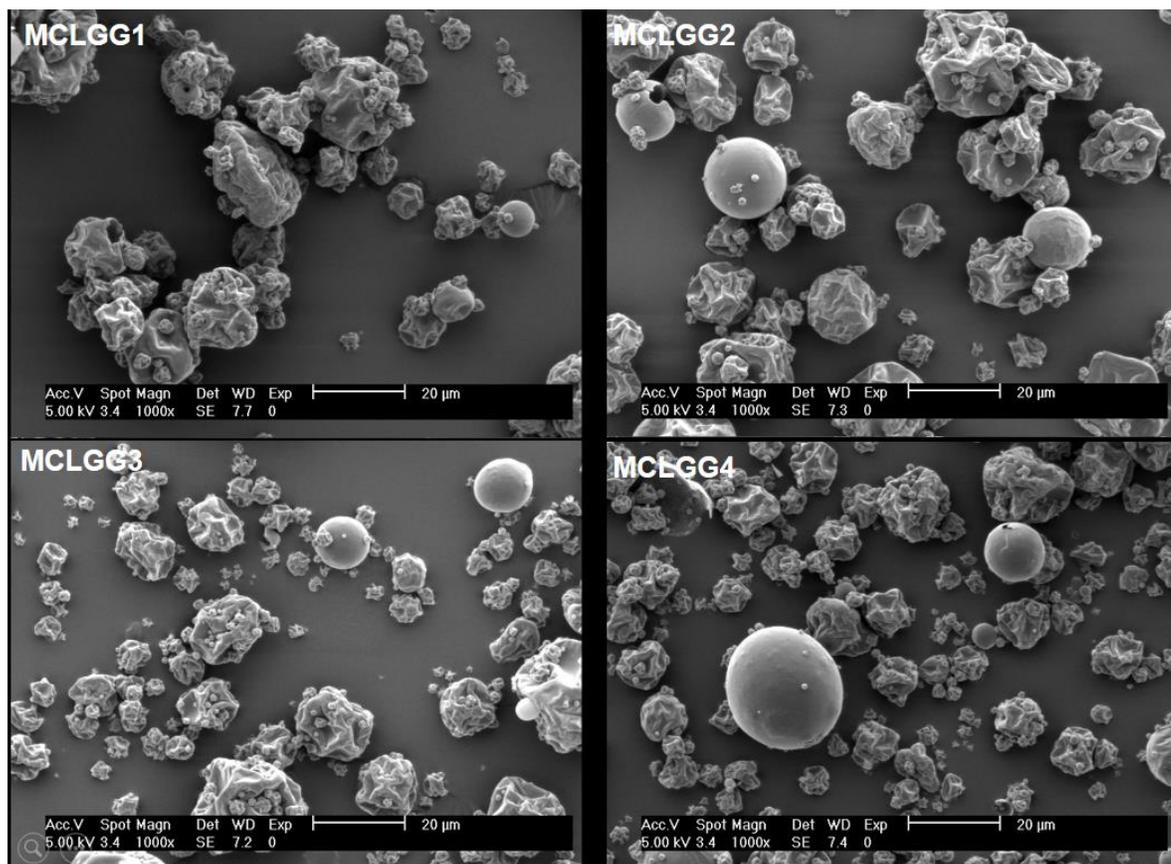


Figura 17. Micrografías SEM de las microcápsulas de *Lactobacillus rhamnosus* GG usando almidón modificado de haba. MCLGG, microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión.

7.4.4 Calorimetría diferencial de barrido de las microcápsulas

En la Figura 18, se presentan los termogramas de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de *Lactobacillus rhamnosus* GG usando almidón modificado de haba y el microorganismo no encapsulado. La temperatura de fusión del pico mayor para el microorganismo libre fue de 124.9 °C. Este pico representa una transición primordial en la inactivación por calor de las células, esto se asocia a la desnaturalización de los ribosomas. Lee *et al.* (2002) para *E. coli* realizó el análisis de calorimetría del microorganismo y de sus ribosomas, pudieron observar que el pico mayor representaba un punto de inactivación de las

células completas y, por lo tanto, se atribuye dicha inactivación a la desnaturalización de los ribosomas del microorganismo.

Como se puede apreciar en la Figura 18, en general el aumento de las temperaturas de fusión puede indicar el fortalecimiento de la estructura interfacial y una mayor estabilidad de los probióticos microencapsulados, sugiriendo que tiene influencia en la estabilidad del ribosoma y, por ende, en la resistencia térmica. Sin embargo, para confirmar dicha protección se necesita medir su viabilidad a estas condiciones. Con base en lo descrito anteriormente para los posteriores análisis se usaron las microcápsulas del tratamiento MCLGG4.

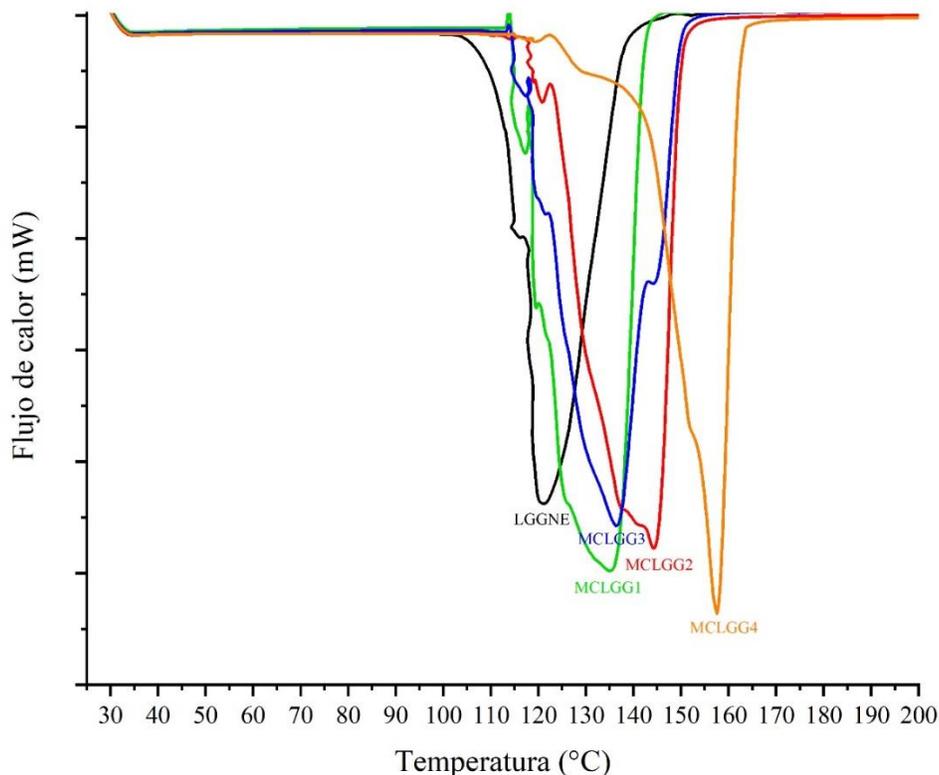


Figura 18. Termograma de las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión de *Lactobacillus rhamnosus* GG usando almidón modificado de haba. LGGNE, *L. rhamnosus* GG no encapsulado; MCLGG, microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión.

7.5 Formulación y elaboración de salchicha tipo Viena

La formulación que se usó para la elaboración de la salchicha de cerdo sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG se presenta en el Cuadro 18. Se realizó de acuerdo a la formulación tradicional de una salchicha con la adición de pimentón rojo para sustituir el colorante sintético (E120) que se utiliza comúnmente en la industria cárnica para proporcionar el color rosado característico de los productos embutidos cocidos.

Cuadro 18. Formulación de la salchicha tipo Viena.

Ingrediente	g/kg
Carne de cerdo	455.00
Carde de res	180.00
Lardo	89.50
Hielo	250.00
NaCl	12.00
Fosfatos	4.00
Sal cura (5% nitrito)	2.50
Pimiento rojo	3.50
Azúcar	2.00
Ajo en polvo	0.50
Glutamato monosódico	1.00
Eritorbato de sodio	0.50
Pimienta negra	0.05

Las salchichas deben cumplir con ciertos parámetros que pueden llegar a establecer su calidad. De acuerdo con la Norma Mexicana, el producto debe tener un contenido mínimo de 9.5 % de proteína, un máximo de 30 % de grasa y como máximo 70 % de humedad (NMX-F-065-1984). La salchicha de cerdo desarrollada en este proyecto tuvo un porcentaje de proteína de 14 ± 0.85 (N x 6.25), 7 ± 0.40 % de cenizas, 21 ± 3.7 % de grasa, y 70 ± 2.4 % de humedad. Para el uso de nitritos, la Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002 establece un máximo de 156 ppm en producto terminado expresado como nitritos. En la determinación realizada a la salchicha se obtuvieron 84 ± 0.99 ppm de nitritos. Por lo que se

puede observar que cada uno de los parámetros evaluados se encuentran dentro de lo establecido por las normas y cabe destacar el alto contenido de proteína y baja concentración de nitritos, hacen de este un buen producto cárnico.

Se realizó la determinación de bacterias ácido lácticas en la salchicha para conocer el conteo inicial que pudiera tener el producto sin la adición del probiótico, dicho conteo fue de 1 ± 0.5 Log UFC/g, que puede ser debido a la microbiota nativa presente en la carne. Para asegurar la calidad microbiológica del producto se realizaron los análisis establecidos por las Normas Mexicanas NMX-F-065-1984 y NOM-213-SSA1-2018. En cuanto a mesófilos aerobios se obtuvieron 70 ± 27 UFC/g, lo que habla de las buenas prácticas de manufactura y calidad de los insumos usados para la elaboración del producto. Acorde al método del número más probable se obtuvo un conteo <3 de *Escherichia coli* que representa la ausencia de dicha bacteria. Respecto a otros microorganismos patógenos las normas marcan la determinación de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, ambas bacterias estuvieron ausentes en el producto.

7.5.1 Evaluación sensorial

Los resultados de la evaluación sensorial ayudan a estudiar las propiedades de los alimentos utilizando sentidos como la vista, el olfato y el gusto. Uno de los objetivos principales es comprender la importancia de los atributos de los alimentos y su papel en la aceptación del consumidor (Severiano *et al.*, 2017). La salchicha tuvo buena aceptación por los consumidores y las evaluaciones de los atributos se presentan en la Figura 19. Como la formulación propuesta tuvo una evaluación satisfactoria se procedió a realizar las salchichas con la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas y posteriormente la evaluación de la vida de anaquel del producto.

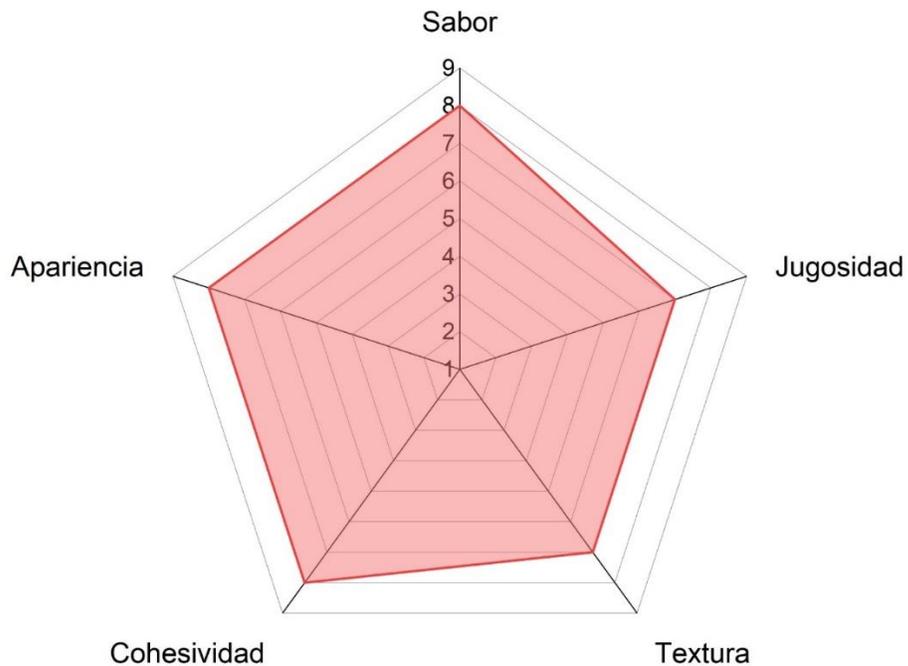


Figura 19. Gráfico radial de los atributos calificados en la evaluación sensorial de la salchicha sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas.

Para la evaluación sensorial de similitud entre muestras de salchicha con y sin la incorporación de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas se realizó una prueba triangular. Con una confianza del 95 % se pudo confirmar que no más del 47 % de los evaluadores pueden distinguir las muestras. Es un porcentaje alto porque se desearía que la población no distinguiera la adición del microorganismo al producto; sin embargo, las observaciones fueron satisfactorias, siendo la salchicha con la adición de probióticos la que tuvo mejores comentarios y por ende agrado a la población.

7.5.2 Sobrevivencia a digestión *in vitro*

Los resultados de sobrevivencia a la digestión *in vitro* se presentan en la Figura 20. La línea negra representa la muestra de salchicha con la adición del probiótico, se puede observar que la concentración de microorganismos en cada fase de la

digestión se mantiene dentro de lo requerido para considerarse un producto probiótico (6 a 8 Log UFC). La grasa presente en el sistema cárnico de la salchicha también puede encapsular las microcápsulas de almidón que contienen las células probióticas (Barragan *et al.*, 2019) y, por lo tanto, brindar protección extra durante el tratamiento térmico, por lo que puede contribuir a que un alto número de células probióticas se mantengan vivas aun cuando han sido sometidas a un estrés letal. Dicho fenómeno también podría explicar el por qué los microorganismos probióticos tuvieron mayor sobrevivencia en el producto cárnico respecto a las microcápsulas libres (MCLGG-MFBS6).

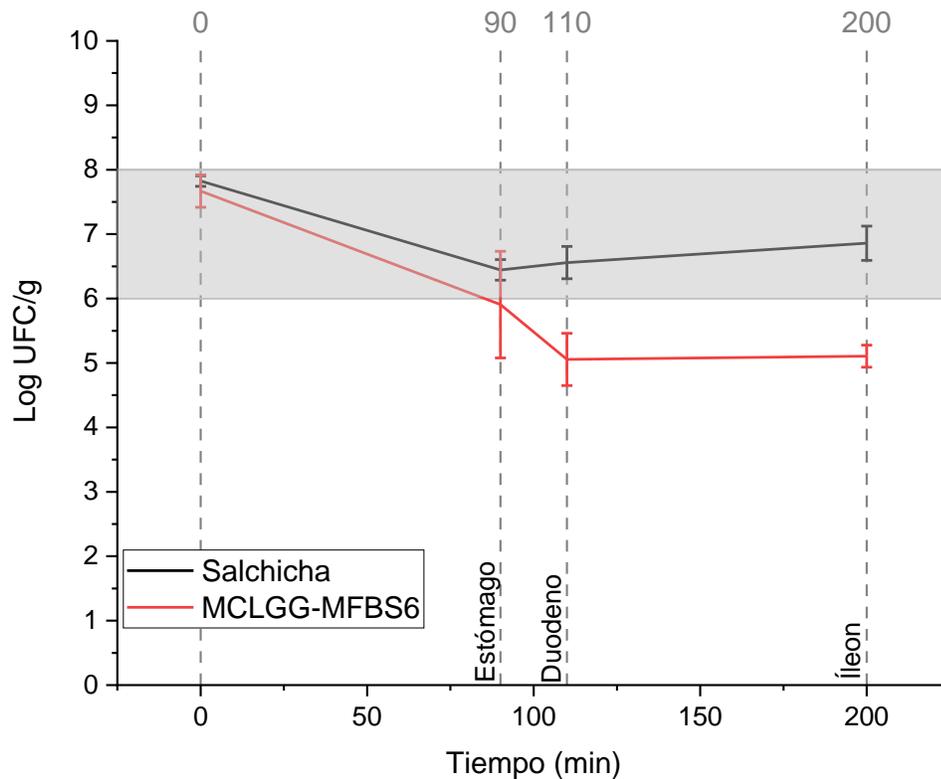


Figura 20. Sobrevivencia a digestión *in vitro* de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Microcápsulas en salchicha, línea negra y microcápsulas libres, línea roja (MCLGG-MFBS6).

7.5.3 Microscopía electrónica de barrido de las salchichas

Se usó microscopía electrónica de barrido para observar la microestructura de las salchichas. Las imágenes de la salchicha sin la adición de LGG microencapsulado se presentan en la Figura 21 como Salchicha Control; las imágenes de la salchicha con la adición de LGG microencapsulado con almidón de haba modificado se presentan en la Figura 21 como Salchicha MCLGG. La muestra Control presentó poros más grandes y una estructura rugosa, mientras que en las muestras MCLGG se observó una matriz más densa o compacta con poros de menor dimensión. Song *et al.*, (2010) reportaron el mismo cambio de estructura en muestras de salchicha usado almidón de maíz OSA en la formulación. La diferencia en las microestructuras de las muestras podría atribuirse a que el almidón OSA es un emulsionante eficaz debido a la adición de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de doble función (Song *et al.*, 2010; Ovando-Martinez *et al.*, 2017). El efecto asociativo de las cadenas hidrofóbicas en los almidones OSA puede formar una red con la molécula de grasa mediante interacciones hidrofóbicas, y las cadenas hidrofílicas pueden formar una red con la molécula de agua, lo que mejora la cohesión de la salchicha observándose una estructura con menos poros y más uniforme.

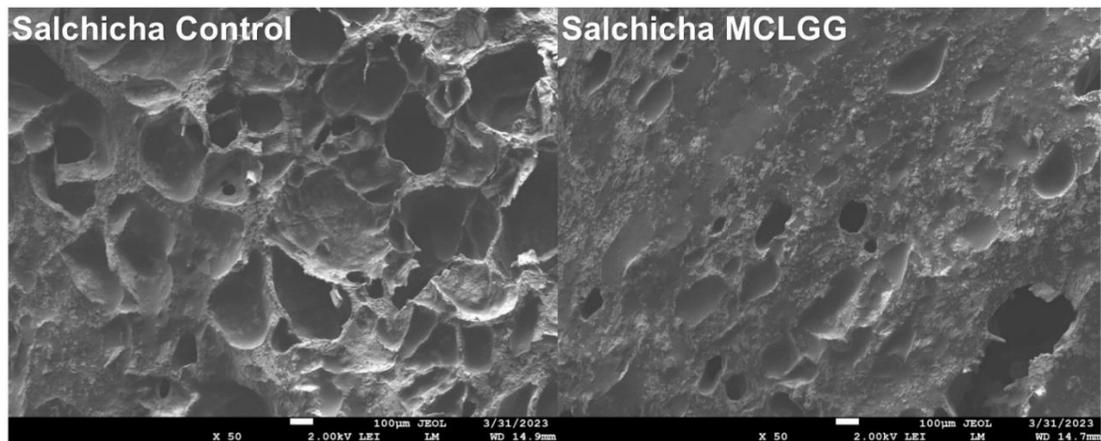


Figura 21. Micrografías SEM de las salchichas con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas.

7.6 Vida de anaquel instrumental

Para la determinación de la vida de anaquel, se realizaron 3 réplicas para cada tiempo y tipo de muestra. Los resultados se presentan como muestra Control, que se refiere a las salchichas sin la adición de probióticos encapsulados y muestra Probióticos, referente a las salchichas con la adición del microorganismo encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas.

7.6.1 Color, pH y temperatura

Los resultados de los parámetros de pH, temperatura, luminosidad (L^*), índice rojo-verde (a^*) e índice amarillo-azul (b^*) se muestran en el Anexo 4. En la Figura 22 se puede observar que los valores iniciales de pH de 5.8 para ambas muestras, se mantuvieron casi constantes con ligero incremento a los 30 días de almacenamiento. Similar a lo observado por Bilenler *et al.* (2017) en salchicha cocida inoculada con microorganismos microencapsulados. Debido a que las muestras se almacenaron en condiciones controladas de temperatura está variable no presentó cambios significativos en el tiempo (Figura 22).

Los parámetros de color se presentan gráficamente en la Figura 23, se puede observar que la luminosidad de las muestras aumentó con el tiempo de almacenamiento, donde después 20 días el incremento fue considerable, teniéndose muestras que presentaban mayor luminosidad y esto pudiera deberse al agua que se estaba perdiendo por sinéresis. La incorporación de los microorganismos probióticos resultó en una coloración similar a la de la salchicha sin la adición del microorganismo. El índice de color rojo disminuyó con el tiempo de almacenamiento, las muestras de salchichas que contenían los probióticos presentaron una disminución del tono rojo menos drástica y que se mantuvo constante del día 20 al 30. Por lo contrario, el índice de color amarillo se mantuvo estable al pasar el tiempo de almacenamiento, con una ligera tendencia a disminuir para ambas muestras. Estos alimentos con un alto contenido de agua y un valor de pH cercano al neutro son naturalmente perecederos y no se pueden

almacenar durante largos períodos de tiempo. La susceptibilidad de estos productos al deterioro se debe a la actividad microbiana y cambios químicos indeseables, como la oxidación de proteínas y lípidos durante el almacenamiento. La oxidación lipídica en los alimentos cárnicos provoca pérdida de color (Das *et al.*, 2021). Esta pérdida de color se puede observar visualmente en la Figura 24, donde claramente al día 20 se observa la descoloración de la salchicha, lo cual es más evidente al día 30, mientras que en las muestras de Probióticos el cambio es casi imperceptible a la vista.

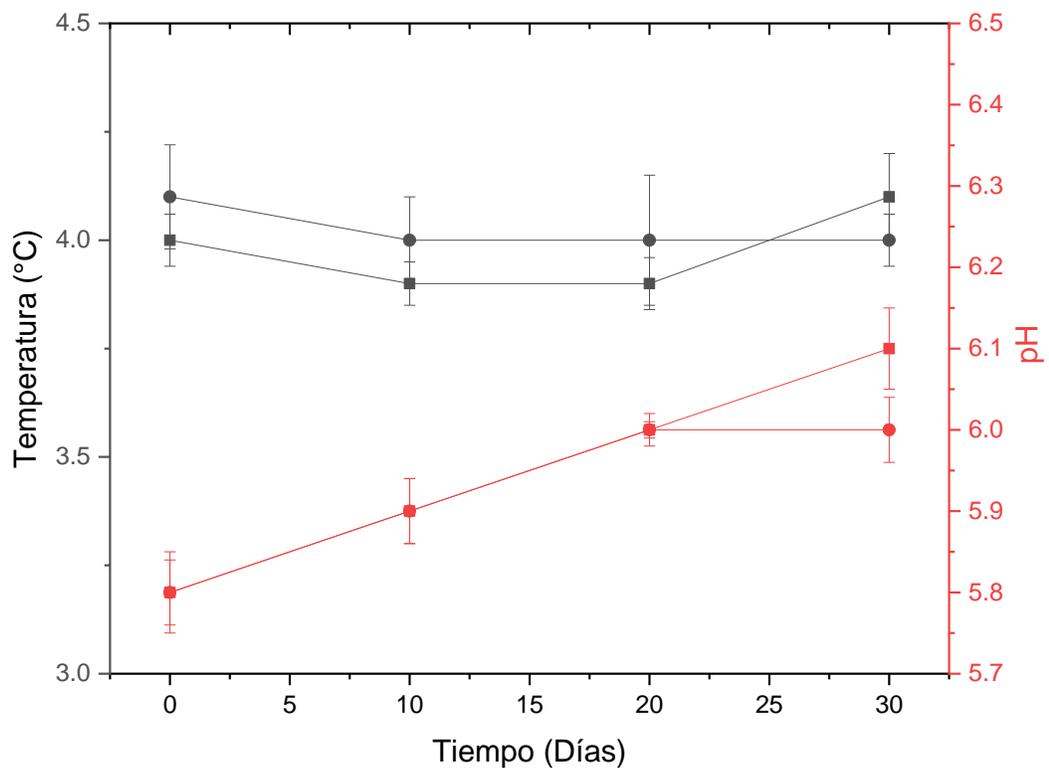


Figura 22. Temperatura y pH de salchichas con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C. ■, Control y ●, Probióticos.

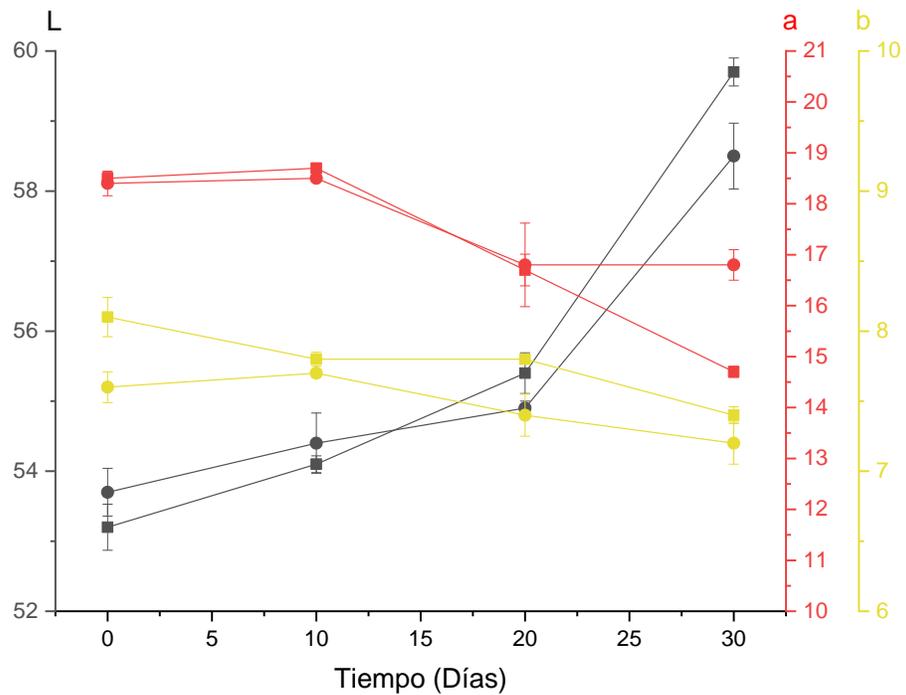


Figura 23. Luminosidad (L), índice rojo-verde (a) e índice amarillo-azul (b) de salchichas con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C. ■, Control y ●, Probióticos. HunterLab MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Inc.) iluminante D65/10°.

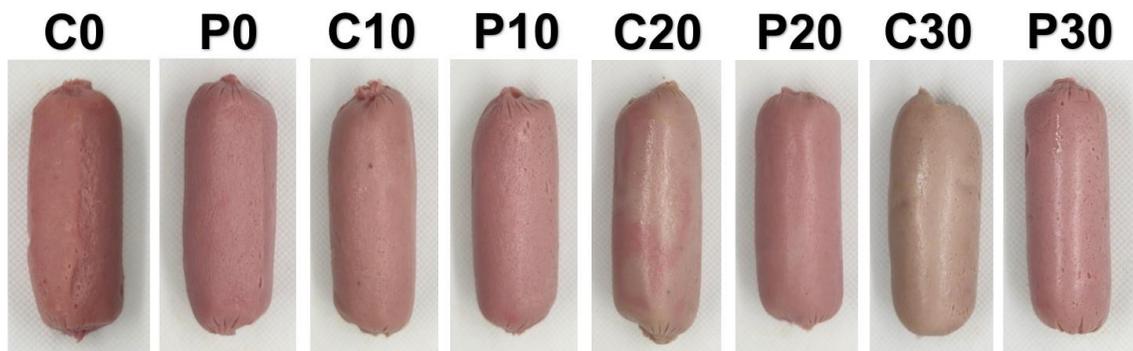


Figura 24. Imágenes de las muestras de salchicha con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por

energía de microondas. Control (C) y Probióticos (P). 0, 10, 20 y 30 indican el tiempo de almacenamiento en días. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

7.6.2 Textura

Algunos autores han reportado que la dureza, la elasticidad y la cohesión son parámetros mecánicos primarios que pueden utilizarse para caracterizar las propiedades de textura de una salchicha (Song *et al.*, 2010). La dureza es la fuerza necesaria para penetrar en la muestra; la elasticidad es la capacidad del producto para recuperar su forma original después de eliminar la fuerza de deformación; la cohesión es la medida en que el producto puede deformarse antes de la ruptura y la masticación es el producto de la dureza, la elasticidad y la cohesión. Los resultados de dichas determinaciones se presentan en el Anexo 5. En la Figura 25, se puede observar que no hubo diferencias significativas para cada tiempo en cada una de las variables, lo que es un indicativo positivo ya que el producto se logró mantener al paso del tiempo con las mismas características físicas. Excepto para dureza en la muestra Control que posiblemente se deba a la pérdida de agua por sinéresis que presentaron las muestras. Como se comentó anteriormente, las cadenas hidrofílicas en los almidones OSA pueden formar una red con la molécula de agua (Song *et al.*, 2010), lo que pudiera disminuir la sinéresis de agua y por lo tanto no afectar la dureza de la salchicha.

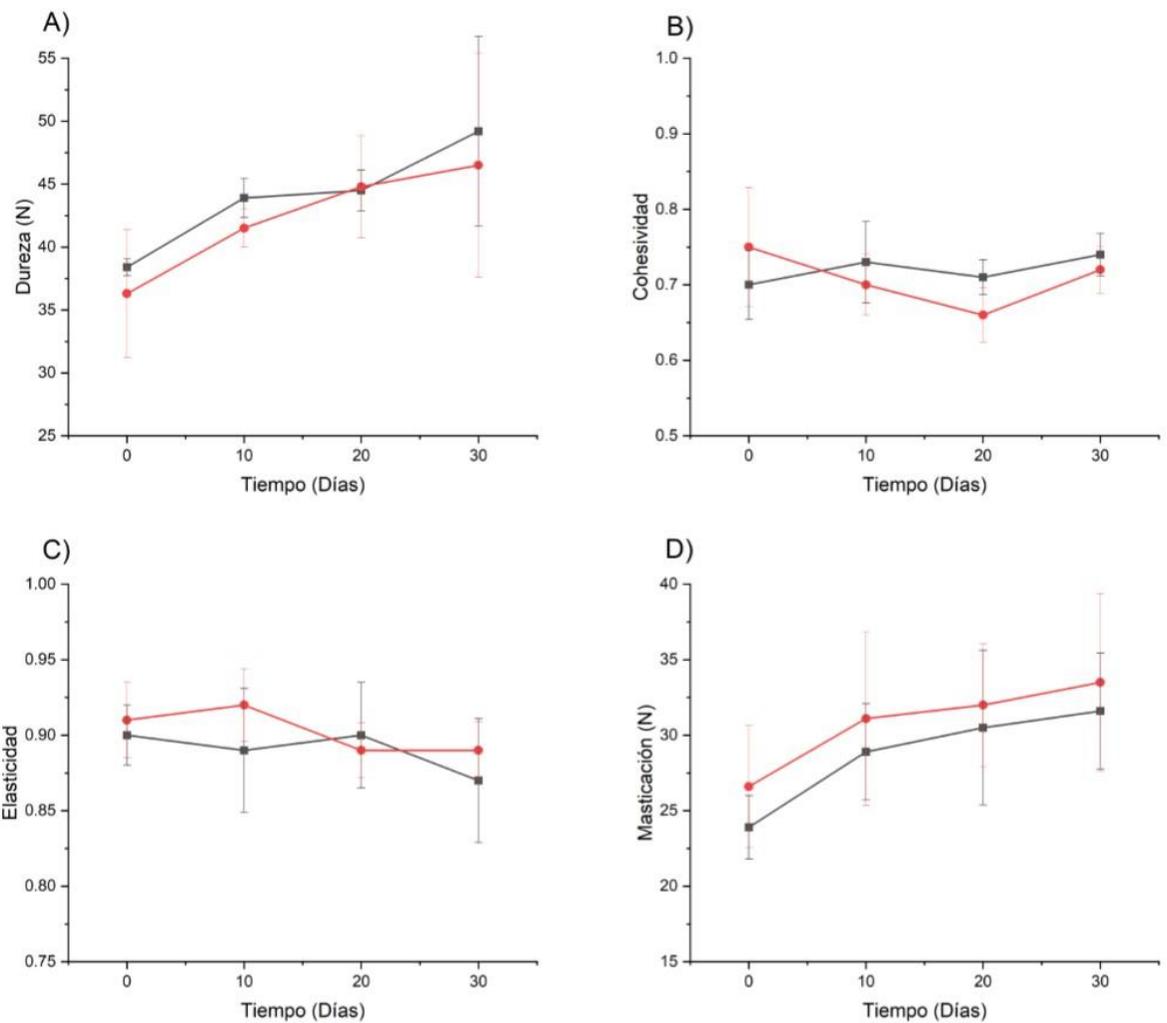


Figura 25. Gráficos de perfil de textura de salchichas con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. A) Dureza, B) Cohesividad, C) Elasticidad y D) Masticación. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C. ■ Control, línea negra y ● Probióticos, línea roja.

7.6.3 Concentración de nitritos

Como se comentó anteriormente, el uso de nitritos está determinado en normas oficiales, siendo lo permitido un máximo de 156 ppm en producto terminado (expresado como nitritos). En la Figura 26 se puede observar la clara reducción de

los nitritos al paso del tiempo. Al final del período de almacenamiento, solo se detectó alrededor del 50% del nitrito inicial. Esto pudo ser debido a que la carne fresca tiene microorganismos nativos que pueden ser termotolerantes como bacterias ácido lácticas, *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae* (Andritsos *et al.*, 2012) que participan en la reducción de nitratos y nitritos. Bilenler *et al.* (2017) detectaron solo el 10% del nitrito inicial en salchichas cocidas. Esta mayor reducción se pudo deber a que los autores inocularon las salchichas con microorganismos que presentan actividad reductora de nitritos, y que la encapsulación mantuvo la actividad de los cultivos iniciadores reductores de nitrito durante el procesamiento térmico.

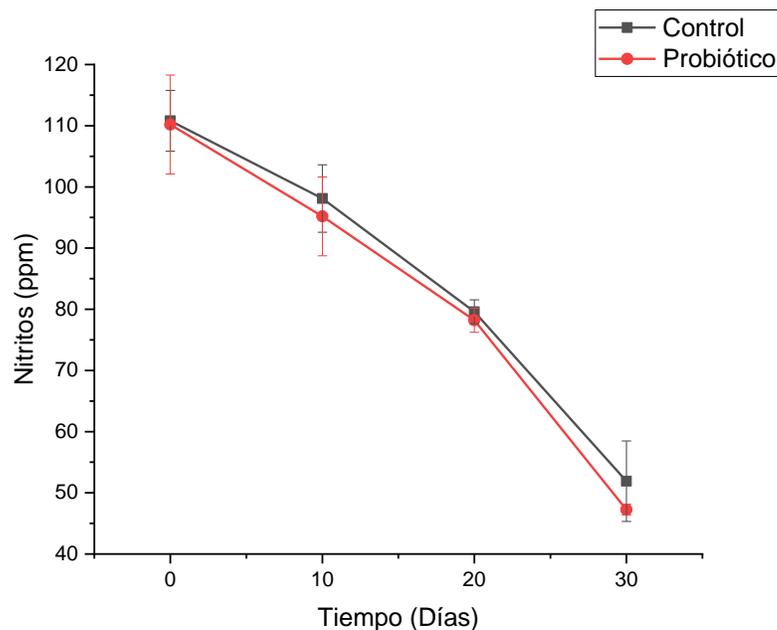


Figura 26. Concentración de nitritos en salchicha con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas y almacenada a 4 °C.

7.6.4 Análisis microbiológico

En la Figura 27 se puede apreciar el recuento de lactobacilos de la salchicha Control, la salchicha con Probióticos y la diferencia entre ambas determinaciones.

Se puede apreciar que hay un incremento al paso del tiempo en ambas muestras. En los productos cárnicos empacados, como los embutidos cocidos, las interacciones entre factores como los nutrientes y la disponibilidad de agua influyen en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. Y en los productos cárnicos, el empacado al vacío y el contenido de sal provocan una presión selectiva que favorece a las bacterias ácido lácticas (Barragan *et al.*, 2019). Al determinar la diferencia se puede ver que la salchicha contiene lo requerido para considerarse un producto probiótico (6 a 8 Log UFC) hasta el día 20. Al día 30 de almacenamiento esta comparación muestra que la salchicha ya no presenta las características de dicho producto. Sin embargo, se puede tomar en cuenta el rápido crecimiento de los microorganismos en la salchicha Control respecto a la muestra probiótica que tiene una tendencia más estable al tiempo. Por lo tanto, podría ser que la muestra de Probióticos al contener a los microorganismos microencapsulados su liberación y por ende crecimiento en el producto sea más lento y por ende aún tener potencial para ser un producto considerado probiótico.

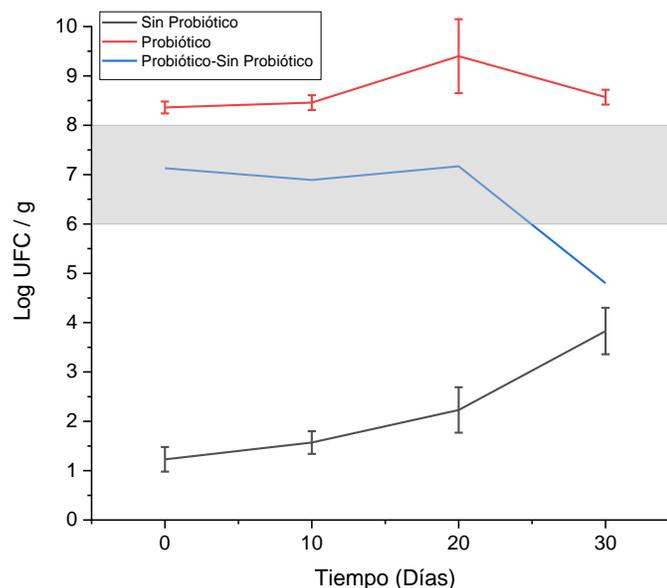


Figura 27. Sobrevivencia de *Lactobacillus* en muestras de salchicha con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

7.6.5 Oxidación lipídica

La oxidación de los lípidos en la carne ocurre a través de un mecanismo de radicales libres autocatalítico llamado autooxidación donde se producen productos más estables, alcoholes, ácidos y aldehídos (Fernández *et al.*, 1997). Todos estos productos tienen un efecto negativo sobre el olor, el sabor y el valor nutricional, lo que afecta la calidad de los alimentos y son una de las principales causas del deterioro de los productos cárnicos (de Azevedo *et al.*, 2003). La oxidación lipídica en los alimentos cárnicos provoca pérdida de color, daños estructurales en las proteínas y la producción de sabores rancios o desagradables. Estos cambios afectan negativamente la calidad sensorial, el valor nutricional y la aceptabilidad del consumidor y, en consecuencia, acortan su vida útil. Los cambios oxidativos afectan en última instancia a la textura y a la capacidad de retención de agua de los alimentos durante su almacenamiento (Das *et al.*, 2021). Como era de esperarse, la rancidez oxidativa aumentó significativamente con el tiempo de almacenamiento en las muestras Control y Probióticos, esto debido a que el material encapsulante usado en este trabajo no presentaba propiedades antioxidantes, pero si se pudo observar que dicho incremento fue en menor grado para las muestras con probióticos en comparación con el Control (Figura 28). Como se presentó en la Figura 24, al día 20 las muestras Control presentaban un cambio drástico de pérdida de color que podría relacionarse a el aumento de la oxidación lipídica, el cual se dispara considerablemente ese mismo día, esto pudiera deberse a que en la microestructura de las salchichas Control se tienen más poros (Figura 21) que pudieran tener oxígeno y por ende acelerar el proceso de oxidación. Es bien sabido que la oxidación de lípidos es un proceso complejo y dinámico que se incrementa con el tiempo y produce diversos compuestos; el proceso de oxidación de lípidos generalmente se divide en tres fases: la primera se denomina fase de iniciación, e implica la formación de radicales libres de lípidos e hidroperóxidos como productos primarios de reacción, el segundo paso o paso de propagación, donde los hidroperóxidos formados se descomponen en productos de peroxidación secundarios, la mayoría de los cuales son aldehídos

(principalmente malondialdehído o MDA), y la etapa final, que incluye la formación de un producto terciario como epóxido o peróxido cíclico (Kerr *et al.*, 2015); la mayor concentración de TBARS se produjo al día 20 en la muestra Control debido a la formación de productos de oxidación secundarios y luego disminuye ligeramente debido a la formación posterior de productos terciarios (Raharjo y Sofos, 1993; Kerr *et al.*, 2015). Wójciak *et al.* (2012) añadieron cepas probióticas del género lactobacilos en un producto cárnico curado y observaron un retardo en la oxidación lipídica y decoloración en comparación con una muestra sin cepas probióticas, similar a lo observado en nuestro trabajo para un producto cárnico cocido.

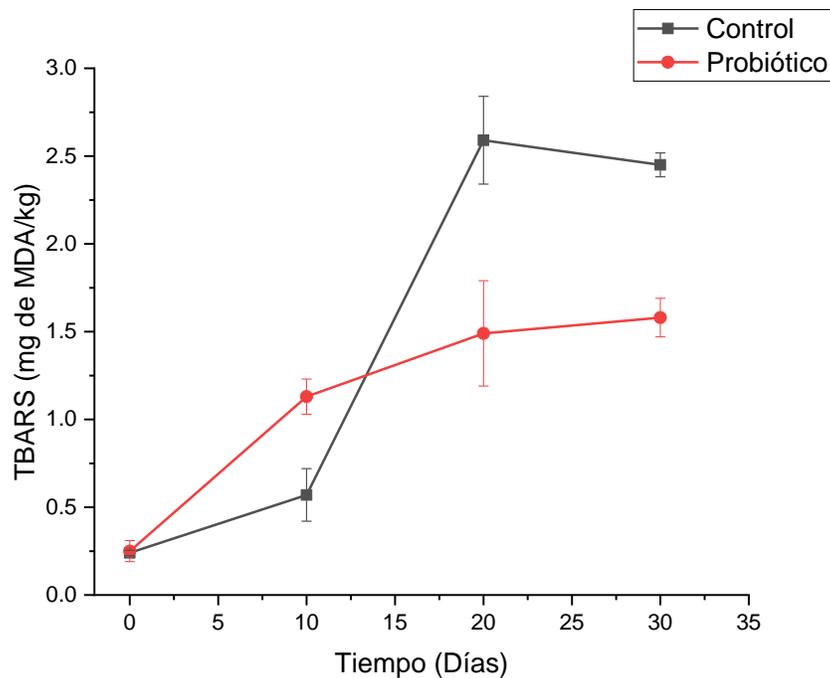


Figura 28. Concentración de especies reactivas al ácido 2-tiobarbiturico en salchicha con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado en almidón de haba modificado por energía de microondas y almacenada a 4 °C.

VIII. Conclusiones

El tratamiento con microondas aumentó la concentración de amilosa, azúcares reductores, solubilidad y absorción de agua. Estos cambios se vieron reflejados en la modificación de sus propiedades fisicoquímicas, disminuyendo la viscosidad y concentración de almidón resistente, lo que sugiere que los almidones fueron altamente hidrolizados. Además, con la aplicación de energía de microondas se logró la modificación del almidón hidrolizado (esterificación con OSA) en tiempos cortos comparado con la esterificación tradicional, lográndose en algunos tratamientos incrementar la concentración de almidón resistente más del 50% respecto al almidón hidrolizado. Finalmente, la aplicación de energía de microondas favorece la obtención de almidón modificado con baja viscosidad y alta solubilidad que son características propicias para uso como material de pared en el secado por aspersion.

La microencapsulación mediante secado por aspersion de *Lactobacillus rhamnosus* GG usando almidón modificado de haba tuvo alto rendimiento (>50%) y sobrevivencia (>80%). Las microcápsulas presentaron propiedades fisicoquímicas y morfológicas aceptables para su funcionalidad y la conservación de la viabilidad de los microorganismos probióticos. Además, tuvieron características similares a las que se obtienen con almidones modificados comerciales.

La elaboración de una salchicha probiótica se logró con el uso de la tecnología de microencapsulación. El producto obtuvo buena aceptación sensorial y no más del 50% de la población es capaz de detectar diferencias entre una salchicha tradicional y probiótica. Se observó una alta sobrevivencia a la digestión *in vitro* y almacenamiento a 4°C por 30 días. La morfología que presentó la salchicha con la adición del microorganismo encapsulado con almidón de haba modificado por energía de microondas fue compacta y con porosidades pequeñas. La evaluación de su vida de anaquel mostró buena textura, color, sobrevivencia de LGG y baja

oxidación lipídica incluso al día 30 de almacenamiento lo que sugiere que el producto podría ser competitivo en el mercado.

Este trabajo describe un método que utiliza una tecnología emergente (energía de microondas) para obtener almidón modificado mediante una ruta en seco, que utiliza menos consumo de energía en un tiempo de reacción más corto y sin efluentes para el medio ambiente. El almidón obtenido tiene características deseables para su uso como material encapsulante, con un buen rendimiento en la encapsulación de probióticos. Además, se comprobó que los probióticos encapsulados con dicho material sobreviven a la aplicación en productos que sean sometidos a tratamientos térmicos.

IX. Referencias

- Agudelo, J., Cano, A., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2017). Disaccharide incorporation to improve survival during storage of spray dried *Lactobacillus rhamnosus* in whey protein-maltodextrin carriers. *Journal of Functional Foods*. 37: 416–423.
- Akanny, E., Bourgeois, S., Bonhommé, A., Commun, C., Doleans-Jordheim, A., Bessueille, F., & Bordes, C. (2020). Development of enteric polymer-based microspheres by spray-drying for colonic delivery of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Journal of Pharmaceutics*. 119414.
- Alcázar-Alay, S. C., & Meireles, M. A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology*. 35: 215–236.
- Altuna, L., Herrera, M. L., & Foresti, M. L. (2018). Synthesis and characterization of octenyl succinic anhydride modified starches for food applications. A review of recent literature. *Food Hydrocolloids*. 80: 97–110.
- Ambigaipalan, P., Hoover, R., Donner, E., Liu, Q., Jaiswal, S., Chibbar, R., Nantanga, K.K.M., & Seetharaman, K. (2011). Structure of faba bean, black bean and pinto bean starches at different levels of granule organization and their physicochemical properties. *Food Research International*. 44: 2962–2974.
- Ambigaipalan, P., Hoover, R., Donner, E., Liu, Q. (2013). Retrogradation characteristics of pulse starches. *Food Research International*. 54: 203–212.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18: 240–251.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., & Rani, R. P. (2014). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Hypercholesterolemia: A Review. *Chinese Journal of Biology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/572754>.
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. Vol. 1. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists Int., Gaithersburg, MD.
- Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT– Food Science and Technology*. 99: 583–593.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* with different wall materials by spray drying. *LWT – Food Science and Technology*. 63: 985–690.
- Arihara, K., & Ohata, M. (2011). Use of probiotics and prebiotics in meat products. In *Processed meats: Improving safety, nutrition and quality*. *Processed Meats*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. <https://doi.org/10.1533/9780857092946.2.403>.

- Armenteros, M., Heinonen, M., Ollilainen, V., Toldrá, F., & Estévez, M. (2009). Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Meat Science*. 83: 104–112.
- Ashwar, A. B., Gani, A., Gani, A., Shah, A., & Massodi, A. F. (2018). Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chemistry*. 239: 287–294.
- Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2019). Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. *Annual Review of Food Science and Technology*. 10: 8.1–8.29.
- Avila-Reyes, S. V., Garcia-Suarez, F. J., Jiménez, M. T., San Martín-Gonzalez, M. F., & Bello-Perez, L. A. (2014). Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*. 102: 423-430.
- Bansal, T., & Garg, S. (2008). Probiotics: From Functional Foods to Pharmaceutical Products. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 9: 267–287.
- Bao, J., Xing, J., Phillips, D. L., & Corke, H. (2003). Physical Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Rice, Wheat, and Potato Starches. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 2283-2287.
- Bartkiene, E., Zavistanaviciute, P., Lele, V., Ruzauskas, M., Bartkevics, V., Bernatoniene, J., Gallo, P., Tenore, G. C., & Santini, A. (2018). *Lactobacillus plantarum* LUHS135 and *paracasei* LUHS244 as functional starter cultures for the food fermentation industry: Characterisation, mycotoxin-reducing properties, optimisation of biomass growth and sustainable encapsulation by using dairy by-products. *LWT - Food Science and Technology*. 93: 649–658.
- Bilenler, T., Karabulut, I., & Candogan, K. (2017). Effects of encapsulated starter cultures on microbial and physicochemical properties of traditionally produced and heat treated sausages (sucuks). *Food Science and Technology*. 75: 425-433.
- Bouchard, J., Chornet, E., & Overend, R. P. (1988). High-performance liquid chromatographic monitoring of carbohydrate fractions in partially hydrolyzed corn starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36: 1188–1192.
- Braşoveanu, M., & Nemţanu, M. R. (2013). Behaviour of starch exposed to microwave radiation treatment. *Starch – Stärke*. 66: 3–14.
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Henkens, T., Kiekens, S., van den Broek, M. F. L., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2017). Enhancing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying and during storage. *International Journal of Pharmaceutics*. 534: 35–41.
- Burgain, J., Gaiani, C., Cailliez-Grimal, C., Jeandel, C., & Scher, J. (2013). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. *Innovative Food*

Science. 19: 233-242.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104: 467–483.

Bustamante, M., Oomah, B. D., Rubilar, M., & Shene, C. (2017). Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chemistry*. 216: 97–105.

Bustos, P., & Bórquez, R. (2013). Influence of Osmotic Stress and Encapsulating Materials on the Stability of Autochthonous *Lactobacillus plantarum* after Spray Drying. *Drying Technology*. 31: 57–66.

Cai, C., Weic, B., Tiana, Y., Maa, R., Chena, L., Qiu, R., & Jin, Z. (2019). Structural changes of chemically modified rice starch by one-step reactive extrusion. *Food Chemistry*. 288: 354–360.

Chávez-Murillo, C. E., Veyna-Torres, J. I., Cavazos-Tamez, L. M., de la Rosa-Millán, J., & Serna-Saldívar, S. O. (2018). Physicochemical characteristics, ATR-FTIR molecular interactions and in vitro starch and protein digestion of thermally-treated whole pulse flours. *Food Research International*. 105: 371–383.

Cheow, W. S., Kiew, T. Y., & Hadinoto, K. (2016). Effects of adding resistant and waxy starches on cell density and survival of encapsulated biofilm of *Lactobacillus rhamnosus* GG probiotics. *LWT - Food Science and Technology*. 69: 497–505.

Cheow, W. S., Kiew, T. Y., & Hadinoto, K. (2014). Controlled release of *Lactobacillus rhamnosus* biofilm probiotics from alginate-locust bean gum microcapsules. *Carbohydrate Polymers*. 103: 587–595.

Consejo Mexicano de la Carne (2022). Compendio estadístico 2022. Recuperado el 2 de abril de 2023 de <https://comecarne.org/estadisticas/>.

Cruz-Benítez, M.M., Gómez-Aldapa, C.A., Castro-Rosas, J., Hernández-Hernández, E., Gómez-Hernández, E., & Fonseca-Florido, H.A. (2019). Effect of amylose content and chemical modification of cassava starch on the microencapsulation of *Lactobacillus pentosus*. *LWT–Food Science and Technology*. 105: 110–117.

Das, A.K., Nanda, P.K., Chowdhury, N.R., Dandapat, P., Gagaoua, M., Chauhan, P., Pateiro, M., Lorenzo, J.M. (2021). Application of pomegranate by-products in muscle foods: oxidative indices, colour stability, shelf life and health benefits. *Molecules*. 26, 467.

De Azevedo Gomes, H., da Silva, E.N., Lopes do Nascimento, M.R., Fukuma, H.T. (2003). Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. *Food Chem*. 80: 433-437.

- Dogan, M., Tekiner, I. H., DemirkesenBicak, H. (2019). Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases. Probiotics From Food Products and Gastrointestinal Health. Elsevier Inc. 13: 169-177.
- Dokoohaki, Z. N., Sekhavatizadeh, S. S., & Hosseinzadeh, S. (2019). Dairy dessert containing microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) with quince seed mucilage as a coating material. LWT. 115: 108429.
- Doron, S., Snyder, D. R., Gorbach, S. (2005). *Lactobacillus* GG: Bacteriology and Clinical Applications. Gastroenterology Clinics of North America. 34: 483-498.
- Eckert, C., Agnol, W. D., Dallé, D., Serpa, G., Maciel, M. J., Lehn, D. N., & Volken de Souza, C. F. (2018). Development of alginate-pectin microparticles with dairy whey using vibration technology: Effects of matrix composition on the protection of *Lactobacillus* spp. from adverse conditions. Food Research International. 113: 65-73.
- Eckert, C., Serpa, V. G., Felipe dos Santos, A. C., Marinês da Costa, S., Dalpubel, V., Lehn, D. N., & Volken de Souza, C. F. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. LWT- Food Science and Technology. 82: 176–183.
- Falfán-Cortés, N., Gaytán-Martínez, M., Verdalet-Guzmán, I., Amaya-Llano, S.L., Ferreira-Grosso, C.R., & Martínez-Bustos, F. (2014). Evaluation of modified amaranth starch as a shell material for encapsulation of probiotics. Cereal Chemistry Journal. 91: 300–308.
- Fan, D., Wang, L., Zhang, N., Xiong, L., Huang, L., Zhao, J., Wang, M., Zhang, H. (2017). Full-time response of starch subjected to microwave heating. Scientific Reports. 7: 3967.
- Fang, S., Zhao, X., Liu, Y., Liang, X., & Yang, Y. (2019). Fabricating multilayer emulsions by using OSA starch and chitosan suitable for spray drying: Application in the encapsulation of β -carotene. Food Hydrocolloids. 93: 102-110.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2019). Carne y Productos Cárnicos. Recuperado el 5 de abril de 2019 de <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html>.
- Farias, T. G. S. de, Ladislau, H. F. L., Stamford, T. C. M., Costa Medeiros, J. A., Mendonça Soares, B. L., Stamford Arnaud, T. M., & Stamford, T. L. M. (2018). Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. LWT. 100: 391-396.
- Fernández, J., Álvarez, J.A., López, J.A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. Food Chem. 59: 345-353.
- Fornal, L. Soral-Śmietana, M., & Fornal, J. (1985). Chemical characteristics and physico-chemical properties of faba bean starch isolated from the by-product after protein extraction. Die Nahrung. 29: 793–801.

- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*. 45: 306–312.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M.J., Sánchez-Zapata, E., & Pérez-Álvarez, J.A. (2010). Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*. 43: 931–942.
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*. 69: 365–371.
- García-Gurrola, A., Rincón, S., Escobar-Puentes, A. A., Zepeda, A., Pérez-Robles, J. F., & Martínez-Bustos, F. (2019). Synthesis and succinylation of starch nanoparticles by means of a single step using sonochemical energy. *Ultrasonics Sonochemistry*. 56: 458–465.
- Gómez-Mascaraque, L. G., Ambrosio-Martín, J., Perez-Masiá, R., & Lopez-Rubio, A. (2017). Impact of Acetic Acid on the Survival of *L. plantarum* upon Microencapsulation by Coaxial Electro spraying. *Journal of Healthcare Engineering*. <https://doi.org/10.1155/2017/4698079>.
- González-Mendoza, M. E., Martínez-Bustos, F., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S.L. (2022). Effect of Microwave Irradiation on Acid Hydrolysis of Faba Bean Starch: Physicochemical Changes of the Starch Granules. *Molecules*, 27, 3528.
- González, Z., & Pérez, E. (2002). Evaluation of lentil starches modified by microwave irradiation and extrusion cooking. *Food Research International*. 35: 415–420.
- Gorbach, S., Doron, S., Magro, F. (2017). The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. *Lactobacillus rhamnosus* GG. Elsevier Inc.. 7: 79-88.
- Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., ... Gaiani, C. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *Journal of Food Engineering*. 193: 10–19.
- Guo, Y., Xu, T., Li, N., Cheng, Q., Qiao, D., Zhang, B., ... Lin, Q. (2019). Supramolecular structure and pasting/digestion behaviors of rice starches following concurrent microwave and heat moisture treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*. 135: 437–444.
- Haasen, N.U., & Shi, H.L. (1991). A characterization of faba bean starch (*Vicia Faba L*). *Stärke*. 43: 205-208.
- Han, J.A., Chung, H.J., & Lim, S.T. (2019). Physical and emulsifying properties of OSA-corn dextrin with various manufacturing methods. *Food Hydrocolloids*, 89: 563–569.

- Hernández-Barrueta, T., Martínez-Bustos, F., Castaño-Tostado, E., Lee, Y., Miller, MJ y Amaya-Llano, SL (2020). Encapsulación de probióticos en aislado de proteína de suero y almidón de huauzontle modificado: un enfoque para evitar la fermentación y estabilizar los compuestos polifenólicos en un té verde probiótico listo para beber. *LWT*. 109131.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung H. J., & Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food Research International*. 43: 399–413.
- Hoyos-Leyva, J. D., Bello-Pérez, L. A., Alvarez-Ramirez, J., & Garcia, H. S. (2016). Microencapsulation using starch as wall material: A review. *Food Reviews International*. 34: 148–161.
- Huertas, A. R. (2011). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 63: 5669–5684.
- Hugues-Ayala, A. M., Sarabia-Sainz, J. A., González-Rios, H., Vázquez-Moreno, L., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2020). Airbrush encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in dry microbeads of alginate coated with regular buttermilk proteins. *LWT*. 117: 108639.
- Jantzen, M., Göpel, A., & Beermann, C. (2013). Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *Journal of Applied Microbiology*. 1: 1029–1036.
- Jeong, D., Han, J. A., Liu, Q., & Chung, H. J. (2019). Effect of processing, storage, and modification on in vitro starch digestion characteristics of food legumes: A review. *Food Hydrocolloids*. 90: 367-376.
- Jiang, N., Kumar, G. D., Chen, J., Mishra, A., & Solval, K. M. (2020). Comparison of concurrent and mixed-flow spray drying on viability, growth kinetics and biofilm formation of *Lactobacillus rhamnosus* GG microencapsulated with fish gelatin and maltodextrin. *LWT*. 109200.
- Joshi, M., Aldred, P., McKnight, S., Panozzo, J. F., Kasapis, S., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2013). Physicochemical and functional characteristics of lentil starch. *Carbohydrate Polymers*. 92: 1484–1496.
- Jyothi, A. N., Rajasekharan, K. N., Moorthy, S. N., & Sreekumar, J. (2005). Microwave-Assisted Synthesis and Characterization of Succinate Derivatives of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Starch. *Starch – Stärke*. 57: 556–563.
- Karaman, M., Tuncel, N. B., & Yilmaz Tuncel, N. (2017). The effect of ultrasound-assisted extraction on yield and properties of some pulse starches. *Starch*. 69: 9–10.
- Kerr, B. J., Kellner, T. A., Shurson, G. C. (2015). Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets. *J. Anim. Sci. Biotech*. 6:30.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S., & Das, G. (2018).

Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*. 26: 927–939.

Khem, S., Bansal, V., Small, D., & May, B. (2015). Comparative influence of pH and heat on whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum* A17 during spray drying. *Food Hydrocolloids*. 54: 162–169.

Krokida, M. (2018). Thermal and nonthermal encapsulation methods. CRC Press. 1-221.

Kumar, Y., Singh, L., Sharanagat, V. S., Patel, A., & Kumar, K. (2020). Effect of microwave treatment (low power and varying time) on potato starch: Microstructure, thermo-functional, pasting and rheological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 155: 27-35.

Kweon, D. K., Choi, J. K., Kim, E. K., & Lim, S. T. (2001). Adsorption of divalent metal ions by succinylated and oxidized corn starches. *Carbohydrate Polymers*. 46: 171–177.

Larkin, P. (2011). Infrared and Raman spectroscopy principles and spectral interpretation. Elsevier. ISBN: 978-0-12-386984-5.

Lapsiri, W., Bhandari, B., & Wanchaitanawong, P. (2012). Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in Different Protectants during Spray Drying and Storage. *Drying Technology*. 30: 1407–1412.

Lewicka, K., Siemion, P., & Kurcok, P. (2015). Chemical Modifications of Starch: Microwave Effect. *International Journal of Polymer Science*. 2015: 1–10.

Li, L., Yuan, T. Z., Setia, R., Raja, R. B., Zhang, B., & Ai, Y. (2019). Characteristics of pea, lentil and faba bean starches isolated from air-classified flours in comparison with commercial starches. *Food Chemistry*. 276: 599–607.

Li, Y., Hu, A., Zheng, J., & Wang, X. (2019). Comparative studies on structure and physicochemical changes of millet starch under microwave and ultrasound at the same power. *International Journal of Biological Macromolecules*. 141: 76–84.

Li, R., Zhang, Y., Polk, D. B., Tomasula, P. M., Yan, F., & Liu, L. (2016). Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. *Journal of Controlled Release*. 230: 79–87.

Lin, D., Zhou, W., He, Q., Xing, B., Wu, Z., Chen, H., Qin, W. (2018). Study on preparation and physicochemical properties of hydroxypropylated starch with different degree of substitution under microwave assistance. *International Journal of Biological Macromolecules*. 125: 290-299.

Liu, B., Fu, N., Woo, M. W., & Chen, X. D. (2018). Heat stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its cellular membrane during droplet drying and heat treatment. *Food Research International*. 112: 56–65.

Liu, L., Chen, P., Zhao, W., Li, X., Wang, H., & Qu, X. (2017). Effect of microencapsulation with the Maillard reaction products of whey proteins and

isomaltooligosaccharide on the survival rate of *Lactobacillus rhamnosus* in white brined cheese. *Food Control*. 79: 44–49.

Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L., & Li, L. (2009). Thermal processing of starch-based polymers. *Progress in Polymer Science*. 34: 1348–1368.

Lu, K., Zhu, J., Bao, X., Liu, H., Yu, L., Chen, L. (2020). Effect of starch microstructure on microwave-assisted esterification. *International Journal of Biological Macromolecules*. 164: 2550-2557.

Ma, Z., Yin, X., Hu, X., Li, X., Liu, L., & Boye, J. I. (2018). Structural characterization of resistant starch isolated from Laird lentils (*Lens culinaris*) seeds subjected to different processing treatments. *Food Chemistry*. 263: 163-170.

Manca, M., Woortman, A., Loos, K., & Loi, M. (2015). Imaging inclusion complex formation in starch granules using confocal laser scanning microscopy. *Starch/Stärke*. 67: 132–138.

Martín, M. J., Lara-villoslada, F., Ruiz, A., & Morales, E. (2014). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 27: 15-25.

Martínez, O., Lapo B., Pérez J., Zambrano C., & Maza F. (2015). Gelatinization mechanism of exportable banana native starch of Ecuador. *Revista Colombiana de Química*. 44: 16-21.

McClements, D. J. (2014). *Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b17280>.

Mishra, S., & Mishra, H. (2012). Technological aspects of probiotic functional food development. *Nutrafoods*. 11: 117–130.

Moayyedi, M., Eskandari, M. H., Rad, A. H. E., Ziaee, E., Khodaparast, M. H. H., & Golmakani, M.-T. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*. 40: 391–399.

Moore, S., Kailasapathy, K., Phillips, M., & Jones, M.R. (2015). Development of a viability standard curve for microencapsulated probiotic bacteria using confocal microscopy and image analysis software. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.002>.

Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G. C., Tian, H., & Bian, X. (2017). Integration of polysaccharide-thermoprotectant formulations for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. *Food Hydrocolloids*. 66: 286–295.

Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., & Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of

modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 91: 380–386.

Nambiar, R. B., Sellamuthu, P. S., & Perumal, A. B. (2018). Development of milk chocolate supplemented with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* HM47 and to determine the safety in a Swiss albino mice model. *Food Control*. 94: 300–306.

Narváez González, E., Figueroa, C., Taba, S., Castaño Tostado, E., & Martínez Peniche, R. (2007). Efecto del tamaño del gránulo de almidón de maíz en sus propiedades térmicas y de pastificado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30: 269-277.

Neffe-Skocińska, K., Rzepkowska, A., Szydłowska, A., & Kolozyn-Krajewska, D. (2018). Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. *Alternative and Replacement Foods. Handbook of Food Bioengineering*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811446-9/00003-4>.

NMX-F-065. (1984). Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Foods. Sausage. Specifications. Normas mexicanas. Recuperado el 10 de enero de 2019 de <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-065-1984.PDF>.

NMX-F-097. (1978). Determinación de nitritos en embutidos. Norma Mexicana. Recuperado el 20 de enero de 2019 de <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-097-S-1978.PDF>.

No, J., & Shin, M. (2019). Preparation and characteristics of octenyl succinic anhydride-modified partial waxy rice starches and encapsulated paprika pigment powder. *Food Chemistry*. 295: 466-474.

NOM-213-SSA1. (2018). Productos y servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Recuperado el 19 de Febrero de 2019 de http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/7665/salud13_C/salud13_C.html.

Nunes, G. L., Etchepare, M., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Barin, J. S., Flores, E., da Silva, C., & de Menezes, C. R. (2017). Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. 89: 128–133.

Nunes, G. L., Motta, M. H., Cichoski, A. J., Wagner, R., Muller, E. I., Codevilla, C. F., da Silva, C., & de Menezes, C. R. (2018). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium* Bb-12 by spray drying and evaluation of its resistance in simulated gastrointestinal conditions, thermal treatments and storage conditions. *Food Technology*. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180035>.

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

Ovando-Martinez, M., Whitney, K., Ozsisli, B., & Simsek, S. (2017).

Physicochemical Properties of Octenyl Succinic Esters of Cereal, Tuber and Root Starches. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41: 1–9.

Panghal, A., Janghu, S., Virkar, K., Gat, Y., Kumar, V., & Chhikara, N. (2018). Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Bioscience*. 21: 80–89.

Pereira, J. O., Soares, J., Monteiro, M. J. P., Gomes, A., & Pintado, M. (2018). Impact of whey protein coating incorporated with Bifidobacterium and Lactobacillus on sliced ham properties. *Meat Science*. 139: 125-133.

Pérez-Chabela, M. L., Díaz-Vela, J., Reyes-Menéndez, C. V., & Totosaus, A. (2013a). Improvement of Moisture Stability and Textural Properties of Fat and Salt Reduced Cooked Sausages by Inoculation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Properties*. 16: 1789–1808.

Parra, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista, Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 8: 95-105.

Pérez-Chabela, M. L., Lara-Labastida, R., Rodríguez-Huezo, E., & Totosaus, A. (2013b). Effect of Spray Drying Encapsulation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria on Meat Batters Properties. *Food and Bioprocess Technology*. 6: 1505–1515.

Pérez-Chabela, M., Totosaus, A., & Guerrero, I. (2008). Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28: 132–138.

Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Encapsulation of Lactobacillus rhamnosus in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 42: 292–297.

Pirarat, N., Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Ooi, E. L., Katagiri, T., & Maita, M. (2015). Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated Lactobacillus rhamnosus GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against Streptococcus agalactiae. *Animal Feed Science and Technology*, 207, 93–103.

Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*. 10: S49–S66.

Poletto, G., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Barin, J. S., Wagner, R., & Ragagnin de Menezes, C. (2019). Study of viability and storage stability of Lactobacillus acidophilus when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. *Food Hydrocolloids*. 95: 238–244.

Principi, A. N., Cozzali, R., Farinelli, E., Brusaferrò, A., & Esposito, S. (2017). Gut dysbiosis and irritable bowel syndrome: the potential role of probiotics. *Journal of Infection*. 76: 111-120.

PROFECO, (2014). Revista del consumidor. Laboratorio Profeco Reporta: Salchichas. Recuperado el 21 de enero de 2019 de https://backend.aprende.sep.gob.mx/media/uploads/tmp/resources/SEC10-2014-RV01-09_13.pdf.

Qi, X., & Tester, R. F. (2019). Starch granules as active guest molecules or microorganism delivery systems. *Food Chemistry*. 271: 182–186.

Radulović, Z., Mirković, N., Bogović-Matijašič, B., Petrušić, M., Petrović, T., Manojlović, V., & Nedović, V. (2012). Quantification of viable spray-dried potential probiotic lactobacilli using real-time PCR. *Archives of Biological Sciences*. 64: 1465–1472.

Raharjo, S., & Sofos, J. N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat Science*. 35: 145–169.

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

Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein - alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*. 4: 891–898.

Rodríguez-Restrepo, Y. A., Giraldo, G. I., & Rodríguez-Barona, S. (2017). Solubility as a fundamental variable in the characterization of wall material by spray drying of food components: Application to microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. *Journal of Food Process Engineering*. DOI: 10.1111/jfpe.12557.

Sadeghi, R., Daniella, Z., Uzun, S., & Kokini, J. (2017). Effects of starch composition and type of non-solvent on the formation of starch nanoparticles and improvement of curcumin stability in aqueous media. *Journal of Cereal Science*. 76: 122–130.

Sajilata, M.G., Singhal, R.S., & Kulkarni, P.R. (2006). Resistant starch—A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 5, 1–17.

Santana, Á. L., Angela, M., & Meireles, A. (2014). New Starches are the Trend for Industry Applications: A Review. *Food and Public Health*. 4: 229–241.

Santivarangkna, C., Hihl, B., & Foerst, P. (2008). Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology*, 25: 429–441.

Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 9: 111–122.

Severiano, P., Gómez, D., Méndez, C., Pedrero, D., Gómez, C., Ríos, S., Escamilla, A., Utrera, M. (2017). Manual de evaluación sensorial. UNAM. PAPIIME PE201210.

Shaharuddin, S., & Muhamad, I. I. (2015). Microencapsulation of alginate-immobilized bagasse with *Lactobacillus rhamnosus* NRRL 442: Enhancement of survivability and thermotolerance. *Carbohydrate Polymers*. 119: 173–181.

Shahidi, F. (2010). Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. *Journal of Food Science*. 69: 146–149.

Shogren, R. L., & Biswas, A. (2006). Preparation of water-soluble and water-swelling starch acetates using microwave heating. *Carbohydrate Polymers*. 64: 16–21.

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

Sjöö, M., & Nilsson, L. (2017). *Starch in Food*. Second Edition. Woodhead Publishing. 195-316.

Song, X., Zhu, W., Li, Z., & Zhu, J. (2010). Characteristics and application of octenyl succinic anhydride modified waxy corn starch in sausage. *Starch - Stärke*, 62(12): 629–636.

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

Sun, Z., Chen, Z., Xu, B., & Shi, Y. S. (2019). Distribution of octenylsuccinate substituents within a single granule of modified waxy maize starch determined by Raman microspectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 216: 282–286.

Sweedman, M. C., Tizzotti, M. J., Schäfer, C., & Gilbert, R. G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: a review. *Carbohydrate Polymers*. 92: 905–920.

Syngai, G. G., Gopi, R., Bharali, R., Dey, S., Lakshmanan, G. M. A., & Ahmed, G. (2016). Probiotics - the versatile functional food ingredients. *Journal of Food Science and Technology*. 53: 921–933.

Tao, Y., Yan, B., Fan, D., Zhang, N., Ma, S., Wang, L., Zhang, H. (2020). Structural changes of starch subjected to microwave heating: A review from the perspective of dielectric properties. *Trends in Food Science & Technology*. 99: 593-607.

Tao, T., Ding, Z., Hou, D., Prakash, S., Zhao, Y., Fan, Z., Zhang, D., Wang, Z., Liu, M., & Han, J. (2019). Influence of polysaccharide as co-encapsulant on powder characteristics, survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 by spray drying. *Journal of Food Engineering*. 252: 10–17.

Tian, Y., Zhang, X., Sun, B., Jin, Z., & Wu, S. (2015). Starch sodium dodecenyl

succinate prepared by one-step extrusion and its properties. *Carbohydrate Polymers*. 133: 90–93.

Tong, F., Deng, L., Sun, R., & Zhong, G. (2019). Effect of octenyl succinic anhydride starch ester by semi-dry method with vacuum-microwave assistant. *International Journal of Biological Macromolecules*. 141: 1128-1136.

Totosaus, A. (2007). Productos cárnicos emulsionados bajos en grasa y sodio. *Nacameh*. 1: 53-66.

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 9: 225–241.

Vandamme, T. F., Gbassi, G. K., Nguyen, T. L., & Li, X. (2016). Microencapsulation of probiotics. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. 97–128.

Villarroel, P., Gómez, C., Vera, C., & Torres, J. (2018). Resistant starch: Technological characteristics and physiological interests. *Revista Chilena de Nutrición*. 45: 271–278.

Wang, M., Sun, M., Zhang, Y., Chen, Y., Wu, Y., & Ouyang, J. (2019). Effect of microwave irradiation-retrogradation treatment on the digestive and physicochemical properties of starches with different crystallinity. *Food Chemistry*. 298: 125015.

Wang, S., Li, T., Wang, S., & Copeland, L. (2017). Effects of hydrothermal-alkali and freezing-thawing pre-treatments on modification of corn starch with octenyl succinic anhydride. *Carbohydrate Polymers*. 175: 361–369.

Watano, S., Shimoda, E., & Osako, Y. (2002). Measurement of Physical Strength of Pharmaceutical Extruded Pellets. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 50: 26–30.

Wu, X., Chang, Y., Fu, Y., Ren, L., Tong, J., & Zhou, J. (2016). Effects of non-solvent and starch solution on formation of starch nanoparticles by nanoprecipitation. *Starch/Staerke*. 68: 258–263.

Wójciak K, Dolatowski ZJ, Okon´ A. (2012) The effect of probiotic strains on oxidative stability of cured pork meat products. *Fleischwirtschaft Int*. 27(1):100–4.

Yan, F., Polk, D. B. (2012). *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health. *Funct Food Rev*. 4(2): 77–84.

Yan, X., Chang, Y., Wang, Q., Fu, Y., Ren, L., & Zhou, J. (2018). Influence of precipitation conditions on crystallinity of amylose nanoparticles. *Starch – Stärke*. 70: 7-8.

Yang, Q., Qi, L., Luo, Z., Kong, X., Xiao, Z., Wang, P., & Peng, X. (2017). Effect of microwave irradiation on internal molecular structure and physical properties of waxy maize starch. *Food Hydrocolloids*. 69: 473–482.

- Ye, J., Hu, X., Luo, S., Liu, W., Chen, J., Zeng, Z., & Liu, C. (2018). Properties of Starch after Extrusion: A Review. *Starch*. 70: 11–12.
- Ye, J., Luo, S., Huang, A., Chen, J., Liu, C., & McClements, D. J. (2019). Synthesis and characterization of citric acid esterified rice starch by reactive extrusion: A new method of producing resistant starch. *Food Hydrocolloids*. 92: 135–142.
- Ying, D., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., & Augustin, M. A. (2013). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*. 5: 98–105.
- Ying, D., Sun, J., Sanguansri, L., Weerakkody, R., & Augustin, M. A. (2012). Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. *Journal of Food Engineering*. 109: 597–602.
- Zhang, B., Mei, J.Q., Chen, B., & Chen, H.Q. (2017). Digestibility, physicochemical and structural properties of octenyl succinic anhydride-modified cassava starches with different degree of substitution. *Food Chemistry*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.061>
- Zhang, Z., Tian, X., Wang, P., Jiang, H., & Li, W. (2019). Compositional, morphological, and physicochemical properties of starches from red adzuki bean, chickpea, faba bean, and baiyue bean grown in China. *Food Science & Nutrition*. 7: 2485–2494.
- Zhong, Y., Liang, W., Pu, H., Blennow, A., Liu, X., & Guo, D. (2019). Short-time microwave treatment affects the multi-scale structure and digestive properties of high-amylose maize starch. *International Journal of Biological Macromolecules*. 137: 870–877.
- Zhou, D., Ma, Z., Yin, X., Hu, X., & Boye, J. I. (2019). Structural Characteristics and Physicochemical Properties of Field Pea Starch Modified by Physical, Enzymatic, and Acid Treatments. *Food Hydrocolloids*. 93: 386-394.
- Zhu, F. (2017). Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food Chemistry*. 229: 542–552.
- Zhu, S. C., Ying, D. Y., Sanguansri, L., Tang, J. W., & Augustin, M. A. (2013). Both stereo-isomers of glucose enhance the survival rate of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG during storage in the dry state. *Journal of Food Engineering*. 116: 809–813.

X. Anexos

Anexo 1. Evaluación de aceptabilidad de salchicha de cerdo tipo Viena.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

Edad: _____ Género: _____ Fecha: _____

Muestra: Salchicha de cerdo

INSTRUCCIONES: De acuerdo a la escala presentada, indica con una cruz el nivel de agrado de los atributos que se muestran en el cuadro. PORFAVOR BEBE AGUA Y COME UN TROZO DE GALLETA CADA VEZ QUE TERMINE DE PROBAR.

	1 	2 	3 	4 	5 	6 	7 	8 	9
	Me disgusta muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta bastante	Me disgusta ligeramente	Ni me gusta ni me disgusta	Me gusta ligeramente	Me gusta bastante	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo
Sabor									
Jugosidad									
Textura									
Cohesividad									
Apariencia general									

Comentarios:

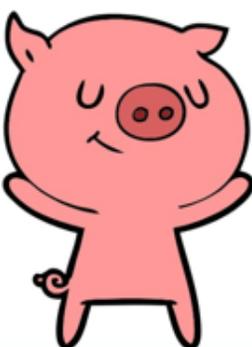
Anexo 2. Poster para el reclutamiento de panelistas.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Departamento de Investigación y
Posgrado en Alimentos



Evaluación sensorial de un producto cárnico embutido "Salchicha de cerdo"



24 de enero • 11:30 a.m. • Planta Piloto de
Alimentos, Edificio Biotecnológico,
Universidad Autónoma de Querétaro

¡PARTICIPA COMO PANELISTA!

Anexo 3. Consentimiento informado.

Consentimiento informado

No. de boleta: _____

Fecha: _____

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos
C.U., Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas,
C.P.76010, Querétaro, Qro.

Título del proyecto: Evaluación del uso de almidón modificado de haba en la microencapsulación de *Lactobacillus ramosus* GG para su incorporación en salchicha cocida.

Investigador responsable: Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Nombre del evaluador: M. en C. Mayra Esthela González Mendoza

El consentimiento informado es el procedimiento mediante el cual se garantiza que usted ha expresado voluntariamente su intención de participar en la investigación, después de haber comprendido la información que se le ha dado, acerca de los objetivos del estudio, los beneficios, las molestias, los posibles riesgos y las alternativas, sus derechos y responsabilidades.

Se considera que usted es apto para ser participe en un estudio de evaluación sensorial. Este consiste en probar una salchicha cocida. La cual está elaborada a base de carne de cerdo y res, grasa de cerdo, almidón, fosfatos, sal y sal cura. La salchicha puede estar o no adicionada con microorganismos probióticos. Este producto no tiene ningún riesgo para usted. La actividad es solamente de tipo experimental, confidencial y de carácter voluntario, por lo que, si desea retirarse de esta actividad, puede hacerlo en cualquier momento, aún durante la prueba. Está en su derecho de aclarar cualquier duda o pregunta que tenga antes, durante y al concluir la prueba.

Justificación del estudio

La demanda de alimentos ha cambiado de una dieta que proporcionaba energía a una dieta con un perfil de nutrientes equilibrado y que confiera beneficios a la salud, dentro de ellos se encuentran los alimentos probióticos. Éstos pueden mejorar diferentes afecciones como disbiosis, resistencia a patógenos, prevención de trastornos gastrointestinales y modulación de la respuesta inmunológica. La incorporación de probióticos en diferentes matrices de alimentos podría representar un gran desafío ya que diferentes especies muestran distintas sensibilidades a la acidez, temperatura, humedad, entre otras.

Por otro lado, el consumo de productos cárnicos cocidos como la salchicha ha incrementado en los últimos años, por lo que es de gran interés el desarrollo de un producto cárnico probiótico de este tipo. La temperatura de cocción en el proceso de elaboración de una salchicha es el punto crítico para la elección del microorganismo.

Lactobacillus rhamnosus GG es uno de los microorganismos probióticos que tienen gran relevancia en la industria de alimentos debido a sus efectos benéficos a la salud, sin embargo, para asegurar su sobrevivencia se pueden utilizar métodos de encapsulación con materiales que provean protección para aumentar su viabilidad, en este contexto, el uso de biopolímeros como el almidón es común en las tecnologías de encapsulación. Actualmente se buscan nuevas alternativas de fuentes de almidón que provean las características necesarias para llevar a cabo de manera efectiva la encapsulación. El almidón de haba es una fuente con alto potencial para ser utilizada por su composición rica en amilosa, contenido de almidón resistente y tamaño de gránulo. Además, para mejorar sus características fisicoquímicas, se pueden realizar modificaciones al almidón nativo usando tecnologías emergentes. El uso de energía de microondas permitirá la obtención de un material con características anfífilas y de baja viscosidad, mejorando sus propiedades de pared. Por lo que la encapsulación con almidón modificado de haba proveerá protección al microorganismo probiótico para su aplicación en la elaboración de una salchicha.

Objetivo del estudio

Obtener un material encapsulante a partir de almidón de haba modificado por energía de microondas, que provea protección térmica al microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* GG para su incorporación en un producto cárnico cocido (salchicha).

Procedimiento del estudio

Si usted cumple con los requisitos para participar en este estudio (Categoría A: sin riesgo) y acepta participar voluntariamente se aplicará la siguiente evaluación sensorial:

1. Se presentarán de manera aleatoria 2 muestras de salchicha cocida codificadas con números de 3 dígitos.
2. Se le brindará agua para que enjuague su paladar antes y entre cada muestra de salchicha.
3. Se le brindará un formato donde se le pedirá cierta información de su persona y donde tendrá que indicar el nivel de aceptación o desagrado de algunos atributos.

Duración del estudio: Se estima que la duración de la prueba sea de 30 min.

Riesgos asociados con el estudio

Se le garantiza que los alimentos que usted va a ingerir son inocuos microbiológicamente. Asegurando su calidad microbiológica mediante los análisis que marca la Norma Mexicana NMX-F-065-1984 y NOM-213-SSA1-2018. Las salchichas a ingerir contienen carne de cerdo y carne de res; grasa de cerdo; almidón (compuesto extraído de una leguminosa, haba) el cual NO tiene relación alguna con los compuestos causantes de alergias por leguminosas como lo son las proteínas "lectinas y gluteninas". Sin embargo, podría contener concentraciones traza de proteína de haba. Por lo que se recomienda que si usted es consciente de presentar alergias asociadas a estos ingredientes desista de

participar en este estudio. En caso de presentar alguna reacción alérgica a uno de los componentes del alimento o presentar algún síntoma de malestar será retirado del estudio y trasladado inmediatamente a la Unidad Médica de la Universidad para que se le proporcione el tratamiento adecuado.

Aclaraciones

- Su participación en la evaluación sensorial es voluntaria.
- Puede preguntar y aclarar cualquier duda que tenga antes, durante y al finalizar la prueba.
- No recibirá compensación económica por participar.
- Puede solicitar que le repitan las instrucciones las veces que sea necesario.
- Puede retirarse de la prueba en el momento que lo desee.
- Si al inicio había dicho que si realizaría la prueba, pero cambia de opinión repentinamente, puede retirarse de la prueba.
- No tiene que hacer ninguna contribución económica a la prueba.
- Los datos o información que obtengamos de su persona serán utilizados exclusivamente para fines de esta investigación.
- Se le comunicará el resultado de la prueba en caso de que usted lo solicite.
- Datos personales serán estrictamente confidenciales.
- La información proporcionada en este consentimiento informado ha sido revisada y aprobada por el comité de bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Cualquier duda sobre el resguardo de su información, dudas sobre su participación o comentarios como contribución a esta prueba puede realizarlos a través de:

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Jefe de investigación y posgrado

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Presidenta de la comisión de bioética

Facultad de química

Universidad Autónoma de Querétaro

Teléfono: 01 442 1921200 ext. 5578,
5514

Correo electrónico: ecastano@uaq.mx

Facultad de química

Universidad Autónoma de Querétaro

Teléfono: 01 442 1921200

Correo electrónico:

iza.perez@hotmail.com

Si usted de manera voluntaria desea participar en el estudio, favor de firmar esta hoja, de lo contrario respetamos su decisión.

Fecha y firma del participante

Consentimiento informado Revocación o Rechazo

Fecha: _____

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos
C.U., Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas,
C.P.76010, Querétaro, Qro.

Título del proyecto: Evaluación del uso de almidón modificado de haba en la microencapsulación de *Lactobacillus rhamosus* GG para su incorporación en salchicha cocida.

Investigador responsable: Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Nombre del evaluador: M. en C. Mayra Esthela González Mendoza

Nombre del participante:

Por mí mismo dejo constancia de mi decisión de revocar la autorización que firmé con anterioridad, en documento de consentimiento informado.

En tales condiciones revoco que se me aplique la evaluación sensorial programada.

Firma del participante y fecha

Anexo 4. Parámetros de calidad de la salchicha de cerdo con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Muestra	Tiempo (días)	Vida de anaquel				
		pH	T (° C)	L*	a*	b*
Control	0	5.8 ± 0.04 ^B	4.0 ± 0.06 ^A	53.2 ± 0.33 ^A	18.5 ± 0.12 ^A	8.1 ± 0.14 ^A
Control	10	5.9 ± 0.04 ^B	3.9 ± 0.05 ^A	54.1 ± 0.12 ^B	18.7 ± 0.10 ^A	7.8 ± 0.05 ^B
Control	20	6.0 ± 0.01 ^A	3.9 ± 0.06 ^A	55.4 ± 0.29 ^C	16.7 ± 0.31 ^B	7.8 ± 0.03 ^B
Control	30	6.1 ± 0.05 ^A	4.1 ± 0.10 ^A	59.7 ± 0.20 ^D	14.7 ± 0.11 ^C	7.4 ± 0.06 ^C
Probióticos	0	5.8 ± 0.05 ^b	4.1 ± 0.12 ^a	53.7 ± 0.34 ^c	18.4 ± 0.24 ^a	7.6 ± 0.11 ^a
Probióticos	10	5.9 ± 0.04 ^{ab}	4.0 ± 0.10 ^a	54.4 ± 0.43 ^{bc}	18.5 ± 0.03 ^a	7.7 ± 0.03 ^a
Probióticos	20	6.0 ± 0.02 ^a	4.0 ± 0.15 ^a	54.9 ± 0.10 ^b	16.8 ± 0.82 ^b	7.4 ± 0.15 ^{ab}
Probióticos	30	6.0 ± 0.04 ^a	4.0 ± 0.06 ^a	58.5 ± 0.47 ^a	16.8 ± 0.30 ^b	7.2 ± 0.15 ^b

n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$). ^{A-D}, comparaciones del Control en el tiempo. ^{a-c}, comparaciones de Probióticos en el tiempo. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C. *HunterLab MiniScan EZ (Hunter Associates Laboratory, Inc.) iluminante D65/10°.

Anexo 5. Perfil de textura de la salchicha de cerdo con y sin la adición de *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Muestra	Tiempo (días)	Vida de anaquel			
		Dureza, N	Cohesividad	Elasticidad	Masticación, N
Control	0	38.4 ± 0.66 ^B	0.70 ± 0.046 ^A	0.90 ± 0.020 ^A	23.9 ± 2.09 ^A
Control	10	43.9 ± 1.55 ^{AB}	0.73 ± 0.054 ^A	0.89 ± 0.041 ^A	28.9 ± 3.19 ^A
Control	20	44.5 ± 1.62 ^{AB}	0.71 ± 0.023 ^A	0.90 ± 0.035 ^A	30.5 ± 5.12 ^A
Control	30	49.2 ± 7.52 ^A	0.74 ± 0.028 ^A	0.87 ± 0.041 ^A	31.6 ± 3.84 ^A
Probióticos	0	36.3 ± 5.07 ^a	0.75 ± 0.079 ^a	0.91 ± 0.025 ^a	26.6 ± 4.04 ^a
Probióticos	10	41.5 ± 1.51 ^a	0.70 ± 0.040 ^a	0.92 ± 0.024 ^a	31.1 ± 5.75 ^a
Probióticos	20	44.8 ± 4.05 ^a	0.66 ± 0.036 ^a	0.89 ± 0.018 ^a	32.0 ± 4.06 ^a
Probióticos	30	46.5 ± 8.91 ^a	0.72 ± 0.031 ^a	0.89 ± 0.019 ^a	33.5 ± 5.88 ^a

n=3 replicaciones, ensayos realizados por triplicado. Media ± desviación estándar, valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencia estadística significativa ($\alpha= 0.05$). ^{A-D}, comparaciones del Control en el tiempo. ^{a-c}, comparaciones de Probióticos en el tiempo. Almacenamiento en refrigeración a 4 °C.