

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS

EFFECTO DEL AGENTE ENCAPSULANTE EN LA VIABILIDAD DE UN
MICROORGANISMO PROBIÓTICO (*Lactobacillus rhamnosus* B442)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN DESARROLLO
DE PRODUCTOS BIÓTICOS

PRESENTA:

I.B.Q. SANDRA VICTORIA AVILA REYES

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. LUIS ARTURO BELLO PÉREZ

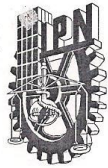
M.C. FRANCISCO JAVIER LEOBARDO GARCÍA SÚAREZ



YAUTEPEC, MORELOS; DICIEMBRE 2011

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad del Departamento de Desarrollo de Tecnológico del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Planta Piloto de la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP), bajo la dirección del Dr. Luis Arturo Bello Pérez, el M. en C. Francisco Javier L. García Suárez y la Dra. María Teresa Jiménez Munguía.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-IPN) por las becas otorgadas para la realización de estos estudios.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 15:00 horas del día 14 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi para examinar la tesis titulada:
Efecto del agente encapsulante en la viabilidad de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* B442)

Presentada por el alumno:

Ávila
Apellido paterno

Reyes
Apellido materno

Sandra Victoria
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	3	4	0
---	---	---	---	---	---	---


aspirante de:

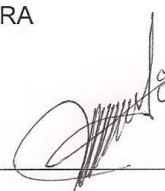
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

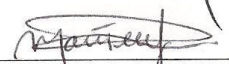
Directores de tesis

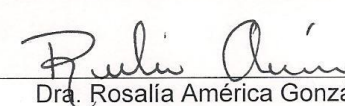

Dr. Luis Arturo Bello Pérez


M.C. Francisco Javier Leobardo García Suárez


Dra. Edith Agama Acevedo


Dr. Miguel Gerardo Velázquez del Valle


Dra. María Teresa Jiménez Munguía


Dra. Rosalía América González Soto

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis "EFECTO DEL AGENTE ENCAPSULANTE EN LA VIABILIDAD DEL MICROORGANISMO PROBIÓTICO *Lactobacillus rhamnosus* B442" es responsabilidad del C. Dr. Luis Arturo Bellos Pérez, el C. M. en C. Francisco Javier Leobardo García Suárez y la C. I.B.Q. Sandra Victoria Ávila Reyes, que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos, a 5 de diciembre del 2011.

ATENTAMENTE



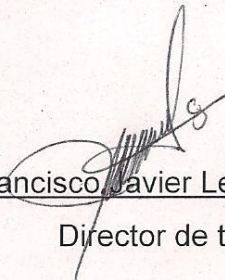
I.B.Q. Sandra Victoria Ávila Reyes

Alumna



Dr. Luis Arturo Bello Pérez

Director de tesis



M. en C. Francisco Javier Leobardo García Suárez

Director de tesis



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **Yautepec, Morelos**, el día 5 del mes de diciembre del año **2011**, la que suscribe **Sandra Victoria Ávila Reyes** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos** con número de registro **B091340**, adscrito al **Centro de Desarrollo de Productos Bióticos**, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Luis Arturo Bello Pérez** y el **M. en C. Francisco Javier Leobardo García Suárez** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Efecto del agente encapsulante en la viabilidad del microorganismo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* B442”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62731, Apartado Postal 24. Teléfonos: (735) 394 20 20, 394 18 96, (55) 57 29 69 00 Ext. 82500 / 82505. Fax 82512, 82521**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

I.B.Q. Sandra Victoria Ávila Reyes

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, porque nunca me ha dejado y me ha demostrado que siempre hay algo por que luchar.

Al **Dr. Luis Arturo Bello Pérez**, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y lograr realizar una meta más.

A mi comité tutorial: **El Dr. L. Arturo Bello P., El M.C. Francisco J.L. García S., La Dra. Edith Agama A., La Dra. Ma.Tere Jiménez M., El Dr. Miguel G. Velázquez del Valle.** por sus oportunas observaciones.

A mis amigos y a mis compañeros que he conocido en el CeProBi: **Cony, Elizabeth, Laura, Lupis Drupis, Yadi, Viri, Vicky, Israel, Isaí, Uli, Ferchito, Victor, Alma, Maribel, Vicente, Rubí, Heidi.**

A **Paola, Verillius, Karim, Rayito, Paty** y **las otras Veros** que siempre me apoyaron y me dieron algo más importante que su ayuda: su amistad. Las quiero mucho.

A la **Dra. Ma. Tere** y al **Dr. Aurelio** por su apoyo, disposición y consejos para sacar adelante el trabajo durante mi estancia en la universidad.

Al "**Inge. Francisco**" y a la **Dra. Agama** por su paciencia, apoyo y amistad brindada a lo largo de estos dos años.

Al CONACYT y PIFI, por darme la oportunidad de realizar un sueño.

.....y a todos aquellos que **Dios** me puso en mi camino y que tanto me han ayudado, enseñándome que siempre se aprenden cosas nuevas.

"La fuerza no proviene de la capacidad física, sino de la voluntad indomable."

Mahatma Ghandi

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedico a:

Mis padres **Rode Reyes Flores** y **José Ávila Figueroa** (†), que siempre me han apoyado en todas mis decisiones. En especial a mi “amá” porque nunca me ha dejado sola y siempre ha estado conmigo y con mis bebés. Porque sin su dedicación, y fortaleza, no habría logrado llegar a donde estoy. Papito, no sabes cuánto siento que no te encuentres ahora conmigo.

Mis hermanos, **Eva, Carla, Norma, Jesús y Nacho**, por ser tan geniales, aun con todo y la forma tan particular de ser de cada quien. Ya que aun con todos los momentos de enojos siempre ha habido momentos de alegrías que los han superado.

A mi amigo y compañero, **Héctor** que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas, haciendo que estas últimas sean más pasaderas.

Y a los más importantes, esas personitas que se han convertido en el motor de mi vida: mis bebés, **Centeotl, Quitzé** y a mi nena hermosa, **Mixtly** (†), que me hizo ver que hay cosas más importantes en esta vida, como el tiempo dedicado a uno mismo.

RESUMEN

En los últimos años los microorganismos (m.o.) probióticos han cobrado importancia, ya que su consumo tiene efectos en la salud del sistema digestivo. Por esta razón, la industria está buscando procesos para que estos microorganismos no pierdan su viabilidad y cumplan su función, por lo que se ha recurrido a la encapsulación como un método de protección frente a las condiciones ambientales como la humedad o temperatura que puedan disminuir su viabilidad. Los probióticos necesitan de sustancias prebióticas para mantener su viabilidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes concentraciones de dos prebióticos (almidón de arroz e inulina) como material de pared en la viabilidad de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*). Para determinar las condiciones del proceso, se realizó un diseño experimental factorial 2^3 para cada uno de los agentes encapsulantes, estimándose como variable de respuesta la eficiencia de la encapsulación, manifestada como el número de microorganismos viables en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g). Se evaluó la aplicación como agente encapsulante de manera individual, para lo cual se prepararon suspensiones de los prebióticos al 10, 15 y 20% (p/p), las cuales fueron inoculadas con 1×10^9 UFC/g de *L. rhamnosus*. Cada suspensión fue sometida al proceso de secado por aspersión empleando una velocidad de flujo de 14 g/min y temperaturas de entrada de 135 y 155 °C, evaluando una suspensión al 15% y 145°C como punto central. A los polvos obtenidos se les determinó el porcentaje de humedad, actividad de agua (a_w), densidad de bulto, tamaño de partícula, fermentabilidad, morfología y la distribución de los lactobacilos en los agentes encapsulantes. También, se evaluó la viabilidad a dos temperaturas de almacenamiento durante 4 semanas (32 días): ambiente (25°C) y refrigeración (4°C), observándose que la menor reducción de ciclos logarítmicos se obtuvo en las condiciones de: almidón al 20%, temperatura de entrada de 135°C y temperatura de salida de 65°C, mismas que al término del almacenamiento no presentaron diferencias significativas en comparación con otras concentraciones de almidón, pero sí con los encapsulados de inulina. Los resultados muestran que la formación de microcápsulas de aglomerados porosos con el almidón de arroz protegieron de manera efectiva a los microorganismos indistintamente de la temperatura a la que fueron almacenados, y las UFC/g obtenidas al final de esta prueba están dentro de los parámetros establecidos para que sea considerado como un producto funcional (5.83×10^8 UFC/g). Los polvos con inulina presentaron reducciones logarítmicas mayores a la temperatura de 25°C, por lo que la temperatura de refrigeración fue más adecuada para este agente al tener una menor reducción. Los valores de humedad y la a_w obtenidos para los polvos durante éste proceso fueron bajos y considerados apropiados. Se observó también un tamaño de partícula homogéneo para ambos agentes (5–6 μm) durante el proceso de encapsulación. A los polvos que presentaron mejor viabilidad durante el proceso de estabilidad se les determinó la capacidad fermentativa (prebiótica), observándose que ambos encapsulantes fueron utilizados por el microorganismo (en diferente proporción) reflejándose como un aumento en la producción de ácido láctico (disminución del pH) y el crecimiento del m.o. en el medio MRS modificado.

ABSTRACT

In recent years, probiotics have become increasingly important. Final their consumption has effects on the human digestive system. For this reason, the industry is looking for processes which preserve the viability of these types of microorganisms (m.o.) to fulfill their function, such as the techniques of encapsulation that protect them against environmental conditions that may reduce their viability. Probiotics need prebiotic substances (such as inulin and resistant starch) to maintain their viability. The aim of this study was to evaluate the effect of native rice starch and inulin as wall material in the encapsulation of probiotics. To determine the conditions of process, an experiment was carried out for each of the encapsulating agents, estimated as the variables of response: the encapsulation efficiency, expressed as the number of viable microorganisms in colony forming units (CFU/g). To evaluate the individual application of the encapsulating agent bacterial suspensions of *Lactobacillus rhamnosus* were proposed at 10^9 CFU/g at 10,15 and 20 % concentration (w/w). Each suspension was dried sprayed, using a flow rate of 14 g/min and inlet temperatures of 135 and 155°C, considering a suspension of 15% and 145°C as a central point. The obtained powders were analyzed for moisture content, water activity (a_w), bulk density, particle size, fermentability, morphology and distribution of lactobacillus in the encapsulating agents. Also, the viability of storage at two temperatures for 4 weeks (32 days), was assessed: at room temperature (25°C) and refrigeration temperature (4°C), observing that the smaller reduction in log units was obtained in the following conditions: starch 20%, inlet temperature of 135°C, and outlet temperature 65°C, and when the storage time effect was tested, the viability of the m.o. did not change at the different starch concentrations, but difference was found with the m.o. encapsulated with inulin. The results show that the formation of microcapsules porous of rice starch effectively protected the microorganisms regardless of the temperature at which they were stored, and the CFU/g obtained at the end of this test are within the parameters established to be considered a functional product (5.83×10^8 CFU/g). Powders with inulin had log reductions greater of 25°C, the refrigeration temperature was more appropriated to have a smaller reduction. Humidity and water activity (a_w) values obtained for the powders were low and they are considered appropriate. There was also a homogeneous particle size for both agents (5-6 μm) during the encapsulation process. The powder with higher viability during the stability test were used to determine the fermentative capacity (prebiotic test), showing that both wall material were used by the m.o. in different level due to the acid lactic production (decrease of pH) in the MRS medium.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Índice	iii
Índice de figuras	vi
Índice de cuadros	viii
Lista de abreviaturas	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Encapsulación	3
2.2. Estructura de las microcápsulas	4
2.3. Materiales encapsulados	6
2.3.1. Microorganismos probióticos	7
2.3.2. Lactobacilos	9
2.3.2.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	12
2.3.3. Aplicaciones de la encapsulación de microorganismos probióticos	14
2.4. Material pared	15
2.4.1. Prebióticos	18
2.4.2. Almidón	19
2.4.2.1. Amilosa	22
2.4.2.2. Amilopectina	24
2.4.3. Inulina	24
2.5. Técnicas de encapsulación	28
2.5.1. Secado por aspersion	30
2.5.2. Propiedades de los productos encapsulados por secado por aspersion	31

2.6. Métodos de liberación	33
2.7. Alimentos funcionales	34
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. HIPÓTESIS	36
V. OBJETIVOS	37
5.1. General	37
5.2. Específicos	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1. Materiales	39
6.2. Métodos	39
6.2.1. Preparación de las dispersiones de los agentes encapsulantes	39
6.2.2. Caracterización de las disoluciones de los agentes encapsulantes	40
6.2.2.1. Viscosidad	40
6.2.2.2. Densidad absoluta	41
6.2.3. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i>	42
6.2.4. Preparación del microorganismo	43
6.2.5. Secado por aspersion	44
6.2.5.1. Calibración	44
6.2.5.2. Proceso de secado	44
6.2.5.3. Microencapsulación de <i>L. rhamnosus</i>	45
6.2.6. Caracterización fisicoquímica de los polvos obtenidos en el secado	46
6.2.6.1. Humedad	46
6.2.6.2. Actividad de agua	47
6.2.6.3. Densidad de bulo	47
6.2.6.4. Tamaño de partícula	48
6.2.7. Morfología	48
6.2.7.1. Microscopía electrónica de barrido	48
6.2.7.2. Microscopía confocal de barrido láser	48

6.2.8. Recuento microbiano	49
6.2.9. Evaluación del agente encapsulante como prebiótico	52
6.2.9.1. pH	53
6.2.9.2. Acidez titulable	53
6.2.9.3. Cinética de crecimiento	54
6.3. Análisis estadístico	54
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
7.1. Caracterización de las dispersiones de los agentes encapsulantes	55
7.2. Curva de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i>	57
7.3. Secado por aspersión	58
7.4. Caracterización fisicoquímica de los encapsulados	59
7.4.1. Humedad , a_w y densidad aparente	59
7.4.2. Tamaño de partícula	62
7.5. Caracterización morfológica de las microcápsulas	64
7.5.1. Microscopía Electrónica de Barrido	64
7.5.2. Microscopía Confocal de Barrido Láser	67
7.6. Recuento microbiano	69
7.6.1. Viabilidad al término del secado por aspersión	69
7.6.2. Viabilidad en el ensayo de estabilidad	71
7.7. Evaluación del agente encapsulante como prebiótico	75
VIII. CONCLUSIONES	79
IX. BIBLIOGRAFÍA	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		Página
1	Morfología de diferentes tipos de microcápsulas a) forma esférica; b) forma irregular; c) forma multi-núcleo; d) forma multipared y e) forma matricial	5
2	Efectos benéficos de los microorganismos probióticos en la salud humana	8
3	Población bacteriana del tracto gastrointestinal humano	10
4	Estructura helicoidal de la molécula de amilosa	23
5	Estructura química de la molécula de amilopectina	25
6	Estructura química de la inulina	27
7	Esquema del proceso de secado por aspersión	32
8	Diagrama del planteamiento experimental	38
9	Sembrador en espiral Autoplate 4000	42
10	Secador por aspersión Büchi modelo B-290	45
11	Esquema de la técnica de viabilidad por conteo en placa	50
12	Escáner Qcount	51
13	Cinética de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i>	57
14	Distribución de tamaño de partícula de los encapsulados con almidón nativo de arroz (a) e inulina (b)	63
15	Micrografía electrónica de barrido de microcápsulas de	65

aglomerados formados con almidón nativo de arroz (a, b) y microcápsulas formadas con inulina de achicoria (c, d) mediante la técnica de secado por aspersión

- | | | |
|-----------|--|----|
| 16 | Micrografía confocal de barrido láser de: (a) almidón nativo de arroz, (b) inulina de achicoria, (c) <i>L. rhamnosus</i> , (d) <i>L. rhamnosus</i> en un aglomerado formado con almidón nativo de arroz, (e, g) <i>L. rhamnosus</i> en la periferia de los gránulos de almidón y (f, h) encapsulados de inulina. | 68 |
| 17 | Viabilidad de <i>L. rhamnosus</i> encapsulado en almidón nativo de arroz e inulina sometido a estabilidad en condiciones de almacenamiento de 4 y 25°C: a) ANA y b) IN. | 74 |
| 18 | Comportamiento del porcentaje de acidez (como ácido láctico)(a) y pH (b) de <i>L. rhamnosus</i> en medios de cultivo sin dextrosa como la fuente principal de carbono y un control sin cambio en la composición inoculados con <i>L. rhamnosus</i> . | 77 |
| 19 | Cinética de crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> utilizando el agente encapsulante (almidón e inulina) como fuente de carbono. | 78 |
-

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Microorganismos que son considerados como probióticos en humanos	11
2	Clasificación científica de <i>L. rhamnosus</i>	13
3	Principales componentes utilizados como material pared en la encapsulación	16
4	Carbohidratos de interés considerados como prebióticos	20
5	Tratamientos resultantes del diseño experimental para el encapsulamiento de <i>L. rhamnosus</i> mediante secado por aspersión	40
6	Propiedades fisicoquímicas de las dispersiones encapsulantes	56
7	Temperaturas de salida del secador	59
8	Propiedades fisicoquímicas de los encapsulados con <i>L. rhamnosus</i>	61
9	Viabilidad de <i>L. rhamnosus</i> al término del proceso de secado por aspersión utilizando almidón de arroz e inulina a diferentes concentraciones	70
10	Resultados de viabilidad de <i>L. rhamnosus</i> en los encapsulados almacenados en refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente (25°C) durante 32 días	72

ABREVIATURAS

Anotación	Significado
m.o.	Microorganismo
UFC/g	Unidades formadoras de colonias por gramo
p/p	Peso/peso
g/min	Gramos por minuto
°C	Grados Celsius
a_w	Actividad de agua
Log	Logaritmo
μm	Micrómetro
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
ANA	Almidón nativo de arroz
IN	Inulina
GP	Grado de polimerización
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
FOS	Fructooligosacáridos
V	Volumen
BAL	Bacterias ácido lácticas
h	Hora
g	Gramo
g/mL	Gramo por mililitro
μ	Viscosidad
μ_c	Viscosidad cinemática
ρ_s	Densidad de la solución

rpm	Revoluciones por minuto
mm	Milímetros
L/h	Litros por hora
v/v	Volumen/ volumen
ρ_b	Densidad de bulto
N_0	Población microbiana antes del secado
N	Población microbiana después del secado
g/L	Gramos por litro
g/cm ³	Gramos por centímetro cúbico
cP	Centipoise
p/v	Peso/ volumen
mL/min	Mililitro por minuto
CL	Ciclo logarítmico

I. INTRODUCCIÓN

En el último siglo, la nutrición ha sido dirigida básicamente a proveer la cantidad suficiente de alimentos que cubran los requerimientos de nutrientes en una dieta bien balanceada, proporcionando además al consumidor un sentimiento de satisfacción y bienestar. Las recientes investigaciones en ciencias biológicas y de alimentos han llevado a observar que la dieta controla y de alguna forma modula, las diversas funciones en el organismo humano, contribuyendo a que éste se encuentre en un mejor estado de salud, reduciendo de esta manera, el riesgo de padecer algunas enfermedades y dando origen al concepto de “Alimentos funcionales” (Ferrer y Dalmau, 2001). Dentro de éste grupo se encuentran aquellos que contienen microorganismos probióticos, del cual su consumo se encuentra asociado con beneficios a la salud del sistema digestivo (Shanahan, 2002; Guarner y Malagelada, 2003).

En la actualidad, uno de los retos para la tecnología alimentaria, respecto a la adición de probióticos en un alimento, es garantizar que dichos microorganismos lleguen vivos al intestino grueso, no contaminados y sin variación o mutación, es decir, mantener el cultivo funcional, con una concentración en el orden de 1×10^7 UFC/mL al momento de su consumo (Guarner y Schaafsma, 1998; Ouwehand y Salminen, 1998; Ding y Shah, 2007). Por lo anterior, se han buscado diferentes alternativas para evitar la pérdida y el deterioro de los probióticos, al interactuar éstos con otros compuestos al momento de su consumo o durante el procesamiento de este. La encapsulación, es uno de los métodos que mejores resultados ha dado para lograr este propósito, introduciendo a los microorganismos en una matriz o material de recubrimiento, para que su estabilidad metabólica y actividad funcional sea conservada (Chen y Col. 2005; Hernández, 2010).

Los prebióticos son aquellos componentes de los alimentos (almidón resistente, fructooligosacáridos, inulina), que no entran en el proceso de digestión en el intestino delgado, por lo que son utilizados en el colon como sustrato para el desarrollo de la flora intestinal (Gibson y Roberfroid, 1995; Simmering y Blaut, 2001) ayudando a que

mejoren las funciones de defensa inmunológica del intestino del huésped (Kaur y Col. 2002; Roberfroid, 2007). En un almidón nativo, la resistencia a la digestión puede ser causada por las limitaciones de accesibilidad física, por la estructura granular del almidón nativo o modificación física en el proceso de secado, por lo que se puede considerar que éste presenta la característica para funcionar como un prebiótico (Lakkis, 2007). La inulina, por otro lado, no puede ser digerida sino por la actividad bacteriana debido a la presencia de enlaces β -(2-1), lo anterior resulta en una comunidad en la que predominan las bacterias ácido lácticas teniendo con esto un efecto prebiótico (Kaur y Gupta. 2002; Roberfroid, 2007).

Se han utilizado almidones modificados de diferentes fuentes en la encapsulación de sabores, colores, vitaminas, microorganismos, por mencionar algunos. Sin embargo, tales modificaciones implica el aumento de costos. El almidón de gránulo pequeño, como lo es el almidón nativo de arroz, en presencia de proteína tiende a formar agregados esféricos (Zhao y Whistler, 1994; Beirao da Costa y col., 2011), por lo que ha sido utilizado en la encapsulación de vitamina C y aceite de orégano, obteniendo microcápsulas estables. El uso de la inulina como material de pared ha sido poco explorado, limitándose a la encapsulación de carotenoides, polifenoles (Sáenz y col., 2009) y recientemente en microorganismos probióticos (Hernández, 2010).

De esta manera, el conocimiento de carbohidratos como el almidón resistente y oligosacáridos (como la inulina), y el papel prebiótico que ambos desempeñan, puede ser muy interesante para darles un carácter funcional al ser utilizados como agentes encapsulantes de microorganismos probióticos, diversificando de esta manera sus aplicaciones. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos carbohidratos con características prebióticas, almidón de arroz e inulina, como material de pared en la encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* B442 mediante la técnica de secado por aspersión.

II. ANTECEDENTES

2.1. Encapsulación

Los procesos de encapsulación fueron desarrollados para su aplicación comercial entre 1930 y 1940, por la National Cash Register (NCR) para la encapsulación de un tinte empleando gelatina como agente encapsulante, mediante un proceso conocido como coacervación (Pedroza-Islas, 2002). Actualmente, se utilizan indistintamente los términos encapsulación y microencapsulación en las industrias (alimentaria y farmacéutica) cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades (Gibbs y col., 1999; Yáñez y col., 2002), por lo que, dentro del término de microencapsulación, se incluyen las nanocápsulas, microcápsulas, micropartículas y sustancias activas atrapadas o embebidas (Pedroza-Islas, 2002).

La encapsulación hoy en día se aplica para preservar y/o proteger numerosos ingredientes comerciales (Pszczola, 1998; Gibbs y col., 1999), ya que ésta envasa, separa y almacena materiales a escala microscópica para su posterior liberación, considerándola de esta manera, una forma especial de empacar, debido a que un material en particular puede ser recubierto de manera individual, para protegerlo del ambiente y agentes extraños (Pedroza-Islas, 2002; Loksuwan, 2007).

El material que es cubierto se refiere como fase interna (núcleo) y el material que recubre es llamado pared y generalmente no reacciona con el material a encapsular (Balassa y Brody, 1968). Se puede definir a la encapsulación como el proceso fisicoquímico o mecánico, en el cual se generan emulsiones estables para generar partículas que contienen ingredientes activos cubiertos por una capa de otro material con el fin de protegerlas, controlando la liberación del ingrediente principal. Asimismo, se ven involucrados fenómenos de transferencia de masa entre el núcleo (ingrediente activo) y la capa protectora (cápsula o recubrimiento) (Lakkis, 2007; Wilson y Shah, 2007; Hernández, 2010).

De manera general, la encapsulación se ha convertido en un proceso muy atractivo en las últimas décadas, tanto para productos alimentarios como para compuestos químicos, fármacos o cosméticos, manteniendo el propósito de incrementar la estabilidad y la vida media o de anaquel de éstos (Fuchs y col., 2006; Reyes-Nava, 2010).

2.2. Estructura de las microcápsulas

Una microesfera o microcápsula se compone de una sola o de la combinación de varios ingredientes tales como: azúcares, gomas, proteínas, polisacáridos, lípidos o de polímeros sintéticos modificados, que se encuentran revistiendo el núcleo, éstas se producen en forma de geles o en forma de polvo seco.

Las microcápsulas presentan una amplia variedad de estructuras, así como geometrías (Figura 1); por mencionar algunas: se encuentran formas esféricas con una fase interna continua rodeada por una pared continua también, a esto se le conoce como estructura de partícula simple (Figura 1a), mientras que otras pueden tener una geometría irregular (Figura 1b), o una estructura multipared (Figura 1d), las cuales tienen varias composiciones; de igual manera pueden contener diversos núcleos en una misma estructura (Figura 1c) o tener microcápsulas de tipo matricial, donde el material activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica (Figura 1e), (Shahidi y Han, 1993; Thies, 1996; Gibbs y col., 1999; Pedroza-Islas, 2002).

Los intervalos del tamaño al que pertenece cada tipo de estructura, puede decirse que van desde 0.2 a 5000 μm (King, 1995; Re, 1998), cuando el tamaño es inferior a 1 μm , se le denomina nanocápsula (Lozano-Berna, 2009; Salager, 2009; Reyes-Nava, 2010), de 1 μm a 5000 μm microcápsulas y mayores a 5000 μm se consideran macrocápsulas.

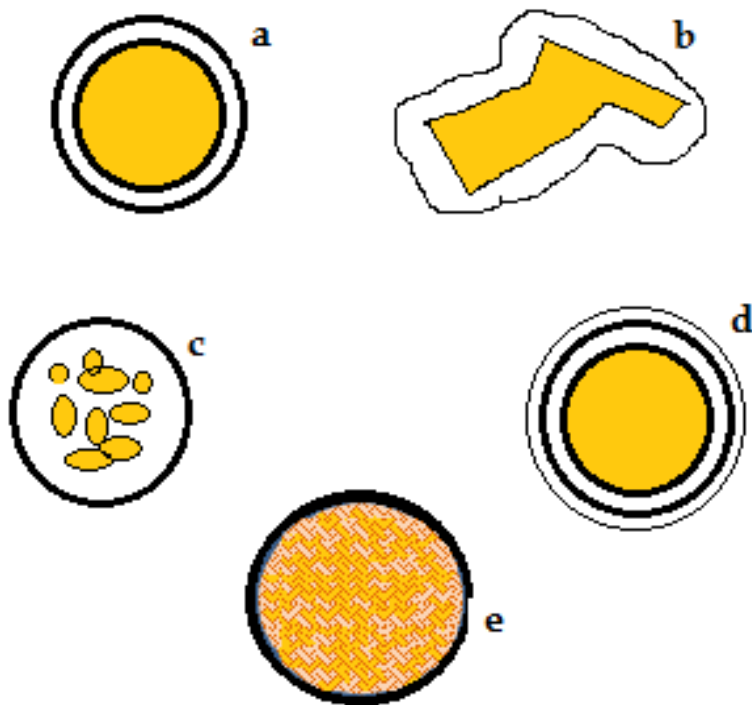


Figura 1. Morfología de diferentes tipos de microcápsulas a) forma esférica; b) forma irregular; c) forma multi-núcleo; d) forma multipared y e) forma matricial (Gibbs y col., 1999).

Dependiendo de las características fisicoquímicas del material activo, de la composición del material pared y de la técnica de microencapsulación empleada, se podrán obtener las diversas estructuras que se observan en la Figura 1 (Reyes-Nava, 2010).

Las técnicas de microscopía permiten detectar la estructura de las microcápsulas así como observar y analizar sus características morfológicas y distribución de tamaños. Entre las técnicas más utilizadas se pueden mencionar a la microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (MEB) y técnicas de difracción de rayo láser.

2.3. Materiales encapsulados.

Muchos de los principios activos que se manejan en la industria, y no sólo de alimentos, son susceptibles a las condiciones que prevalecen en el ambiente, como son la exposición a la luz, el oxígeno, la humedad y las altas temperaturas, con lo cual se alteran sus propiedades (Reineccius, 1991; Popplewell y col., 1995). De esta manera, la protección que ofrece la encapsulación, puede ayudar a minimizar el daño ocasionado por dichos factores, permitiendo mantener su estabilidad, viabilidad y una máxima absorción de los compuestos, con un mínimo de reacciones adversas como las reacciones de oxidación (Yáñez y col., 2002; Desai y Park, 2005).

Entre algunos de los compuestos activos que se pueden mencionar, y en los que se ha utilizado el proceso de microencapsulación se encuentran: sabores, agentes antimicrobianos, activos nutraceúticos y terapéuticos, vitaminas, minerales, antioxidantes, colores, ácidos, bases, reguladores, edulcorantes, nutrientes, enzimas, levaduras, agentes químicos para fermentación, grasas, aceites, oleorresinas y microorganismos probióticos, entre otros (Madene y col., 2006; Champagne y Fustier, 2007; Guevara, 2009).

2.3.1. Microorganismos probióticos

La palabra probiótico se deriva de dos palabras griegas que son: *pro* (a favor de) y *biótico* (vida). Lilly y Stillwell en el año de 1965 intentaron utilizar por primera vez el término, en el sentido de que una sustancia microbiana estimulara el crecimiento de otro microorganismo (Fooks y col., 1999). Sperti (1971) sustituyó esta definición por: extracto de tejido que mejora el crecimiento bacteriano, sin lograr la aceptación general para ésta. Fuller (1989) definió a los microorganismos probióticos como: “un suplemento alimenticio con microorganismos vivos que afecta benéficamente al huésped mejorando el equilibrio microbiano intestinal” con lo que logró una mayor aceptación. La definición más reciente, y la más ampliamente aceptada al día de hoy es la publicada por la FAO/ WHO (2002) la cual menciona lo siguiente: “*los microorganismos probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped*”.

De acuerdo a lo anterior, los microorganismos probióticos son las bacterias “*benéficas*” que habitan normalmente en el tracto intestinal y aunque la palabra bacteria se asocia generalmente con los gérmenes, las bacterias benéficas ayudan al cuerpo con la función de mantener la salud y combatir a las enfermedades (Dave y Shah 1998; Kailasapathy y Sultana, 2003). En la Figura 2, se observan algunos de los beneficios que aportan los microorganismos probióticos a la salud del huésped cuando son consumidos manteniendo aun su actividad.

Se ha reportado que la cantidad en la que deben de encontrarse los probióticos en un producto, al menos al momento de su consumo, se encuentra en el orden de 1×10^7 UFC/ mL de microorganismos vivos (Guarner y Schaafsma 1998; Ouwehand y Salminen 1998; Ding y Shah 2007), para que de esta manera se puedan conferir los beneficios a la salud de los consumidores. La literatura indica que es en la fase estacionaria de la curva de crecimiento cuando tienen su mayor actividad (Champagne y col., 1996).

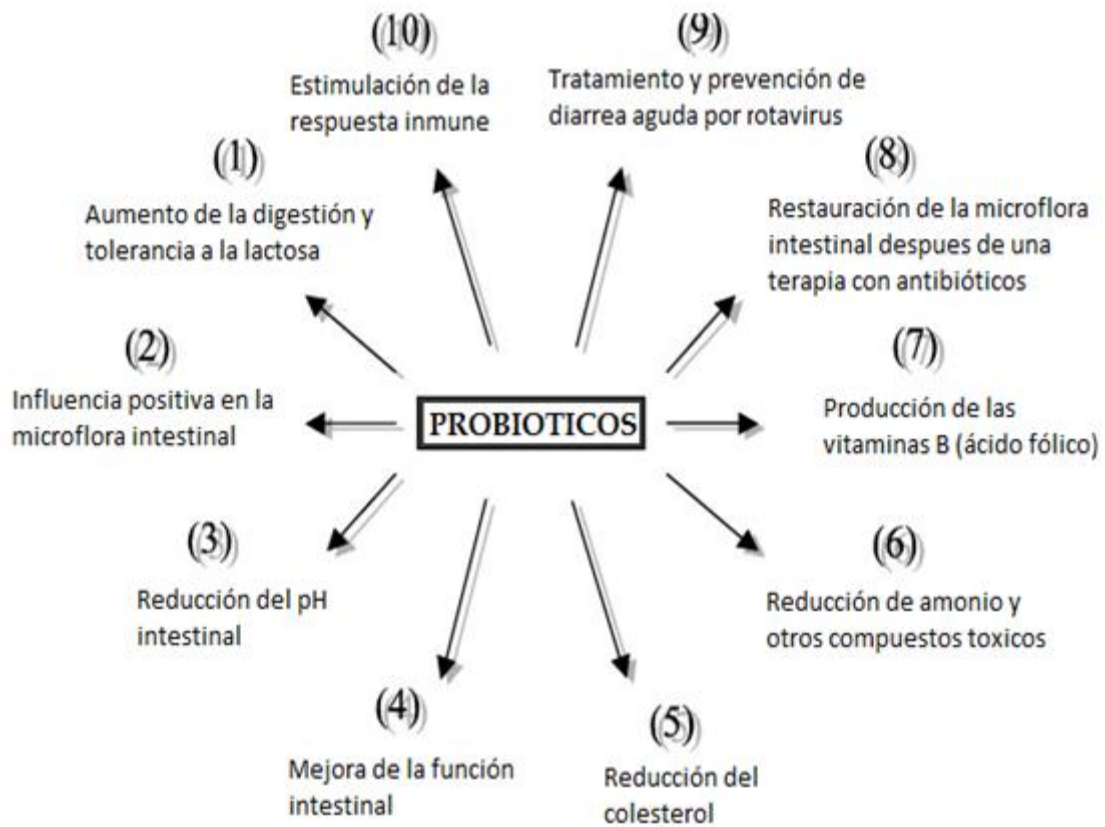


Figura 2. Efectos benéficos de los microorganismos probióticos en la salud humana (adaptado de Gibson y Roberfroid, 1995).

La población bacteriana en el estómago es baja $<10^3$, debido al pH ácido en este sitio, ya que las secreciones ácidas, biliares y pancreáticas destruyen casi todas las bacterias que pasan por este lugar, por lo que, difícilmente éstas pueden incrementarse al llegar al intestino delgado, ya que el tiempo de tránsito es reducido (4 a 6 h) (Figura 3). El número de bacterias aumenta progresivamente de aproximadamente 10^4 células en el yeyuno a 10^7 UFC/g de contenido en el íleon distal. En el intestino grueso las bacterias se incrementan a niveles de 10^{11} a 10^{12} UFC/g, puesto que el tiempo de tránsito de este sitio, hasta el recto, es de 54 a 56 horas (World Gastroenterology Organisation, 2008).

De entre los microorganismos probióticos más importantes se encuentran a las bacterias ácido lácticas (BAL), fundamentalmente lactobacilos y bifidobacterias (De las Cagigas y Blanco, 2002). En el Cuadro 1 se observan algunas de las BAL que son consideradas como probióticos.

2.3.2. Lactobacilos

Los *Lactobacillus* son un género de bacteria de la familia Lactobacillaceae, Gram-positiva, anaerobias. Crecen bien en medios ligeramente ácidos, pH de 6.4 hasta 4.5, y con un óptimo desarrollo entre 5.5 y 6.2 (Forrest, 1979). Su crecimiento cesa a valores de pH de 3.6 a 4.0 (dependiendo de la especie y la cepa), disminuyendo de manera notable en medios neutros o ligeramente alcalinos. Mediante la formación de ácido láctico, reducen el crecimiento de otros microorganismos, excepto el de otras BAL y levaduras (Samaniego y Sosa, 2000).

La mayoría de las cepas de *lactobacillus* son aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento en la concentración de CO_2 (entre el 5 y 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del desarrollo superficial sobre medios sólidos

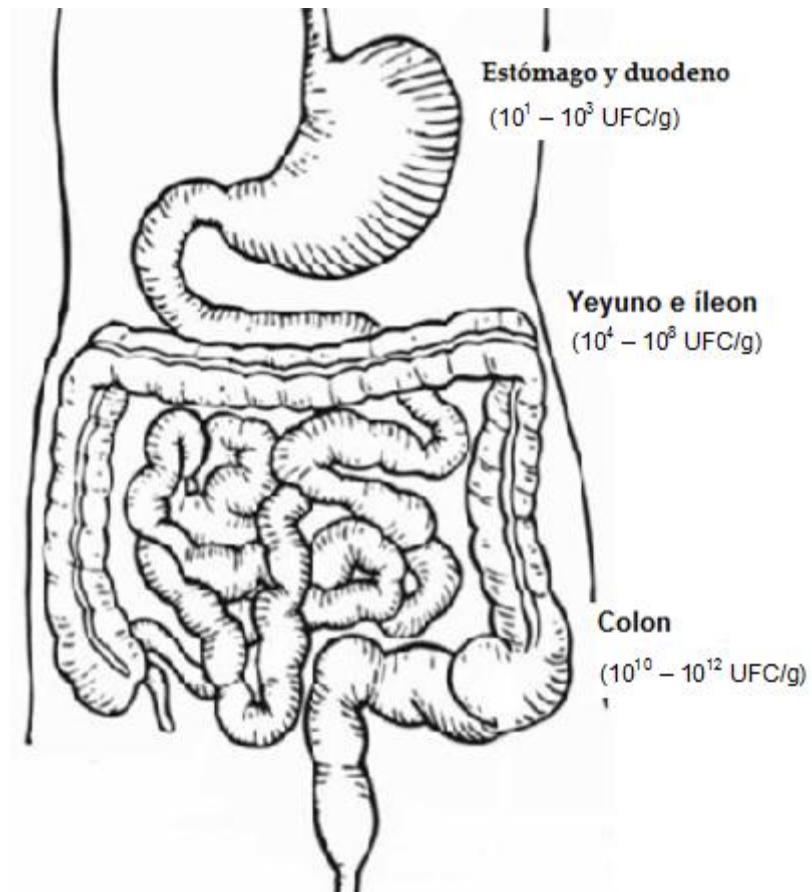


Figura 3. Población bacteriana a lo largo del tracto digestivo humano (adaptado de Holzapfel y col., 1998).

Cuadro 1. Microorganismos que son considerados como probióticos en humanos.

Especies de <i>Lactobacillus</i>	Especies de <i>Bifidobacterium</i>	Otras bacterias ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> *
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecum</i> *
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> *
<i>L. jhonsonii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus termófilus</i>
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. salivarius</i>		

* Especies usadas principalmente en animales.

Fuente: Adaptado de Nag, 2011.

(Samaniego y Sosa, 2000). La mayor parte de los *Lactobacillus* son mesófilos (30-40°C), con un límite superior de 40°C. Los lactobacilos homofermentativos transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares en ácido láctico, y los heterofermentativos pueden generar otros productos finales, adicionales al ácido láctico como: peróxido de hidrógeno, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico (Chandramouli y col., 2004).

2.3.2.1. *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103) es una cepa que se aisló en 1983 en el tracto intestinal de un ser humano sano, la cual se consideró como una subespecie de *L. casei*. Años más tarde la investigación genética catalogó a *L. rhamnosus* GG como una especie propia (Gorbach y col., 1987).

La cepa *L. rhamnosus* B-442 (ATCC 7469) pertenece a la misma especie bacteriana de *L. rhamnosus* GG (Collins y col. 1989) (Cuadro 2), produce compuestos como el peróxido de hidrógeno o el piroglutamato, además del ácido láctico, con lo cual inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas (McCartney, 1996). Esta especie se utiliza a veces en el yogur y otros productos lácteos. Ya que es considerado como un organismo benéfico (probiótico), y es capaz de resistir el pH ácido del estómago y la concentración de las sales biliares en el intestino delgado, colonizando el tracto digestivo y manteniendo un balance de la flora intestinal

Majamaa e Isolauri (1997) demostraron que la administración oral de *L. rhamnosus* en niños alérgicos a la proteína de leche de vaca, disminuye la inflamación de la pared intestinal y mejora el eccema atópico.

Cuadro 2. Clasificación científica de *L. rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus

Reino	Bacteria
División	Firmicutes
Clase	Bacilo
Orden	Lactobacilae
Familia	Lactobacilacea
Género	<i>Lactobacillus</i>
Especie	<i>L. rhamnosus</i>
Nombre binomial	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

Fuente: Collins y col. (1989)

2.3.3. Aplicaciones de la encapsulación de microorganismos probióticos

En la actualidad, uno de los retos para la tecnología alimentaria respecto a la adición de probióticos en un alimento, es garantizar que dichos microorganismos lleguen vivos y en óptimas condiciones a su lugar de acción dentro del organismo humano (Krasaekoopt y col., 2002), así como lograr su aplicación en una gama más amplia de alimentos y otros productos. Las aplicaciones de la microencapsulación de probióticos abarca la producción de cultivos iniciadores, viabilidad de probióticos en el tracto gastrointestinal, aplicación en fermentaciones, elaboración de alimentos funcionales e inmovilización de células probióticas (Mortazavian y col., 2007).

La microencapsulación ha sido utilizada con éxito para mejorar la sobrevivencia de microorganismos en alimentos lácteos (Adhikari y col., 2002; Kailasapathy, 2006) fermentados, como yogurt o leche fermentada (Krasaekoop y col., 2003); no fermentados como queso de diferentes variedades, helado, mantequilla, leche en polvo, postres refrigerados y algunos productos no lácteos como mayonesa, bebidas de fruta, cereales y carne (Shah, 2001; Stanton y col., 2003; Salinas, 2005; Tamime, 2005; Beristain, 2006) asegurándolos, de esta manera, contra la pérdida de nutrientes e incorporando mecanismos dentro de las formulaciones (Kailasapathy, 2006).

Por mencionar un ejemplo de lo anterior es el queso en polvo, que se puede utilizar en salsas, bizcochos, aderezos y directamente como saborizante en platos calientes como espaguetis y sopas; sin embargo, en la producción de este queso al adicionarle los microorganismos, la presencia de una cierta cantidad de aromas durante el secado es inevitable (Pisecky, 2005).

Homayouni y col., (2007), estudió el comportamiento de dos cepas prebióticas, (*B. lactis* y *L. casei*) encapsuladas en alginato de calcio como material pared, en dos tipos de helado que contenían 1% de almidón resistente. Uno de los helados contenía probióticos encapsulados y el otro, células libres. Los resultados indicaron

que la encapsulación incrementó significativamente la sobrevivencia de los microorganismos probióticos en el helado (30%) durante el periodo de almacenamiento, sin afectar las propiedades sensoriales del helado y sin producir fermentación en el helado en el que se utilizó almidón resistente como compuesto prebiótico.

Es por esto que la protección física en la encapsulación es un nuevo enfoque para mejorar la supervivencia de microorganismos probióticos, considerando que éstos tienen un papel fundamental en nuestra cultura, por lo que, su encapsulación está ganando la atención como un método que pueda proporcionarles estabilidad en alimentos funcionales. La encapsulación ayuda a aislar a las células bacterianas de los efectos del ambiente hostil como la congelación y las soluciones gástricas, con lo cual se evita su pérdida. Además de los ambientes adversos, la microencapsulación protege a los probióticos de los bacteriófagos (Villena y col., 2009).

2.4. Material pared

Gracias a los agentes encapsulantes muchos de los productos que alguna vez se consideraron técnicamente no viables son ahora posibles. Existe una amplia variedad de materiales como gomas, carbohidratos, celulosas, lípidos, proteínas y materiales inorgánicos (Cuadro 3), que pueden ser usados para encapsular compuestos alimentarios (Yáñez y col., 2002).

Con este proceso, tales compuestos adquieren una ventaja adicional, ya que se obtienen productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales, al proteger con un material pared las propiedades del componente original (Gharsallaoui y col., 2007).

Cuadro 3. Principales componentes utilizados como material pared en la encapsulación

Tipo de material pared	Material específico	Compuesto a encapsular
Gomas	Goma arábica, goma xantana, goma guar, alginato de calcio, carragenina	Aceites esenciales, aromas, microorganismos, Vitaminas, agentes de fermentación, enzimas
Carbohidratos	Almidón modificado, jarabe de maíz, dextrinas, maltodextrinas, pectinas, quitosano, sacarosa, inulina	Sabores, vitaminas, aceites esenciales, carotenos
Lípidos	Ceras, parafinas, triestearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas	Antígenos, antibióticos, fungicidas, enzimas
Proteínas	Gluten, caseína, grenetina, albúmina, colágeno	Antibióticos, enzimas,

Fuente: Adaptado de Yáñez y col. (2002).

La estabilidad de la matriz encapsulante (material pared) es una condición importante para preservar las propiedades de los compuestos a encapsular. Muchos factores tales como: la estructura de la cápsula, el tipo del material pared (Imagi y col., 1992), la interacción que se da entre el compuesto del núcleo y el material pared (Minemoto y col., 1999), el método de encapsulación y las condiciones de almacenamiento (Minemoto y col., 1997; Yoshii y col., 1997), afectan la estabilidad del compuesto encapsulado.

De acuerdo con el proceso de encapsulación utilizado, el material pared presentará formas como: películas, esferas o partículas irregulares (porosas o compactas) y varias apariencias físicas (colapsado, amorfa o matriz vítrea), mismos que tienen influencia en la difusión de sabores o en las sustancias externas (oxígeno, disolventes), así como de conferirle estabilidad durante el almacenamiento (Reyes-Nava, 2010).

El uso de goma arábica, goma acacia o de alginato como parte de un material pared en la industria alimentaria, es común debido a sus características de viscosidad, solubilidad y formación de emulsiones (Beirão-da-costa y col., 2010). Estos materiales se han utilizado para encapsular compuestos volátiles (Brückner y col., 2007) y oleorresinas, como la del comino (Kanakdande y col., 2007). Sin embargo, debido a la escasez de suministros y los altos costos, es obligada la búsqueda de nuevos materiales como sustitutos.

De esta manera, otros materiales han sido estudiados, tal es el caso de los almidones modificados (papa, maíz, trigo y arroz, principalmente) (Yáñez y col., 2002; Fuchs y col., 2006) e inulina (Sáenz y col., 2009; Hernández, 2010), los cuales pueden ser utilizados para encapsulación debido a las propiedades fisicoquímicas que estos presentan, entre estas se encuentran la aportación de baja viscosidad y fácil dispersabilidad (Gharsallaoui y col., 2007), lo que genera que el ingrediente activo contenido dentro de la cápsula sea liberado rápidamente. Por otro lado, tienen rápidas velocidades de secado y alta resistencia a la oxidación, además de tener

excelentes propiedades de estabilidad, gracias a esto pueden encapsular mayor carga de compuesto activo que otros ingredientes (Ré, 1998). Mezclas de sólidos de maíz, maltodextrinas y almidones modificados podrían permitir un óptimo encapsulamiento (Madene y col., 2006; Loksuwan, 2007).

La elección del material pared es importante para mejorar la eficiencia de la encapsulación y la estabilidad de la microcápsula. Los criterios de selección de un material de pared se basan principalmente en las propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, peso molecular, transición vítrea, cristalinidad, formación de película, propiedades emulsificantes o el tamaño de partícula (Lian y col., 2002; Gharsallaoui y col., 2007; Guevara, 2009).

2.4.1. Prebióticos

En el colon, las bacterias tienen acceso a los nutrientes que requieren para proliferar, los cuales incluyen a todos aquellos alimentos que no fueron absorbidos en el intestino como las fibras y los azúcares no digeribles, la materia del intestino como mucosa y células muertas, así como metabolitos producidos a partir de la actividad enzimática sobre carbohidratos, entre los que están los ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico). Estos ácidos ejercen un efecto en el metabolismo colónico, en la regulación hepática de azúcares y lípidos, así como de proveer de energía a las células. Otros efectos benéficos son la hidrólisis de proteínas y la producción de vitaminas (Wilson y Sha, 2007).

El concepto de prebiótico hace referencia a aquel componente de los alimentos que no entra en el proceso de digestión en el intestino delgado, proporcionando un efecto benéfico fisiológico en el anfitrión, por la estimulación selectiva en el colon del crecimiento favorable o de la actividad de un número limitado de bacterias de la flora intestinal (FAO / WHO, 2001; Simmering y Blaut, 2001).

Se define como prebiótico un componente que responde a las siguientes 4 condiciones (Gibson y Roberfroid, 1995):

1. No es asimilado en el intestino delgado, por lo que llega intacto al intestino grueso.
2. Constituye un sustrato (ej. fuente de carbono) para algunos tipos de bacterias del colon, esto quiere decir que es bioselectivo.
3. Dirige el metabolismo de la flora del colon en sentido benéfico para el organismo.
4. Provoca reacciones benéficas para la salud del huésped.

Para la encapsulación de las bacterias ácido láctica (BAL), los polisacáridos, tales como el almidón resistente, alginato, carragenina y el quitosano, han sido ampliamente estudiados (Koop y col., 2001), pero solamente algunos de estos materiales se han reportado como funcionales y a su vez como una buena fuente de material de recubrimiento (Ann y col., 2007) (cuadro 4).

Todos los sustratos prebióticos tienen diferente funcionalidad, de acuerdo a su composición química, tipo de enlace y grado de pureza, sin embargo, no se consideran como un sustrato promotor del crecimiento de bacterias potencialmente patógenas como clostridium, bacteroides y patógenos como *Escherichia coli* (de Vaux y col., 2002; Manning y col., 2004; Ann y col., 2007).

2.4.2. Almidón

El almidón es el principal polisacárido de reserva sintetizado por las plantas superiores. Es un componente importante de un gran número de productos agrícolas como los cereales, las leguminosas, los tubérculos y algunos frutos en estado

Cuadro 4. Carbohidratos de interés considerados como prebióticos

Almidón resistente

Fructooligosacáridos (inulina, fructanos)

Oligosacáridos

Galactooligosacáridos

Isomaltooligosacáridos

Xilooligosacáridos

Lactulosa

Rafinosa

Estaquiosa

Sorbitol

Xilitol

Fuente: Adaptado de Wildman, 2007.

fisiológico maduro (Núñez-Santiago y col., 2004). El almidón está organizado en partículas discretas o gránulos, de los cuales su contenido, características morfológicas, composición química y arreglo molecular son particulares de la fuente botánica (Rodríguez-Marín, 2009). En el arroz, el almidón se encuentra en un 70-80%, los gránulos son de tamaño pequeño (2–5 μm de diámetro) (Jane y col., 1992) a diferencia de los de maíz, que presentan un tamaño intermedio (1.72–29.15 μm (Medina y Salas, 2008) o los de papa que corresponden a los gránulos más grandes (2.02–65.94 μm) (Masaharu y col., 2003).

Zhao y Whistler (1994), observaron la capacidad de los gránulos de tamaño pequeño del almidón de arroz para formar agregados esféricos porosos con potencial para encapsulación. Los agregados parecían esferas con apariencia de palomitas de maíz, las cuales pueden llevar el compuesto a encapsular en los espacios abiertos de la estructura porosa.

Las propiedades fisicoquímicas y funcionales que presentan los almidones (gelatinización, retrogradación, hinchamiento, solubilidad, absorción de agua, entre otras) están determinadas por el contenido de dos α -glucanos: amilosa y amilopectina (Tester y col., 2004), así como a la organización de estos dos polímeros en el interior del gránulo (Bello-Pérez, 1995; Tester y Karkalas, 2002).

Los almidones nativos y sus derivados se han usado por décadas en la industria de los alimentos como un ingrediente básico debido a las propiedades funcionales que proveen (Rodríguez, 2009). Se han empleado principalmente como agentes espesantes y mejoradores de textura (Wurzburg y Szymanski, 1970), agentes de relleno y productos de panadería (Rodríguez, 2009). Sin embargo, el uso de los almidones nativos se ha visto limitado ya que no proporcionan todas las propiedades funcionales requeridas, por ejemplo, son sensibles al pH, a la temperatura y a los esfuerzos de corte extremo, otra desventaja es que son poco solubles.

Para mejorar sus características y diversificar sus aplicaciones, los almidones deben modificarse por diversos tratamientos (Manrique-Quevedo y col., 2007). La modificación produce una alteración en una o más de las propiedades físicas, químicas o estructurales del almidón, que es debido a la incorporación de un compuesto ajeno a su estructura, o a su degradación controlada por una modificación ácida. Esto produce un cambio considerable en la gelatinización y en las propiedades de hinchamiento de los gránulos de almidón (Bajpai y Bhanu, 2007). Por lo que se les puede utilizar de manera más amplia en la industrias alimentaria (natillas, salsas, rellenos para postres, embutidos y frituras), farmacéutica (suspensiones, tabletas, cápsulas) o cosmética (povos, cremas), empleándose como agentes mejoradores de textura, espesantes o encapsulantes.

2.4.2.1. Amilosa

La amilosa es un polímero esencialmente lineal, se encuentra formado por unidades de glucopiranosas unidas por enlaces α -(1 – 4), de manera espaciada y poco frecuente se han encontrado de dos a ocho ramificaciones con enlace α -(1 – 6) (Santacruz, 2004; Liu, 2005) (Figura 4), lo que hace que la amilosa tenga el comportamiento de un polímero lineal (Lineback y Rasper, 1988). De acuerdo al contenido de amilosa, los gránulos de almidón de arroz se clasifican como: altos en amilosa (cuando tienen un contenido >25%), de contenido medio (20 – 25 %) y contenido bajo (<20%) (Juliano y col., 1981; Li-Jia y col., 2011).

Las moléculas de amilosa tienen un peso molecular promedio aproximado de 10^6 Daltones (Da) y un grado de polimerización (GP) de 324 – 4,920. A temperatura ambiente, en solución, se encuentra en forma helicoidal (Utrilla-Coello, 2007), considerándose que estas regiones helicoidales son relativamente rígidas y presentan de 10 a 15 giros por región (Whistler y Daniel, 1984).

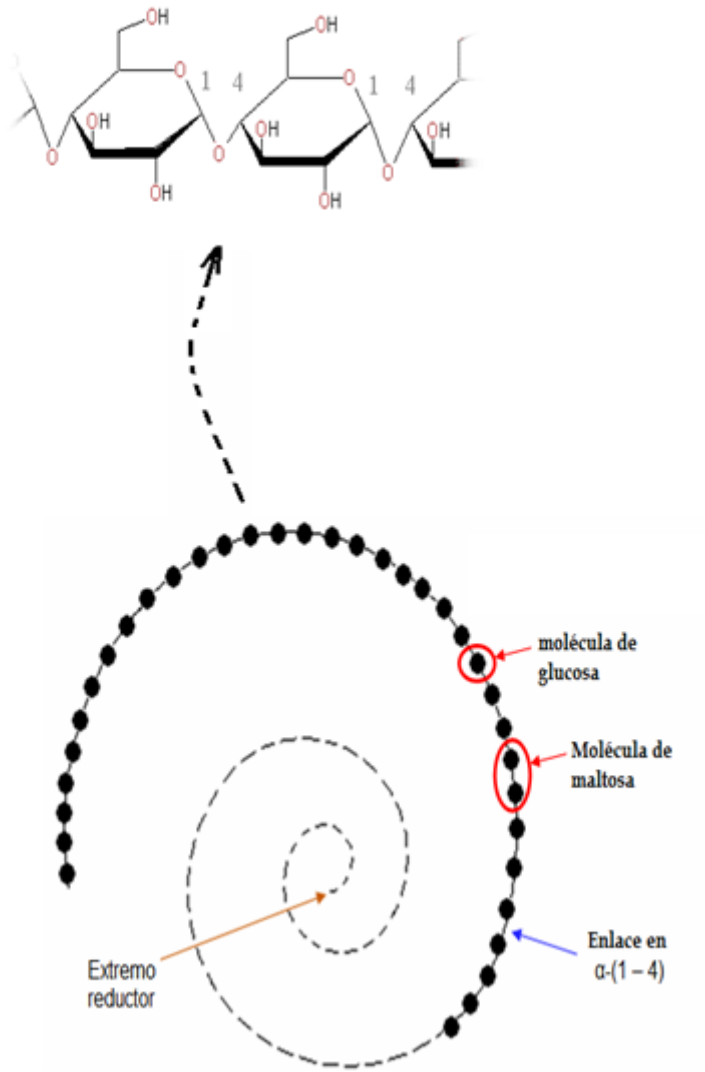


Figura 4. Estructura helicoidal de la molécula de amilosa.

Fuente: www.scienceinschool.org

En cada giro se emplean aproximadamente seis moléculas de glucosa. Cada cadena contiene aproximadamente de 200 a 700 residuos de glucosa, lo que equivale a un peso molecular de 32,400-113,400 Da (Tester y Karkalas, 2002).

2.4.2.2. Amilopectina

La amilopectina representa un 70–80% del almidón total en tipos comunes, y hasta casi un 100% en los almidones cerosos. Es una molécula altamente ramificada, compuesta de subunidades de glucosa, las cuales se unen por enlaces α -(1–4) que representan un 92–96% y α -(1–6) que integran el 5–6% restante de estos enlaces glucosídicos (MacAllister, 1979; Santacruz, 2004). Los enlaces α -(1–6) forman puntos de ramificación dentro de la molécula cada 15–25 unidades de glucosa (Morales-Martínez, 2011) (Figura 5).

La amilopectina es quizás el componente que tiene mayor importancia en función de las propiedades del almidón, dado que su estructura y propiedades contribuyen notablemente en la composición y funcionalidad del gránulo, por lo que esta molécula ha sido estudiada ampliamente en función de su tamaño molecular, ramificación y longitud de las cadenas internas y externas (Thurn y Burchard, 1985; Zobel 1988; Bello-Pérez y col., 1996).

2.4.3. Inulina

La inulina y los oligofructanos son componentes naturales que pertenecen a una clase de hidratos de carbono conocidos como fructanos (Kaur y Gupta., 2002), los cuales se encuentran en las frutas y vegetales. Su nombre deriva de la primera planta de la cual se aisló en 1804, el helenio (*Inula helenium*). Se ha estimado que en Europa el consumo per cápita se encuentra entre 3 y 11 g (Roberfroid, 2007), mientras que en Estados Unidos se encuentra entre 1 y 4 g (Moshfegh y col., 1999).

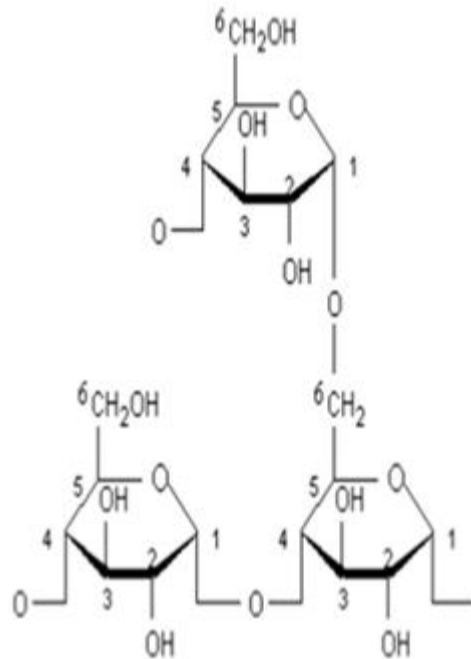
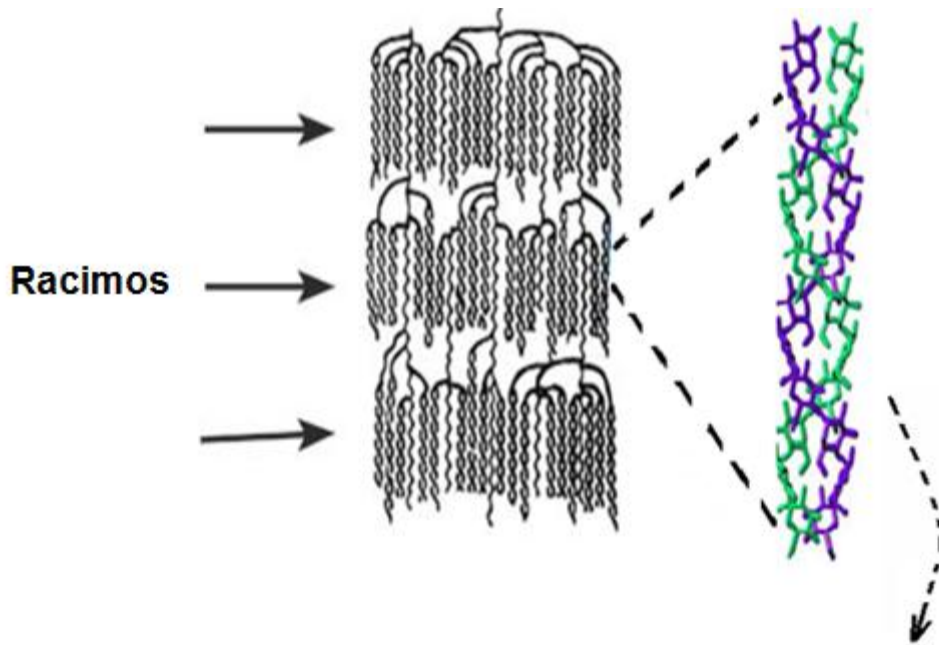


Figura 5. Estructura química de la molécula de amilopectina.

Fuente: www.scienceinschool.org

Estos compuestos son considerados como ingredientes de alimentos funcionales, ya que afectan a los procesos fisiológicos y nutricionales en los seres humanos, resultando en una mejor salud y reduciendo el riesgo de enfermedades (Roberfroid, 2007).

Se localizan principalmente en las raíces, tubérculos y rizomas de ciertas plantas fanerógamas como sustancia de reserva; entre las fuentes diarias más comunes se encuentran: la achicoria, diente de león, yacón, trigo, cebolla, plátano, ajo, puerro, etc. (Roberfroid, 2007; Hernández, 2010).

Químicamente la inulina se encuentra compuesta de cadenas fructosil-fructosa unidas por enlaces β -(2 \leftarrow 1) (Waterhouse, 1993). Una glucosa inicial puede estar presente, más no siempre es así, por lo que los siguientes compuestos se incluyen bajo la misma nomenclatura: a) glucopiranosil-(fructofuranosil)n-fructosa y b) fructopiranosil- (fructofuranosil)n-fructosa (Figura 6).

El grado de polimerización (GP) de la inulina de achicoria varía de 2–60 unidades, con un GP promedio igual a 12. Alrededor del 10% de la cadena de fructanos en la inulina nativa de achicoria tiene un GP entre 2 y 5.

Una vez ingerida, la inulina libera fructosa en muy pequeña proporción durante la digestión, debido a la configuración β del C₂ anomérico en sus monómeros de fructosa. Debido a esto, la inulina puede resistir la hidrólisis de las enzimas digestivas del intestino delgado, ya que estas enzimas son específicas para los enlaces glucosídicos, por lo que el organismo humano carece de enzimas específicas para hidrolizarla (Kaur y Gupta, 2002). De esta manera, la inulina se ha clasificado como un oligosacárido no digerible (Roberfroid y Lavin, 2000).

Los estudios experimentales han mostrado su uso como agente bifidógeno, estimulando el sistema inmunológico del cuerpo así como la disminución de bacterias

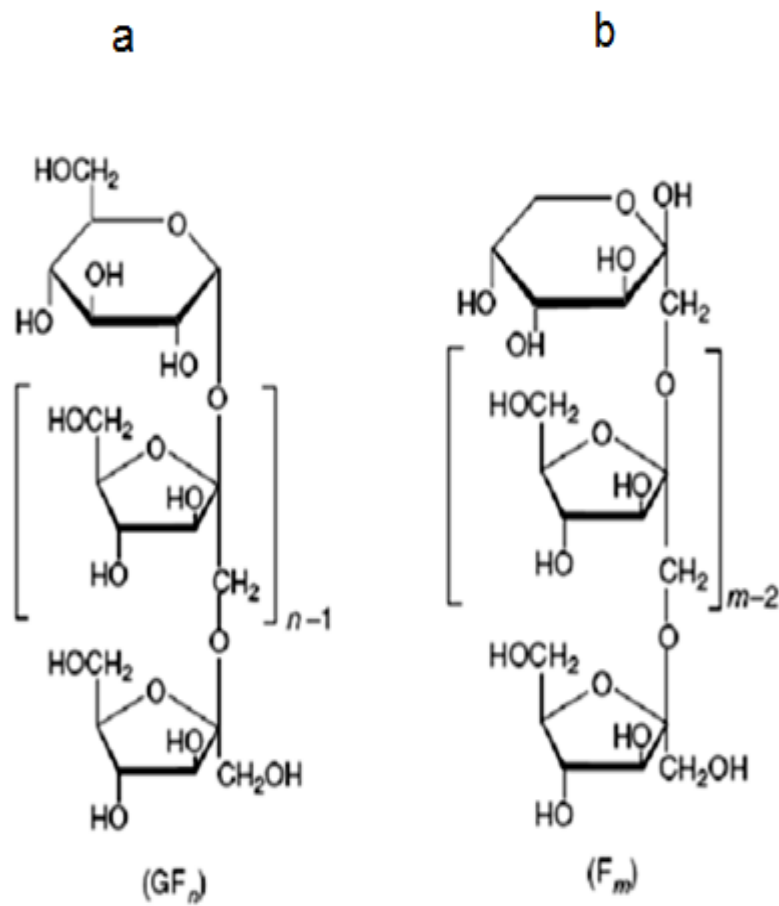


Figura 6. Estructura química de la inulina, a) con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) y b) con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil) (Roberfroid, 2007).

patógenas en el intestino grueso y aumentar la absorción de minerales en el cuerpo (Kaur y Gupta, 2002); además, se considera un compuesto prebiótico que actúa sobre la proliferación de los microorganismos probióticos como son los lactobacilos. La inulina al no ser digerida, sino por la actividad bacteriana, adopta la propiedad de poder alterar la composición de la flora intestinal humana por la fermentación. Lo anterior resulta en una comunidad en la que predominan las bifidobacterias teniendo con esto un efecto prebiótico (Guigoz y col, 2002).

Corcoran y col. (2004) compararon la sobrevivencia de *L. rhamnosus* GG, en diferentes etapas de crecimiento, encapsulados en leche descremada adicionada con prebióticos (inulina con tres GP diferentes). Los resultados mostraron que las bacterias que se encontraban en la fase estacionaria de la curva de crecimiento y en presencia de los prebióticos, tuvieron una mejor viabilidad (50%) en comparación a las que se encontraban en la fase lag (25%) de igual manera la inulina con un mayor GP ofreció una mejor resistencia.

2.5. Técnicas de encapsulación

Investigaciones han dado como resultado la apertura a nuevos procesos para la encapsulación de micropartículas o microgotas (Gharsallaoui y col., 2007). El uso de materiales bioactivos, como vitaminas, sabores (Fuchs y col., 2006), células, enzimas, microorganismos probióticos (Champagne y Fustier, 2007), colorantes (Madene y col., 2006) o agentes antioxidantes (Sultana y col., 2003) entre muchos otros para uso industrial, trae consigo diversos problemas entre los cuales se presenta la escasa resistencia de estos a diferentes condiciones ambientales como la humedad, el calor o condiciones extremas, que resultan en la degradación de dichos materiales (Kailasapathy, 2002; Madene y col., 2006).

Las técnicas de encapsulación son una alternativa para proteger a estos materiales, incorporándolos en pequeñas cápsulas. Estimando que el proceso requiere la consideración del material a encapsular, se han diseñado diferentes estrategias para mantener la estabilidad y viabilidad de estos materiales, desarrollando nuevas técnicas, para reducir los altos costos de producción o incluso la falta de materiales adecuados para la encapsulación (Desai y Park, 2005).

La selección del método de encapsulación está en función de: el tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del costo (Villena y col., 2009). De acuerdo con Beristaín (2006), los métodos de encapsulación se clasifican en:

- Procesos químicos: Coacervación compleja, co-cristalización, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, inclusión molecular y atrapamiento en liposomas.
- Procesos físicos o mecánicos: secado por aspersión, secado por congelamiento/enfriamiento, cobertura por lecho fluidificado y extrusión.

A la hora de utilizar probióticos, el principal problema que se presenta, es la escasa resistencia de éstos a diferentes condiciones ambientales y tecnológicas. Las técnicas de microencapsulación son un buen método para proteger a estos microorganismos, sin embargo no todas las técnicas son apropiadas para los probióticos, ya que por sus características se tiene que permitir la obtención de un tamaño de partícula adecuado, el cual oscila entre 15-100 μm , las microcápsulas mayores a 100 μm son detectables en la boca, y las inferiores a 15 μm no dan la suficiente protección frente a los agentes externos para la supervivencia de éstos (Villena y col., 2009).

2.5.1. Secado por aspersión

Aunque se considera el secado por aspersión como un proceso de deshidratación, este se puede utilizar para encapsular materiales activos dentro de una matriz protectora formada por un polímero fundido (Dziezak, 1988). Muchas técnicas han sido desarrolladas para encapsular ingredientes de alimentos, el secado por aspersión es la tecnología más comúnmente empleada en la industria alimentaria debido al bajo costo y disponibilidad de los equipos. Para inicios de 1900, este proceso se aplicó por vez primera en el secado de leche y después para la elaboración de café y huevo. Finalmente, ha sido adaptado tanto para alimentos líquidos como aquéllos que son sensibles a los tratamientos térmicos (Heldman, 1975).

Por definición, corresponde a la transformación de un fluido en un material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado caliente (Ré, 1998). La formación de las gotas ocurre cuando se introduce la sustancia a encapsular (agente activo) en el agente encapsulante (material pared), seguido de la aspersión de la mezcla dentro de una cámara, a través de una boquilla (sistema de alimentación), o a través de discos giratorios de rociado de alta velocidad en el interior de una cámara de secado cilíndrica a la cual le es suministrado aire caliente, (Hernández 2010). El agua se evapora entonces de dichas gotas de manera casi instantánea, y se obtienen partículas secas de sólido que se separan de la corriente de aire y son transportadas a un separador de polvo ciclónico para su recuperación en un colector (Guevara, 2009) (Figura 7). La atomización del líquido en pequeñas gotas finas incrementa significativamente el área por unidad de volumen/masa para acelerar la transferencia de masa y calor. Mediante este método se pueden obtener partículas cuyo tamaño varía de 2 a 150 μm (Geankoplis, 2006; Bhandari, 2008; Hernández, 2010).

Durante el proceso de evaporación de agua de las partículas, los fenómenos de transferencia de calor y de masa están presentes. El secado por aspersión es un sistema convectivo, por lo tanto, la velocidad es función de las diferencias de

temperatura y presión de vapor entre la superficie de las gotas y el aire utilizado en el proceso.

Asimismo, otros factores que influyen en la velocidad de transferencia de masa y calor son la difusión del agua en el aire, velocidad relativa del aire con respecto a la velocidad de la gota y la viscosidad cinemática, conductividad y capacidad calorífica del aire (Bandhari, 2008; Hernández, 2010).

2.5.2. Propiedades de los productos encapsulados por secado por aspersión

Las propiedades que presentan los productos encapsulados son de referencia para la evaluación en términos de su calidad y función. Asimismo, éstas tienen influencia durante el envasado de dichos polvos, en el transporte dentro de tuberías, reconstitución del producto, solubilidad, estabilidad en el almacenamiento y mezclado (Bhandari, 2008).

Entre las propiedades más importantes de los productos encapsulados mediante secado por aspersión se encuentran las siguientes (Bhandari, 2008):

- Humedad: Debe ser menor al 5% con una actividad de agua (a_w) de 0.15 a 0.30.
- Densidad de partícula: Puede variar de 1.2-1.4 g/mL y está influenciada por la presencia de aire en las partículas.
- Tamaño de partícula: El tamaño promedio se encuentra entre 5 -150 μm , pero varía en función de la naturaleza del ingrediente activo y el proceso.
- Forma: La mayoría de las veces se obtienen esferas, pero depende del tipo de material y el proceso. La forma de los encapsulados influyen en el mezclado, fluidez y densidad de la partícula.

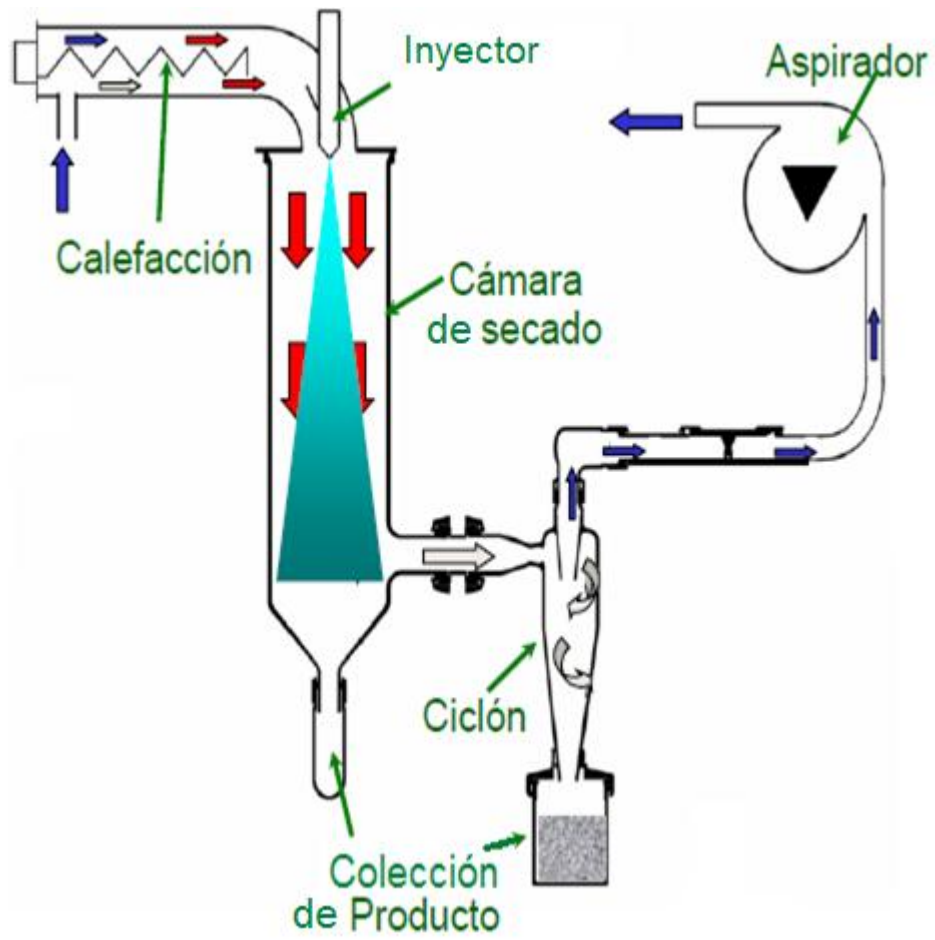


Figura 7. Esquema del proceso de secado por aspersión (Büchi, B-290).

2.6. Métodos de liberación

La liberación controlada puede ser definida como un método por el cual agentes o ingredientes están disponibles en sitios y tiempos deseados (Madene y col, 2006), liberándose a una proporción específica. Esta característica es una funcionalidad clave que puede ser proporcionada por la encapsulación, que a su vez, también proporciona estabilidad al componente atrapado, de tal manera que al momento de liberarlo, éste conserva las mismas propiedades que antes de haber sido encapsulado (Anal y Singh, 2007; Reyes-Nava, 2010).

La liberación del contenido de las microcápsulas está influenciada por la temperatura y el pH; ésta se puede llevar a cabo por disolución en agua, esfuerzos de cizalla, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. No obstante, esta liberación puede controlarse por difusión a través de la pared de la microcápsula o bien por medio de una membrana que recubra la pared (Pedroza-Islas, 2002; Yáñez y col., 2002).

Existen dos métodos de liberación: retardada y sostenida. El primer método se presenta cuando la liberación de la sustancia activa es retardada hasta que su liberación es favorable pero no impedida como en el caso de microencapsulación de microorganismos prebióticos, para su protección en su trayecto a través del intestino delgado para llegar al colón. En cambio, el segundo método, mantiene la concentración constante del agente activo y su sitio de acción (Madene y col., 2006).

La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad de los componentes de la pared de la cápsula influyen en la velocidad de difusión. Por todo esto, la selección de una matriz o membrana es importante, también tienen especial relevancia, la naturaleza química, la morfología, la temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento de los componentes de la cubierta, ya que pueden disminuir la velocidad de liberación (Yáñez y col., 2002).

2.7. Alimentos funcionales

Aunque no existe una definición normalizada y aceptada por todos sobre lo que es de forma concreta un alimento funcional, en Europa se ha llegado a un consenso sobre conceptos científicos en relación con este tipo de productos. El documento fue elaborado en 1999 por un grupo de expertos coordinados por el ILSI (International Life Sciences Institute), y dice que *“un alimento funcional es aquel que contiene un componente, sea nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable”*.

Dentro de la definición de los alimentos funcionales, se encuentra el subgrupo de alimentos probióticos, los cuales, de acuerdo a los estudios realizados se considera que son benéficos para la salud, ya sea porque producen o por que contienen microorganismos vivos. De esta manera, un producto alimenticio que contiene tanto compuestos prebióticos como microorganismos probióticos se le nombra como alimento funcional o simbiótico (Homayouni y col, 2007), dando origen a una sinergia entre éstos. Los compuestos prebióticos son consumidos por los probióticos como una fuente de carbono o energía dentro del colon. Esto produce un aumento en la cuenta probiótica (microflora intestinal benéfica) y por lo tanto, hay una reducción de microorganismos patógenos en el intestino (Vernazza y col., 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento de los desórdenes gastrointestinales, como la intolerancia a la lactosa, infecciones estomacales o cáncer de colon, atribuidos al actual estilo de vida, la industria alimentaria ha buscado posicionar en el mercado productos que mejoren el equilibrio de la flora intestinal, por lo que se ha incrementado el consumo de productos alimenticios que contienen microorganismos probióticos, los que, tomando en cuenta que su consumo es por vía oral, es lógico pensar que sus efectos benéficos se pondrán de manifiesto en patologías intestinales. Sin embargo, el problema que se presenta a la hora de incorporarlos en cualquier formulación, es la escasa resistencia que muestran durante el procesamiento y a las condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura. Por todo esto, es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Para ello, se recurre a las técnicas de microencapsulación, que consisten en el recubrimiento de pequeñas cantidades del microorganismo mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica, como lo es el almidón de arroz y la inulina, los cuales dada su naturaleza prebiótica, además de fungir como un material de pared, pueden ser una fuente de energía para los microorganismos favoreciendo su desarrollo en el transcurso por el tracto digestivo.

IV. HIPÓTESIS

El almidón de arroz y la inulina, además de proporcionar una barrera (protección) contra el ambiente hostil y agresivo del tracto digestivo, tienen propiedades prebióticas, contribuyendo a mantener la viabilidad de los microorganismos probióticos.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto encapsulante del almidón de arroz y de la inulina como material pared, en la viabilidad del microorganismo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* B442 mediante la técnica de secado por aspersión.

5.2 Objetivos específicos.

- 1) Encapsular *L. rhamnosus* empleando almidón nativo de arroz e inulina mediante el proceso de secado por aspersión, utilizando un diseño experimental.
- 2) Realizar la caracterización fisicoquímica y morfológica de los encapsulados de inulina y almidón de arroz.
- 3) Evaluar la viabilidad de *L. rhamnosus* antes y después del encapsulado, así como su estabilidad durante un periodo de 4 semanas a temperatura ambiente (25 °C) y en refrigeración (4 °C).
- 4) Evaluar a los agentes encapsulantes como prebióticos en la encapsulación del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* B442, mediante la prueba de fermentabilidad.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El diagrama experimental (Figura 8) muestra la estrategia de trabajo que se siguió para realizar las determinaciones a los polvos obtenidos en el secador por aspersión. Partiendo de almidón nativo de arroz e inulina como agentes encapsulantes se realizó un diseño experimental para comprobar que condiciones fueron las mejores, considerando la viabilidad del probiótico como variable respuesta. A los encapsulados obtenidos después del secado se les sometió a estabilidad, se les caracterizó y se evaluó al prebiótico mediante fermentabilidad.

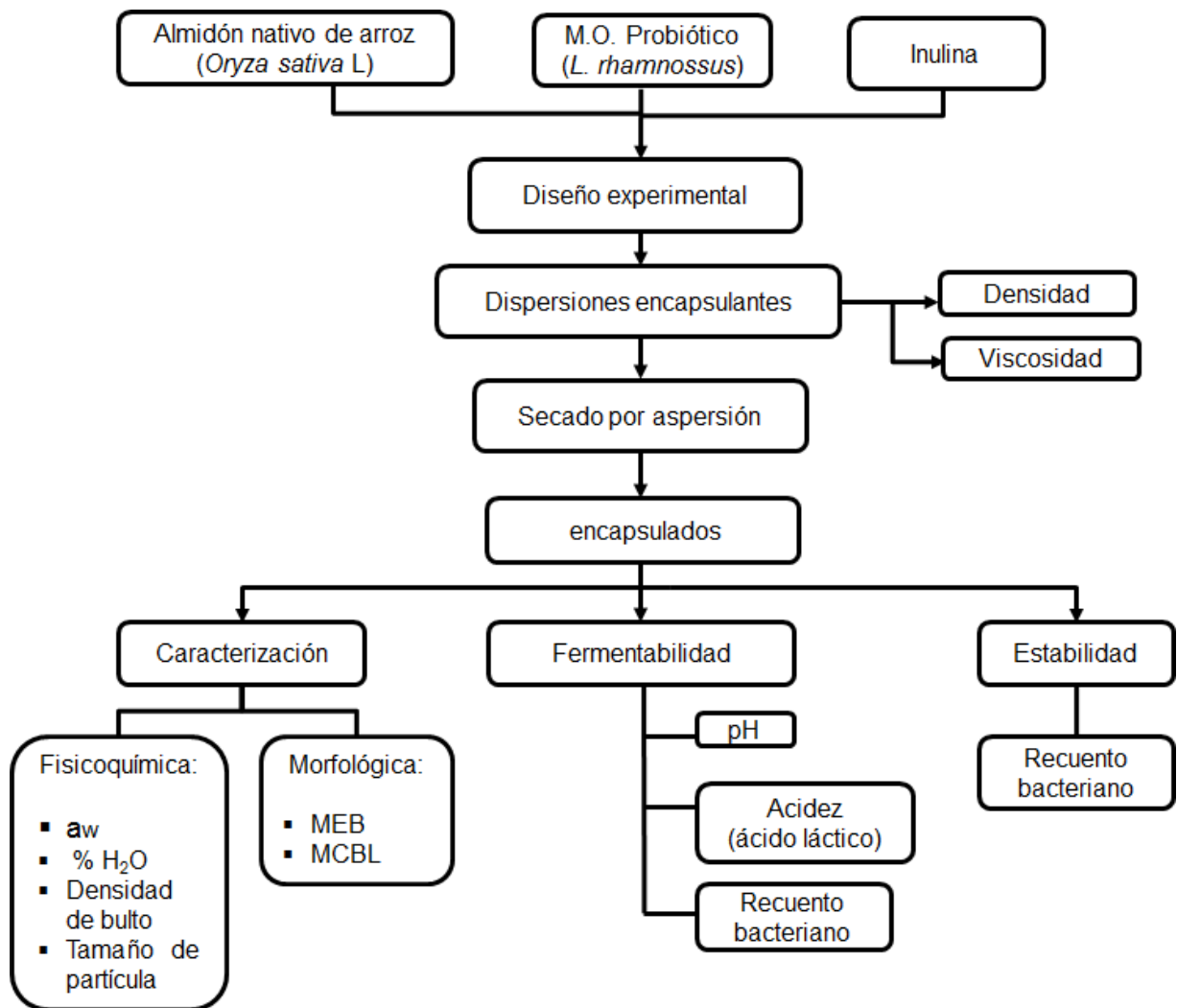


Figura 8. Diagrama experimental.

6.1. Materiales

Como agentes encapsulantes fueron utilizados: almidón nativo de arroz (ANA) (*Oryza sativa* L.), variedad Morelos – A98, obtenido en el Laboratorio de control de calidad del Departamento de Desarrollo tecnológico del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos mediante el método de Pátindol y col. (2007) con modificaciones de Palma-Rodriguez y col. (2011) e inulina (IN) de achicoria (*Cichorium intybus* L.) de Beneo™ ST, Orafti (Donación de la empresa Megafarma Alimenta).

Se trabajó con el microorganismo (m.o.) *Lactobacillus rhanmnosus* B442 (donación del Departamento de servicios de Investigación de Agricultura de la USDA "United States Department of Agriculture" a través de la Universidad de las Américas Puebla), dicho m.o. se mantuvo en refrigeración en tubos con agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (Merck, Alemania), el cual se reactivó colocándolo en medio líquido en caldo MRS (B.D. Difco™, México), mismo que se sembró cada dos meses aproximadamente para mantenerlo en estado viable (activo).

6.2. Métodos

6.2.1. Preparación de las dispersiones con los agentes encapsulantes

Se realizó un diseño experimental, para determinar las unidades experimentales, mediante un factorial 2^3 totalmente al azar más un punto central, con una réplica para cada uno de los 5 tratamientos resultantes ANA e IN, respectivamente. Se tomaron como variables independientes la temperatura de entrada y el porcentaje de sólidos, estimando la viabilidad como variable de respuesta. Se consideró un máximo y un mínimo para la temperatura de entrada (135 y 155°C) y para el porcentaje de sólidos (10 y 20%), así como 145°C y 15% como punto central. Una vez aplicado, el diseño consistió en la elaboración de las mezclas experimentales tanto de ANA, como de IN (cuadro 5).

Las dispersiones con ANA se realizaron adicionando el agente en agua estéril a temperatura ambiente (25°C), se prepararon 400 g (% p/p) de cada una de ellas a las concentraciones descritas, aplicando agitación magnética constante para mantener homogénea la dispersión. En el caso de las soluciones con IN, fue necesario incrementar la temperatura del agua (80°C) para favorecer la disolución de la misma.

Cuadro 5. Tratamientos resultantes del diseño experimental para el encapsulamiento de *L. rhamnosus* mediante secado por aspersion.

No. de experimento	Material encapsulante	Temperatura de entrada (°C)	Sólidos (%)	Tratamiento
1	ANA	135	10	A-135-10
2			20	A-135-20
3		145	15	A-145-15
4		155	10	A-155-10
5			20	A-155-20
6	IN	135	10	I-135-10
7			20	I-135-20
8		145	15	I-145-15
9		155	10	I-155-10
10			20	I-155-20

ANA = Almidón nativo de arroz; IN = Inulina

6.2.2. Caracterización de las mezclas de los agentes encapsulantes

6.2.2.1. Viscosidad

Se determinó la viscosidad de las dispersiones de ANA y la solución de IN, mediante el método de Geankoplis (1998), para lo cual se empleó un viscosímetro Cannon-Fenske (Mod. 350 152 1 Cannon Instrument Company, Pensilvania, EE.UU).

La aplicación del método consistió en medir el tiempo de desplazamiento del fluido a través del capilar del viscosímetro. De esta forma, se dejó fluir el líquido y se registró el tiempo en que pasó desde la marca del menisco superior hasta la marca del menisco inferior del bulbo (Sosa, 2008), finalmente éste se relacionó con la viscosidad del agua, la cual se obtuvo de la misma forma. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$\mu = \rho_s \times \nu_c$$

$$\nu_c = c \times t$$

Dónde:

μ = viscosidad dinámica (cP = Pa * s)

ρ_s = densidad de la muestra (g/cm³)

ν_c = viscosidad cinemática (cSt)

c = constante del viscosímetro (mm²/s²) = 0.3375

t = tiempo (s)

6.2.2.2. Densidad absoluta.

Para determinar la densidad de las mezclas de los agentes encapsulantes se utilizó el método 962.37 de la A.O.A.C, (1995). Se requirió el uso de un picnómetro de vidrio (el cual se mantuvo previamente a peso constante a la temperatura de 25 °C). Finalmente, se determinó la densidad aplicando la siguiente ecuación:

$$\rho_s = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} \times \rho_{H_2O}$$

Dónde:

ρ_s = densidad de la solución (g/cm³)

m_1 = masa del picnómetro vacío (g)

m_2 = masa del picnómetro c/H₂O (g)

m_3 = masa del picnómetro c/sln (g)

ρ_{H_2O} = densidad de agua (g/cm³)

6.2.3. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus*

La curva de crecimiento de *L. rhamnosus* se realizó tomando como referencia lo descrito por Mani (2005); esto para corroborar la fase de desarrollo en la que se encontraba el m.o. al momento de iniciar el análisis y estimar el tiempo de crecimiento de la población óptima para realizar la encapsulación. El microorganismo se inoculó tomando tres asadas de éste en medio sólido (agar MRS) y se colocaron en 100 mL de medio líquido (caldo MRS) incubándose a 35°C durante 48 h. La población microbiana se determinó durante las 48 horas siguientes, tomando los tiempos 0, 4, 8, 12, 16, 24, 28, 36, 40 y 48 h. La siembra del m.o. para su recuento se realizó en superficie de agar MRS de una caja de petri, mediante el sembrador en espiral Autoplate 4000 (Spiral Biotech, Exotech, EE.UU.) (Figura 9).



Figura 9. Sembrador en espiral Autoplate 4000 (Spiral Biotech, Exotech, EE.U.)

6.2.4. Preparación del microorganismo

La preparación y recuperación del microorganismo para su posterior inoculación en las mezclas con los agentes encapsulantes, se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Guevara (2009). En 100 mL de caldo MRS se inoculó *L. rhamnosus* mediante tres asadas, tomadas del cultivo en tubos con agar inclinado. El caldo MRS se colocó en una incubadora (Mod. Imperial III, Lab-Line Instruments, EE.UU.), por un lapso de 36 horas a 35°C para obtener la población óptima, de acuerdo a lo observado en la curva de crecimiento. Una vez pasadas las 36 horas de incubación, los 100 mL de caldo se vertieron y distribuyeron en tubos de centrifuga (25 mL de caldo en cada tubo aproximadamente), previamente pesados y esterilizados (cada uno con un peso aproximado de 9.3 gramos) para su posterior centrifugación a 12,000 rpm durante 10 minutos y a 5°C en una centrifugadora refrigerada (Mod. Marathon 21 K/R, Fisher Scientific, EE.UU.), cabe mencionar que es importante mantener esta temperatura al momento de la centrifugación, ya que de lo contrario, el m.o. no sedimenta correctamente.

Mediante decantación se retiró el sobrenadante de cada uno de los tubos de centrifuga, desechándolo. Para la re-suspensión del microorganismo, se añadió un volumen conocido (1 mL) de agua destilada estéril en uno de los tubos, se agitó mediante un vortex hasta total disolución. Una vez que se resuspendió el residuo del primer tubo, se vertió en el tubo siguiente. Se volvió a agitar en el vortex hasta total disolución. El residuo resuspendido se pasó al tercer tubo. La operación de agitación y disolución se repitió de manera sucesiva, hasta obtener el residuo de todos los tubos en uno solo. Se registró el peso final del residuo recuperado en el último tubo, restando el peso del volumen de agua adicionada para la resuspensión del microorganismo. Dicho peso se utilizó para realizar los cálculos de conversión del recuento inicial en UFC/mL a UFC/g.

6.2.5. Secado por aspersión.

6.2.5.1. Calibración

Para el correcto funcionamiento del equipo y para obtener mejores resultados, fue necesario realizar la calibración de la bomba y seguir detenidamente el protocolo de operación el equipo.

El proceso de calibración se llevó a cabo bombeando 10 mL de la dispersión con el agente encapsulante, para lo cual se utilizaron diferentes velocidades de flujo expresadas como porcentajes de funcionamiento de la bomba del equipo (20, 40, 60, 80 y 100%) y se registró el tiempo en que se llenó una probeta graduada con capacidad de dicho volumen. Con los datos obtenidos se realizó la curva de calibración, la cual relaciona la velocidad de flujo de la mezcla encapsulante con el porcentaje de bomba utilizado, por lo que fue necesario determinar la pendiente de la ecuación que relaciona ambas variables para conocer el correspondiente porcentaje de uso de la bomba para un flujo establecido de 14 g/min.

6.2.5.2. Proceso de secado

El proceso de secado de las mezclas, inoculadas con *L. rhamnosus*, se llevó a cabo utilizando un equipo de secado por aspersión a escala de laboratorio (Mod. B-290, Büchi, Suiza) (figura 10), siguiendo la técnica de Guevara (2009). Se encendió el equipo y el compresor, verificando que la válvula de paso de éste se encontrara abierta para permitir el flujo de aire y de esta manera, que el rotámetro alcanzara una altura de 40 a 45 mm, equivalente a 450-565 L/hora. Las mezclas se secaron utilizando un flujo de alimentación de 14 g/min, a las temperaturas de entrada de 135, 145 y 155° C, de acuerdo al diseño experimental descrito en el punto 6.2.1. Antes de tratar las mezclas se realizó el acondicionamiento del secador con agua destilada estéril, con el fin de mantener la estabilidad en las temperaturas de entrada y salida, y que el cambio en las temperaturas al momento de hacer pasar el m.o. con el agente encapsulante no fuera tan pronunciado. El proceso de precalentamiento de

la columna de secado, para la estabilización de la temperatura del aire de salida, fue validado por Rodríguez (2009). Las mezclas se atomizaron en la cámara de secado, regulando la velocidad de flujo de aire entre 450 – 565 L/h. Una vez que se alcanzó la temperatura de entrada del secador, se mantuvo durante un tiempo de 20 a 30 min. para estabilizar la temperatura de salida. Al finalizar el proceso, y una vez frío el equipo, se recolectó el polvo obtenido durante el secado en la cámara de recolección de los sólidos, colocándolo en contenedores estériles y herméticos para evitar su humectación.

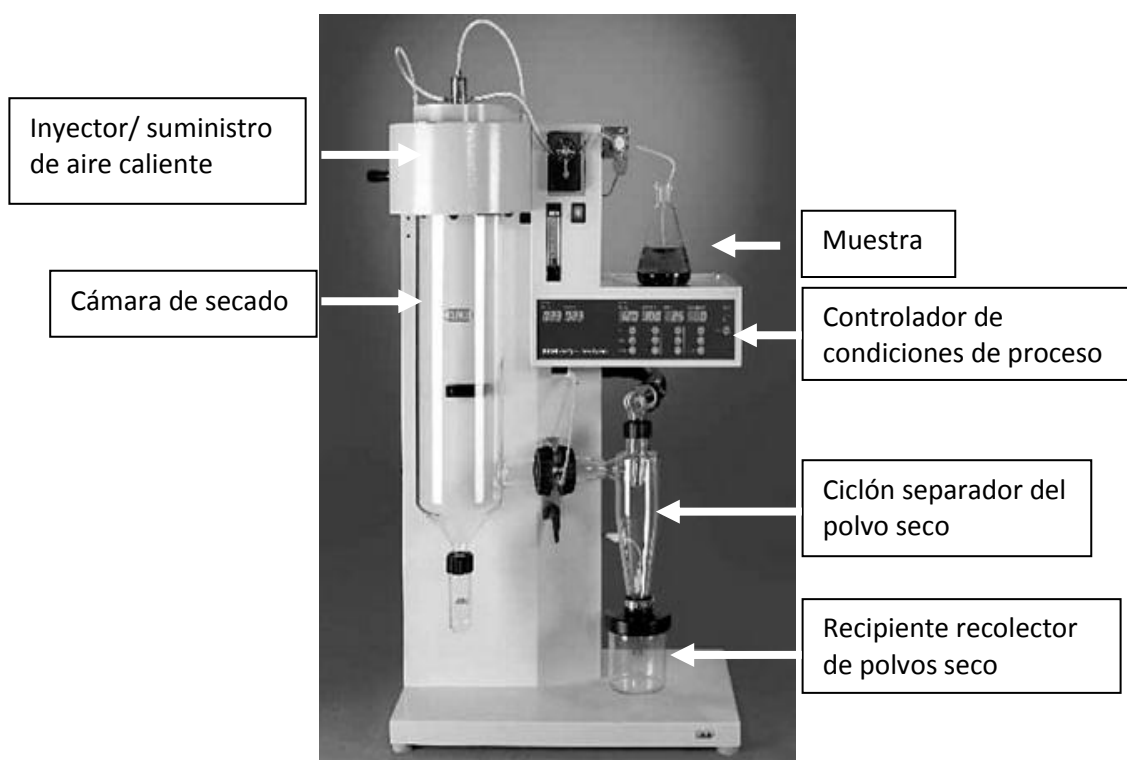


Figura 10. Secador por aspersión (Modelo B-290, Büchi, Suiza)

6.2.5.3. Microencapsulación de *L. rhamnosus*

Los sólidos obtenidos en la centrifugación del caldo (m.o.), una vez resuspendidos se inocularon en las diferentes mezclas preparadas con los agentes

encapsulantes, los cuales se sometieron posteriormente a la microencapsulación mediante la técnica de secado por aspersión.

Previo al proceso de microencapsulación, fue necesario pasar una solución de cloro al 5% (v/v) por la manguera por donde se bombeó la dispersión encapsulante con el microorganismo suspendido al equipo. El recipiente de recolección del polvo se limpió con alcohol al 70% (v/v). Este procedimiento se realizó en las pruebas preliminares y en las pruebas realizadas con las condiciones del diseño experimental (Hernández, 2010).

6.2.6. Caracterización fisicoquímica de los polvos obtenidos en el secado

6.2.6.1. Humedad

El contenido de humedad residual de los encapsulados obtenidos se determinó de acuerdo al método 925.25 de la A.O.A.C (1995), esta técnica se basa en la determinación de la diferencia de peso entre la muestra húmeda y el peso de la muestra seca a las condiciones establecidas. Se pesó 1 g de muestra, por triplicado, en una charola de aluminio puesta previamente a peso constante, la cual se colocó en una estufa de vacío (Mod. 207370, Cole-Parmer, EE. UU.), durante 3 horas a 70° C, manteniendo un vacío de 50 mm Hg, para IN (Guevara, 2009) y 4 horas a 90 °C, sin vacío, para ANA. Una vez transcurrido el tiempo establecido, las charolas se sacaron de la estufa, se dejaron enfriar en un desecador por un lapso de 30-50 min y posteriormente se pesaron. El porcentaje de humedad se obtuvo por diferencia de peso, utilizando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso muestra (g)} - (\text{Peso final (g)} - \text{Peso charola (g)})}{\text{Peso muestra (g)}} \times 100$$

6.2.6.2. Actividad de agua

Para realizar esta determinación se utilizó un higrómetro Aqua lab (Mod. 3TE, Decagon Devices, Inc., EE. UU.), este equipo sigue el principio de la técnica del punto de rocío, la cual consiste en colocar la muestra, distribuida completamente en la superficie de una charola, y esperar hasta que se equilibre con el espacio de cabeza dentro de una cámara cerrada que contiene un espejo, por medio del cual se detecta la condensación del agua contenida en la muestra en equilibrio con la humedad relativa del aire en la cámara (Decagon Devices, Inc., 2007). La calibración del dispositivo se realizó utilizando carbón activado ($a_w < 0.5$) y agua destilada ($a_w = 1.000 \pm 0.003$); posteriormente se introdujo 1 gramo de muestra a la cámara y se registró la lectura (Rodríguez, 2009).

6.2.6.3. Densidad de bulto

La densidad de bulto toma en cuenta a todos los poros, dentro y fuera de las partículas individuales y puede calcularse colocando una masa de las partículas dentro de un contenedor de volumen conocido. Para la determinación de la densidad de bulto se utilizó una probeta de 10 mL, pesándola antes y después de incorporar el polvo. La ecuación a utilizar será la siguiente (Jiménez, 2007):

$$\rho_b = \frac{m}{V}$$

Dónde:

ρ_b = densidad de bulto (g/mL)

m = masa del encapsulado (g)

V = volumen ocupado en la probeta (mL)

6.2.6.4. Tamaño de partícula

Para medir la distribución del tamaño de partícula en los encapsulados obtenidos en el secador, se utilizó un equipo de difracción de rayos láser (Malvern Mastersizer 2000, Malvern, UK). Bajo las siguientes condiciones de operación: Se ponen en un vaso de precipitado de 600 mL 400 mL de agua destilada, mismo que se coloca en el equipo y se agrega la muestra poco a poco hasta que la lectura dé un valor del saturación del 15% momento en que termina el ensayo, obteniéndose el resultado en una gráfica y los datos de la misma.

6.2.7. Morfología

6.2.7.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La observación por MEB permite definir el tamaño de las microcápsulas, observar su estructura interna así como detectar una posible agregación de las partículas. Para determinar la morfología de los encapsulados, éstos se espolvorearon sobre una cinta conductora de cobre y carbono de doble adhesión, la cual se fijó previamente en un soporte de aluminio del microscopio electrónico de barrido JEOL (modelo JSEM 35CX, Japan electronic optical limited, Japón). Posteriormente se cubrieron con una película de oro mediante un ionizador (DMS-5 Cold Sputterin Module). Una vez cubiertas las muestras con la película, se colocaron en una charola y se llevó a cabo el estudio en el MEB.

6.2.7.2. Microscopía Confocal de Barrido Láser (MCBL)

La técnica de microscopía confocal de barrido láser, permite tener una visión no destructiva a través de la pared de la cápsula; el método consiste, para muestras biológicas, en hacer emitir luz en una longitud de onda superior (microscopía de fluorescencia) auxiliándose de marcadores (cromóforos). De las distintas líneas de láser que tiene el equipo, el selector de excitación permite elegir la que se desea utilizar, el haz de luz atraviesa un filtro óptico acústico y atravesando el objetivo, ilumina un punto de la muestra. Las ventajas que presenta frente a la microscopía

óptica tradicional son mayor resolución (0.14 – 0.23 μm), mayor contraste, posibilidad de realizar secciones ópticas, análisis de imágenes, reconstrucción 3D, imágenes multidimensionales e imágenes lambda.

El estudio se realizó en un microscopio confocal de barrido láser (Carl Zeiss, modelo FluoView™ FV1000-PME OLYMPUS). Se tomó una pequeña cantidad del encapsulado y se colocó en un portaobjetos, cubriéndola posteriormente con unas gotas de solución de rodamina (cromóforo) a una concentración del 0.005% con la cual se hizo fluorecer al m.o. presente. El portaobjetos con la muestra se colocó en la oscuridad por un lapso de 25 min para fijar el cromóforo; terminado este tiempo, se colocó un cubreobjetos y se fijó en los extremos para su posterior análisis. Previo al estudio con la solución de rodamina, los agentes (ANA e IN) sin encapsular, se sometieron a observación sin el cromóforo para descartar que éstos autofloreccieran y esto interviniera en el resultado final.

6.2.8. Recuento microbiano

Se realizó el recuento del microorganismo antes y después del proceso de secado siguiendo la técnica descrita por Guevara (2009) (figura 11). Antes de iniciar el proceso de encapsulación, se tomó 1 mL de cada una de las dispersiones encapsulantes inoculadas con *L. rhamnosus* y se colocó en 9 mL de agua peptonada, realizando las disoluciones necesarias para obtener un crecimiento adecuado (entre 30 y 300 colonias) en las placas sembradas en superficie de agar MRS mediante el sembrador en espiral. El recuento microbiano inicial del residuo de *L. rhamnosus* obtenido en la centrifugación, se reportó en base a UFC/g de sólidos secos, una vez que se inoculó en las distintas dispersiones encapsulantes.

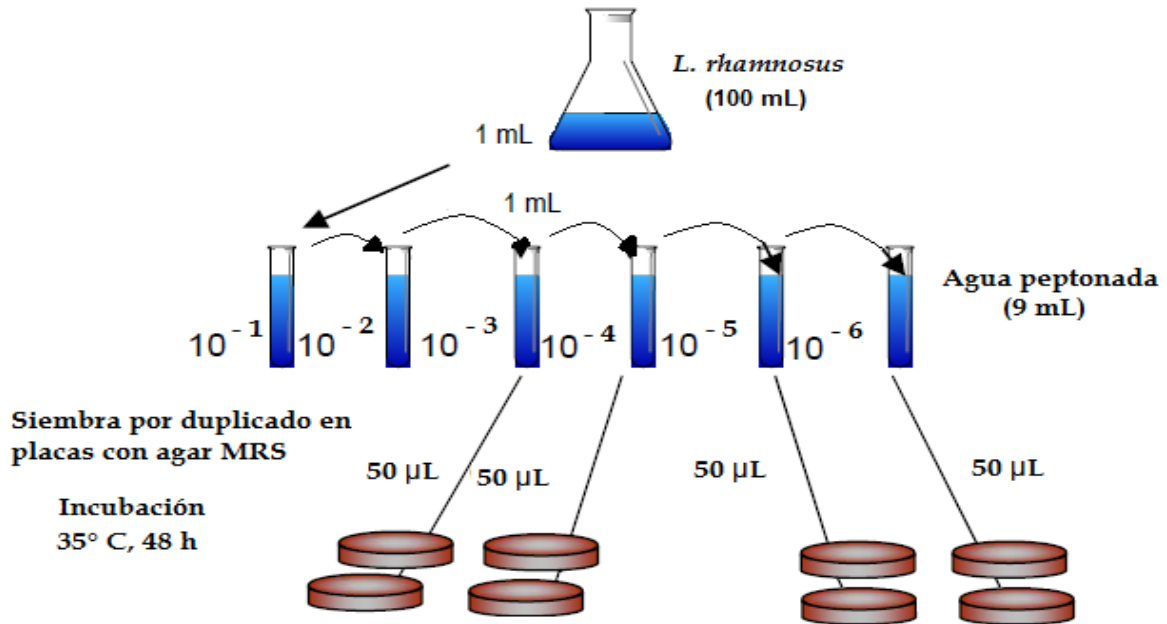


Figura 11. Esquema de la técnica de viabilidad por conteo en placa (adaptado de Cruz, 2010).

Los sólidos secos y la conversión de UFC/mL a UFC/g de sólidos secos se obtienen utilizando la siguiente ecuación:

$$g \text{ sólidos secos} = g \text{ sólidos de la dispersión} + g \text{ residuo en la centrifugación}$$

$$\frac{UFC}{g \text{ sólidos secos}} = \frac{UFC}{mL \text{ solución}} * \frac{1}{\rho} * \frac{g \text{ solución}}{g \text{ sólidos secos}}$$

Dónde:

g de sólidos de la dispersión = peso de los sólidos en la dispersión

g residuo en la centrifugación = peso del residuo (m.o.) obtenido en el centrifugado

UFC/mL solución = recuento del m.o. en la dispersión encapsulante

ρ = densidad de la solución (g/mL)

g de dispersión = peso total de la dispersión

Para realizar el recuento después del proceso de secado por aspersión se disolvió 1 g de cada polvo encapsulado en 99 mL de agua peptonada, agitando para liberar el m.o., se realizaron las diluciones que se consideraron convenientes para su posterior siembra en agar MRS utilizando el sembrador en espiral. Posteriormente, las placas se colocaron en una incubadora a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Después de 48 horas, se realizó el recuento microbiano en las placas, utilizando el escáner Qcount (Spiral Biotech, Exotech, EE.UU) (Figura 12).

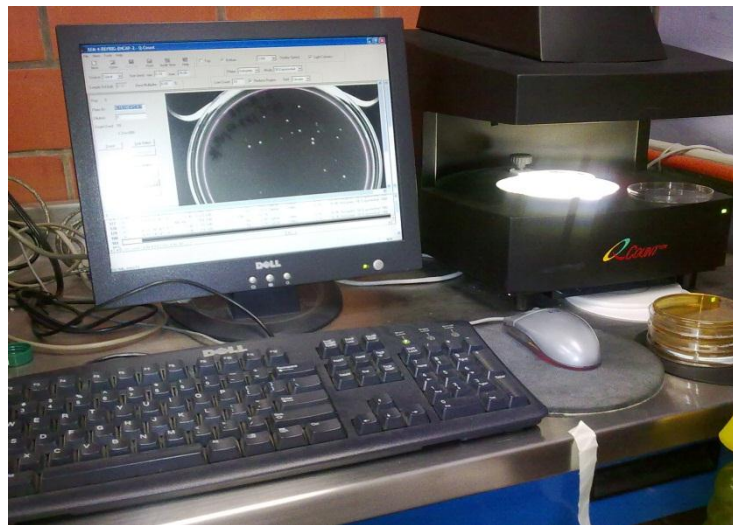


Figura 12. Escáner Qcount (Spiral Biotech, Exotech, EE.UU).

Para la determinación del porcentaje de supervivencia de *L. rhamnosus* se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{N}{N_0} * 100$$

Dónde:

N_0 = población microbiana antes del secado.

N = población microbiana después del secado.

Los polvos se almacenaron en frascos de vidrio a dos temperaturas diferentes: temperatura ambiente (25°C) y a temperatura de refrigeración (4°C).

Para la evaluación de la supervivencia del microorganismo microencapsulado durante el almacenamiento se disolvió 1 gramo del polvo en 99 mL de agua peptonada y así sucesivamente hasta obtener las diluciones necesarias para su posterior siembra en superficie de agar MRS, en el sembrador en espiral.

La evaluación de la supervivencia se realizó cada 8 días en los polvos a las diferentes condiciones de almacenamiento. Así mismo, ambas evaluaciones se realizaron durante 32 días. La viabilidad de *L. rhamnosus* durante el almacenamiento se determinó a partir de las reducciones microbianas, las cuales se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Reducciones microbianas} = \text{Log } N_0 - \text{Log } N$$

Dónde:

N_0 = población microbiana después del secado

N = población microbiana en los diferentes días de almacenamiento.

6.2.9. Evaluación del agente encapsulante como prebiótico

Con base a la formulación del caldo MRS, se prepararon tres caldos modelo sin la fuente principal de azúcar (Dextrosa). Por lo que se requirieron los siguientes ingredientes para elaborar 100 mL de caldo:

- Peptona de carne (10 g/L)
- Extracto de res (10 g/L)

- Extracto de levadura (5 g/L)
- Polisorbato 80 (1 g/L)
- Citrato de amonio (2 g/L)
- Acetato de sodio (5 g/L)
- Sulfato de Magnesio (5g/L)
- Sulfato de Manganeso (0.1 g/L)
- Fosfato dipotásico (2 g/L)

Una vez que se prepararon los tres caldos sin dextrosa, a dos de éstos se les inoculó de manera independiente 1 gramo de *L. rhamnosus* microencapsulado en las condiciones de I-20-155 y en A-20-135, considerando que estos tratamientos fueron los que mejor respuesta ofrecieron en la prueba de estabilidad. Al caldo restante se le inoculó *L. rhamnosus* en fase estacionaria sin microencapsular, el cual se etiquetó como blanco 1. Por último se preparó un cuarto caldo en condiciones normales (conteniendo dextrosa), se le inoculó *L. rhamnosus* en fase estacionaria y se etiquetó como blanco 2. Los cuatro caldos fueron colocados a 35°C en una incubadora y cada 4 horas se les determinó el pH, % de acidez titulable (como ácido láctico) y recuento microbiano, hasta llegar a 36 horas.

6.2.9.1. pH

Cada 4 horas durante 36 horas se midió el pH de los cuatro caldos modelo utilizando un potenciómetro (Mod. Ultrabasic, Denver Instruments, Colorado, EE.UU.) previamente calibrado y por inmersión directa del electrodo.

6.2.9.2. Acidez titulable

Cada 4 horas durante 36 horas se tituló 1 mL de cada uno de los caldos modelo con NaOH 0.1 N y el resultado se expresó como porcentaje de ácido láctico utilizando la siguiente expresión (Mani, 2005):

$$\% \text{ acidez} = \frac{(Vol_{NaOH}) (N_{NaOH})(0.09)}{mL_{muestra}} \times 100$$

Dónde:

0.09 = Miliequivalente de ácido láctico

6.2.9.3. Cinética de crecimiento

Se realizó el conteo microbiano de los cuatro caldos modelo cada 4 horas durante 36 horas. Se tomó 1 mL de caldo y se colocó en 9 mL de agua peptonada y así sucesivamente hasta realizar las diluciones que se consideraron convenientes para su posterior siembra en agar MRS utilizando el sembrador en espiral. Posteriormente, las placas se colocaron en una incubadora a 35°C en condiciones anaerobias. Después de 48 horas se realizó el recuento microbiano en las placas utilizando el escáner Qcount.

6.3. Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos obtenidos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se utilizó el Software JMP (v.5.0 2009). Cabe mencionar que cuando se encontraron diferencias significativas entre las muestras se utilizó una prueba de comparación múltiple de Tukey.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización de las dispersiones de los agentes encapsulantes

El Cuadro 6 muestra los resultados de la densidad y viscosidad de las dispersiones de alimentación obtenidas a partir de almidón nativo de arroz (ANA) e inulina de achicoria (IN) a diferente concentración de sólidos. La densidad para ambos agentes encapsulantes tuvo valores cercanos a la unidad ($1.03 - 1.04 \text{ g/cm}^3$), y no se encuentra diferencia significativa al comparar la misma concentración en ambos agentes encapsulantes; se observa que al aumentar la concentración de sólidos aumenta ligeramente también el valor de la densidad, estos valores son similares a los obtenidos por Hernández (2010) para inulina y maltodextrina al 25 % (1.12 y 1.11 g/cm^3 , respectivamente). La viscosidad fue mayor en las dispersiones con ANA ($13.2 - 13.6 \text{ cP}$), este valor era esperado dadas las características de insolubilidad de ANA en agua con lo cual se forma una dispersión, contrario a IN, que forma una solución verdadera (mezcla homogénea), donde el peso molecular tiene un papel importante, siendo el almidón de arroz miles de veces más grande que la inulina, cuyo grado de dextrosa equivalente es de 5-7. De acuerdo a Wang y Wang (2000), la diferencia en la estructura de las moléculas de los carbohidratos, es la que va a determinar su viscosidad, siendo las de más alto peso molecular las que muestren una viscosidad más alta, ya que las moléculas poliméricas más grandes (como el almidón) forman una solución más viscosa que las moléculas pequeñas (como la inulina).

En un estudio realizado por Boza y col. (2004) evaluando la sobrevivencia de *Beijerinckia* sp. encapsulado en diferentes carbohidratos (maltodextrinas, Capsul® [almidón modificado], jarabes de glucosa y goma arábica), reportaron valores de viscosidad similares (13.6 cP) con Capsul® en dispersiones al 20 % de éste. Por otro lado, los resultados observados en las soluciones encapsulantes con IN ($2.2-2.5 \text{ cP}$) mostraron bajas viscosidades, por lo que siguieron el mismo comportamiento que las soluciones con jarabe de glucosa (2.5 cP) y las soluciones con maltodextrina (4.0

cP), las cuales presentan una mayor solubilidad en agua al igual que la IN. De igual manera que en la densidad, en esta determinación se observa una tendencia a incrementar el valor de viscosidad en relación al aumento de sólidos presentes en la dispersión.

Cuadro 6. Propiedades fisicoquímicas de las dispersiones encapsulantes.

Agente encapsulante	Sólidos (%)	Densidad * (g/cm ³)	Viscosidad * (cP)
ANA	10	1.03 ± 0.002 ^f	13.2 ± 0.02 ^c
	15	1.05 ± 0.002 ^d	13.3 ± 0.06 ^b
	20	1.07 ± 0.001 ^b	13.6 ± 0.14 ^a
IN	10	1.04 ± 0.001 ^e	2.2 ± 0.04 ^f
	15	1.06 ± 0.001 ^c	2.4 ± 0.13 ^e
	20	1.08 ± 0.001 ^a	2.5 ± 0.08 ^d

* Los valores son la media ± error estándar, n=3; letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa (p<0.05). ANA=Almidón nativo de arroz; IN=Inulina; 10, 15, 20=% sólidos (p/p)

Investigaciones realizadas han determinado que la viscosidad y la densidad de las soluciones de alimentación, se encuentran relacionadas con las características fisicoquímicas finales de los encapsulados, así como en el establecimiento de las condiciones de secado, como la fijación del flujo de la solución (Guevara, 2009), el cual es necesario para estandarizar los experimentos de secado por aspersión. Algunos autores relacionan la viscosidad de la solución del agente encapsulante con el aumento o disminución de la viabilidad de los microorganismos; Boza y col. (2004), describen que a menores viscosidades la viabilidad del microorganismo encapsulado mediante secado por aspersión puede llegar a ser mayor, de aquí se considera que al disminuir la viscosidad del agente encapsulante, puede aumentar la velocidad de flujo, disminuyendo el volumen de la gota al momento de llevarse a cabo la

aspersión, por lo que puede disminuir el tamaño de partícula y aumentar por consiguiente la superficie de contacto entre el agente encapsulante y el material encapsulado (Doherty y col., 2011).

7.2. Curva de crecimiento de *L. rhamnosus*

En la Figura 13 se observan las etapas de crecimiento de *L. rhamnosus*, donde el inicio de la fase estacionaria se localiza a las 24 h, identificando que el máximo crecimiento se encuentra a las 36 h, con una población de 9.8×10^9 UFC/g, por lo que es a este tiempo al cual se incubó *L. rhamnosus* para preparar los inóculos de cada tratamiento experimental. en la fase exponencial se obtuvo una población bacteriana de 8.6×10^8 UFC/g. Corcoran y col. (2004) encapsularon *L. rhamnosus* GG mediante secado por aspersión, examinando su sobrevivencia en las distintas etapas de la curva de crecimiento, lag [I], exponencial [II] y estacionaria [III], para lo cual utilizaron leche descremada reconstituida al 20% (p/v) y povidexrosa al 10 % (p/v), determinando que el mayor porcentaje de sobrevivencia de los cultivos de *L. rhamnosus* se encontró en la fase estacionaria (31-50 %), con una población de 2.9×10^9 UFC/g, mientras que en la fase exponencial fue de 2.1×10^7 UFC/g (14 % de sobrevivencia).

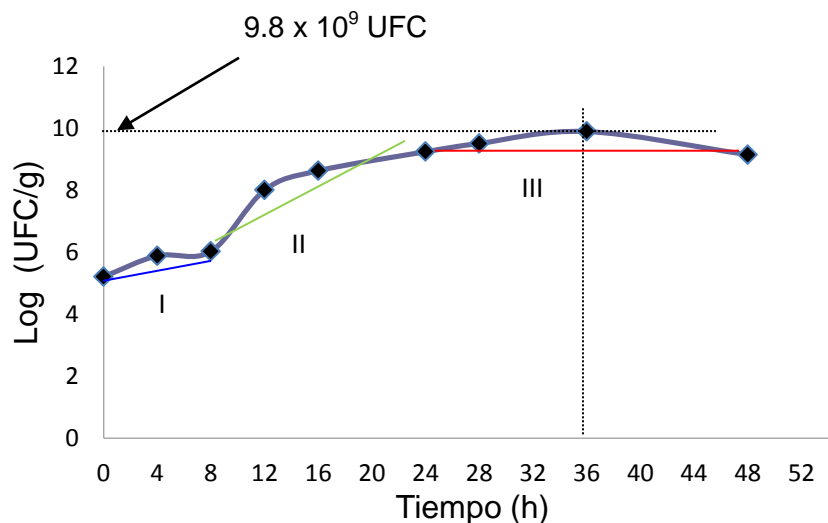


Figura 13. Cinética de crecimiento de *L. rhamnosus*.

Lian y col. (2002) y Guevara (2009) también indican que la mejor etapa de recuperación del microorganismo para su encapsulación es la estacionaria, por ser la fase de crecimiento donde se encuentra la mayor población bacteriana. Por lo que, considerando los estudios mencionados, se realizó la curva de crecimiento del probiótico, a fin de identificar el tiempo al cual *L. rhamnosus* se encontraba en la fase estacionaria de dicha curva y partir de una población óptima (1×10^9 UFC/g), obteniendo un producto con características funcionales.

7.3. Secado por aspersión

De los 400 g a tres concentraciones (10, 15 y 20 % (p/p) en agua), que se prepararon para ambos agentes encapsulantes (ANA e IN), se obtuvieron rendimientos de recuperación de sólidos del 65,68 y 74 % para ANA y del 43, 51 y 54 % para IN, respectivamente para cada concentración mencionada.

En el Cuadro 7 se muestran las temperaturas de salida obtenidas para cada tratamiento durante el proceso de encapsulamiento, las cuales van desde 58°C hasta 77°C, mostrando un aumento de acuerdo a las temperaturas de entrada y la concentración de sólidos. Al utilizar la técnica de secado por aspersión, estas temperaturas se pueden considerar bajas para el encapsulamiento de microorganismos probióticos, en comparación a los resultados obtenidos por otras investigaciones con condiciones similares a las utilizadas en este estudio. Boza y col. (2004) obtuvieron temperaturas de salida de 75°C durante la encapsulación de *Beijerinckia sp.* con maltodextrinas y jarabes de glucosa mediante secado por aspersión. Utilizaron una temperatura de entrada de 135°C y un flujo de 10 mL/min. Gardiner y col. (2000) relacionaron el porcentaje de sobrevivencia, de los microorganismos probióticos encapsulados, con el porcentaje de humedad residual y la temperatura de salida en el secador, encontrando que mientras esta última disminuía, el contenido de humedad de los productos aumentaba, al igual que la viabilidad de *L. paracasei*. Un registro del aumento en el contenido de humedad del producto se debe a que la temperatura de salida del aire de secado se reduce, lo

que decae en una disminución en el daño a la pared celular de los microorganismos y por lo tanto hay una mayor viabilidad de éstos

Cuadro 7. Temperaturas de salida del secador

Tratamiento	Temperatura de salida (°C)
A-10-135	58 ± 0.68 ^g
A-20-135	61 ± 1.82 ^f
A-15-145	65 ± 1.02 ^d
A-10-155	70 ± 1.44 ^{bc}
A-20-155	76 ± 1.58 ^a
I-10-135	60 ± 0.92 ^f
I-20-135	63 ± 1.21 ^e
I-15-145	68 ± 0.92 ^c
I-10-155	71 ± 0.52 ^b
I-20-155	77 ± 1.44 ^a

Los valores son la media ± error estándar, n=3; letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). A=Almidón; I=Inulina; 10, 15, 20=% sólidos (p/p). 135, 145, 155 = Temperaturas de entrada al secador.

7.4. Caracterización fisicoquímica de los encapsulados

7.4.1. Humedad, a_w y densidad aparente

Los resultados obtenidos de a_w (0.12–0.22), contenido de humedad residual (<4%) y densidad aparente (0.43-0.55 g/cm³), de los diferentes tratamientos con ANA e IN, se observan en el cuadro 8. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), encontrando diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los valores de a_w , densidad aparente y humedad residual. Otras investigaciones (Gardiner y col., 2000; Ananta y col., 2004), han obtenido resultados de humedad semejantes a las obtenidas en este estudio, al encapsular microorganismos probióticos con leche desnatada (4%), o con mezclas de leche reconstituida con polidextrosa e inulina (<4%) (Corcoran y col., 2004); así como para los valores de actividad de agua, con materiales pared como

quitosano encapsulando ácido ascórbico (0.108) (Pulido y Berinstain, 2009) y con mezclas de inulina, maltodextrinas, goma arábiga encapsulando *L. casei* (0.180-0.232) (Hernández, 2010).

De entre los factores que se consideran más importantes en el secado por aspersión y que van a influir directamente sobre las características físicas y químicas del producto final, como los parámetros antes mencionados, se pueden mencionar a la temperatura, humedad, velocidad y presión del aire en la cámara de secado, siendo la diferencia de temperaturas que se tiene de bulbo seco del aire y la de bulbo húmedo de la superficie de la partícula que está siendo secada, uno de los factores más importantes, y la cual va a determinar críticamente la velocidad de secado, ya que entre mayor sea esta diferencia, mayor será la humedad de vapor que el aire tome y por lo tanto repercutirá en la velocidad a la cual esta humedad pueda ser removida de la superficie del material (Lozano-Berna, 2009). Al trabajar con un caudal alto del aire de secado la humedad final del producto será mayor, ya que bajará la presión parcial del agua evaporada, o de igual forma tendremos una humedad residual mayor si se trabaja con una humedad del aire de entrada alta, ya que habrá una presión parcial más alta del aire de secado. Ananta y col. (2004) determinaron un valor de humedad crítico de 7%, encapsulando *L. rhamnosus* con proteína de leche en polvo y polidextrosa, encontraron que a valores superiores a éste, se comprometía la calidad del producto durante el almacenamiento, por sufrir una recristalización.

Para que un polvo se considere de calidad, algunos autores proponen que los valores deben de encontrarse entre 0.15 y 0.3 para a_w y por debajo de 5% para la humedad residual, ya que por arriba de estos valores podría haber crecimiento de microorganismos patógenos (pérdida de estabilidad microbiológica), “apelmazamiento” o recristalización del material que forma la matriz, en el caso de polvos encapsulados (Ananta y col., 2004; Chacon, 2006). Boza y col. (2004) obtuvieron valores de a_w de 0.23 a 0.43 en la encapsulación de *Beijerinckia sp*,

utilizando maltodextrinas, jarabe de glucosa y almidón resistente como agente encapsulante, valores superiores a los obtenidos en este estudio.

Cuadro 8. Propiedades fisicoquímicas de los encapsulados con *L. rhamnosus*.

Tratamiento	a_w	Humedad (%)	Densidad (g/cm ³)
A-10-135	0.15 ± 0.007 ^{abc}	2.7 ± 0.060 ^{cd}	0.43 ± 0.004 ^c
A-20-135	0.13 ± 0.007 ^{bc}	2.2 ± 0.203 ^{de}	0.43 ± 0.004 ^c
A-15-145	0.16 ± 0.032 ^{abc}	1.8 ± 0.053 ^e	0.45 ± 0.002 ^{bc}
A-10-155	0.22 ± 0.032 ^{ab}	3.6 ± 0.069 ^a	0.44 ± 0.004 ^c
A-20-155	0.12 ± 0.021 ^c	2.6 ± 0.069 ^{cd}	0.47 ± 0.001 ^b
I-10-135	0.24 ± 0.010 ^a	3.9 ± 0.106 ^a	0.55 ± 0.009 ^a
I-20-135	0.22 ± 0.004 ^{abc}	3.9 ± 0.069 ^a	0.43 ± 0.005 ^{cd}
I-15-145	0.21 ± 0.004 ^{abc}	2.6 ± 0.041 ^{cd}	0.44 ± 0.003 ^c
I-10-155	0.24 ± 0.021 ^a	3.2 ± 0.074 ^b	0.46 ± 0.010 ^{bc}
I-20-155	0.20 ± 0.023 ^{abc}	2.8 ± 0.041 ^{bc}	0.47 ± 0.009 ^b

Los valores son la media ± error estándar, n=3; letras diferentes en la misma columna indica diferencia estadística significativa (p<0.05). A=Almidón; I=Inulina; 10, 15, 20=% sólidos (p/p). 135, 145, 155 = Temperaturas de entrada al secador.

Por otra parte, ya que el agua contribuye a la estabilidad de la diversidad biológica, también la eliminación de agua puede causar daños irreversibles, como cambios en la integridad estructural y funcional de las membranas bacterianas y las proteínas (Jouppila y Ross, 1994). Por lo que la preservación de estas funciones, es esencial para la sobrevivencia de las bacterias y conservar, de esta manera, su capacidad fermentativa. Al trabajar con una temperatura de entrada elevada, habrá una mayor temperatura de salida, obteniendo una menor humedad en el producto final, sin embargo, al tener una menor humedad relativa del aire de entrada, se puede llegar a afectar la estructura de la partícula y la sobrevivencia de los microorganismos al tener una mayor influencia de la temperatura directamente sobre ésta.

El contenido de agua es un parámetro importante para la estabilidad de los cultivos secos (Clementi y Rossi, 1984). De acuerdo a Prajapati y col. (1987), la máxima sobrevivencia bacteriana, ocurre en polvos con contenidos de humedad de alrededor de 3.5% y en una baja actividad de agua. Sin embargo, durante el secado puede disminuir la viabilidad y la estabilidad de los microorganismos (de Valdez y col., 1985). Sin embargo, otros autores informan que el contenido óptimo de humedad residual, la capacidad de fermentar y la sobrevivencia de los microorganismos, varía con la composición del fluido en el que los microorganismos se han secado, con la atmósfera de almacenamiento, y con la especie o cepa que se ha utilizado (Fry, 1966).

Fuchs y col. (2006) y Hernández (2010) mencionan que la densidad de bulto se encuentra directamente relacionada al tamaño de partícula, por lo que el valor de la densidad será menor mientras más pequeño sea el tamaño de éste. Un polvo que tenga un tamaño de partícula pequeño, ocupará un menor espacio en una probeta, o se compactará más, que un polvo cuyo tamaño de partícula sea mayor. Guevara (2009), reporta valores entre 0.28-0.32 g/cm³ y Fuchs y col. (2006) de 0.333 g/cm³. Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran ligeramente por arriba a los reportados por estos autores, lo que indica probablemente que los encapsulados obtenidos tienen un tamaño de partícula más grande que los el de los trabajos antes mencionados.

7.4.2. Tamaño de partícula

Todos los tratamientos presentaron un tamaño de partícula homogéneo (Figura 14) en ANA (5.6 – 5.9 µm) (Figura 14a) y en IN (3.5 – 6.1 µm) (Figura 14b) durante el proceso de encapsulación. El análisis de tamaño de partícula concuerda con lo mostrado en el análisis morfológico de microscopia electrónica de barrido y en el análisis de microscopia confocal de barrido láser. Santos y col. (2005) obtuvieron tamaños de partícula con un tamaño medio de 16.0 a 20.3 µm, utilizando almidón de

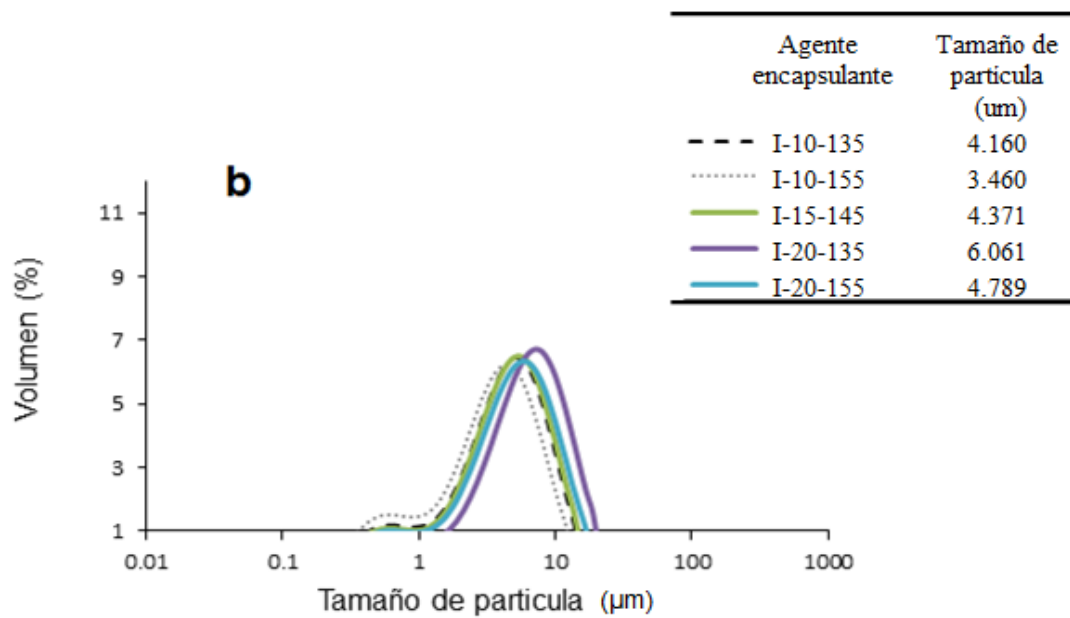
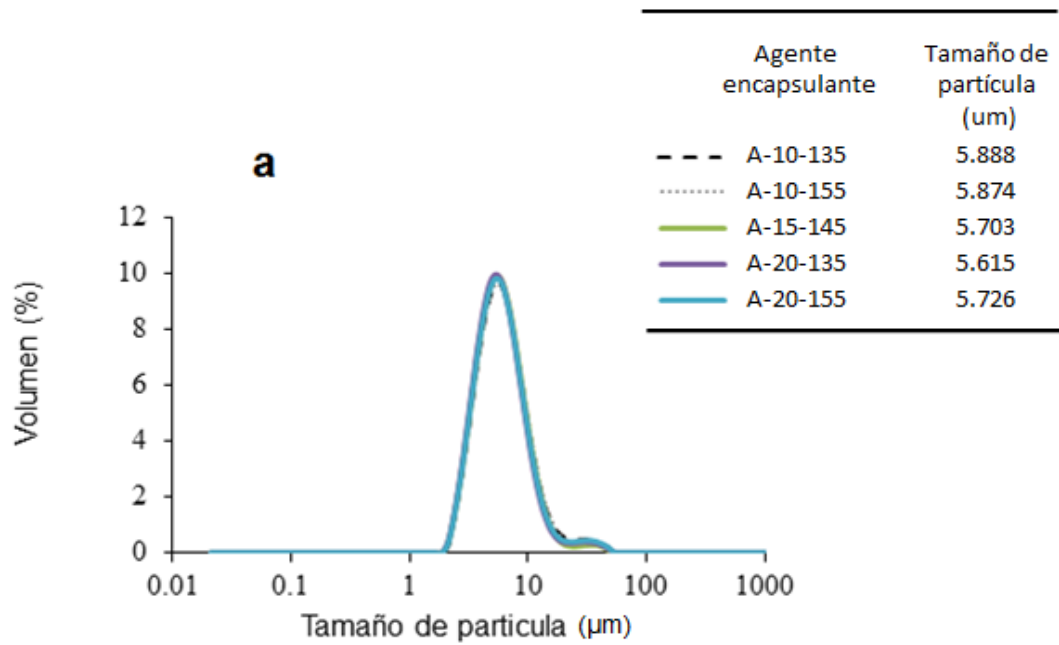


Figura 14. Distribución de tamaño de partícula de los encapsulados con almidón nativo de arroz (a) e inulina (b)

arroz/goma arábica, y una variación de 2 a 60 μm , utilizando almidón de arroz/gelatina, este valor se incrementa al utilizar un agente de unión.

Así mismo, Beirão da Costa y col. (2011), durante la caracterización de los aglomerados de arroz, obtuvo tamaños de partícula menores a 5 μm , resultados similares a los obtenidos en este estudio. Ellos mencionan que la concentración del agente encapsulante es el parámetro que más significativamente afecta el tamaño de partícula en la formación de los agregados, así como también el agente de unión (gelatina) cuando este es adicionado a las dispersiones alimentarias, volviéndose el tamaño de partícula más heterogéneo. Al utilizar carboximetilcelulosa, aparentemente ésta no tuvo mayor influencia en el tamaño de partícula.

En cuanto a la distribución de tamaño de partícula de los encapsulados para ambos materiales pared, ANA e IN, hay pocos estudios con estos, utilizados como agentes encapsulantes. Algunos autores mencionan que hay una mayor viabilidad de los microorganismos, cuando el tamaño de partícula es menor, ya que hay una mayor superficie de contacto (Doherty y col., 2011). Downing (1989) menciona que el tamaño y geometría de la partícula, van a intervenir en la velocidad de secado, ya que una partícula más pequeña y/o delgada es más rápida de secar que una de un grosor mayor, obteniendo consecuentemente humedades menores.

7.5. Caracterización morfológica de las microcápsulas

7.5.1. Microscopía electrónica de barrido

En la microencapsulación, la protección ofrecida por el material de pared al igual que las propiedades de las microcápsulas, dependen de la estructura interior y exterior de esta, y en como el material de pared está compuesto y organizado al formar las microcápsulas (Rosenberg y col., 1985; Wang y Wang, 2000; Pulido y Berinstain, 2010). Como se puede observar, la Figura 15 muestra la formación de microcápsulas con ANA e IN. En la Figura 15a y 15b se observa la micrografía de

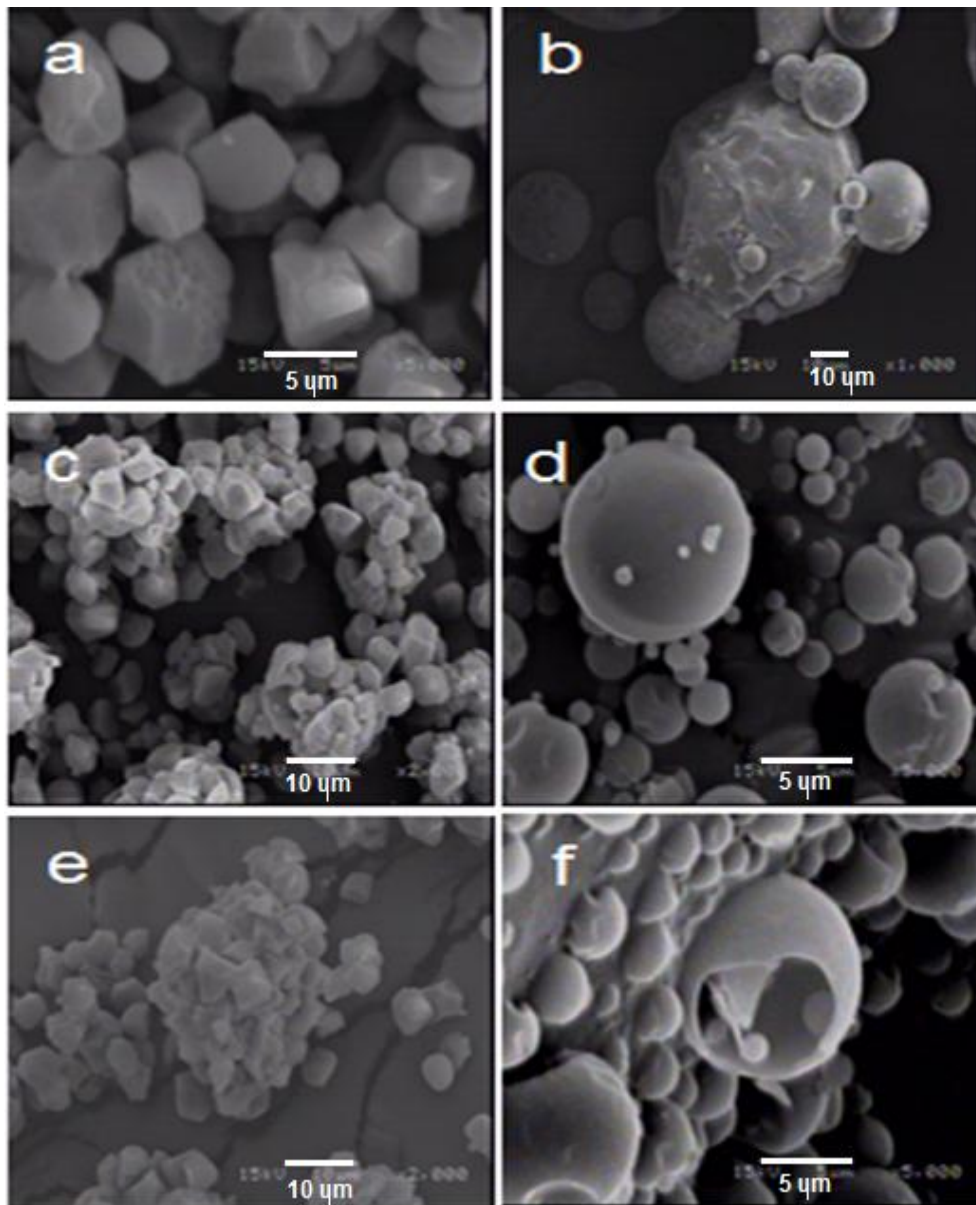


Figura 15. Micrografía electrónica de barrido de: almidón nativo de arroz (a), inulina de achicoria (b), microcápsulas de aglomerados formados con almidón nativo de arroz al 20% (p/p) y temperatura de entrada al secador de 135°C (c, e) y microcápsulas formadas con inulina de achicoria al 20% (p/p) y temperatura de entrada al secador de 155 °C (d, f) mediante la técnica de secado por aspersion.

ANA e IN, respectivamente, antes del proceso de secado por aspersión. En estas micrografías se observa una superficie más rugosa para ambos agentes encapsulantes, y porosa para el caso de ANA, mientras que en las micrografías de las Figuras 15c-f la superficie de las estructuras es más lisa, observándose de esta manera un ligero cambio en la morfología de la superficie de los gránulos de ANA y de las partículas de IN. De manera general, las imágenes muestran un tamaño de partícula homogéneo, consistente con el análisis realizado mediante la técnica de difracción de rayos láser. Los gránulos de ANA formaron microcápsulas con forma de agregados (Figuras 15c y 15e), las cuales concuerdan con las formas reportadas por Zhao y Whistler (1994) para almidón de arroz, trigo y amaranto, en los cuales encapsularon ácido cítrico; esta morfología también ha sido reportada por Santos y col. (2005), los cuales utilizaron el almidón de arroz para encapsular oleorresina de paprika. En ambos estudios fue adicionada gelatina como agente de unión para formar los aglomerados, ya que referían la necesidad de adicionar una proteína para la formación de dichos aglomerados.

En este estudio no se adicionó proteína para “cimentar” a los gránulos de almidón y formar los agregados, lo que coincide con los resultados de Beirão da Costa y col. (2010), quienes caracterizaron estas estructuras, encontrando que el contenido de proteína del almidón de arroz comercial que utilizaron (0.64%), fue suficiente para fomentar su formación sin agregar algún agente de unión adicional. El contenido de proteína en el almidón de arroz de este estudio fue de 5.2%. Este porcentaje de proteína es muy alto en comparación lo reportado por Beirão da Costa y col. (2010), lo cual es debido al método de extracción del almidón, ya que no se purificó para eliminar las proteínas asociadas al gránulo de almidón. En los almidones comerciales se utilizan métodos más exhaustivos de limpieza, como por ejemplo proteasas, para realizar el pulido del arroz.

Las figuras 15d y 15f muestran las imágenes de las microcápsulas de inulina, las cuales presentan una estructura de partícula simple (esférica, con una pared continua y huecas). Este resultado coincide con Gharsallaoui y col. (2007), quienes describen que las partículas que se originan, de las gotas en secado por aspersión,

adquieren forma esférica, y dependiendo de la composición del núcleo estas pueden ser compactas o huecas. Este tipo de morfología ha sido encontrada en otros carbohidratos, utilizados como agentes encapsulantes mediante secado por aspersión, como fructanos (aguamiel) (Rodríguez-Huezo y col., 2007), inulina de agave (Arenas-Ocampo y Col., 2008), jarabes de glucosa o maltodextrinas de bajo peso molecular (Boza y col., 2004), los cuales tienen la característica en común de ser muy solubles y tener bajas viscosidades.

7.5.2. Microscopía confocal de barrido láser

En la Figura 16a, 16b y 16c se observan las micrografías de ANA, IN y de *L. rhamnosus* antes de ser sometidos al secado por aspersión, respectivamente. En las micrografías de ANA e IN se observa que éstos no presentan fluorescencia intrínseca o ésta es casi nula con el cromóforo utilizado (rodamina b) a diferencia de *L. rhamnosus* que si presenta una fluorescencia muy marcada, esto es debido a la unión de la rodamina a cadenas acilo o a fosfolípidos en la pared celular de los microorganismos probióticos (Martínez-Estrada, 2006). En la Figura 16f se observan gránulos de ANA posterior al secado, observándose mediante fluorescencia, que los microorganismos se encuentran en la periferia del gránulo de almidón. En la figura 16d se observa la distribución de *L. rhamnosus* en los intersticios (poros) de un aglomerado, con lo cual se sugiere una doble protección, ya que los probióticos se encuentran tanto en la periferia de los gránulos de almidón, así como en el interior e intersticios de los aglomerados. En las figuras 16e y 16g se muestra la presencia de microorganismos en cápsulas de inulina, sin embargo, la técnica utilizada no fue lo suficientemente eficiente como para describir si estos se encontraban en la superficie o en el interior de las cápsulas, ya que a la luz fuera de foco, la estructura se desvaneció sin permitir apreciar con claridad la distribución de *L. rhamnosus*, con lo cual podría sugerirse la realización de un nuevo estudio con otros marcadores. La confirmación de la encapsulación de los microorganismos probióticos, así como su distribución en los polímeros involucrados, es un paso importante en la metodología de microencapsulación utilizada.

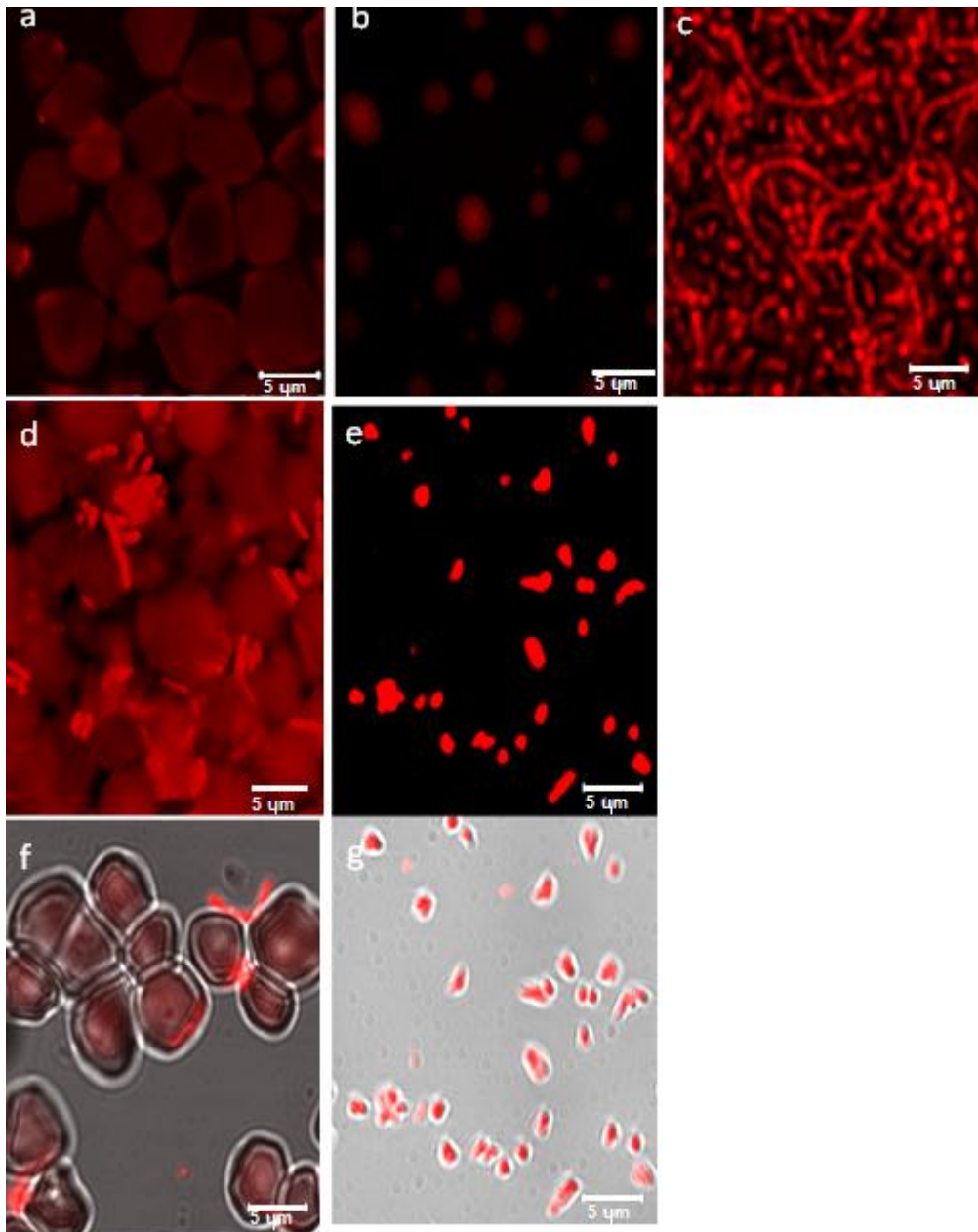


Figura 16. Micrografía confocal de barrido láser de: almidón nativo de arroz (a), inulina de achicoria (b), *L. rhamnosus* (c), *L. rhamnosus* en un aglomerado formado con almidón nativo de arroz (d), *L. rhamnosus* en la periferia de los gránulos de almidón (f) y encapsulados de inulina (e, g).

Beirão da Costa y Col. (2011), encapsularon aceite de orégano en almidón de arroz, inulina y sacarosa/gelatina, el cual mostró las mismas oportunidades de encapsulamiento con los agentes usados, mediante análisis por microscopía confocal de barrido láser. Otras investigaciones con *L. rhamnosus* GG han mostrado una clara distribución de estos en los canales de la superficie de microcápsulas formadas por técnica de goteo con alginato (Doherty y col., 2011), o las cápsulas de leche descremada formadas por extrusión (Gardiner, 2000).

La actividad biológica en cada sistema (ANA e IN) se podría mejorar mediante la manipulación de diferentes parámetros de procesamiento, tales como agentes de unión, contenido de sólidos y la temperatura de secado.

7.6. Recuento microbiano

7.6.1. Viabilidad al término del secado por aspersión

En el Cuadro 9 se observa la población bacteriana inicial (antes del secado por aspersión) y la población bacteriana al final del secado. Se puede observar que en ANA el tratamiento 10% de sólidos y temperatura de entrada de 135°C (A-10-135), se obtuvo la menor reducción microbiana (0.27 CL), mientras que en el tratamiento de 20% de sólidos y temperatura de entrada de 135°C se obtuvo la mayor reducción (0.42 CL), este último resultado fue contrario a lo esperado, ya que al tener la menor temperatura de entrada en ambos porcentajes de sólidos (10 y 20%), se esperaba una menor reducción microbiana en ambos tratamientos. Boza y col. (2004), usaron temperaturas de entrada de 135°C, utilizando maltodextrina, con la cual se obtuvieron reducciones logarítmicas de 0.16 a 0.23 al término del proceso de secado por aspersión, estos resultados son menores a los aquí reportados. En cuanto a las reducciones con Capsul® (almidón modificado) se obtuvieron valores de 1.58 a 1.67 CL. Guevara (2009), obtuvo reducciones logarítmicas muy altas (3.16 CL) al término del secado, utilizando maltodextrinas, lo que indica una alta pérdida de viabilidad microbiana. El tener pérdidas menores a 2 CL en este estudio, y conservar una población microbiana mayor a 1×10^7 UFC/g, necesaria en la incorporación de un

alimento que pueda ser considerado funcional, da un indicio de que la formación de estructuras de aglomerados de ANA ofrecen una buena protección a los microorganismos durante el proceso de secado. Hernández (2010) utilizó soluciones simples de IN para encapsular *L. casei*, así como mezclas binarias y terciarias con maltodextrina y goma arábica, de las que obtuvo reducciones de 0.92 ciclos logarítmicos para las soluciones encapsulantes simples y hasta reducciones de 1.79 CL con mezclas de inulina, maltodextrina y goma arábica, siendo estos valores, para ambas condiciones, mayores a los aquí reportados.

Cuadro 9. Viabilidad de *L. rhamnosus* al término del proceso de secado por aspersión utilizando almidón de arroz e inulina a diferentes concentraciones.

Tratamiento	No. de células viables		Reducción logarítmica de la población (Log N ₀ /N)*
	Población inicial N ₀ (UFC/g) (E+08)	Población después del secado N (UFC/g) (E+08)	
A-10-135	18.2	9.69	0.27 ± 0.07 ^c
A-20-135	23.5	9.04	0.42 ± 0.05 ^{bc}
A-15-145	23.9	12.00	0.30 ± 0.03 ^c
A-10-155	15.8	6.65	0.38 ± 0.04 ^{bc}
A-20-155	16.2	8.06	0.31 ± 0.06 ^{bc}
I-10-135	15.0	4.56	0.52 ± 0.04 ^b
I-20-135	17.2	8.26	0.32 ± 0.03 ^{bc}
I-15-145	15.2	8.14	0.27 ± 0.03 ^c
I-10-155	24.4	4.64	0.72 ± 0.11 ^a
I-20-155	22.1	8.54	0.41 ± 0.05 ^{bc}

* Los valores son la media ± error estándar, n=6; letras diferentes en una misma columna indica diferencia estadística significativa (p<0.05). A=Almidón; I=Inulina; 10, 15, 20=%sólidos (p/p); 135, 145, 155=Temperatura de entrada al secador.

7.6.2. Viabilidad en el ensayo de estabilidad

En el Cuadro 10 se observan la reducción microbiana al término de 32 días de almacenamiento, la cual se evaluó a las temperaturas de 25°C y 4°C. Como se puede apreciar, la población microbiana se puede considerar adecuada, ya que se encuentra por arriba del valor mínimo requerido para ser considerado como funcional (1×10^7 UFC/g) al final del ensayo de estabilidad. En la condición de refrigeración, para el caso del almidón al 10 y 20% y temperatura de entrada de 135°C, se obtuvieron reducciones logarítmicas de 0.40 y 0.19, lo que equivale a tener una población microbiana de 3.82×10^8 UFC/g y 5.83×10^8 UFC/g, respectivamente. En el almacenamiento a temperatura ambiente se encontró el mismo comportamiento, obteniendo reducciones menores a 1 CL (0.62 y 0.17 CL para 10 y 20 % de sólidos en ANA, respectivamente), donde se observa una mayor protección con el tratamiento con más contenido de sólidos. En los tratamientos con temperatura de entrada de 155 °C, el comportamiento fue similar para este mismo agente encapsulante, los tratamientos con mayor contenido de sólidos (20%) tuvieron una reducción logarítmica menor en ambas condiciones de almacenamiento (0.15 a 4°C y 0.38 a 25°C). Estos resultados son menores a los reportados por Boza y col. (2004) a los 30 días de almacenamiento (2.18 CL) con almidón modificado de maíz (Capsul®), maltodextrina (1.37 CL) y jarabe de glucosa (2.45 CL). O'Riordan y col. (2001) reportaron la disminución de 4 CL a los 22 días de almacenamiento a temperatura ambiente con almidón de maíz ceroso modificado. En el punto central se esperaba, de acuerdo al contenido de sólidos, que en condiciones de refrigeración, hubiese una menor reducción de CL en comparación a los tratamientos con 20% de sólidos, pero contrario a este resultado fue el tratamiento que menor viabilidad arrojó. Cabe mencionar que los tratamientos, con 15% de sólidos, fueron los que menor porcentaje de humedad residual presentaron (1.8% en ANA y 2.6% en IN), lo que relacionándolo a lo mencionado en el apartado 7.4.1 y por Gardiner (2000), se corrobora el hecho de que es necesario un porcentaje mayor de humedad para que puedan seguir manteniendo una mayor viabilidad los microorganismos encapsulados. De manera general, las reducciones logarítmicas para ANA fueron

bajas en comparación a las obtenidas con IN y a las reportadas por diversos autores utilizando almidones modificados. Se observa que este material es estable aún en almacenamiento a temperatura ambiente (25°C), sin necesidad de que se tenga que invertir en una cámara con atmósfera controlada.

Cuadro 10. Resultados de viabilidad de *L. rhamnosus* en los encapsulados almacenados en refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente (25°C) durante 32 días.

Tratamiento	Población microbiana al término del secado Log N ₀ (UFC/g)	Población microbiana al día 32 Log N (UFC/g)		Reducción microbiana al día 32 * (Log N ₀ - Log N)	
		4°C	25°C	4°C	25°C
A-10-135	8.99	8.58	8.36	0.40 ± 0.09 ^{de}	0.62 ± 0.09 ^d
A-20-135	8.96	8.77	8.79	0.19 ± 0.06 ^{fg}	0.17 ± 0.06 ^{ef}
A-15-145	9.08	8.28	8.74	0.80 ± 0.07 ^{cd}	0.34 ± 0.11 ^{de}
A-10-155	8.82	8.50	8.29	0.33 ± 0.13 ^{ef}	0.54 ± 0.14 ^d
A-20-155	8.91	8.76	8.52	0.15 ± 0.05 ^{fg}	0.38 ± 0.09 ^{de}
I-10-135	8.66	7.80	6.92	0.86 ± 0.02 ^c	1.74 ± 0.05 ^b
I-20-135	8.92	8.29	6.69	0.63 ± 0.15 ^{cde}	2.23 ± 0.12 ^a
I-15-145	8.91	7.08	6.65	1.83 ± 0.06 ^a	2.26 ± 0.18 ^a
I-10-155	8.67	7.84	6.78	0.83 ± 0.03 ^c	1.89 ± 0.05 ^b
I-20-155	8.93	7.62	7.70	1.32 ± 0.13 ^b	1.23 ± 0.08 ^c

* Los valores son la media ± error estándar, n=6; letras diferentes en una misma columna indica diferencias significativas (p<0.05) A=Almidón; I=Inulina; 10, 15, 20=% sólidos (p/p); 135, 145, 155=Temperatura de entrada al secador.

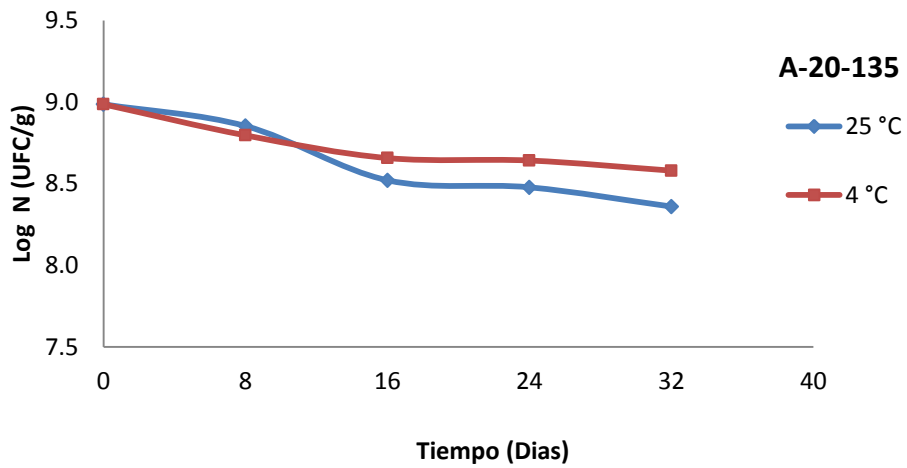
En el caso de la inulina, también un mayor porcentaje de sólidos (20%) representó una menor reducción de ciclos logarítmicos (mayor viabilidad), pero solo a la temperatura de entrada de 135°C en la condición de almacenamiento en refrigeración (0.86 y 0.63 CL para 10 y 20% de sólidos, respectivamente) y a la

temperatura de entrada de 155°C a temperatura ambiente (1.89 y 1.23 CL para 10 y 20% de sólidos, respectivamente). En los tratamientos de temperatura de entrada a 135°C y almacenamiento a temperatura ambiente, la mejor protección fue el tratamiento con menor contenido de sólidos (10%) (1.74 CL), presentándose este comportamiento también en la temperatura de refrigeración con el tratamiento de 10% de sólidos y 155°C (0.83 ciclos logarítmicos). Hernández (2010), reportó reducciones de 1.54 y 0.52 CL a los 32 días de almacenamiento a 25°C y 5°C, respectivamente; con inulina como agente encapsulante, obteniendo mejores resultados con mezclas ternarias de inulina, goma arábiga y maltodextrina, incrementando el contenido de esta última (I-MD-GA (1:2:1)). En el caso de la inulina, los tratamientos almacenados en temperatura de refrigeración (4°C), fueron, los que menor estabilidad y viabilidad presentaron.

De manera general, los tratamientos que más susceptibilidad presentaron, fueron los de menor porcentaje de sólidos (10 y 15%) para ambas temperaturas de entrada (135 y 155°C). Los tratamientos que proporcionaron una mejor protección en ambas condiciones de estabilidad fueron los que presentaron una mayor cantidad de sólidos, destacando en el caso de ANA, el tratamiento de 20% de sólidos y 135°C de temperatura de entrada (A-20-135) (0.19 y 0.17 CL en el almacenamiento a 4 y 25°C, respectivamente) y en el caso de IN, el tratamiento de 20% de sólidos y 155°C de temperatura de entrada (I-20-155) (1.32 y 1.23 CL en almacenamiento a 4 y 25°C, respectivamente) (Figuras 17a y 17b).

De igual forma, a medida que aumenta la concentración de sólidos y disminuye el contenido de agua, se mejora la eficiencia en su evaporación, facilitando la formación de película y ofreciendo una mejor protección al ingrediente activo encapsulado, evitando de esta manera la transferencia de oxígeno y la presencia de reacciones desfavorables.

a)



b)

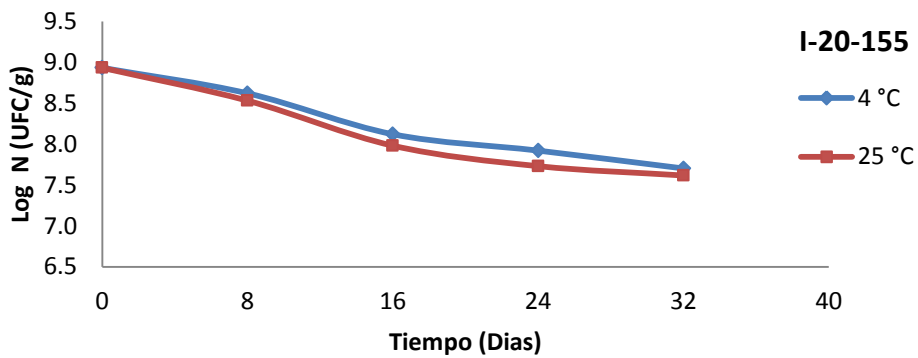


Figura 17. Viabilidad de *L. rhamnosus* encapsulado en almidón nativo de arroz e inulina sometido a estabilidad en condiciones de almacenamiento de 4 y 25 °C.

ANA = Almidón nativo de arroz.

IN = Inulina de achicoria.

A-20-135 = Tratamiento con almidón, 20 % (p/p) de sólidos y temperatura de entrada 135 °C.

I-20-155 = Tratamiento con inulina, 20 % (p/p) de sólidos y temperatura de entrada 155 °C.

7.7. Evaluación del agente encapsulante como prebiótico

Como mencionan diversos autores, el objetivo principal de la encapsulación es el asegurar la estabilidad del encapsulado a través del tiempo tanto en las cápsulas como en el producto donde se vaya a incorporar para que de esta forma, el microorganismo llegue de forma adecuada a su sitio de acción, en este caso el tracto-gastrointestinal (Kailassapathy, 2002; Ananta y col., 2004; Anuradha, 2005; Guevara, 2009). Por lo que el encapsular con sustancias prebióticas, a los microorganismos probióticos es lograr este objetivo proporcionándoles un substrato adecuado para que lleguen en una cantidad adecuada a su sitio de acción. Para la realización de esta determinación, se eligieron los tratamientos que presentaron mejor supervivencia (viabilidad) durante el análisis de estabilidad (A-20-135 e I-20-155).

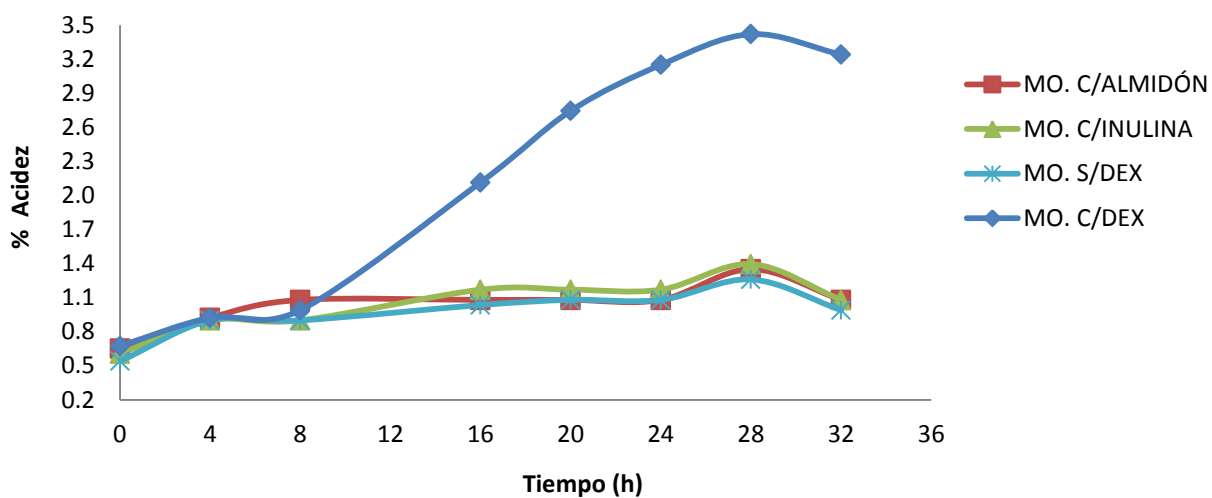
En las Figura 18a se puede apreciar los resultados correspondientes a la acidez total titulable (expresado como ácido láctico) y al pH que se monitorearon en medio de cultivo líquido MRS elaborado sin dextrosa como fuente principal de carbono, el cual contiene a *L. rhamnosus* encapsulado (A-20-135 e I-20-155) y de forma libre en medio sin dextrosa y en medio sin modificación. La Figura 18a muestra como el porcentaje de acidez, en las primeras horas de incubación, tiende a incrementar, en el medio de cultivo que contiene a *L. rhamnosus* encapsulado con ANA, alcanzando a las 8 h su máximo valor (1.1%), para posteriormente mantenerse estable. En el medio que contenía al blanco sin dextrosa y el que contenía a *L. rhamnosus* encapsulado con inulina, el comportamiento fue muy parecido en las primeras 8 horas, tiempo a partir del cual el medio que contenía inulina se incrementó hasta alcanzar el 1.4% a las 16 horas para posteriormente mantenerse estable. El blanco con *L. rhamnosus* sin dextrosa como fuente de carbono se mantuvo estable en 1% de acidez.

Después de las primeras 8 h, el porcentaje de acidez en el medio con dextrosa mantuvo un incremento constante hasta las 28 h, tiempo en el cual empezó a descender. El incremento en el porcentaje de acidez durante las primeras 4 h, pudo

deberse a la actividad metabólica de *L. rhamnosus* tomando las fuentes más simples de carbono, como la glucosa en el almidón, en el cual se observa que se incrementa el porcentaje de acidez de manera más rápida que en los otros medios. Posteriormente, *L. rhamnosus* estaría consumiendo las fuentes de carbono alternas, como el almidón resistente que pudiese contenerse en ANA y los fructooligosacáridos como la inulina. Una posible explicación al incremento que se presenta en el porcentaje de acidez a las 28 horas y que interviene en la tendencia de disminución de este, puede ser un cambio en el patrón de fermentación. Considerando que *L. rhamnosus* es un microorganismo heterofermentativo, una vez agotada la fuente de carbono adicional (glucosa y fructosa) y en situaciones de estrés toma del medio, fuentes de carbono alternas como el citrato (Borch y Agerhem, 1992; Nychas y Arkoudelos, 1990), el cual se encuentra en una pequeña cantidad en la formulación del medio de cultivo, pudiendo deberse a esto el que se presentara un nuevo incremento para posteriormente descender en los 4 medios monitoreados.

La Figura 18b, muestra la capacidad de *L. rhamnosus* para reducir el valor de pH en los medios de cultivo, a través de la producción de ácido láctico por fermentación del carbono presente en el medio. Esta curva se relaciona de manera inversa a la que muestra el porcentaje de acidez. Como se puede apreciar, el medio que disminuyó más rápido en las primeras horas fue el que contenía a *L. rhamnosus* encapsulado en ANA, alcanzando un valor máximo de pH de 6.0 a las 20 h de fermentación, tiempo después del cual tiende a mantenerse. A partir de las 16 horas el comportamiento es similar al del blanco sin dextrosa. La inulina por otra parte disminuyó poco a poco hasta las 8 h cayendo precipitadamente después de este tiempo y hasta las 16 h, tiempo en el cual alcanzó un valor de pH máximo de 5.6. El blanco sin modificación mantuvo un descenso constante desde las 8 hasta las 16 h, tiempo después del cual siguió en descenso pero con más lentitud. Este patrón de comportamiento fue encontrado con *L.rhamnosus GG* y *L.reuteri* por diversos autores

a)



b)

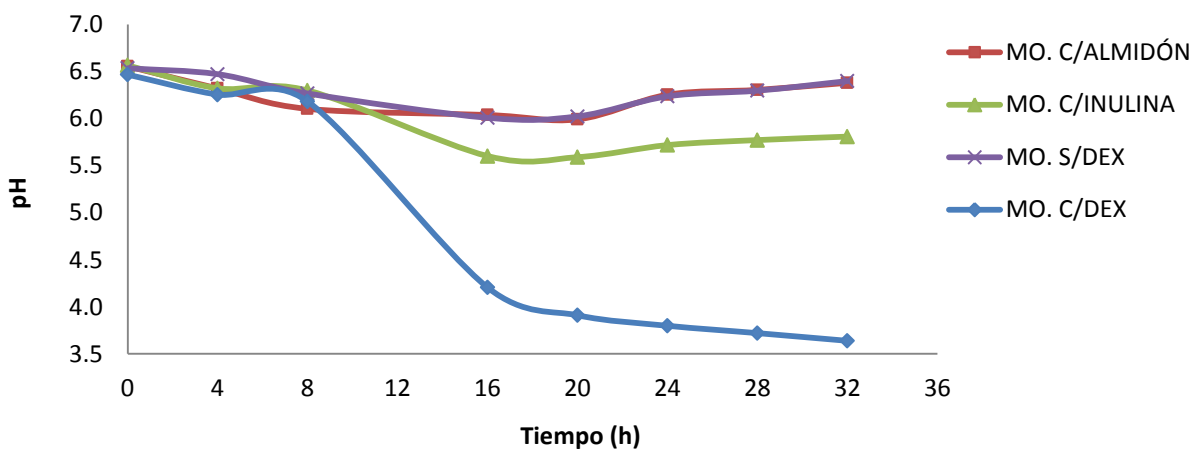


Figura 18. Comportamiento del porcentaje de acidez (como ácido láctico)(a) y pH (b) de *L. rhamnosus* en medios de cultivo sin dextrosa como la fuente principal de carbono y un control sin cambio en la composición inoculados con *L. rhamnosus*. MO.= Microorganismo; S/DEX = sin dextrosa; C/DEX = con dextrosa.

(Corcoran y col., 2004; Ampatzoglou y col., 2010), donde la fuente de carbono disminuyó rápidamente en las primeras 14 h, reduciendo el medio a valores de pH de 3.6.

Estos resultados fueron relacionados con la sobrevivencia de dichos microorganismos, donde se encontró que, conforme disminuía el valor de pH, la viabilidad aumentaba. En la Figura 19, se observan las cinéticas de crecimiento para los medios de cultivo con los diferentes inóculos. Donde el crecimiento de los microorganismos encapsulados es relativamente igual en IN que en ANA, sin embargo en las primeras 4 horas el crecimiento es más acelerado en ANA. En el medio de cultivo que contenía a *L. rhamnosus* sin dextrosa, también hubo crecimiento debido a la naturaleza heterofermentativa de microorganismo, pero lentamente. En el medio con dextrosa el comportamiento es similar al de la curva de crecimiento que se presenta en el apartado 7.2.

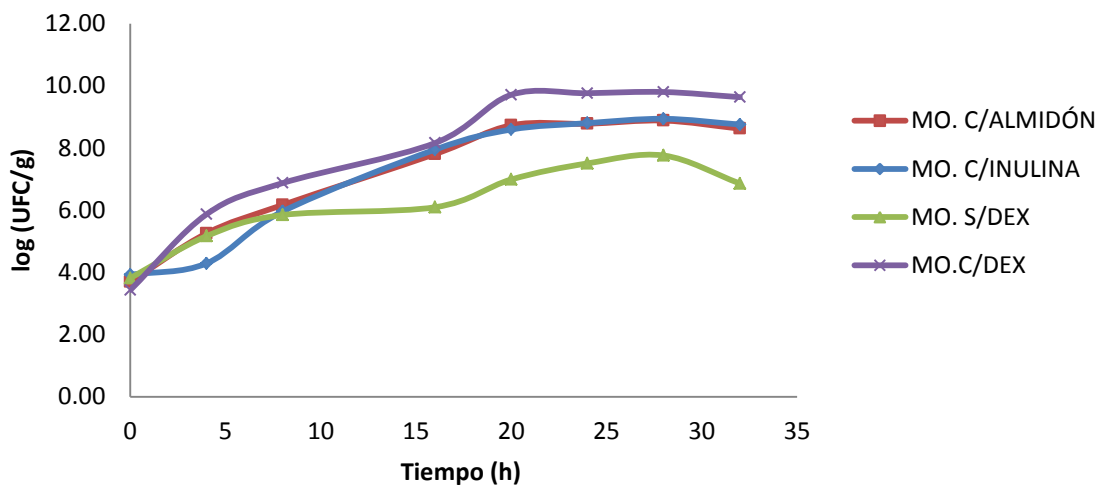


Figura 19. Cinética de crecimiento de *L. rhamnosus* utilizando el agente encapsulante (almidón e inulina) como fuente de carbono. MO.= Microorganismo; S/DEX = sin dextrosa; C/DEX = con dextrosa.

CONCLUSIONES

- Ø Mediante el diseño experimental propuesto, se determinaron las mejores condiciones para el encapsulamiento de *L. rhamnosus* B442.
- Ø Una humedad entre el 2% a 3.5% y baja aw, son necesarios para que el microorganismo encapsulado permanezca viable.
- Ø El encapsulamiento de probióticos con almidón de gránulo pequeño, como es el arroz, sugiere una doble protección para el microorganismo, al encontrarse distribuido tanto en las microcápsulas de aglomerados como en la periferia de los gránulos de almidón.
- Ø Las bajas temperaturas de salida del secador y una mayor concentración de sólidos, influyeron positivamente en la viabilidad de los microorganismos probióticos.
- Ø Se observó un efecto prebiótico en los medios de cultivo adicionados con *L. rhamnosus* B442 encapsulado con ANA e IN.

BIBLIOGRAFIA

- Adhikari, k., Mustapha, A., and Grun, I. U. 2002. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium Longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*. 68: 275-280.
- Ampatzoglou A.; Schurr, B.; Deepika, G.; Baipong, S.; Charalampopoulos, D. 2010. Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Biochemical Engineering Journal*. 52: 65-70.
- Ann E. Y., Kim, Y., Oh, S., Imm, J. Y., Park, D.J., Han, K. S. and Kim S. H. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridization system. *International Journal Food Science and Technology*. 42: 411-419.
- Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*. 18(5): 240-251.
- Ananta, E., Volkert, M., and Knorr, D. 2004. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*. 15:399-409.
- Anuradha, S. and Rajeshwari K. 2005. Probiotics in health and disease. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*. 6:67-72.
- A.O.A.C, 1995. *Official Methods of Analysis*. 10th ed. Association of Official Analytical Chemists. Inc. Washington, D.C. EUA.
- Arenas-Ocampo, M.L.*, Jiménez-Aparicio, A., Vargas-Solano, V., Alamilla-Bernal, L., Jaramillo-Flores, M.E. y Martínez-Velarde, R. 2008. Inulin as a Carrier in the Spray-Drying of Marigold (*Tagetes erecta*) carotenoids. 3rd International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Universidad Autonoma de Queretaro. Queretaro, México. Pp. 279.

- Asp, N. G. 1992. Resistant starch. Trends in Food Science y Technology. 3: 111-114.
- Balassa, L. and Brody, J. 1968. Microencapsulation. Food Engineering. November, 88-91.
- Bajpai, A.K. and Bhanu, S. 2007. Dynamics of controlled release of heparin from swellable crosslinked starch microspheres. Journal of Materials Science. 18: 1613-1621.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Moldão-Martins, M. and Beirão-da-Costa, M. L. 2010. Physical characterization of rice starch spherical aggregates produced by spraydrying. Journal of Food Engineering. 104: 36–42.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A., Pinheiro, A., Serra, A.T., Moldão-Martins, M., Nunes, M.I., Vicente, A.A., Delgadillo, I., Duarte, C. and Beirão-da-Costa, M.L.; 2011. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. Journal of Food Engineering. Article in press.
- Bello-Pérez, L. A. 1995. Amilopectina caracterización molecular y funcional. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, México.
- Bello-Pérez, L.A., Paredes-López, O., Roger, P. and Colonna, P. 1996. Molecular characterization of some amylopectins. Cereal Chemistry. 73:12-17.
- Beristain, S. C. 2006. Viabilidad de *L.acidophilus* encapsulado en matrices de alginato incorporado a helado. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla, México 67-76.
- Blazek, J. and Copeland, L. 2007. Pasting and swelling properties of wheat flour and starch in relation to amylose content. Carbohydrate polymers. 71: 380-387.

- Bhandari, B. 2008. Spray Drying and Power Properties. En: Hui, Y.H., Clary, C., Farid, M.M., Fasina, O.O, Noomhorm, A and Welti-Chanes, J. (Eds.). Food Drying Science and Technology. Microbiology, Chemistry, Applications. DEStech Publications, Inc.: Lancaster, Pennsylvania U.S.A.
- Bird, A. R., Brown, I. L. and Topping, D. L. 2000. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 1: 25–37.
- Boza, Y., Barbin, D. and Scamparini, A. R. P. 2004. Survival of *Beijerinckia* sp. microencapsulated in carbohydrates by spray-drying. *Journal of Microencapsulation*. 21:15–24.
- Brückner, M., Bade, M. and Kunz, B. 2007. Investigations into the stabilizations of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process. *European Food Research and Technology*. 226: 137-146.
- Chacón, V.A. 2006. Perspectivas Agroindustriales actuales de los oligofructanos (FOS). *Agronomía Mesoamericana* 17: 265-286.
- Champagne, C.P. and Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion Biotechnology*. 18: 184 190.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P. and Jones, M. 2004. An improve method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*. 56: 27.
- Chen, Y.C., Chen, M., Liu, J., Lin, C. and Chiu, H. 2005. Optimization of incorporated prebiotics as coating material for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science* 70(5): M260-M266. En Chacón, V.A. 2006. Perspectivas Agroindustriales actuales de los oligofructanos (FOS). *Agronomía Mesoamericana* 17: 265-286.
- Collins, M. D., Phillips, B. A. and Zannoni, P. 1989. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. subsp. *paracasei*

and subspecies *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. International Journal System Bacteriology. 39: 105-108.

Corcoran, B.M., Ross, R.P. Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. Journal of Applied Microbiology. 96:1024-1039.

Cruz-Pacheco, K. 2010. Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. Tesis de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos. UPIBI-IPN, México, D.F.

Dave, R.I. and Shah, N.P. 1998. Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts. Journal Food Australia. 49: 164-168.

De las Cagigas, A.L. and Blanco, J. 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Revista Cubana de Alimentos y Nutrición. 16: 63-68.

De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology. 23, 130–135.

Desai, K.G.H. and Park, H.J. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Drying Technology. 23: 1361–1394.

De Vaux, A., Morrison, M. and Hutkins, R.W. 2002. Displacement of *Escherichia coli* O157:H7 from Rumen Medium containing prebiotic sugars. Applied and Environmental Microbiology. 68: 519-524.

Ding, W.K. and Shah, N.P. 2007. Acid, Bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. Journal of food science. 72: M446 – M450.

- Ding W.K. and Shah N.P. 2009. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Journal of Food Science*. 74, 02:M53 – M61.
- Ding W.K. and Shah N.P. 2009. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*. 74, 02:M100 – M107.
- Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. and Brodkorb, A. 2011. Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*. 25: 1604-1617.
- Dziezak, J.D. 1988. Microencapsulation and encapsulation ingredients. *Food Technology*. 42, 136–151.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. <<http://www.fao.org/es/ESN/Probio/Probio.htm>>.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.
- Ferrer, L.B and Dalmau, S.J. 2001. Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediátrica Española*. 59(3): 49-54.
- Fooks, L.J., Fuller, R. and Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*. 9: 53-61.
- Forrest, J.C. 1979. Fundamentos de la ciencia de la carne. Editorial Acribia. En: Minor-Pérez, H. 1999. Cambios en parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la carne de cerdo sometida a fermentación láctica como método de conservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N. and Dumoulin, E. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*. 75: 27-35.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378. En Anal, A.K and Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and target delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18: 240-251.
- Gardiner, G.E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P. and Stanton C. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray dryig. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2605-2612.
- Geankoplis, 2006. "Procesos de transporte y principios de procesos de separación". CECSA: México.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40:1107-1121.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Ali, I. and Mulligan, C.H. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal Food Science Nutrition*. 50: 213-224.
- Gibson G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125: 1401-1412.
- Gorbach, S.L., Chang, T.W. and Goldin, B.R. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *The Lancet*. 330: 1519.

- Guarner, F. and Malagelada, J.R., 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 360: 512–519.
- Guarner, F. and Schaafsma, G. 1998. Probiotics. *International Journal Food Microbiology*. 39: 237-238.
- Guevara, N.B. 2009. Optimización de las condiciones de secado por atomización para encapsular *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus casei* y mejorar su viabilidad. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla, México.
- Guigoz Y. Lauque S. and Vellas B.J. 2002 The Mini Nutritional Assessment. Identifying the elderly at risk of malnutrition. *Clinical Geriatric Medicine*. 18(4):737-57.
- Hernández, M.R. 2010. Evaluación de mezclas de inulina, maltodextrina y goma arábiga para la microencapsulación de *L. casei*. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas Puebla.
- Heldman, D. R. 1975. Food Process Engineering, *The Avi Publishing Company Incorporated, Westport, Connecticut*.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S. and Razavi, S.H. 2007. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Journal Food Chemistry*. 111: 50-55.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis int't Veld, J.H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal Food Microbiology*. 41: 85-101.
- Imagi J., Yamanouchi, T., Okada, K., Tanimoto, M. and Matsuno, R. 1992. Properties of agents that effectively entrap liquid lipids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 56: 477–480.

- Jane, J., Wang, Y., White, P. and Pollak, L. 1992. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm 83 mutant genotypes with Oh43 inbred line background. *Cereal Chemistry*. 70: 171-179.
- Jiménez, M.T. 2007. Agglomération de particules par voie humide en lit fluidisé. Tesis Doctoral. École Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires. Francia.
- Jouppila, K. and Ross, Y.H. 1994. Glass transitions and crystallization in milk powders. *Journal of Dairy Science*. 77: 2907-2915.
- Juliano, O. B., Pérez, C. M., Blakeney, A. B., Castillo, T., Kongseeree, N., Laignelet, B., Lapis, E. T., Murty, V. V., Paule, C. M. and Webb, B. D. 1981. International cooperative testing on the amylose content of milled rice. *Stärke/Stärke*, 33:157-162.
- Kailassapathy, K. and Chin, J. 2000. Review Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology & Cell Biology*. 78: 80-8.
- Kailassapathy, K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues Intestinal Microbiology*. 3: 39-48.
- Kailassapathy K. and Sultana, K. 2003. Survival and b-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. *Australian Journal of Dairy Technology*. 58: 223–227.
- Kailasapathy, K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*. 39: 1221-1227.

- Kaur N. and Gupta A.K. 2002. Applications of Inulin and Oligofructose in Health and nutrition. *Journal Bioscience*. 27: 703-714.
- Kanakdande, D., Bhosale, R. and Shingal R.S. 2007. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrina and modified starch. *Carbohydrate Polymers*. 67: 536-541.
- King, A.H. 1995. Encapsulation of Food Ingredients: A review of available technology, focussing on hydrocolloids, " En: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, ACS Symposium Series 590, Ed. By Sara J. Risch and Gary A. Reineccius. American Chemical Society, Washington DC. Pp. 26-39.
- Kopp-Hoolihan, L. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *Journal of the American Dietetic Association*. 101: 229-241.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2002. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt: a review. *International Dairy Journal*, 13: 3-13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14: 737–743.
- Lakkis, J.M. 2007. Encapsulation and controlled release technologies in food systems. Blackwell Publisshing, Iowa, USA
- Lian, W. C., Hsiao, H. C. and Chou, C. C. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal Food Microbiology*. 74: 79-86.
- Lineback, D. R. and Rasper, V.F. 1988. Wheat Carbohydrates, In: *Wheat, Chemistry and Technology*, Pomeranz Y. (Ed.), St. Paul Minnesota. pp. 227-372.

- Liu, Q. 2005. Understanding starches and their role in foods. En: Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications, Cui, S., W. (Ed) Taylor & Francis, Inc. Chapter 7, pp. 314-323.
- Loksuwan, J. 2007. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. Food hydrocolloids. 21: 928-935.
- Lozano-Berna, M. 2009. Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización. Tesis de Licenciatura que para obtener el Título de Ingeniero Técnico Industrial con especialidad en Química Industrial. Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. and Desobry, S. 2006. Flavor encapsulation and controlled release, an review. International Journal of Food Science and Technology. 41: 1-21.
- Majamaa, H. and Isolauri, E. 1997. Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. Journal of Allergy Clinical Immunology. 99: 179-185.
- Mani, E. 2005. Viabilidad y propiedades fisicoquímicas de productos lácteos fermentados probióticos. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla, México.
- Manning, S.T., Rastall, R. and Gibson, G. 2004. Prebiotics and Lactic Acid Bacteria. En: Salminen, S; Wright, A. y Ouwehand, A. (Eds). 2004. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, E.E.U.U.
- Manrique – Quevedo, N., González-Soto, R.A., Abu-Hardan, M.O., García-Suárez, F.J. y Bello-Pérez, L.A. 2007. Caracterización de mezclas de almidones de

mango y plátano pregelatinizados mediante diferentes condiciones de extrusión. *Agrociencia*. 41: 627-635.

Martínez- Estrada, M.T. y Moctezuma-González. 2006. Espectrofluorimetría. *Métodos Físico-Químicos en Biotecnología*.

Martín-Villena, M.J., Morales-Hernández, M.E., Gallardo-Lara, V. and Ruiz-Martínez, M.A. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*. 50: 43-50.

Masaharu, S., Hayashi, M., Suzuki, Y., Sano Y. and Hiro-Yuki, H. 2003. Role of amylose in the Maintenance of the Configuration of Rice Starch Granules. *Starch/Stärke*, 55:524-528.

McCartney, A.L., Wenzhi, W. Tannock. 1996. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Applied Environment. Microbiological*. 62 : 4600-4613

Medina, J. A. y Salas, J. C. 2008. Caracterización morfológica del gránulo de almidón nativo: Apariencia, forma, tamaño y su distribución. *Revista de ingeniería*, 27:56-62.

McAllister, 1979. Nutritive sweeteners made from starch. In: S. Tipson and D. Horton, Editors, *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* vol. 36, Academic Press, New York (1979), p. 15.

Minemoto, Y., Adachi, S. and Matsuno, R. (1997). Comparison of oxidation of menthyl linoleate encapsulated with gum arabic by hot-air-drying and freeze-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 4530–4534.

- Minemoto, Y., Adachi, S. and Matsuno, R. 1999. Autoxidation of linoleic acid encapsulated with polysaccharides of differing weight ratio. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63: 866–869
- Morales-Martinez, L. 2011. Morfometría de los granos de arroz (*Oryza sativa* L.) y caracterización fisicoquímica, estructural y reológica de las harinas integrales de las variedades MorelosA-92 y Koshihikari y de seis líneas provenientes de estas. Tesis de Maestría en ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. CeProBi-IPN, Yautepec, Morelos.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani M. R. and Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5:1-18.
- Moshfegh, A.J., Friday J.E., Goldman, J.P. and Chug Ahuga, J.K. 1999. Presence of inulin and oligofructose in the diets of americans. *Journal of Nutrition*. 129: 1407S-1411S.
- Nag, A. 2011. Development of a microencapsulation technique for probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 431 using a protein-polysaccharide complex. Thesis of Masters of Technology in Food Technology, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Núñez-Santiago, M.C., Bello-Pérez, L.A. and Tecante, A. 2004. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behavior of banana (*Musa paradisiaca*) starch. *Carbohydrate Polymers*. 56: 65-7.
- Nychas, G.J. and Arkoudelos, J.S. 1990. Microbiological and physicochemical changes in extracts from different turkey muscles during the growth of *S. aureus*. *Food Microbiology*. 8: 105-117.
- O’Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K. and Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to

- prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 1059-1066.
- Ouwehand, A. C. and Salminen, S. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd edn. Edited by S. Salminen & A. von Wright. New York: Marcel Dekker. pp. 139–160.
- Palma-Rodríguez, H.M., Agama-Acevedo, E., Méndez-Montevalvo, G., Gonzalez-Soto, R.A., Vernon-Carter, E.J. and Bello-Pérez, L.A. 2011. Effect of acid treatment on the physicochemical and structural characteristics of starches from different botanical sources. *Starch/ Stärke*. In press.
- Patindol, J.A., González, B.C., Wang, Y.J., McClungb, A.M. 2007. Starch fine structure and physicochemical properties of specialty rice for canning. *Journal Cereal Science*. 45: 209-218.
- Pedroza-Islas, R., 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Pisecky, J. 2005. Spray drying in the cheese industry. *International Dairy Journal*. 15: 531-536.
- Popplewell, L.M., Black, J.M., Norris, L.M. and Porzio, M. 1995. Encapsulation system for flavors and colors. *Food Technology*. 49: 76-82.

- Prajapati, J.B., Shah, R.K. and Dave, J.M. 1987. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in blended-spray dried acidophilus preparations. *Australian Journal Dairy Technology*. 42: 17-21.
- Pszczola, D.E. 1998. Encapsulated ingredients: providing the right fit. *Food Technology* 52: 70-77.
- Pulido, A. y Berinstain, C.I. 2010. Encapsulación de ácido ascórbico mediante secado por aspersion, utilizando quitosano como material de pared. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 9: 189-195.
- Ré, M.I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology* 16: 1195-1236.
- Reineccius, G. 1991. Off-flavors in foods. *Critical Review Food Science Nutritional* 29: 38-402.
- Reyes-Nava, L.A. 2010. Optimización y caracterización de la microencapsulación de la proteasa hemisfericina refinada. Tesis de Maestría en Ciencias en Bioprocesos. UPIBI-IPN, México, D.F.
- Roberfroid M.B. and Lavin J. 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Critical Review Food Science Nutrition*. 40: 461 – 80.
- Roberfroid, M.B. 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*. 137: 2493–2502.
- Rodríguez, V. 2009. Encapsulación de vitamina C y vitamina A mediante secado por atomización. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla, México.
- Rodríguez-Huezo, M.E., Durán-Lugo, R., Prado-Barragán, L., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J. and Vernon-Carter, E.J. 2007. Pre-selection of

protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International* 40: 1299-1306.

Rodríguez-Marín, M.L. 2009. Efecto de tres agentes entrecruzantes sobre las propiedades fisicoquímicas y características morfológicas del almidón de plátano. Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. CeProBi-IPN, Yautepec, Mor.

Rosenberg, M.I., Kopelman, J. y Talmon, Y.1985. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science* 50, 139-144.

Sáenz, C., Tapia, S., Chávez, J. and Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. 114: 616-622.

Salager, J. L. 2009. Nanoencapsulación en el Sector Higiene-Salud. *Journées de Formulation*. 13: 1-2.

Salinas, A. 2005. Elaboración de queso tipo crema para la incorporación del probiótico *Lactobacillus acidophilus*. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas Puebla. México.

Samaniego, L.M., Sosa, M. 2000. *Lactobacillus spp.*: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Reseña. Centro de Estudios Biotecnológicos. Universidad de Matanzas, Cuba.

Santacruz, Y.A. 2004. Impregnación de *Lactobacillus* en productos de manzana. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla, México.

- Santos, A.B.; Fávaro-Trindade, C.S. y Grosso, C.R. 2005. Preparo e atomização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas. 25: 322-326.
- Sha, N.P. 2001. Functional food from probiotics and prebiotics. *Food Technology*. 55: 46 – 53.
- Shahidi, F. and Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33: 501-547.
- Shanahan, F. 2002. Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fantasy to facts and future. *British Journal of Nutrition*. 88: S5 – S9.
- Simmering, R. and Blaut, M. 2001. Pro- and prebiotics – the tasty guardian angels?. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55:19-28.
- Sosa, M.E. 2008. *Manual de Laboratorio de Ingeniería de Alimentos I*. Universidad de las Américas Puebla, México.
- Sperti, G.S. 1971. *Probiotics*. Avi Publishing company, Westport, Connecticut, U.S.A. pp 1-120.
- Stanton, C., Desmond, C., Coakley, M., Collins, J. K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P. 2003. Challenges facing development of probiotic-containing functional 84 foods. In “Handbook of fermented functional foods”. ed. E.R. Farnworth. CRC Press. Boca Raton. Flo. E.U.A. p. 27.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. 2003. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 47-55.

- Tamime, A. 2005. Probiotic dairy products. Blackwell Publishing. Iowa, E.U.A.
- Tester, R. F. ; Karkalas, J. 2002. Starch. En: Steinbûchel, A. (Series Ed.) Vandamme, E. J., De Baets, S., Steinbûchel, A. (vol. Eds.), Biopolymers, vol. 6 Polysaccharides. II. Polysaccharides from Eukaryotes, Wiley-VCH, Weinheim. pp 381-438.
- Tester, R., Karkalas, F. and Qi, X. 2004. Starch-Composition, fine structure and architecture. Journal of Cereal Science. 39:151-165.
- Thies, C., 1996. A survey of Microencapsulation processes. En: Microencapsulation. (ed. por S. Benita), pp.1-20. Marcel Dekker, Inc. N.Y., EUA.
- Thurn, A. and Burchard, W. 1985. Heterogeneity in branching of amylopectin. Carbohydrate Polymers. 5: 441.
- Utrilla- Coello, R. 2007. Caracterización fisicoquímica, morfológica y bioquímica de los gránulos de almidón de maíz azul. Tesis de Maestría. CeProBi-IPN. México.
- Vernazza, C.L., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. 2005. In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human faecal bacteria. Carbohydrate Polymers. 60: 539-545.
- Villena, M., Morales-Hernández, M.E., Gallardo, V. y Ruíz-Martínez, M.A. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. Ars Pharmaceutica. 50: 43-50.
- Wang, Y.J. and Wang, F. 2000. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato and rice starches. Starch/Stärke. 52, 296-304.

Waterhouse, D.F., 1993. The Major Arthropod Pests and Weeds of Agriculture En Southeast Asia: Distribution, Importance and Origin. Australian Centre for International Research, Canberra, Australia, pp: 141.

Whistler, R.L., Daniel, J.R. 1984. Molecular structure of starch. En Whistler,R.L., Bemiller, J.N., Paschall, E.F., eds, Starch: Chemistry and Technology, Ed 2. Academic Press, New York, pp 153–182.

Wildman, R., 2007. Handbook of nutraceuticals and functional foods. Ed 2. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, EEUU.

Wilson N. and Shah, N.P. 2007. Microencapsulation of Vitamins: A review paper. ASEAN Food Journal. 14: 1-14

World Gastroenterology Organisation. 2008. Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Diarrea aguda.

Wurzburg, O.B. and Szymanski, C.D. 1970. Modified starches for the food industry. Journal Agriculture Food Chemistry. 18: 997-1001.

www.scienceinschool.org

Yáñez, J., Salazar, J.A., Chaires, L., Jiménez, J., Márquez, M. y Ramos, E.G. 2002. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. Avance y Perspectiva. 21: 313- 319.

Yoshii, H., Furuta, T. and Kawasaki, K. 1997. Oxidative stability of powder tridocosahexanoin included in cyclodextrin and its application to fish meal paste. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 61: 1376–1378.

Zhao, J. and Whistler, R.L. 1994. Spherical aggregates of starch granules as flavor carriers. Food Technology. 48: 104-105.

Zobel, H. F.1988. Molecules to granule: a comprehensive starch review.
Starch/Stärke. 40:44-50.