



**Universidad Autónoma Metropolitana**

*Unidad Iztapalapa*

---

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO

**“VIABILIDAD DE *Bifidobacterium bifidum* BB02 MICROENCAPSULADO EN  
MATRICES BIOPOLIMÉRICAS POR SECADO POR ASPERSIÓN EN  
PRESENCIA DE AGUAMIEL COMO PREBIÓTICO TERMO-PROTECTOR”**

ING EN ALIMENTOS: REYNA DURAN LUGO

ASESORA: DRA. MARÍA EVA RODRÍGUEZ HUEZO

LABORATORIO DE BIOPROCESOS

## INDICE

<b>1. ANTECEDENTES</b>	6
1.1 Probióticos	6
<b>2. INTRODUCCION</b>	7
2.1 Prebióticos	8
2.2 <i>Biopolímeros</i>	9
2.2.1 Goma Arabiga	10
2.2.2 Suero de leche	11
2.2.3 Goma de Mezquite	12
2.2.4 Maltodextrina	12
2.3 Análisis térmico	13
<b>3.JUSTIFICACION</b>	16
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	17
4.1 Objetivos específicos	17
<b>5. HIPÒTESIS.</b>	17
<b>6. MATERIALES</b>	18
<b>7. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS</b>	18
<b>8. MÉTODOS</b>	21
8.1 Preparación de los biopolímeros y mezclas para determinar el coeficiente de difusión efectivo de secado isotérmico	21
8.2 Densidad de los biopolímeros y mezclas	21
8.3 Secado isotérmico de los biopolímeros y mezclas	22
8.4 Difusividad efectiva	22

8.5 Energía de activación	23
8.6 Activación de la cepa	24
8.7 Estimación de la cinética de crecimiento	24
8.8 Cuenta total en Agar MRS	24
8.9 Evaluación del cultivo para identificación y pureza	24
8.10 Preparación de las dispersiones de <i>B. bifidum</i> secadas por aspersión	25
8.11 Secado por aspersión de las distintas formulaciones	25
8.12 Viabilidad de <i>B.bifidum</i> en los polvos durante el almacenamiento	25
8.13 Análisis estadístico	25
8.14 Análisis de la microestructura de los microencapsulados (MEB)	25
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>27</b>
9.1 Densidad	27
9.2 Secado isotérmico de los biopolímeros y mezclas	27
9.3 Energía de activación	27
9.4 Cinética de crecimiento de <i>B.bifidum</i>	28
9.5 Viabilidad de <i>B.Bifidum</i> en los microencapsulados durante el almacenamiento	29
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer...

A dios por darme el regalo maravilloso de la vida.

A mis padres Juan y Guadalupe, por su constante e incondicional apoyo, por su paciencia y amor.

Al Dr. Jaime Vernon Carter y la Dra. Lilia Arely Prado Barragán que colaboraron en los estudios para la realización de ésta tesis. .

De manera especial, agradezco a la Dra. Eva Rodríguez Huevo por su amistad, su buena disposición, su aporte a mis conocimientos y, por supuesto, por cultivar mi paciencia.

Al Consejo Nacional de ciencia y Tecnología de México (CONACyT) por el financiamiento parcial, para la realización de este estudio, a través del acuerdo U45992-Z.

A mis amigos: Claudia, Gabriel, César, Ismael, Alberto, Elba, Itzel, Milly, Gaby, Liliana que me apoyaron y me acompañaron haciendo esta vida más hermosa.

A todos mis compañeros de laboratorio de bioprocesos (T-166), por su apoyo durante la realización de la parte experimental de este proyecto.

A mis lectores por su tiempo dedicado a la crítica. Constructiva al presente trabajo.

## **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue demostrar que la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum*, secada por aspersión y durante el almacenamiento puede ser sustancialmente incrementada por la preselección de coloides protectores que ofrecen resistencia a la difusión de oxígeno (energía de activación alta) y la adición de aguamiel como un prebiótico termo-protector.

Tres diferentes mezclas de coloides protectores que presentaron relativamente alta, media, y bajas energía de activación fueron mezcladas con *B. bifidum*. cosechada en la fase estacionaria, con o sin aguamiel, secada por aspersión a 130 140 y 155°C y almacenada a 4°C a una actividad de agua de 0.32.

La viabilidad fue determinada por cuenta total de células en agar MRS. La mejor viabilidad fue lograda cuando los microorganismos fueron microencapsulados en la mezcla de coloides protectores que presentó la mayor energía de activación ( 40.7 kJ/mol<sup>-1</sup>), con aguamiel y secada a 140°C .

El rango de viabilidad fue de 1.1\*10<sup>8</sup> ufc g<sup>-1</sup> inmediatamente después del secado a 2.8 \*10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> después de 5 semanas de almacenamiento y el tiempo de vida media fue de 16.7 semanas.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Probióticos**

La utilidad de los probióticos se remonta a miles de años. A lo largo de la historia, la comida se ha usado como medicamento y nutrición, pero no fue hasta 1908 cuando el científico ruso Ilya Metchnikoff enfatizó los beneficios que proporcionaba el consumo de yogur a los pobladores de los Balcanes.

En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término de Probiótico, para nombrar a los productos de la fermentación láctica (Lilly 1965). Esta palabra que significa pro-vida, son microorganismos vivos, que después de su ingestión, ejercen beneficios sobre la salud, más allá de la nutrición básica natural. Estos microorganismos, son bacterias ácido lácticas, llamadas así, por producir ácido láctico y la mayoría se incluyen en los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterias*. Esta definición fue modificada y se redefinió el término de Probióticos como microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal.

En la actualidad la definición de probióticos ha sido dada por Fuller (1989) como "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino".

Los próbioticos son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo, también son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos, se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales.

Para que un microorganismo pueda cumplir con esta función de protección tiene que poseer características tales como: Ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda estar vivo en el intestino.

El efecto protector de los probióticos se lleva a cabo mediante dos mecanismos: El antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que impiden su acción patogénica. Este antagonismo esta dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión.

Mediante la inmunomodulación los probióticos protegen al huésped de las infecciones induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos.

Las bacterias ácido lácticas pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal; además, por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedero (Pardio, 1994).

Ha sido probado *in vitro* o *in vivo* el efecto de los probióticos en estados patológicos como diarreas, vaginitis, infecciones del tracto urinario, desordenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia y alergia alimentaria.

## **2. INTRODUCCION**

En la actualidad el ser humano tiene la necesidad de desarrollar nuevos alimentos para mejorar su calidad de vida, sobre todo porque factores; como el stress, cambios de patrones dietéticos, hábitos alimenticios y consumo de fármacos en particular antibióticos, afectan negativamente la salud.

Algunos de estos efectos negativos pueden originar un desbalance en la población bacteriana intestinal. Ejemplo de estos efectos son ciertos desordenes gastrointestinales tales como: indigestión, gastritis, alergias, intolerancia a la lactosa, enfermedades crónicas como colitis, cáncer, entre otras (Mattila 2006, Zuñiga 2005).

De aquí surge el concepto de alimento funcional descrito como aquel alimento que puede proporcionar beneficios a la salud además de nutrición básica. Los alimentos con probióticos son considerados funcionales ya que estos contienen microorganismos específicos en número suficiente para alterar o modificar la flora intestinal y pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud.

Entre estos microorganismos están las *Saccharomyces*, *Lactobacillus* y las *Bifidobacterias*. (Sherezenmeir y col., 2001; Rutherford – Hendriks, 2003). Generalmente son considerados que estos llevan a cabo un mejoramiento en el balance microbioal (Fuller, 1989; Rutherford – Hendriks, 2004). Sin embargo, cada vez es más claro el beneficio que estos tienen en la salud vía inmunidad.

El tracto gastrointestinal cumple varias funciones, una de estas es que el intestino es hospedero de una compleja mezcla de microbios, estos son parte de nuestra microflora, los cuales juegan un papel importante en la salud. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son una fuerte asociación que mantienen el balance microbioal de los intestinos (Rutherford – Hendriks, 2003). El papel más importante de la microflora es actuar en resistencia en contra de la colonización de agentes exógenos, patógenos potenciales. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son bacterias Gram positivo productoras de ácido láctico, acético y constituyentes de una gran parte de la microflora intestinal.

El probiótico debe ser capaz de resistir los ácidos gástricos y las sales biliares, así como el proceso de digestión del estomago, además de establecerse y colonizar los intestinos; es entonces cuando el probiótico establece la habilidad de inhibir el crecimiento de los patógenos. Los probióticos son capaces de prevenir

enfermedades causadas por patógenos como *E. coli* y *Salmonella*; Esto puede ocurrir de dos formas: a) Incrementando la resistencia a enfermedades infecciosas por un antagonismo directo o por estimulación de la inmunidad.

Los probióticos son propuestos para establecer la salud de la microflora de los intestinos y prevenir el establecimiento de bacterias patógenas, para re-establecer la microflora benéfica agotada por antibióticos y prevenir la reinfección por patógenos.

En el caso de ***Bifidobacterium*** fue descubierto en 1899 - 1900 por el doctor Tissier, del Instituto Pasteur de Francia. Son los microorganismos dominantes en la materia fecal de bebés alimentados con leche materna. Esta bacteria se considero como una especie de *Lactobacillus* por producir ácido acético y ácido láctico a partir del metabolismo de los azúcares (Weiss y Rettger, 1934 y 1938). A medida que se fue profundizando en la investigación, se descubrieron varias propiedades de este microbio, probándose que era incapaz de reproducirse en presencia de oxígeno. Por esta razón se clasificó en un género anaeróbico obligado el cual comprende once especies (Dehnert, 1957; Reuter, 1963; Mitsuoka, 1969; Scardovi y Col., 1969; Buchanan y Gibbons, 1974). Dentro de estas se encuentra a ***Bifidobacterium bifidum*** un bacilo gram positivo, heterofermentativo, su tamaño es de 0.5 micras de ancho y 2.5 micras de largo, anaerobio. Su temperatura óptima de crecimiento ocurre a los 37 ° C y su pH óptimo es de 6 – 7.

## 2.1 Prebióticos

Por medio de diferentes modelos experimentales, se ha demostrado que los prebióticos, definidos como ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un limitado grupo de bacterias de la flora intestinal favoreciendo diversas funciones del organismo mejorando así la salud del huésped. Dentro de los prebióticos se pueden mencionar a los Fructooligosacáridos (FOS), inulina, Galactosacáridos, lactulosa y lactilol.

Esta selectividad fue demostrada para *Bifidobacteria*, la cual puede ser promovida por la ingestión de sustancias tales como fructooligosacáridos e inulina. (Gibson y Roberfroid,1995) y los probióticos pueden tener una acción sinérgica contra ciertas afecciones cuando se encuentran juntos. A esta unión se le ha denominado simbiosis, porque la palabra alude al sinergismo, este término debería reservarse para productos en los cuales los componentes prebióticos selectivamente favorecen a los componentes probioticos (García-Garibay, 2003). Los alimentos simbióticos son aquellos que contienen probióticos y compuestos prebióticos. El aguamiel es un fluido obtenido del *Agave atrovirens* Karb que normalmente se fermenta para la obtención del pulque, cuya composición es; sacarosa 68 g/l, fructosa 9.2 g/l. glucosa 4.6 g/l y FOS( incluyendo inulina) 15 g/l ( Loyola, 1956). El aguamiel, gracias a su contenido de FOS puede ser considerado como una



alternativa para incorporarse en formulaciones actuando como prebiótico termoprotector.

Hoy en día los probióticos son principalmente ingeridos en capsulas o en productos lácteos fermentados sin embargo, el análisis de leches fermentadas en varios países ha confirmado que las cepas probióticas exhiben una baja sobrevivencia (Shah 2000).

El desarrollo de nuevos productos con probioticos, no es tarea fácil, hay que considerar las características fisicoquímicas del alimento al que se piensan introducir, así como las condiciones de procesamiento a las que éste es sometido; todo esto, para no contrarrestar la actividad probiótica de las bacterias utilizadas.

Una de las características más importantes de un probiótico es que éste sea viable cuando se ingiere y que permanezca así dentro del tracto gastrointestinal. En el caso de las *Bifidobacterias*; por ejemplo, éstas son susceptibles al oxígeno y al calor; por lo que, su aplicación como probiótico en alimentos con tratamientos térmicos elevados se ve limitada con respecto a la de los *Lactobacillus*, que son más resistentes a esta condición. Aunque el microorganismo soporte las condiciones de procesamiento del alimento, su viabilidad se ve afectada desde que el alimento se encuentra en almacenamiento. Además, las bacterias vivas, una vez en el organismo, deben superar el ambiente altamente ácido del estómago y sobrevivir al paso a través del intestino delgado, hasta alcanzar el colon (Banwart, 1979).

Algunos estudios sobre la viabilidad de los probioticos en productos lácteos fermentados recomiendan que en un principio el alimento debe tener  $10^8$  a  $10^{10}$  (ufc) por 100g de producto para que al ser este ingerido, queden por lo menos cantidades de  $10^6$  a  $10^7$  ufc/100g vivas en el intestino (Zuñiga, 2004).

En yogurt, hay estándares de niveles de cultivos activos. Sin embargo no hay estándares para niveles de bacterias probioticas viables en otros productos alimenticios. “un posible nivel a lograr es de  $5 \cdot 10^6$  de bacterias activas por porción de alimento”.(Gerdes, 2005)

Además su aplicación en productos no lácteos representa un gran reto ya que la viabilidad de los probióticos en la matriz del alimento depende de factores tales como: pH, temperatura de almacenamiento, presencia de organismos competitivos y la presencia de sustancias inhibidoras.

## 2.2 Biopolímeros

Las proteínas y polisacáridos son dos de los tipos más importantes de biopolímeros, conocidos por sus propiedades emulsionantes y microencapsulantes. Las proteínas son polímeros de aminoácidos y los polisacáridos son polímeros de monosacáridos.

Los biopolímeros tienen la capacidad de modificar apariencia, textura y el sabor de emulsiones alimentarias debido a sus características funcionales (capacidad para: estabilizar espumas y emulsiones, formar geles y aumentar la viscosidad en soluciones) (Tolstoguzov, 2003; McClements, 1999).

Las propiedades funcionales de los biopolímeros son determinadas por sus características moleculares, tales como peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad e interacciones. Las características moleculares son determinadas por el tipo, número y secuencia de monómeros que forman la cadena polimérica. Los monómeros varían de acuerdo a su polaridad (iónica, bipolar, no-polar, anfifílica), dimensiones, interacciones, y grupos funcionales (McClements, 1999; Samant y col., 1993).

Las proteínas y los polisacáridos tienen enlaces covalentes sencillos entre los monómeros, por lo que los biopolímeros pueden rotar. Debido a esto y al hecho de que contienen una gran cantidad de monómeros (entre 20 y 20,000) los cuales pueden formar diversas configuraciones en solución.

En la práctica, los biopolímeros tienden a adoptar una conformación que minimiza su energía libre (disminuye el número de interacciones desfavorables) bajo condiciones ambientales prevaletentes, maximizando el número de interacciones intermoleculares e intramoleculares e incrementando su entropía. Las configuraciones que los biopolímeros de forma aislada tienden a adoptar en soluciones acuosas pueden dividirse en tres categorías: globulares, en forma de barra y en forma de espirales. Los biopolímeros globulares presentan estructuras compactas rígidas; los de forma de barra tienen estructuras extendidas y rígidas; y los de forma de espiral presentan estructuras altamente dinámicas y flexibles; aunque estas conformaciones pueden ser alteradas si se modifica el pH, la fuerza iónica, la composición del solvente o la temperatura de las soluciones (BeMiller y Whistler, 1996; Lehninger y col., 1993).

Un biopolímero en solución puede existir como una molécula aislada o puede estar asociado con otros tipos de moléculas. La conformación molecular y la asociación de biopolímeros está gobernada por un balance de energías de interacción y efectos entrópicos (Dickinson y McClements, 1995).

Los biopolímeros de de interés en este estudio son:

2.2.1 Goma arábica: se obtiene de diversas especies de *Acacia* spp. Principalmente *A. senegal*, por incisión de la corteza, en forma de gotas de 2 a 7 cm. de diámetro que se desecan al aire.

Esta goma es una mezcla de diversos polisacáridos muy relacionados, con pesos moleculares comprendidos en el intervalo de 260,000 -1,160,000 daltones. Sus monómeros son L-arabinosa, L-ramnosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico.

La goma arábica está formada por una cadena principal de restos  $\beta$ -D-galactopiranosilo, unidos entre sí por enlaces (1-3), y que, en parte, presenta ramificaciones en posición 6 (Figura 2).

La goma arábica es extremadamente soluble en agua, de tal modo que pueden prepararse disoluciones de una concentración de hasta el 50% con una viscosidad de 4,163 cps (Belitz y col., 1997).

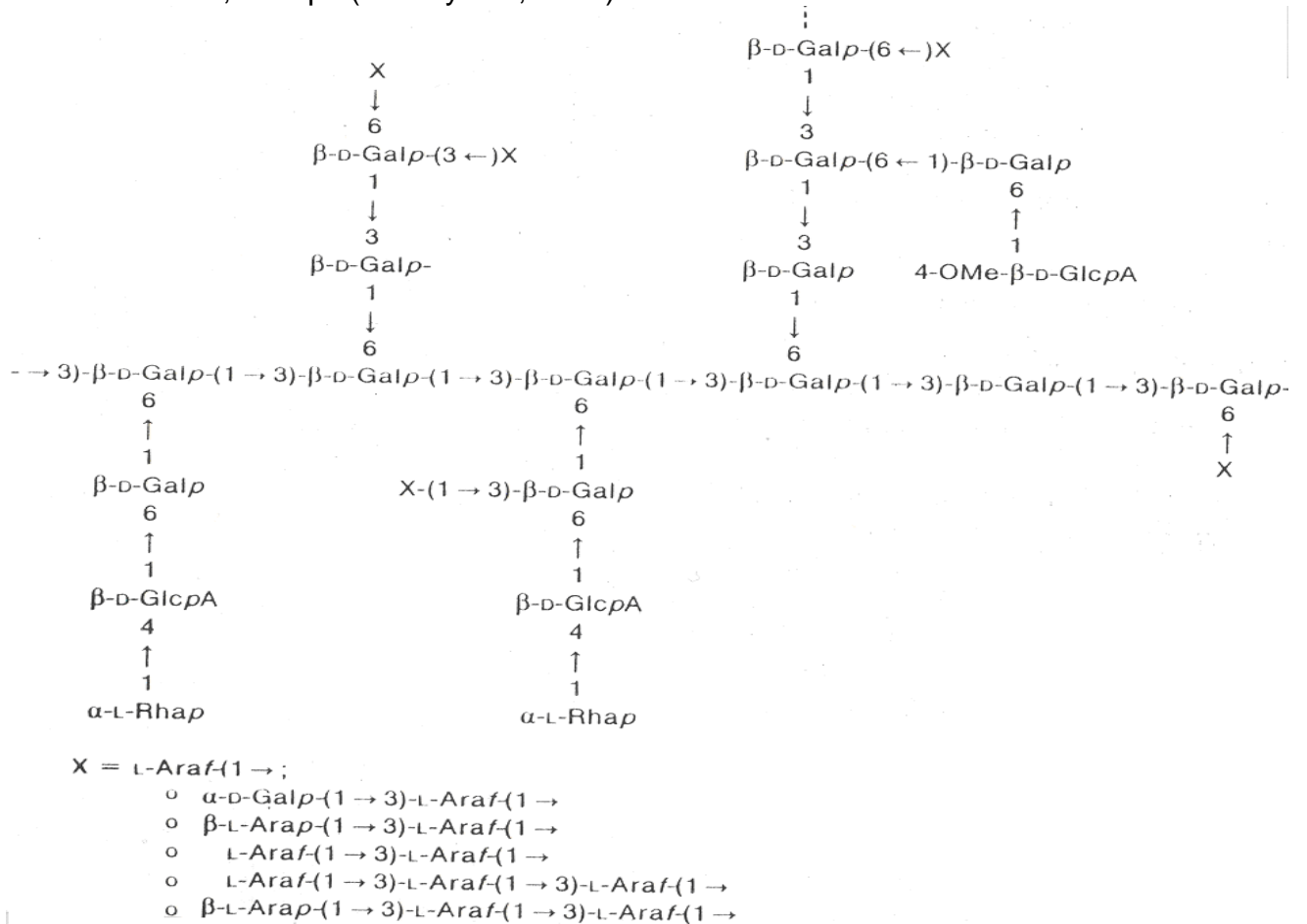


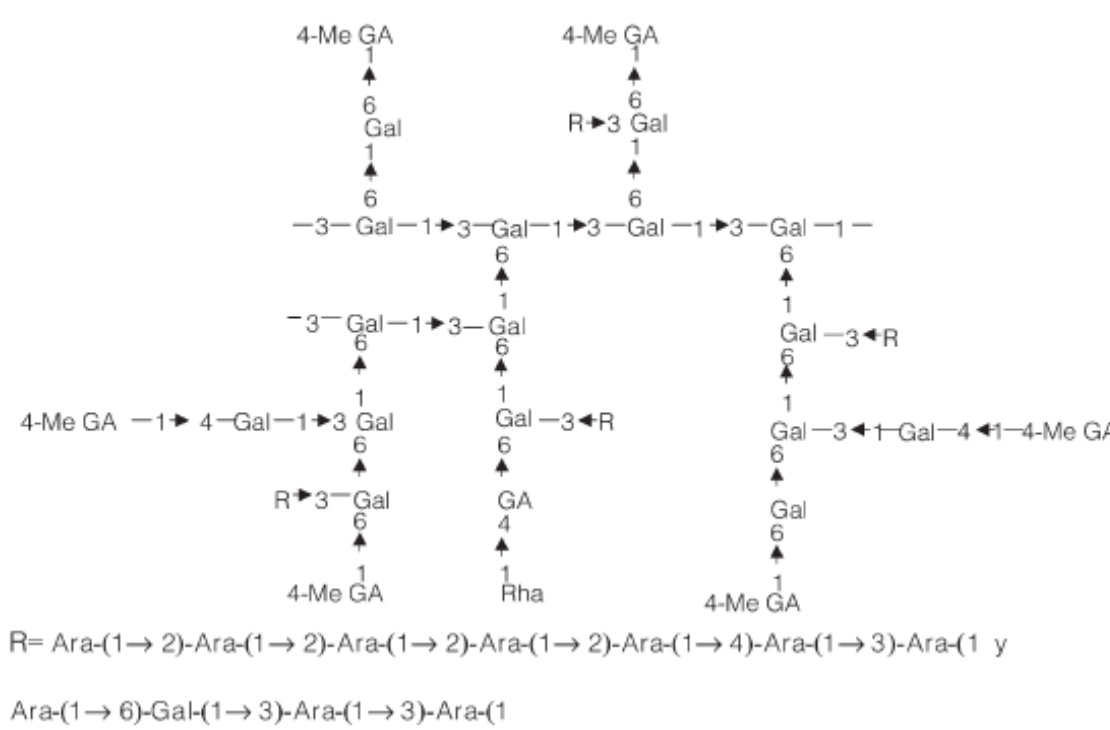
Figura 2 Estructura de la Goma Arábica

2.2.2 Suero de leche: Las proteínas de suero de leche son una mezcla de holoproteínas (que no contienen más que aminoácidos) y de glicoproteínas (que contiene también glucidos). Se obtienen por la precipitación de la caseína a pH de 4.7. Por su estructura y funcionalidad de las proteínas de suero de leche, tienen un uso potencial como agentes microencapsulantes dentro de la industria alimentaria.

El punto isoeléctrico de las proteínas del suero de leche está alrededor de un pH de 5.2. (Anker y Reineccius, 1998).

**2.2.3 Goma de mezquite:** Es una goma natural que debido a su semejanza de la estructura química con la goma arábica puede ser usada en aplicaciones industriales debido a sus propiedades estabilizantes, espesantes, emulsificantes, formadora de películas y de encapsulación entre otras.

En términos generales, se puede decir que la goma de mezquite es la sal neutra de un polisacárido ácido complejo ramificado, formado por un centro de residuos de  $\beta$ -D galactosa, comprendiendo un esqueleto por enlaces (1-3) con enlaces (1-6) en las ramificaciones, variando L-arabinosa (piranosa y furanosa en formas de anillos), L-ramnosa,  $\beta$ -D glucuronato y 4-O metil-  $\beta$ -D glucuronato como azúcares sencillos o cadenas laterales de oligosacáridos. Esta también contiene una pequeña cantidad de proteína (0.7- 5.8%) la cual está generalmente en el centro de la estructura primaria. (Orozco, 2003).



**Figura 4 Estructuras primaria propuesta para el componente polisacárido de la goma de mezquite.**

**2.2.4 Maltodextrina:** La FDA define las maltodextrinas como un polisacárido nutritivo no dulce que consiste en unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces  $\alpha$  (1-4) y que tienen un equivalente de dextrosa (ED) menor que 20. Es preparado como un polvo blanco o en solución concentrada por hidrólisis parcial del almidón de maíz o de papa con ácidos permitidos o enzimas (21 Code of Federal Regulation) Kuntz, 1997).

Las maltodextrinas son clasificadas por su ED. El ED se relaciona con el grado de polimerización (GP) de la molécula de almidón, de acuerdo a  $ED = 100/GP$ . El grado de polimerización corresponde al número de unidades monoméricas o monosacáridas. A más alto ED mayor es el número de unidades monosacáridas y los polímeros son de cadena más corta. La glucosa (dextrosa) posee un  $ED = 100$  y el almidón es aproximadamente cero. Debido a que las maltodextrinas consisten en una mezcla de polímeros de varios largos (glucosa, maltosa, oligosacáridos y polisacáridos) el ED es un valor promedio. Las maltodextrinas presentan baja higroscopicidad, buena solubilidad y bajo poder edulcorante. Son utilizadas en la industria de alimentos en caramelos (30%), pastelería (20%), sopas y caldos (20%), productos lácteos(10%), bebidas cítricas (10%), alimentos para bebés (10%), entre otros. (Szejteta, 2002).

Se ha reportado que mezclas biopoliméricas que presentan mayor energía de activación del proceso de secado isotérmico son consideradas como materiales que limitarán en mejor medida la difusión del vapor de agua y esto se ha empleado como una medida indirecta de la difusión de oxígeno (Pérez-Alonso y col. 2003). La presencia de oxígeno es considerado como un factor crítico para la sobrevivencia de bacterias probióticas anaerobias.

Se han utilizado diferentes modelos para la protección de bacterias probióticas tales como extrucción, tecnologías de emulsión, secado por aspersion entre otros (Fanger, 1974). Este último es ampliamente usado en la industria de los alimentos debido a que es un método económico y efectivo en la protección de materiales. El secado por aspersion es por definición la transformación de un alimento en estado líquido (solución, dispersión, o pasta) a sólido, este método, permite manejar materiales lábiles al calor ya que, a pesar de ser un proceso donde se emplea alta temperatura, el tiempo de contacto es muy corto (5-25 seg).

### 2.3 Análisis térmico

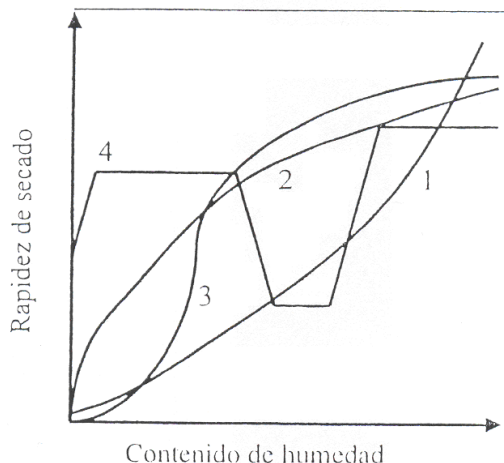
El empleo de biopolímeros como cubiertas entéricas no es sencillo ya que todos ellos son productos naturales de composición distinta y obtenidos por distintos procesos, lo que torna complicado la utilización de estos como materiales puros y más aun cuando se emplean mezclas de estos (Dickinson, 2003).

La tendencia de los recubrimientos entéricos a formar una estructura semipermeable y entretejida durante su secado es difícil de evaluar, pues es caracterizado por la dependencia de la rapidez de secado isotérmico sobre el contenido de humedad. Además, la rapidez de secado isotérmico es gobernada por la rapidez de difusión del agua a través de las cubiertas entéricas. Varios autores han establecido que este último factor es el determinante en el proceso de secado isotérmico de estos materiales (Bangs y Reineccius, 1990; Imagi y col., 1990,1992 ).

Matsuno y Adachi (1993) reportaron un método con el que se puede caracterizar la capacidad de retención de lípidos por distintos materiales de barrera. El método consiste de dos etapas: (1) emulsiónamiento del lípido en una solución del material de barrera, y la estimación de la actividad emulsionante por la distribución y tamaño de partícula; y (2) determinación de la rapidez de secado isotérmico del material de barrera, obteniendo curvas de secado características cóncavas con pendiente positiva curvas tipo 1 (figura 1) donde se aprecia que la rapidez de secado disminuye rápidamente conforme el contenido de humedad decrece.

Estos materiales tienden a formar una película bidimensional fina y densa inmediatamente después de que se inicia el proceso de secado, la cual actúa como barrera contra la transferencia de oxígeno, previniendo la oxidación de lípidos, mortalidad de las bacterias, en general el material que se pretende proteger.

Las curvas tipo 2, 3 y 4 corresponden a materiales que no forman películas densas al inicio del proceso de secado, y no son idóneos para lograr una eficiente encapsulación de lípidos o bacterias.



**Figura 1. Curvas características de secado de materiales de barrera**

Ré (1998) enfatizó que los materiales de barrera (biopolímeros) que se utilicen en la microencapsulación por secado por aspersión deben de tener propiedades térmicas eficientes (baja difusividad efectiva) para proteger al material encapsulado durante la operación del secado. La difusividad es una propiedad de transporte que permite diseñar y optimizar el proceso de secado, así como cuantificar y dar un indicativo de que tan lento se lleva a cabo el proceso de secado (Zogzas y col., 1994). Existen diferentes métodos para determinar la difusividad, entre los más importantes están los métodos analíticos (Hernández y col., 2000; Mulet 1994), métodos numéricos (Hernández y col., 2000; Kiranoudis y col., 1992), el método del régimen regular (Adhikari y col., 2002; Báez-González, 2002; Schoeber 1976;).

Báez–González y col. (2004) desarrollaron un método para cuantificar la difusividad efectiva en diferentes soluciones poliméricas a través del análisis de las curvas del secado isotérmico y del grado de encogimiento de las gotas poliméricas durante el secado. La teoría del régimen regular permite evaluar el coeficiente de difusión efectivo en función del contenido de la humedad y la temperatura.

Con el surgimiento constante de nuevos biopolímeros con propiedades funcionales mejoradas y por motivos económicos, son escasos los desarrollos tecnológicos que contemplan el uso de tan sólo un biopolímero para conformar el material de pared.

La tendencia es usar mezclas de biopolímeros que permitan lograr con mayor efectividad la protección del material que se pretende proteger (Rodríguez-Huezo y col., 2004; Kagami y col., 2003; Sootitawantawat y col., 2003; Sheu y Rosenberg, 1998).

Una manera de seleccionar de forma más objetiva la mezcla idónea para proteger los probióticos es determinando su energía de activación, a partir de la solución numérica de la segunda ley de Fick, de las curvas de secado isotérmico obtenidas a distintas temperaturas (Pérez-Alonso y col., 2003). Esta energía representa la dificultad para que una mol de agua se difunda a través de la membrana polimérica; entre más energía se requiere, más difícil es la difusión del agua, lo que está íntimamente ligado a la microestructura de la membrana.

Los métodos térmicos de análisis son usados ampliamente en investigaciones científicas de las áreas químicas, como de polímeros, químicos orgánicos y farmacéuticos; teniendo aplicaciones en electrónica, geología e ingeniería, en ciencia de los materiales y control de calidad (Haines, 1995).

Los análisis térmicos abarcan varias técnicas que miden o monitorean propiedades físicas o químicas de una sustancia sometida a un control de temperatura sobre tiempo, mientras que la temperatura de la sustancia o muestra es programada en una atmósfera específica.

Entre las dinámicas técnicas termo analíticas más comunes se encuentran tres: la calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis térmico diferencial (DTA) y análisis termogravimétrico (TGA) (Nielsen, 1998); éste último de gran importancia para este estudio, pues el análisis termogravimétrico (TGA) mide cambios en la masa de una muestra en función de la temperatura.

Las aplicaciones de la termogravimetría son limitadas, pues no en todos los eventos térmicos como fases de transición, sublimación, combustión, volatilización y catálisis están acompañadas por cambios en la masa. Sin embargo, en procesos de desorción, deshidratación, descomposición térmica y oxidación se

puede obtener información valiosa del monitoreo de masa mediante la termogravimetría (Brown,1998; Haines, 1995).

El análisis termogravimétrico (TGA) se ha utilizado en la industria de alimentos con alto contenido de almidón para la medición de propiedades fisicoquímicas, cambios dimensionales y de masa, evaluación de estabilidad, comportamientos térmicos de gomas y oxidación de productos.

### **3. JUSTIFICACION**

El estrés, los estimulantes, el suministro de comidas contaminadas, los cambios en la dieta e incluso el proceso normal de envejecimiento alteran drásticamente el ambiente intestinal produciendo una pérdida de bacterias beneficiosas causando graves problemas digestivos que se manifiestan en diarrea, constipación, flatulencias e indigestión.

Las bacterias beneficiosas, conocidas como probióticas, ayudan al ser humano a protegerse de enfermedades provocadas por la invasión de microorganismos patógenos tales como bacterias, hongos y virus. Lo importante, es que el sistema inmune del cuerpo permanezca fuerte y como consecuencia de esa fortaleza inmunológica los patógenos residentes guarden un perfil extremadamente bajo.

Para poder comprender el por qué los probióticos son beneficiosos, es importante conocer lo que está sucediendo en el cuerpo humano. La mayoría de las personas desconocen que se convive con aproximadamente 400 especies distintas de microorganismos en nuestro tracto intestinal

La comida y el agua consumidas diariamente contienen grandes cantidades de microorganismos malignos cuya mayoría se excreta con la materia fecal. El estómago debido a una barrera ácida formidable que minimiza su supervivencia contiene pequeñas cantidades de estos microorganismos; sin embargo, como la comida viaja a través del tracto intestinal, el número y las variedades de los microorganismos se incrementan. El intestino grueso que incluye el colon, aloja el mayor número de estos microorganismos.

Una estructura social compleja existe entre estos microorganismos siendo importante saber cómo favorecer eficazmente el crecimiento de bacterias beneficiosas y simultáneamente minimizando la proliferación de las hostiles.

El objetivo de este proyecto fue demostrar que la viabilidad de *B.bifidum* secada por aspersión y durante el almacenamiento puede ser substancialmente incrementada por la preselección de los coloides protectores que requieren una energía de activación alta durante su proceso de secado isotérmico (limitando la difusión de oxígeno a través de sus matrices deshidratadas) como agentes microencapsulantes y por el uso de aguamiel como prebiótico termo-protector.



El aguamiel es un líquido rico en azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa, fructooligosacáridos e inulina) y es obtenido del *Agave atrovirens* Karb el cual es ampliamente cultivado en distintos estados de la República Mexicana tales como Hidalgo, Tlaxcala, Michoacán Puebla, y estado de México principalmente. Por su composición y al demostrarse su efectividad, se espera que pueda ser empleada como sustancia prebiótica; de esta manera este recurso natural mexicano podría ser considerado para ser incorporado en formulaciones de alimentos funcionales.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la influencia de distintas mezclas poliméricas y el efecto termo-protector del prebiótico (aguamiel) sobre la viabilidad de *B. bifidum* a distintas temperaturas de secado por aspersión durante el almacenamiento.

#### **4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Evaluar el efecto de las mezclas poliméricas con diferentes energías de activación en la protección contra la difusión de oxígeno y la temperatura de secado de *B. bifidum*.
- 2.-Evaluar la influencia de la temperatura de secado por aspersión sobre la viabilidad de *B. bifidum*.
- 3.-Evaluar el efecto termo-protector del aguamiel en la viabilidad de *B.bifidum*.

#### **5. HIPOTESIS**

La selección de una adecuada composición de la matriz polimérica (polímeros y aguamiel) permitirá lograr una mayor viabilidad de *B.bifidum* sujeta a las temperaturas de secado y durante el almacenamiento.

## **6. MATERIALES**

### **6.1 Materiales**

*Bifidobacterium bifidum* se obtuvo de una cepa comercial proporcionada por, Laboratorios Danisco. (Mexico D.F)

Aguamiel: Es un fluido obtenido del *Agave atrovirens* Karb cultivado en el estado de Hidalgo.

MRS caldo (de Man, Rogosa and Sharpe 1960) de BD DIFCO, México, D.F

Agar bacteriológico (BD DIFCO, México D.F)

Biopolímeros; los materiales de barrera utilizados fueron: goma de mezquite (*Prosopis sp*) recolectada en el estado de San Luis Potosí, y purificada por el método propuesto por (Vernon Carter, 1996), la maltodextrina DE10 proporcionada por Complementos Alimenticios S.A de C.V Naucalpan (Edo. Mexico) el concentrado de proteína de suero de leche (SL) adquirido de la Compañía Daisco Foods International,) y goma arábiga (GA) (*Acacia senegal*) proporcionada por la Industria Ragar S.A de C.V (México D.F).

## **7. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS**



**Figura 5 Analizador termogravimétrico (TGA (Hi-Res TGA 2950 Thermogravimetric Analyzer TA Instruments)**

Autoclave (impulsora infinsa)

Espectrofotómetro Genesis 2 UV/Vis (Espectronic Unicam, Rochester, N. Y., E.U.A.)

Potenciómetro (Potenciómetro (Orion Research, inc. Model 410 A)

Densímetro digital Anton Paar modelo DMA 35 N (Antón Paar K.G., Graz, Austria)



Figura 6 Analizador de imágenes (Olimpos U- TVIX Japón)



Figura 7 Centrifuga Hermle Z323K (Hermle Labortechnik GMBH, Wehingen, Alemania)

### Parámetros de centrifugación

Parámetro	Valor
revoluciones por minuto (rpm)	6000
Temperatura ( °C )	4
Tiempo (min)	30

Incubadora (Felisa, México)

Campana de Flujo laminar (Hoteen Lamin Air, HH48)



Figura 8 Secador por Aspersión: (Buchi 190 Mini Spray Dryer)

Parámetros de secado

Parámetro	Valor	Valor	Valor
Temperatura de entrada (°C)	130	140	155
Temperatura de salida (°C)	70	60	70
flujo de aire (bar)	5 a 8	5 a 8	5 a 8

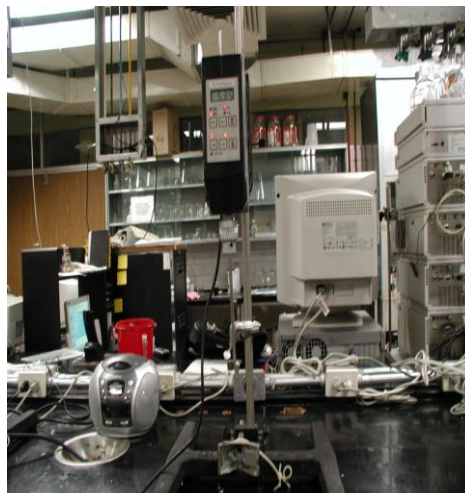
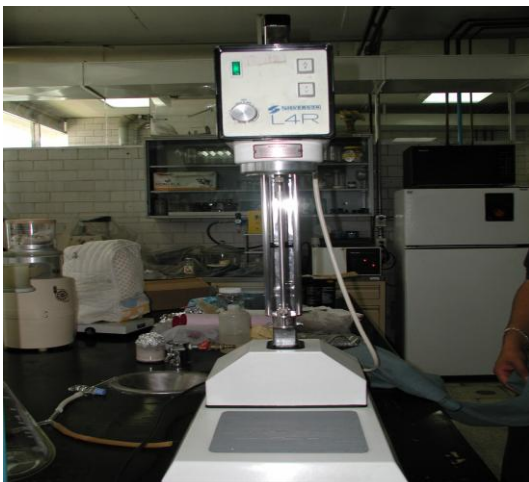


Figura 9 y 10. (Homogeneizador Silverson L4R (Silverson Machines, Ltd., Watreside, Chesham, Bucks, Inglaterra)

Homogenizador Silverson		Homogenizador Caframo
Temperatura	4°C Baño hielo	4°C Baño de hielo
Revoluciones por minuto	5700	1000
Tiempo (min)	2	10

## **8. MÉTODOS**

### **8.1 Preparación de los biopolímeros y mezclas para determinar el coeficiente de difusividad efectiva del secado isotérmico**

Los biopolímeros de goma de mezquite (GM), suero de leche (SL), maltodextrina (MD) y goma arábica (GA) solos y mezclados en distintas relaciones, fueron dispersados en agua destilada a temperatura ambiente (~25°C) en concentraciones de 40%. Las dispersiones se almacenaron a 4°C durante 24 horas antes de ser utilizadas para minimizar el crecimiento de bacterias (Rodd y col., 2000) y al mismo tiempo tener una mejor hidratación del material.

### **8.2 Densidad de los biopolímeros y mezclas**

La densidad inicial de cada dispersión de biopolímeros y mezclas se determinó por triplicado con un densímetro digital a 25°C ± 3 °C.

### 8.3 Secado isotérmico de los biopolímeros y mezclas

Se utilizó un analizador Termogravimétrico (Figura 5) para obtener las curvas de secado isotérmico. De 10 a 25 mg de cada dispersión de biopolímero se coloca en el horno del equipo y se secó isotérmicamente a 50, 60, 70 y 80°C durante 90 min., usando aire como gas de purga con una humedad relativa de 0,008 Kg H<sub>2</sub>O/Kg s.s., y una velocidad de flujo de 100 cm<sup>3</sup>/min. Las tasas de precalentamiento para llevar las muestras de temperatura ambiente a la temperatura de operación variaron para minimizar la inercia térmica, de esta manera se logra llegar a la temperatura isotérmica en el menor tiempo posible para minimizar la pérdida de masa al establecer las condiciones iniciales del experimento.

**Condiciones de operación del TGA para alcanzar el secado isotérmico**

<b>Secado isotérmico</b>	<b>Metódo</b>
T= 50°C	Rampa 35°C/min-40°C Rampa 5°C/min-50°C Isoterma 50°C por 90 min
T= 60°C	Rampa 40°C/min-50°C Rampa 5°C/min-60°C Isoterma 60°C por 90 min
T= 70°C	Rampa 47°C/min-60°C Rampa 5°C/min-70°C Isoterma 70°C por 90 min
T= 80°C	Rampa 54°C/min-70°C Rampa 5°C/min-80°C Isoterma 80°C por 90 min

Las mediciones se realizaron por triplicado.

### 8.4 Difusividad efectiva del agua durante el secado isotérmico

Se obtienen las curvas experimentales de secado isotérmico (contenido de humedad en función del tiempo) de los diferentes biopolímeros y mezclas de ellos; se resuelve analíticamente la ecuación de la segunda ley de Fick para coordenadas esféricas descrita por Crank, (1975). Ecuación 1.

Segunda Ley de Fick 
$$\frac{\partial X}{\partial t} = D\nabla^2 X \quad (1.)$$

Para calcular los coeficientes de difusividad efectiva se sigue el algoritmo descrito por (Pérez Alonso 2001)

### 8.5 Energía de activación

La energía de activación ( $E_a$ ) para el proceso difusivo se determinó calculando un coeficiente de difusividad efectiva ( $D_{eff}$ ) para cada tratamiento de biopolímero, el cual es dependiente de la temperatura y sigue una relación tipo Arrhenius.

$$D_{eff} = D_o \exp \left[ -\frac{E_a}{RT} \right] \quad (2.)$$

Una gráfica de  $\ln D_{eff}$  versus  $1/T$ , forma una línea recta con pendiente  $-E_a/R$ , donde  $D_{eff}$  está en [ $m^2/s$ ],  $D_o$  es el factor de Arrhenius [ $m^2/s$ ],  $E_a$  está en [kJ/mol],  $R$  es la constante universal de los gases ( $8.314 \times 10^{-3}$  KJ/mol K), y  $T$  es la temperatura en la escala absoluta (K).

Conociendo la pendiente ( $-E_a/R$ ) se puede calcular la energía de activación para los biopolímeros y sus mezclas en el rango de temperaturas estudiado (50 a 80 °C).

De las mezclas biopoliméricas estudiadas, se decidió elegir tres de ellas que tuvieran  $E_a$  alta, media y baja, con el fin de evaluar el efecto de la  $E_a$  de las mezclas sobre la protección de *B bifidum*. Las relaciones de las mezclas biopoliméricas se muestran en la ( tabla 1).

**Tabla 1 Mezclas de biopolímeros**

MEZCLAS DE LOS BIOPOLIMEROS	GA	MG	MD
GA50-MG50	50	50	0
GA17-GM66-MD17	17	66	17
SL17-GM17-MD66	17	17	66

GA= goma arábica, MG= goma de mezquite, MD=maltodextrina DE 10

#### Preparación de medios de cultivo y soluciones

Caldo MRS: Se preparo 1 L. de caldo MRS (caldo para *Lactobacillus*) 55g/L

Agar-caldo: Se preparo 1.5 L de solución agar-caldo (55g/L de caldo MRS y 15g/L de agar)

NaCl: Se preparó 1 L. de una solución salina (NaCl) al 0.8% Las soluciones se esterilizaron en autoclave a  $121 \text{Kg/cm}^3$  por 15 min.

### 8.6 Activación de la cepa

Se rehidrató 1 % de la cepa liofilizada de *B. bifidum* en 100 ml de caldo MRS adicionado con L- cysteina al 0.05% Se incubó por 24 h a 37°C haciendo dos transferencias sucesivas en caldo MRS.

### 8.7 Estimación de la cinética de crecimiento

Para estimar el crecimiento de *B. Bifidum*, un frasco fue adicionado con 90 ml de caldo MRS adicionado con 0.05% de L-Cysteina., sellado, engargolado, y posteriormente esterilizado, una vez que este alcanza la temperatura ambiente fue inoculado con 10 ml de caldo MRS que contenía la cepa ya activada.

El frasco fue incubado a 37°C. Cada hora se tomo muestra para realizar plaqueo, mediciones de pH y densidad óptica a 660 nm.

### 8.8 Cuenta Total en Agar MRS

Muestras de células viables (0.1 ml) fueron serialmente diluidas  $10^{-2}$ - $10^{-8}$  en una solución de NaCl al 0.8% y a partir de las diluciones apropiadas fue inoculado 0.1 ml sobre agar MRS y almacenadas en contenedores con agotamiento de oxígeno a 37°C por 48 h.

### 8.9 Evaluación del cultivo para identificación y pureza

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en microbiología que se usa universalmente para distinguir a las bacterias en dos grandes grupos, es una tinción diferencial que basa su distinción en la estructura diferente de la pared bacteriana de las bacteria Gram + (pared más gruesa, y una sola capa de peptidoglucano) y de las Gram- (pared más delgada y dividida en dos partes) las bacterias gram- estarán teñidas de un color rosáceo, y las gram+ de un color violeta.

#### Procedimiento

El frotis es fijado con calor se tiñe 1 min con cristal violeta, se lava con agua, se cubre con solución de lugol durante 1 min y se lava de nuevo con agua, se decolorara con una mezcla de alcohol etílico/acetona. Escurrir y cubrir con safranina (color de contraste) durante 20 s. Lavar y secar.



### 8.10 Preparación de las dispersiones de *B. bifidum* secadas por aspersión

Las células de *B. bifidum* después de 8 h de incubación fueron cosechadas en la fase estacionaria de crecimiento, por centrifugación (3000 x g, 30 min a 4°C, figura 7) para la obtención del concentrado de biomasa. Las células fueron dispersadas en las distintas soluciones biopoliméricas con y sin aguamiel previamente esterilizadas con la ayuda del homogenizador (figura 9 y 10) obteniendo las seis formulaciones como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2. Composición de las formulaciones**

FORMULACION (%)	SL (g)	GM (g)	GA (g)	MD (g)	AGUAMIEL	B. bifidum (UFC)	AGUA
SL17-GM17-MD66	2.55	2.55	0	9.9	10	3.0*10 <sup>9</sup>	75
GA17-GM66-MD17	0	9.9	2.55	2.55	10	3.0*10 <sup>9</sup>	75
GA50-GM50	0	7.5	7.5	0	10	3.0*10 <sup>9</sup>	75
SL17-GM17-MD66	2.55	2.55	0	9.9	0	3.0*10 <sup>9</sup>	85
GA17-GM66-MD17	0	9.9	2.55	2.55	0	3.0*10 <sup>9</sup>	85
GA50-GM50	0	7.5	7.5	0	0	3.0*10 <sup>9</sup>	85

### 8.11 Procedimiento para el secado por aspersión de las distintas formulaciones.

Las formulaciones fueron alimentadas al secador por aspersión (figura 8) con un flujo de 20 mL/min donde son transformadas a pequeñas gotas y atomizadas por medio de una boquilla o disco, los polvos caen a través de un medio gaseoso al fondo del secador y son colectados por medio de un ciclón.

Los microencapsulados fueron almacenados a 4°C y una a<sub>w</sub> de 0.327 empleando una solución saturada de cloruro de magnesio para evaluar su viabilidad a través del tiempo.

### 8.12 Viabilidad de *B. bifidum* en los microencapsulados durante el almacenamiento.

Muestras de 0.1 g de microencapsulados conteniendo las células viables fueron serialmente diluidas 10<sup>-2</sup>-10<sup>-8</sup> en caldo MRS, inmediatamente después de secadas y semanalmente durante 5 semanas. 0.1 ml de las muestras de las diluciones apropiadas fueron inoculadas en agar MRS. Las colonias fueron contadas después de 48 h de incubación a 37°C. en condiciones de anaerobiosis.

### 8.13 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Los microencapsulados fueron pegados a un portamuestras de MEB usando una cinta adhesiva por ambos lados ( Ted Pella, Redding, Calif., E.U.A.) para examinar su estructura externa. Las muestras fueron subsecuentemente cubiertas con oro (Rosenberg y Young, 1993) en un Fine Coat Ion Sputter JFC1100 (Jeol.,

Akishima, Japón). La morfología de los microencapsulados fue vista con un microscopio electrónico de alto vacío Jeol a 10 kV. Algunas micrografías son presentadas en la sección de resultados y discusiones. En el anexo C se encuentra una serie de micrografías para los distintos tratamientos.

#### 8.14 Análisis estadístico.

Todo el estudio se realizó por duplicado, los datos fueron registrados semanalmente durante un periodo de 5 semanas, normalizados y ajustados a una cinética de primer orden ( $\ln ((\log \text{cfu/g})_{t=t})/((\log \text{cfu/g})_{t=0}) = - kt$ ). para obtener las constantes de velocidad de muerte (k) de *B.bifidum*

Los tratamientos fueron organizados en un diseño completamente aleatorio. Los datos fueron analizados por análisis de varianza y las diferencias significativas entre los tratamientos fue determinada por la prueba de Tukey a  $p=0.05$  usando el paquete estadístico NCSS versión 5 (Wireframe Graphics, Kaysville, UT (NCSS, 2001).

En el anexo A se encuentra el estudio completo de análisis estadístico.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 9.1 Densidad

Los datos de la densidad inicial de las diferentes soluciones acuosas de biopolímeros al 40% en peso se muestran en la tabla 3

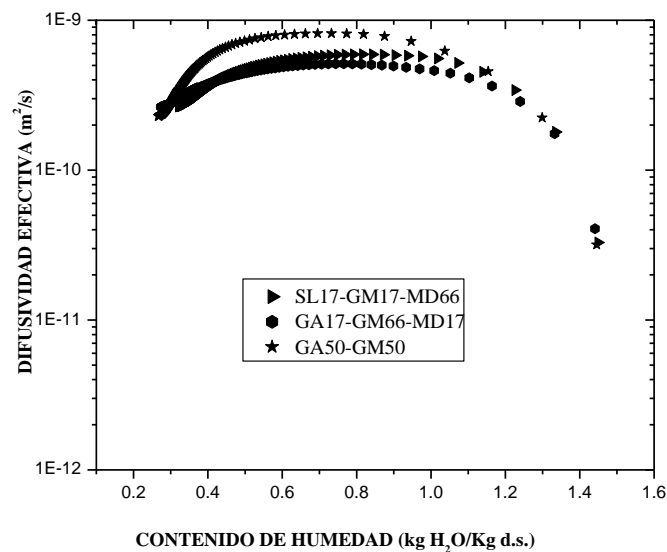
**Tabla 3 Densidad inicial de los biopolímeros en soluciones acuosas al 40% en peso a 25°C**

CODIGO DE MEZCLAS DE BIOPOLIMEROS	$\rho_0$ (kg/m <sup>3</sup> )
SL17-GM66-MD17	1193.1
GA17-GM66-MD17	1189.8
GA50-GM50	1189.5

### 9.2 Secado isotérmico de los biopolímeros y mezclas

Los datos proporcionados por el TGA al analizar los materiales biopoliméricos en estudio fueron: masa de la muestra inicial ( $W_{m-inic}$ ), tiempo (min), porcentaje en peso (W%), derivada del porcentaje en peso con respecto al tiempo ( $d(W\%/dt)$ ) y la temperatura (°C).

A partir de estos datos se obtuvieron los contenidos de humedad (X) y velocidad de secado ( $-dx/dt$ ) de cada material y así la difusividad efectiva. El comportamiento de las mezclas a 60°C se observa en la figura 11. El mismo comportamiento se observó a las demás temperaturas.



**Figura 11. Influencia del contenido de humedad sobre la difusividad efectiva de las mezclas biopoliméricas a 60 °C**

Para valores relativamente bajos del contenido de humedad (alrededor de 0.5 Kg H<sub>2</sub>O/ Kg s.s) la difusividad efectiva muestra un ligero incremento, el cual puede estar indicando que el agua intersticial promueve el transporte de solutos. Sin embargo conforme se logran valores altos de humedad cercanos a la saturación, la difusividad efectiva decrece. Esto puede estar reflejando la formación de capas fronterizas externas que limitan el transporte difusivo de solutos a la matriz coloidal protectora. Estos resultados muestran que, contenidos de humedad bajos inducidos por el método de secado por

aspersión introducen una reducción significativa de la difusividad efectiva y por lo tanto del transporte de oxígeno dentro de la matriz protectora coloidal donde se encuentra atrapada *B.bifidum*.

### 9.3 Energía de activación

Los valores de energías de activación de las mezclas de coloides protectores se muestran en la tabla 4. Se puede observar que el valor más alto de  $E_a$  fue para SL17-GM17-MD66 (40.7kJ/mol), lo cual, de acuerdo a lo descrito por Pérez-Alonso y cols. (2003) pudiera ser el que imparta mayor protección a *B.bifidum* contra la toxicidad del oxígeno. Todas las mezclas de coloides protectores estudiadas presentaron valores muy cercanos a los obtenidos por Pérez-Alonso y cols. (2003, 2006) indicando que el procedimiento es confiable y reproducible.

Tabla 4 Energías de activación de los materiales de barrera

Mezcla	$E_a$ (KJ/mol)
SL17-GM17-MD66	40.7
GA17-GM66-MD17	30.3
GA50-GM50	19.3

GA= goma arábica, GM= goma de mezquite, MD=maltodextrina DE 10

### 9.4 Cinética de crecimiento de *B bifidum*.

La figura 12 muestra que la fase estacionaria se alcanza a las 8 h. de incubación, tiempo en el cual se cosecharon las bacterias.

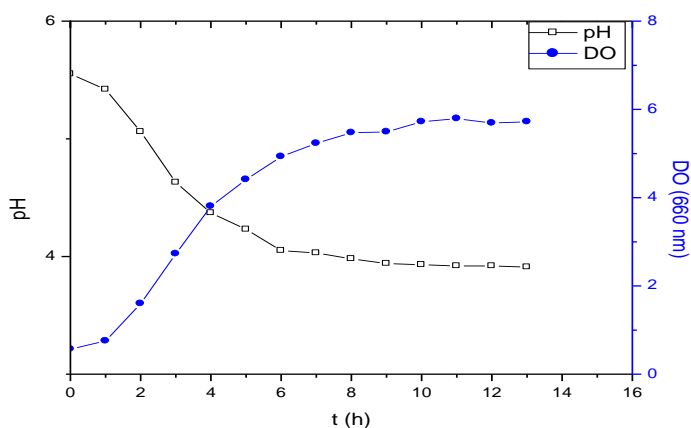


Figura 12 Cinética de crecimiento de *B.Bifidum*

En la figura 13 se puede observar que a las 8 horas de incubación hay  $2.81 \cdot 10^8$  UFC/ml

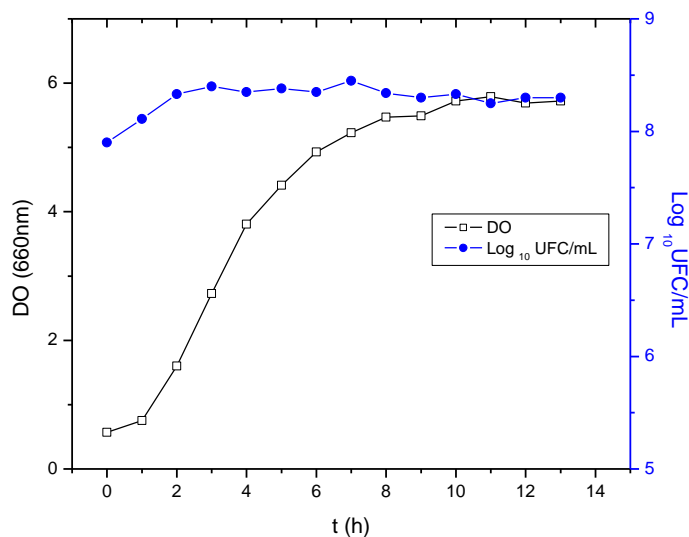


Figura 13 Cinética de crecimiento y ufc de *B. Bifidum*

### 9.5 Viabilidad de *B. bifidum* en los microencapsulados durante el almacenamiento.

Hubo un efecto altamente significativo de las mezclas de coloides protectores, de las temperaturas de secado por aspersión y el uso o no del aguamiel sobre el número de células viables (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de varianza de células viables después de 5 semanas (*gl* grados de libertad, *SM* cuadrado de medias) \* Significante, \*\* Altamente significativo.

((log cfu/g)t=t)/((log cfu/g)t=0)			
Fuente	<i>gl</i>	<i>SM</i>	<i>P&gt;F</i>
Mezcla de coloides protectores	2	0.3972666	0.0000**
Aguamiel	1	6.871301 E-02	0.0000**
Temperatura de secado	2	0.6317954	0.0000**

Las figuras 14, 15 y 16 muestran el efecto de las mezclas de coloides protectores, temperaturas de secado y la inclusión o no del aguamiel sobre la viabilidad celular, respectivamente.

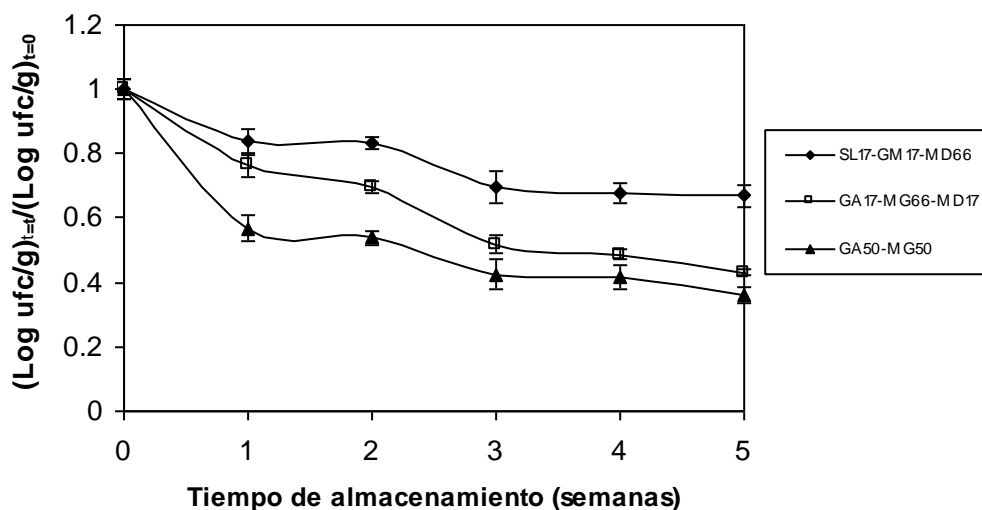


FIG. 14 Efecto de la formulación sobre la viabilidad de *B. bifidum*

En la figura 14 es claro que la mezcla de coloides protectores que permitió la mejor viabilidad a *B. bifidum* a cualquier tiempo específico sobre las 5 semanas de almacenamiento fue la mezcla SL17-GM17-MD66 la cual exhibió la mayor  $E_a$ , seguido por la mezcla GA17-GM66-MD17 y finalmente la mezcla GA50-GM50 la cual mostró la menor  $E_a$  (Tabla 4). Estos resultados indican que la pre-selección de las mezclas coloidales protectoras en términos de la  $E_a$  que requieren para que se lleve a cabo su secado isotérmico es un parámetro efectivo que sirve como criterio para este propósito y que una relación cercana debe existir entre la estructura de la matrices poliméricas y la difusión del oxígeno a través de la matriz. La figura 15 muestra el efecto de la temperatura de secado sobre los cambios en viabilidad de *B. bifidum* durante el tiempo de almacenamiento.

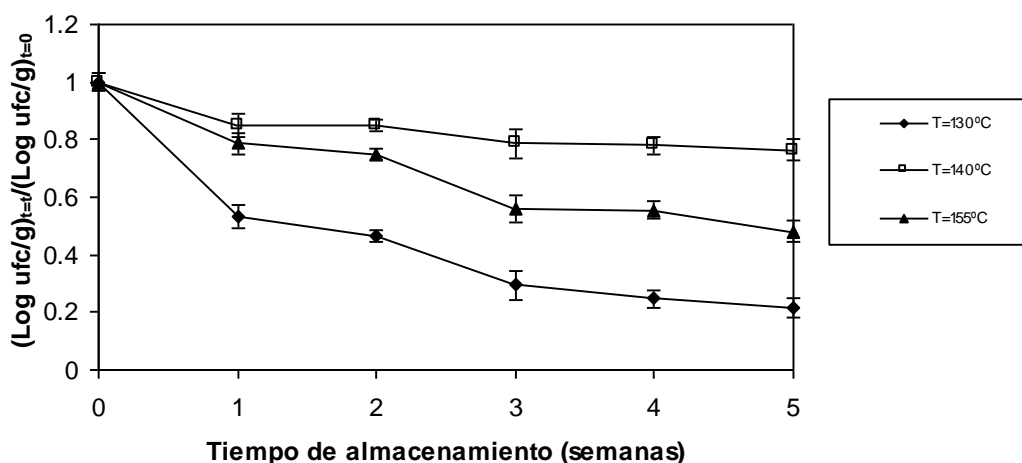


FIG. 15 Efecto de la temperatura de secado sobre la viabilidad de *B. bifidum*

Observe que 140°C fue la mejor temperatura de secado, seguido por la de 155°C. Estos resultados sugieren lo siguiente: i) la temperatura de secado relativamente baja de 130°C indujo un proceso de secado lento, el cual produjo una pobre consolidación de la matriz coloidal protectora. De hecho, los microencapsulados deshidratados a 130°C mostraron una disminución significativa en la viabilidad debido a la naturaleza frágil de la matriz coloidal protectora formada (ver Figura 17a) y ii) temperaturas altas (155°C) pueden conducir a un proceso de secado rápido el cual por otro lado induce la formación de fracturas de la matriz coloidal protectora donde el oxígeno puede difundirse y ser tóxico para las células. Temperaturas de secado moderadas (140°C) producen polvos con una configuración abollada típica que los hace más robustos contra la fractura mecánica y la difusión de solutos (ver Figura 17b).

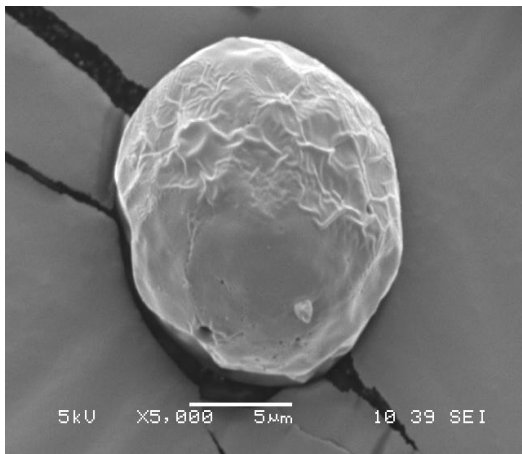


Figura 17a. Partícula típica de polvo secada 130° C.

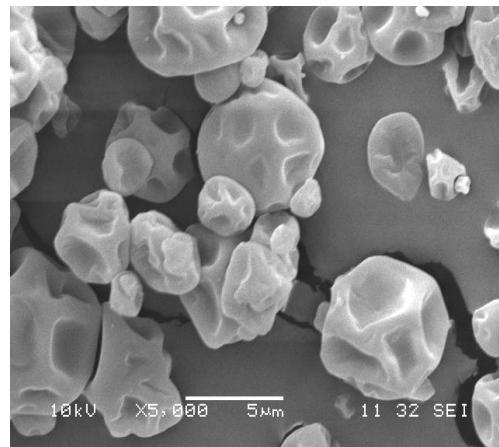


Figura 17b. Partícula típica de polvo secada a 140°C.

El daño de la membrana celular es frecuentemente evidente después del secado por aspersión y este ha sido atribuido principalmente a los efectos del calor y deshidratación (Corcoran y cols. 2004). Por otro lado, la Figura 16 muestra el efecto de la adición del aguamiel sobre la viabilidad de *B. bifidum* durante el almacenamiento.

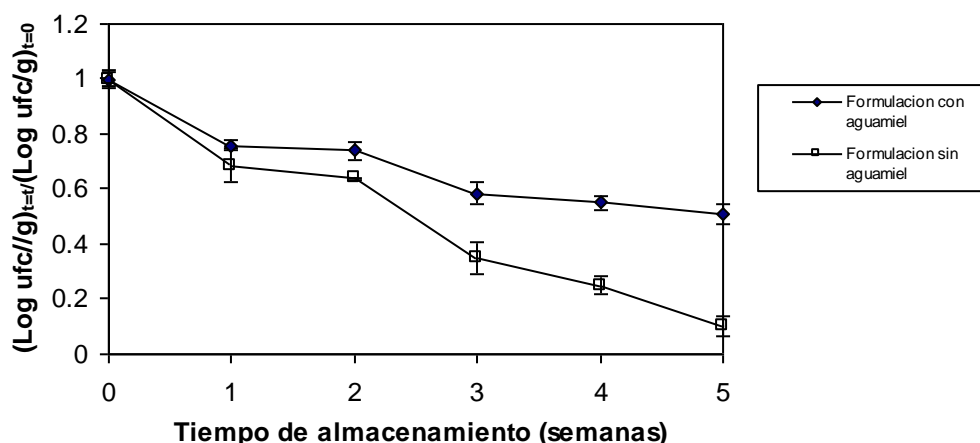


FIG 16. Efecto del aguamiel sobre la viabilidad de *B. bifidum*

Interesantemente, un incremento en la viabilidad fue obtenido cuando la mezcla de coloides protectores fue adicionada con aguamiel, sugiriendo que este prebiótico tuvo un efecto positivo probablemente debido a que actuó como termoprotector para las células sometidas al proceso de deshidratación.

La viabilidad de las células mostró una dinámica disminución tanto en los microencapsulados conteniendo aguamiel como los que no lo contenían. A cualquier tiempo de almacenamiento dado, las microcapsulas conteniendo aguamiel presentaron un número de células viables significativamente mayor que aquellas que no lo contenían.

Al incrementar el periodo de almacenamiento (cerca de 5 semanas), la diferencia en el número de células viables con aguamiel y sin aguamiel incrementó drásticamente. Cualquiera que sea el mecanismo por el cual el aguamiel afectó la viabilidad de las células, esto es claro que un efecto simbiótico ocurrió con *B. bifidum*, este le dio al probiótico un incremento en la resistencia contra factores ambientales.

La pérdida de viabilidad durante el almacenamiento de todas las microcapsulas se ajustó bien a una velocidad cinética de decaimiento de primer orden ( $\ln((\log \text{ ufc/g})_{t=t}) / ((\log \text{ ufc/g})_{t=0}) = -kt$ ). La tabla 6 muestra que la mezcla de coloides protectores, la adición o no de aguamiel y la temperatura de secado tuvieron efectos significativos diferentes sobre las cinéticas de decaimiento y la viabilidad de *B. bifidum* después de 5 semanas de almacenamiento.



**Tabla 6.**  
**Efecto de la mezcla de coloides protectores, adición o no del aguamiel y de la temperatura de secado sobre la cinética de decaimiento y viabilidad de *B. bifidum* después de 5 semanas de almacenamiento.**

Mezcla de coloides protectores	k (semanas <sup>-1</sup> )	Viabilidad después de 5 semanas (ufc g <sup>-1</sup> )
SL17-GM17-MD66	0.134 <sup>a</sup>	2.9 x 10 <sup>4</sup>
GA17-GM66-MD17	0.160 <sup>b</sup>	2.0 x 10 <sup>3</sup>
GA50-GM50	0.461 <sup>c</sup>	8.3
Aguamiel		
Con	0.208 <sup>a</sup>	4.0 x 10 <sup>3</sup>
Sin	0.295 <sup>b</sup>	1.5 x 10 <sup>3</sup>
Temperatura de secado		
130 °C	0.514 <sup>c</sup>	4.6
140 °C	8.910 E <sup>-2 a</sup>	3.3 x 10 <sup>4</sup>
155 °C	0.152 <sup>b</sup>	3.0 x 10 <sup>4</sup>

SL = concentrado proteico de suero , GA = goma arábica, MG = goma de mezquite, MD = maltodextrina DE 10 . Superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p≤0.05).

De esta manera, la viabilidad del probiótico con cada variable fija varió de manera drástica al final de la prueba. Por ejemplo, la viabilidad para la mezcla SL17-GM17-MD66 fue de 2.9 x 10<sup>4</sup> ufc g<sup>-1</sup>, mientras que para la mezcla deGA50-GM50 fue de 8.3 ufc g<sup>-1</sup>.

Finalmente, se decidió que la constante del tiempo de vida media ( $t_{1/2} = \ln 2/k$ ) era un excelente parámetro cuantitativo para determinar la efectividad de cualquier tratamiento sobre la viabilidad de *B. bifidum*. A mayor  $t_{1/2}$  mejor protección impartirá contra el decaimiento de la viabilidad celular para una formulación y temperatura de secado dada.

La mejor formulación tuvo un tiempo de vida media de 16.78 semanas y fue elaborada con la mezcla SL17-GM17-MD66, adicionada con aguamiel y secada a 140°C. Su viabilidad estuvo en el rango de 1.1 x 10<sup>8</sup> ufc g<sup>-1</sup> inmediatamente después del secado a 2.8 x 10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> después de 5 semanas de almacenamiento.

La segunda mejor formulación fue la elaborada con la misma mezcla coloidal protectora pero, sin aguamiel, también secada a 140°C. Su viabilidad estuvo en el rango de 5.7 x 10<sup>7</sup> ufc g<sup>-1</sup> inmediatamente después del secado a 1.8 x 10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> después de 5 semanas de almacenamiento y tuvo un  $t_{1/2}$  de 14.43 semanas. (Tabla 7)

**Tabla 7. Tiempo de vida media de los microencapsulados de *B. bifidum* en diferentes matrices coloidales protectoras, con y sin aguamiel. Viabilidad de *B. bifidum* (después de 5 semanas de almacenamiento).**

Tiempo de vida media de la viabilidad celular (semanas)			
Mezclas coloidales protectoras	130 °C	140 °C	155 °C
SL17-GM17-MD66 + aguamiel	<sup>C</sup> 5.61± 0.08 <sup>a</sup> (1.0x10 <sup>3</sup> )	<sup>A</sup> 16.78±0.06 <sup>a</sup> (2.8x10 <sup>6</sup> )	<sup>B</sup> 10.31±0.06 <sup>a</sup> (1.7x10 <sup>6</sup> )
GA17-GM66-MD17 + aguamiel	<sup>C</sup> 4.38±0.02 <sup>b</sup> (1.0x10 <sup>0</sup> )	<sup>A</sup> 12.77±0.36 <sup>c</sup> (9.6x10 <sup>5</sup> )	<sup>B</sup> 8.68±0.14 <sup>b</sup> (1.6x10 <sup>5</sup> )
GA50-GM50 + aguamiel	<sup>C</sup> 0.70±0.00 <sup>d</sup> (1.0x10 <sup>0</sup> )	<sup>A</sup> 5.42±0.02 <sup>e</sup> (9.0x10 <sup>5</sup> )	<sup>B</sup> 3.09±0.10 <sup>d</sup> (1.6x10 <sup>5</sup> )
SL17-GM17-MD66	<sup>C</sup> 1.87±0.01 <sup>c</sup> (5.0x10 <sup>1</sup> )	<sup>A</sup> 14.43±0.06 <sup>b</sup> (1.8x10 <sup>6</sup> )	<sup>B</sup> 4.53±0.03 <sup>c</sup> (1.1x10 <sup>4</sup> )
GA17-GM66-MD17	<sup>C</sup> 1.56±0.02 <sup>c</sup> (1.0x10 <sup>0</sup> )	<sup>A</sup> 11.24±0.12 <sup>d</sup> (1.5x10 <sup>5</sup> )	<sup>B</sup> 4.28±0.09 <sup>c</sup> (5.8x10 <sup>3</sup> )
GA50-GM50	<sup>B</sup> 0.70±0.00 <sup>d</sup> (1.0x10 <sup>0</sup> )	<sup>A</sup> 3.44±0.04 <sup>f</sup> (1.6x10 <sup>5</sup> )	<sup>A</sup> 3.09±0.09 <sup>d</sup> (2.5x10 <sup>2</sup> )

SL = concentrado proteico de suero, GA = goma arábica, GM = goma de mezquite, MD = maltodextrina DE 10

Letras mayúsculas (A, B) en la misma fila indican diferencias significativas (p≤0.05).

Letras minúsculas (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas (p≤0.05).

Esto remarcó que el aguamiel tuvo un efecto benéfico representado por un tiempo de vida media mayor para todas las microcapsulas independientemente de la mezcla de coloides protectores y la temperatura de secado usada para su obtención.

Es interesante observar que la mezcla SL17-GM17-MD66 fue aquella con la mayor energía de activación. Por lo tanto, el diseño de producción de micro cápsulas con viabilidad celular incrementada de *B. bifidum* se debe considerar el uso de mezclas de coloides protectores con alta energía de activación, adición de aguamiel y el uso de secado por aspersión de 140°C.

## **10. CONCLUSIONES**

Los resultados en este trabajo indican que la incorporación del aguamiel, la energía de activación de la mezcla de coloides protectores y la temperatura de secado son factores importantes que deben ser considerados para incrementar la viabilidad de *B. bifidum* en polvos secados por aspersión. De hecho el mayor tiempo de vida media fue obtenido para la mezcla de coloides protectores conteniendo concentrado proteico de suero, goma de mezquite y maltodextrina en una relación de 17:17:66 la cual exhibió la mayor energía de activación.

Parece que la adición de aguamiel introduce un efecto simbiótico con el probiótico brindándole una mayor resistencia contra factores ambientales, y por lo tanto, incrementando la viabilidad celular. La temperatura de secado es importante, ya que afecta la morfología de las microcápsulas. Morfologías deformadas pueden conducir a daño celular en los microencapsulados.

## BIBLIOGRAFIA

Adhikari, B., Howes, T, Bhandari, B. R., Yamamoto S., Truong V. (2002) Application of simplified method based on regular regime approach to determine the effective moisture diffusivity of mixture of low molecular weight sugar and maltodextrin during desorption. *Journal of Food Engineering*, 54-157-165.

Baéz González J.G (2002). Estudio del proceso de deshidratación durante el secado isotérmico para la selección adecuada de los materiales de pared para la microencapsulación. Msc Thesis in Chemical Engineering, Universidad Autónoma Metropolitana\_ Iztapalapa, México

Báez-González J.G, Pérez Alonso C, Beristain C.I, Vernon-Carter E.J, Vizcarra-Mendoza M.G. (2004). Effective moisture diffusivity in biopolymer drops by regular regime theory. *Food Hydrocolloids*, 18, 325-333.

Banwart, (1979). *Microbiología de los Alimentos* Editorial del Hombre, Barcelona España, 71,74, 237-278.

Buchanan, R. E., & Gibbons N.E, (1974). *Bergey 's Manual Of Determinative Bacteriology*, Eighth Edition, The Williams, Wilkins Company/Baltimore, Baltimore, Md., U.S.A, Waverly Press, INC.

Collins, M.D. and Gibson, G.R. (1999), Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr*, 69, (suppl) 1052S-7S

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.

Dickinson, E. (1992). *An introduction to food colloids*. Oxford, England: Oxford University Press.

Fanger G.O, (1974) *Microencapsulation* 319 avance perspectiva vol 21 (plenum Press Nueva Cork.

Fox JE (1997) Seed Gums. En Imeson A (Ed.) *Thickening and Gelling Agents for Food*. Balckie Academic & Professional. Londres, RU. pp. 262-283.

Fuller R, (1989). Probiotics in man and animal *Journal of Applied Bacteriology*, 66,365-378.

Garibay, M, (2003). Prebioticos Enfoque Alimentación 2 abril/mayo Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana/México

Gauthier, R, (2002). La Salud intestinal: clave para la productividad. *Am,J.Clin Nutr* 71:1682.2000.

Gerdes Sharom (Mayo, 2005). Symbiotic synergy of pro-and prebiotics *Heal/Nutrition*.

Goutcho, M.H (1976) *Microcapsules and techniques* Noyes Data Corporation Park Ridge, New Jersey, EUA

Goycoolea FM, Milas M, Rinaudo M (2001) Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan system. *Int. J. Biol. Macromol.* 29: 181-192.

Kaplan, H. and Hutkins R. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6), 2682-2684.

Kun-Nan Chen, Ming-Ju Chen, Je-Ruei Liu, Chin-Wen Lin, and Hsin- Yi Chiu. (2005). Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70 Nr. 5, 260-266.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, L., Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M., Rizzello, C., and Visconti, A. (2005). Study of adhesion and survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8), 4233-4240.

Lilly. Dm Stillwell R.H, (1965). Probiotics growth promoting factors produced by microorganism *Science* 1965 147/p 747-748.

Loyola M.E, (1956). La Industria del pulque. Banco de México, Depto de Investigaciones Industriales, 1-5.

Mattila-Sandholm, T. , P. Myllärinen, R. Crittenden, G. Mogensen, R. Fondén and M. Saarela. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 12, 173-182.

NCBI, 200. Bifidobacteria and lactobacilli in human health.: Consulta en: [http:// www. ncbi. nlm. nih. gov /](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

NCSS (2001). NCSS-Number cruncher statistical software. Kaysville, Utah, USA.

Nestle, 2003. ¿Que son los prebioticos?.. Consulta en: [http:// www. nestle. cl/](http://www.nestle.cl/)

Mc Clements, DJ, 1999 *Food Emulsions principles, practice, and Technis* CRS pRESS s LLC, USA 376-498.

O'Riordan K., Andreus, D., Buckle, K., and Conway, P., (2001). Evaluation of microencapsulation of Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1059-1066.

Orozco-Villafuerte J, Cruz-Sosa F, Ponce-Alquicira E, Vernon-Carter E.J, Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees *Carbohydrate Polimers* 54, 327-333.

Pardio Sedas VT y cols. Los probióticos y su futuro. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 1994 vol 46 No 1 p 6-10.

Pérez-Alonso C, Baéz-González J.G, Beristain C.I, Vernon-Carter E.J, Vizcarra-Mendoza M.G (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate Polimers*, 53, 197-203.

R.E Buchanan, N. E Gibbons. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Editorial Board., Eigth Edition.

Roberfroid M.B 2000. Prebiotics and probiotics are they funcional Food Am, *J.Clin Nut* 71 (6) 1682 S-16875.

Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L. A., Beristain, C.I., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microencapsulation by spread drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69, E351-E359.

Roller, M., Rechkemmer, G., and Watzl, B. (2004). Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *Journal of Nutritio.*, 134 (1) 153-156.

Roos R.R., Desmond C. Fitzgerald, and Stanton C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *The Society for Applied Microbiology*, 98, 1410-1417.

Rutherford, K. Hendriks. W, (2003). Functional foods and nutraceuticals, *Nutritional biotechnology in the feed and food industries*. Pt. 509.

Schrezenmeir J, (2001). Probiotics, prebiotics and symbiotics approaching a definition". et al. *Am J. Clin. Nutr*; 73 ( suppl): 1660S-4S.

Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M. and Adachi, S. (2006). Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*, 20, 1164-1169.

Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P.(2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen an survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 493-501.

Szekieta, R. Argentina agroalimentaria, un país para descubrir y visitar. periódico empresario. Año 6, 102: 13-14, 2003.

Talwalkar, A. and Kailasapathy, K. (2003). Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. The Australian Journal of Dairy Technology, 58 (1), 36-39.

Talwalkar, A., Miller, C., Kailasapathy, K. & Nguye, M. (2004). Effect of packaging material and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. International Journal of Food Science and Technology, 39 605-611.

Vernon-Carter, E. J., Gómez, S. A., Beristain, C. J., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R., & Moreno-Terrazas, R. C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. Journal of Texture Studies, 27, 625–641.

Wen-Chian Lian, Hung-Chi Hsiao and Cheng-Chun Chou, (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. International Journal of Food Microbiology, 86, 293-301.

Yahaira G, (2004) Aprovechamiento de suero de leche de cabra como sustrato para el desarrollo de un producto fermentado probiótico con *Bifidobacterium Bifidum* y *Lactobacillus acidophilus*. Instituto Tecnológico y de estudios superiores de Monterrey.

Zúñiga R, (2004). Alimentos Funcionales, Departamento de Desarrollo de productos Funcionales. División de Autenticidad del Ciatej (México).

**ANEXO A**

**ANALISIS ESTADISTICO**

**REPORTE DEL ANALISIS DE VARIANZA**

BASE DE DATOS: CINETICA DE PRIMER ORDEN  
 RESPUESTA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE MUERTE DE *B. bifidum* (k)

**TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: GRUPOS	17	2.876112	0.169183	11358.02	0.000000*	
S	17	2.532231E-04	1.489547E-05			
Total (Adjusted)	34	2.876365				
Total	35					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Means and Effects Section**

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	35	0.2543111		
A: GRUPOS				
1	2	0.15835	2.729054E-03	-
9.346081E-02				
2	2	0.36975	2.729054E-03	
0.1179392				
3	2	0.0413	2.729054E-03	-
0.2105108				
4	2	0.048045	2.729054E-03	-
0.2037658				
5	2	0.0672	2.729054E-03	-
0.1846108				
6	2	0.153	2.729054E-03	-
9.881081E-02				
7	2	0.4435	2.729054E-03	
0.1916892				
8	2	0.1236	2.729054E-03	-
0.1282108				
9	2	0.0543	2.729054E-03	-
0.1975108				
10	2	0.06165	2.729054E-03	-
0.1901608				
11	2	0.0799	2.729054E-03	-
0.1719108				
12	1	0.1643	3.859465E-03	-
0.0875108				
13	2	0.995	2.729054E-03	
0.7431892				
14	2	0.9949995	2.729054E-03	
0.7431887				
15	2	0.12775	2.729054E-03	-
0.1240608				
16	2	0.2015	2.729054E-03	-
5.031081E-02				
17	2	0.2242	2.729054E-03	-
0.0276108				
18	2	0.22425	2.729054E-03	-
2.756081E-02				



## **IDENTIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS**

Grupo 1 SL17GM17MD66 con aguamiel secada a 130°C

Grupo 2 SL17GM17MD66 sin aguamiel secada a 130°C

Grupo 3 SL17GM17MD66 con aguamiel secada a 140°C

Grupo 4 SL17GM17MD66 sin aguamiel secada a 140°C

Grupo 5 SL17GM17MD66 con aguamiel secada a 155°C

Grupo 6 SL17GM17MD66 sin aguamiel secada a 155°C

Grupo 7 GA17GM66MD17 con aguamiel secada a 130°C

Grupo 8 GA17GM66MD17 sin aguamiel secada a 130°C

Grupo 9 GA17GM66MD17 con aguamiel secada a 140°C

Grupo 10 GA17GM66MD17 sin aguamiel secada a 140°C

Grupo 11 GA17GM66MD17 con aguamiel secada a 155°C

Grupo 12 GA17GM66MD17 sin aguamiel secada a 155°C

Grupo 13 GA50 GM50 con aguamiel secada a 130°C

Grupo 14 GA50 GM50 sin aguamiel secada a 130°C

Grupo 15 GA50 GM50 con aguamiel secada a 140°C

Grupo 16 GA50 GM50 sin aguamiel secada a 140°C

Grupo 17 GA50 GM50 con aguamiel secada a 155°C

Grupo 18 GA50 GM50 sin aguamiel secada a 155°C

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: CONSTANTE DE VELOCIDAD DE MUERTE DE *B. bifidum* (k)  
 Term A: GRUPOS

Alpha=0.050 Error Term=S DF=17 MSE=1.489547E-05 Critical Value=5.734036

Group	Count	Mean	Different From Groups
3	2	0.0413	10, 5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
4	2	0.048045	5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
9	2	0.0543	11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
10	2	0.06165	3, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
5	2	0.0672	3, 4, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
11	2	0.0799	3, 4, 9, 10, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
8	2	0.1236	3, 4, 9, 10, 5, 11, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
15	2	0.12775	3, 4, 9, 10, 5, 11, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
6	2	0.153	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
1	2	0.15835	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
12	1	0.1643	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 16, 17, 18, 2, 7, 14, 13
16	2	0.2015	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 17, 18, 2, 7, 14, 13
17	2	0.2242	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 2, 7, 14, 13
18	2	0.22425	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 2, 7, 14, 13
2	2	0.36975	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 7, 14, 13
7	2	0.4435	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 14, 13
14	2	0.9949995	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7
13	2	0.995	3, 4, 9, 10, 5, 11, 8, 15, 6, 1, 12, 16, 17, 18, 2, 7

**ANALISIS ESTADISTICO POR BLOQUES**

Response: CONSTANTE DE VELOCIDAD DE MUERTE DE *B. bifidum* (k)

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: FORM_3_	2	0.7495151	0.3747576	25159.16	0.000000*	1.000000
B: CON_AG_SIN_AG	1	2.355633E-03	2.355633E-03	158.14	0.000000*	1.000000

AB	2	4.497532E-02	2.248766E-02	1509.70	0.000000*
		1.000000			
C: TEM_SEC	2	1.196637	0.5983187	40167.82	0.000000*
		1.000000			
AC	4	0.6277897	0.1569474	10536.59	0.000000*
		1.000000			
BC	2	0.012952	6.475999E-03	434.76	0.000000*
		1.000000			
ABC	4	9.797452E-02	2.449363E-02	1644.37	0.000000*
		1.000000			
S	17	2.532231E-04	1.489547E-05		
Total (Adjusted)	34	2.876365			
Total	35				

\* Term significant at alpha = 0.05

### Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	35	0.2543111		
		0.2518108		
A: FORM_3_				
1	12	0.1396075	1.114132E-03	-
0.1122033				
2	11	0.1536545	1.163673E-03	-
9.726914E-02				
3	12	0.4612832	1.114132E-03	
		0.2094724		
B: CON_AG_SIN_AG				
1	18	0.2435	9.096847E-04	-
8.310806E-03				
2	17	0.2657582	9.360579E-04	
		8.310806E-03		
C: TEM_SEC				
130	12	0.5141999	1.114132E-03	
		0.2623891		
140	12	8.909083E-02	1.114132E-03	-0.16272
155	11	0.1510364	1.163673E-03	-
9.966914E-02				
AB: FORM_3_,CON_AG_SIN_AG				
1,1	6	0.08895	1.57562E-03	-
4.234669E-02				
1,2	6	0.190265	1.57562E-03	
		4.234669E-02		
2,1	6	0.1925667	1.57562E-03	
		4.633581E-02		
2,2	5	0.10696	1.726005E-03	-
4.633581E-02				
3,1	6	0.4489833	1.57562E-03	-
3.989111E-03				
3,2	6	0.4735832	1.57562E-03	
		3.989111E-03		
AC: FORM_3_,TEM_SEC				
1,130	4	0.26405	1.929733E-03	-
0.1379466				
1,140	4	0.0446725	1.929733E-03	
		6.778497E-02		
1,155	4	0.1101	1.929733E-03	
		7.016164E-02		
2,130	4	0.28355	1.929733E-03	-
0.1333808				

2,140	4	0.057975	1.929733E-03	
	0.0661533			
2,155	3	0.1080333	2.228264E-03	
	6.722748E-02			
3,130	4	0.9949998	1.929733E-03	
	0.2713274			
3,140	4	0.164625	1.929733E-03	-
0.1339383				
3,155	4	0.224225	1.929733E-03	-
0.1373891				
BC: CON_AG_SIN_AG,TEM_SEC				
1,130	6	0.5322833	1.57562E-03	
	2.639422E-02			
1,140	6	0.07445	1.57562E-03	-
6.330028E-03				
1,155	6	0.1237667	1.57562E-03	-
2.006419E-02				
2,130	6	0.4961165	1.57562E-03	-
2.639422E-02				
2,140	6	0.1037317	1.57562E-03	
	6.330028E-03			
2,155	5	0.18376	1.726005E-03	
	2.006419E-02			
ABC: FORM_3_,CON_AG_SIN_AG,TEM_SEC				
1,1,130	2	0.15835	2.729054E-03	-
8.143672E-02				
1,1,140	2	0.0413	2.729054E-03	
	5.361503E-02			
1,1,155	2	0.0672	2.729054E-03	
	2.782169E-02			
1,2,130	2	0.36975	2.729054E-03	
	8.143672E-02			
1,2,140	2	0.048045	2.729054E-03	-
5.361503E-02				
1,2,155	2	0.153	2.729054E-03	-
2.782169E-02				
2,1,130	2	0.4435	2.729054E-03	
	9.553078E-02			
2,1,140	2	0.0543	2.729054E-03	-
3.536997E-02				
2,1,155	2	0.0799	2.729054E-03	-
0.0601608				
2,2,130	2	0.1236	2.729054E-03	-
9.553078E-02				
2,2,140	2	0.06165	2.729054E-03	
	3.536997E-02			
2,2,155	1	0.1643	3.859465E-03	
	0.0601608			
3,1,130	2	0.995	2.729054E-03	-
1.409406E-02				
3,1,140	2	0.12775	2.729054E-03	-
1.824506E-02				

Response                      CONSTANTE DE VELOCIDAD DE MUERTE DE *B. bifidum* (k)

#### Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
ABC: FORM_3_,CON_AG_SIN_AG,TEM_SEC				

3,1,155	2	0.2242	2.729054E-03
		3.233911E-02	
3,2,130	2	0.9949995	2.729054E-03
		1.409406E-02	
3,2,140	2	0.2015	2.729054E-03
		1.824506E-02	
3,2,155	2	0.22425	2.729054E-03
3.233911E-02			

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CONSTANTE DE VELOCIDAD DE MUERTE DE *B. bifidum* (k)  
Term A: FORM\_3\_

Alpha=0.050 Error Term=S DF=17 MSE=1.489547E-05 Critical Value=3.62798

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	12	0.1396075	2, 3
2	11	0.1536545	1, 3
3	12	0.4612832	1, 2

Term B: CON\_AG\_SIN\_AG

Alpha=0.050 Error Term=S DF=17 MSE=1.489547E-05 Critical Value=2.983746

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	18	0.2435	2
2	17	0.2657582	1

Term C: TEM\_SEC

Alpha=0.050 Error Term=S DF=17 MSE=1.489547E-05 Critical Value=3.62798

Group	Count	Mean	Different From Groups
140	12	8.909083E-02	155, 130
155	11	0.1510364	140, 130
130	12	0.5141999	140, 155

Response: CONSTANTE DE VELOCIDAD DE MUERTE DE *B. bifidum* (k)

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CONSTANTE DE VELOCIDAD DE MUERTE DE *B. bifidum* (k)  
Term AB: FORM\_3\_,CON\_AG\_SIN\_AG

Alpha=0.050 Error Term=S DF=17 MSE=1.489547E-05 Critical Value=4.523675

Group	Count	Mean	Different From Groups
1,1	6	0.08895	(2,2), (1,2), (2,1), (3,1), (3,2)
2,2	5	0.10696	(1,1), (1,2), (2,1), (3,1), (3,2)

1,2	6	0.190265	(1,1), (2,2), (3,1), (3,2)
2,1	6	0.1925667	(1,1), (2,2), (3,1), (3,2)
3,1	6	0.4489833	(1,1), (2,2), (1,2), (2,1), (3,2)
3,2	6	0.4735832	(1,1), (2,2), (1,2), (2,1), (3,1)

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CONSTANTE DE VELOCIDAD DE MUERTE DE *B. bifidum* (k)  
 Term AC: FORM\_3\_,TEM\_SEC

Alpha=0.050 Error Term=S DF=17 MSE=1.489547E-05 Critical Value=4.990773

Group	Count	Mean	Different From Groups
1,140 (3,155)	4	0.0446725	(2,140), (2,155), (1,155), (3,140), (1,130), (2,130), (3,130)
2,140 (3,155)	4	0.057975	(1,140), (2,155), (1,155), (3,140), (1,130), (2,130), (3,130)
2,155 (1,130)	3	0.1080333	(1,140), (2,140), (3,140), (3,155), (2,130), (3,130)
1,155 (1,130)	4	0.1101	(1,140), (2,140), (3,140), (3,155), (2,130), (3,130)
3,140 (3,155)	4	0.164625	(1,140), (2,140), (2,155), (1,155), (1,130), (2,130), (3,130)
3,155 (3,140)	4	0.224225	(1,140), (2,140), (2,155), (1,155), (1,130), (2,130), (3,130)
1,130 (3,140)	4	0.26405	(1,140), (2,140), (2,155), (1,155), (3,155), (2,130), (3,130)
2,130 (3,140)	4	0.28355	(1,140), (2,140), (2,155), (1,155), (3,155), (1,130), (3,130)
3,130 (3,140)	4	0.9949998	(1,140), (2,140), (2,155), (1,155), (3,155), (1,130), (2,130)

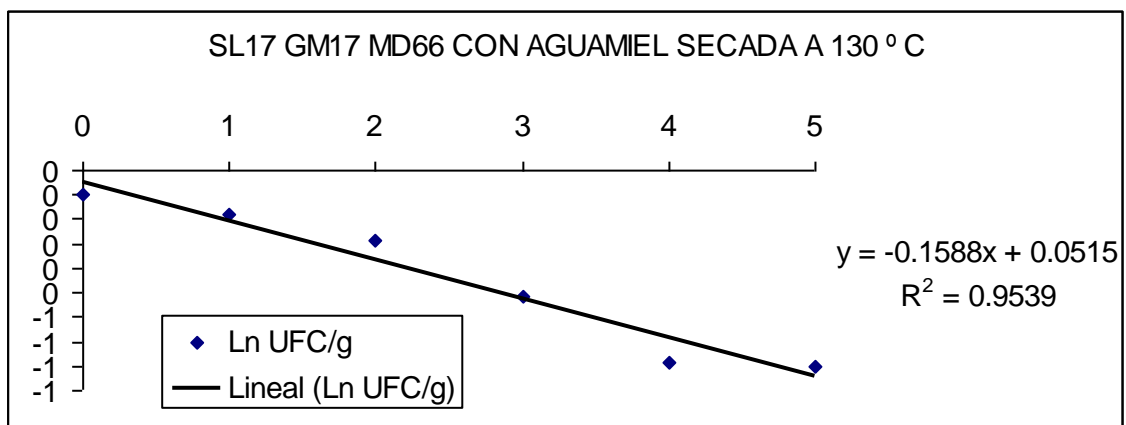
Term BC: CON\_AG\_SIN\_AG,TEM\_SEC

Alpha=0.050 Error Term=S DF=17 MSE=1.489547E-05 Critical Value=4.523675

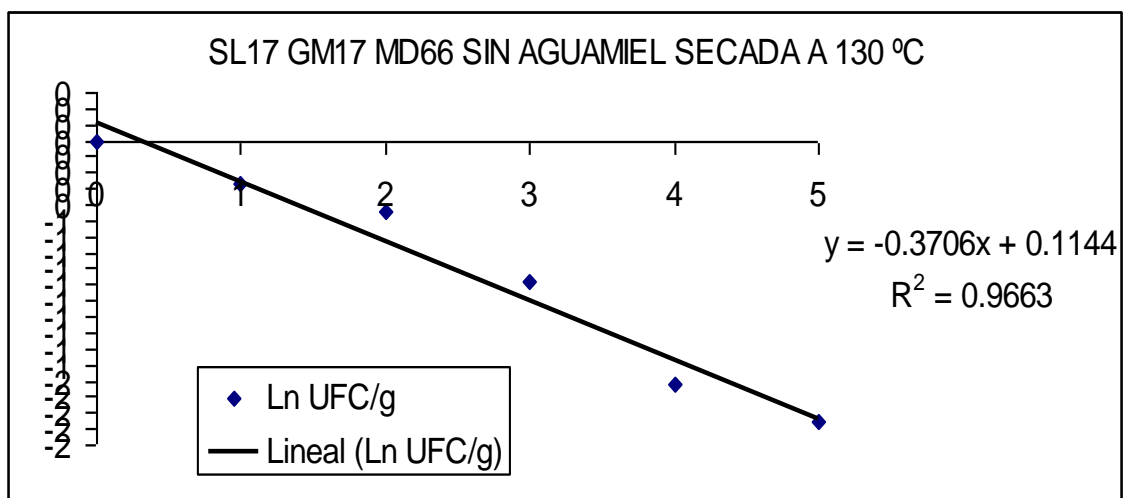
<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
1,140 (1,130)	6	0.07445	(2,140), (1,155), (2,155), (2,130),
2,140 (1,130)	6	0.1037317	(1,140), (1,155), (2,155), (2,130),
1,155 (1,130)	6	0.1237667	(1,140), (2,140), (2,155), (2,130),
2,155 (1,130)	5	0.18376	(1,140), (2,140), (1,155), (2,130),
2,130 (1,130)	6	0.4961165	(1,140), (2,140), (1,155), (2,155),
1,130 (2,130)	6	0.5322833	(1,140), (2,140), (1,155), (2,155),

## ANEXO B AJUSTES DE CINETICA

T=130C	SL117 GM17MD66	C/A	S/A	
	tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización
	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
	1.0000	0.9231	-0.0800	0.7598
	2.0000	0.8288	-0.1878	0.6447
	3.0000	0.6587	-0.4174	0.4135
	4.0000	0.5043	-0.6845	0.2198
	5.0000	0.4951	-0.7030	0.1718
	k	0.1129	0.1588	0.1712
	r	0.9654	0.9539	0.9774
	Tvidamedia	4.4287	4.3640	2.9206
		orden cero	1er orden	orden cero
				1er orden

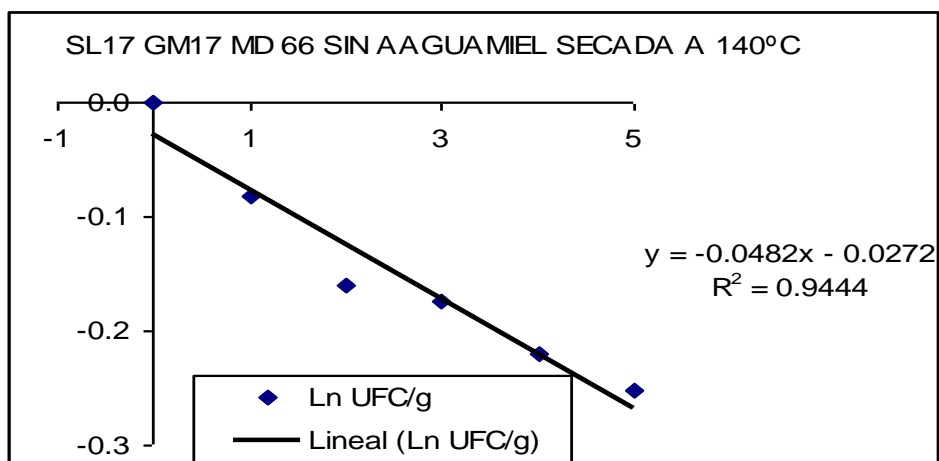
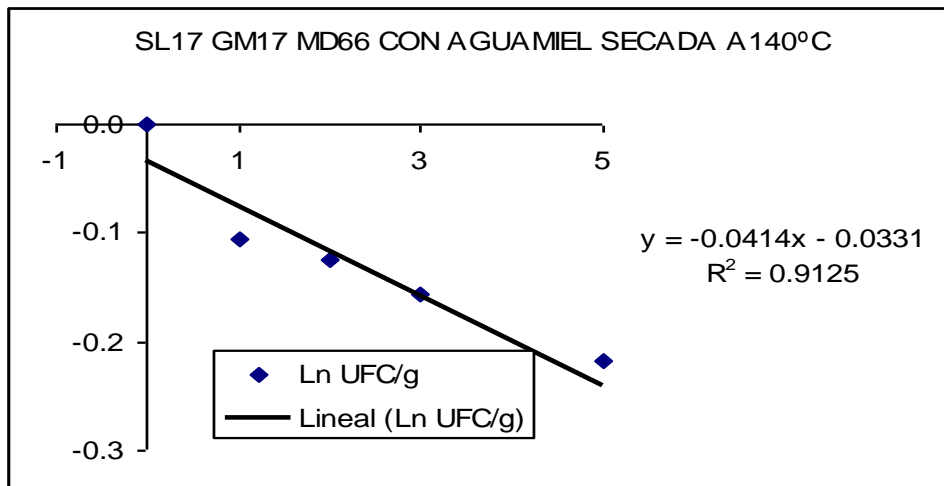


SIN AGUAMIEL

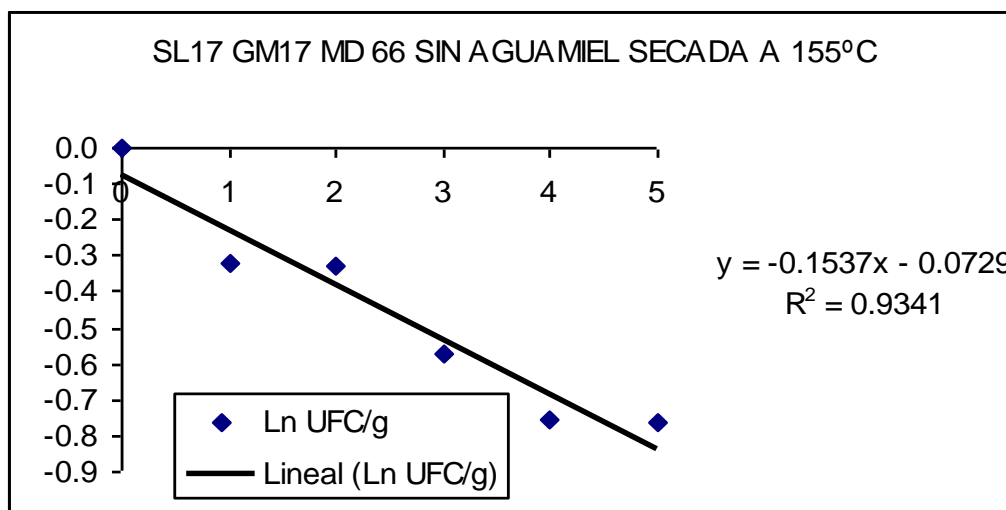
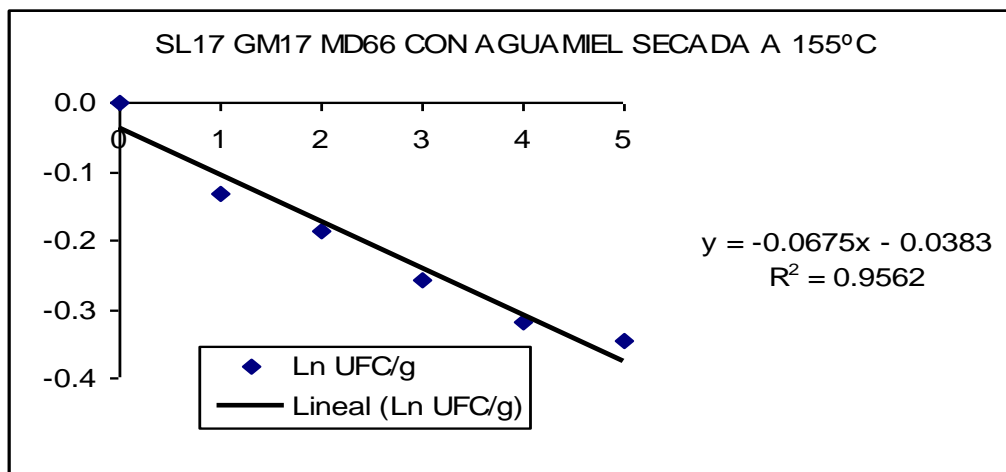




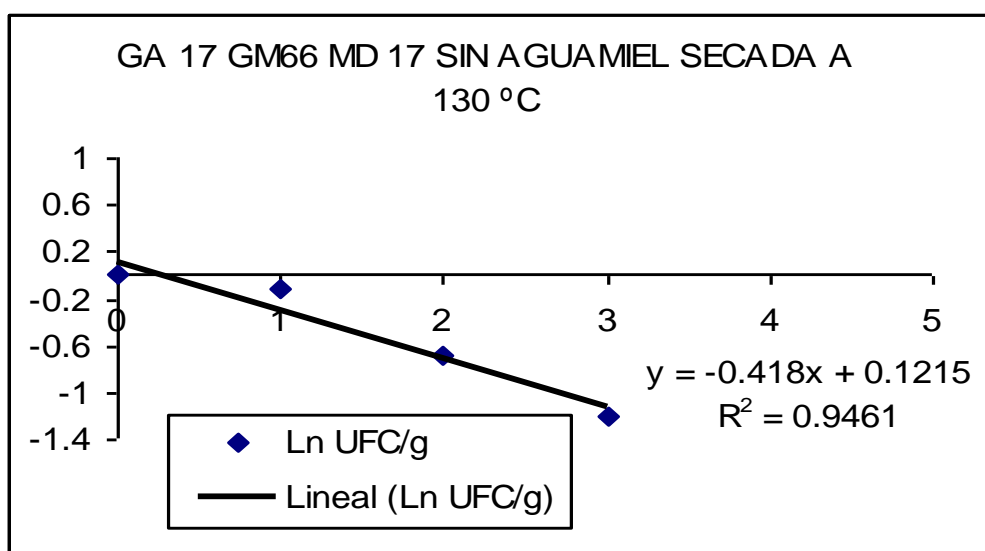
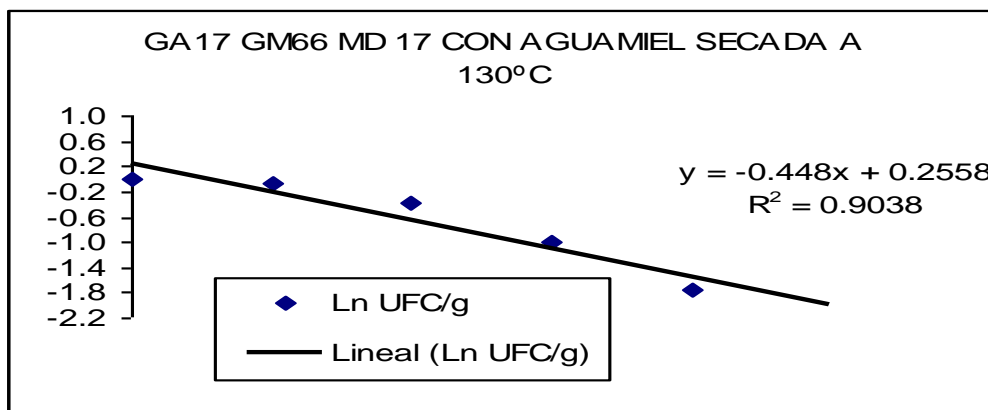
T=140C	SL117 GM17MD66	C/A	S/A	
	tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización
	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
	1.0000	0.9000	-0.1054	0.9219
	2.0000	0.8821	-0.1254	0.8517
	3.0000	0.8555	-0.1561	0.8410
	4.0000	0.8066	-0.2149	0.8029
	5.0000	0.8039	-0.2182	0.7772
	k	0.0368	0.0414	0.0423
	r	0.8962	0.9125	0.9287
	Tvidamedia	13.5870	16.7391	11.8203
		orden cero	1er orden	orden cero
				1er orden



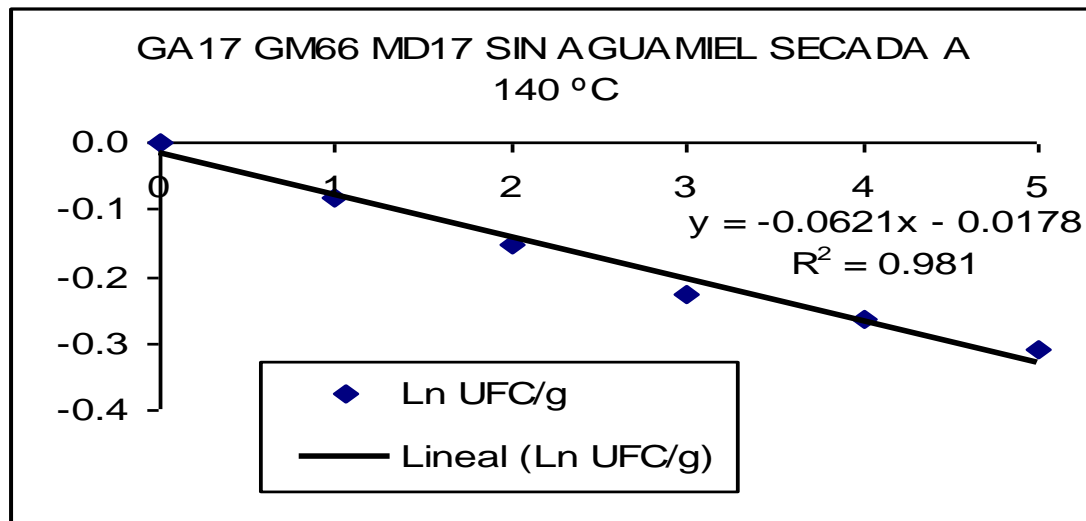
T=155C	SL117 GM17MD66		C/A	S/A	
	tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización	ln(Normalización)
	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
	1.0000	0.8757	-0.1327	0.7277	-0.3179
	2.0000	0.8302	-0.1861	0.7193	-0.3294
	3.0000	0.7728	-0.2577	0.5631	-0.5742
	4.0000	0.7265	-0.3195	0.4683	-0.7587
	5.0000	0.7075	-0.3460	0.4666	-0.7624
	k	0.0562	0.0675	0.1029	0.1537
	r	0.9338	0.9562	0.8942	0.9341
	Tvidamedia	8.8968	10.2667	4.8591	4.5088



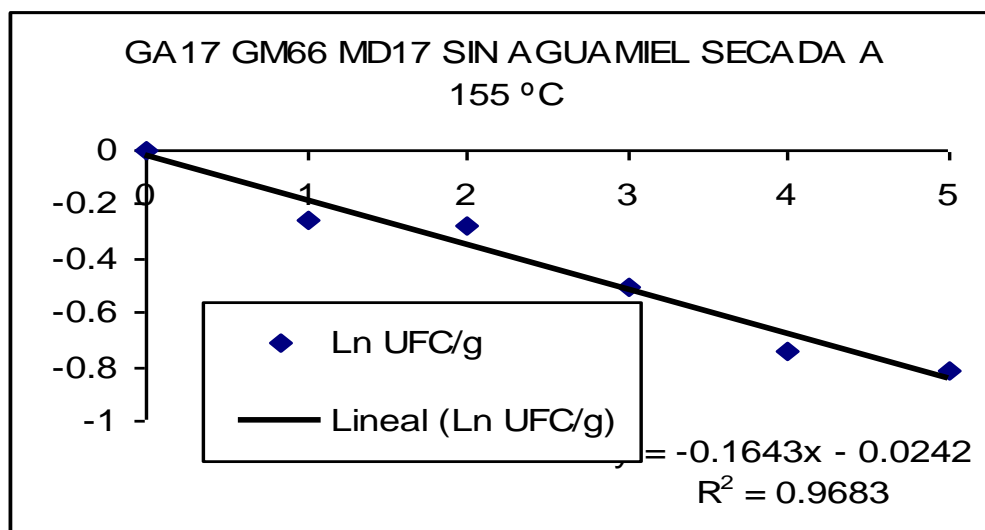
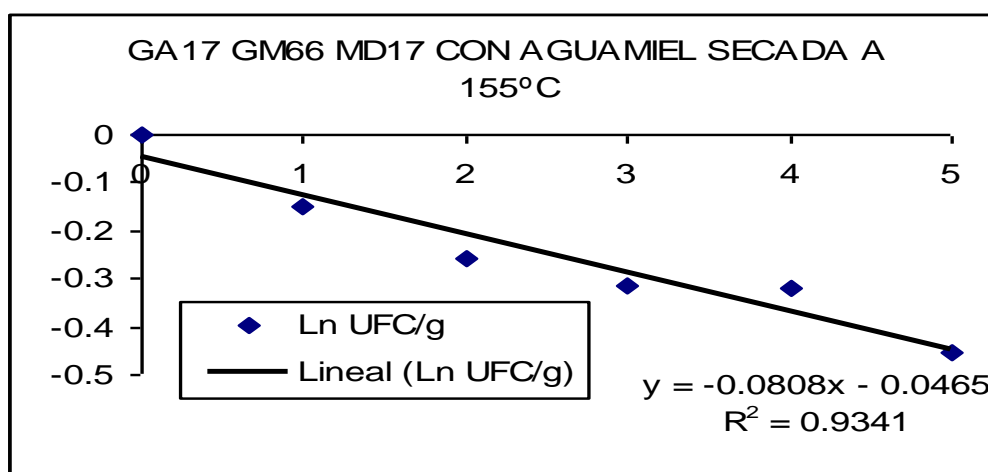
T=130C	GA17GM6MD17	C/A	S/A	
	tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización
	0	1	0	1
	1	0.94608612	-0.055421676	0.88258054
	2	0.68666438	-0.375909637	0.5
	3	0.36623697	-1.004474694	0.3
	4	0.171108353	-1.765603368	0
	5	0	0	0
	k	0.2184	0.448	0.2242
	r	0.9765	0.9038	0.9568
	Tvidamedia	2.28937729	1.546875	2.23015165
		orden cero	1er orden	orden cero
				1er orden



T=140C	GA17GM6MD17		C/A	S/A	
	tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización	ln(Normalización)
	0	1	0	1	0
	1	0.88967288	-0.11690144	0.9200234	-0.08335618
	2	0.84113029	-0.17300871	0.85957931	-0.15131219
	3	0.82526109	-0.19205547	0.79646881	-0.22756731
	4	0.75467615	-0.28146656	0.76655839	-0.26584441
	5	0.75163948	-0.28549849	0.73351983	-0.30990065
	k	0.0475	0.0554	0.053	0.0621
	r	0.9123	0.9298	0.9687	0.981
	Tvidamedia	10.5263158	12.5090253	9.43396226	11.1594203
		orden cero	1er orden	orden cero	1er orden

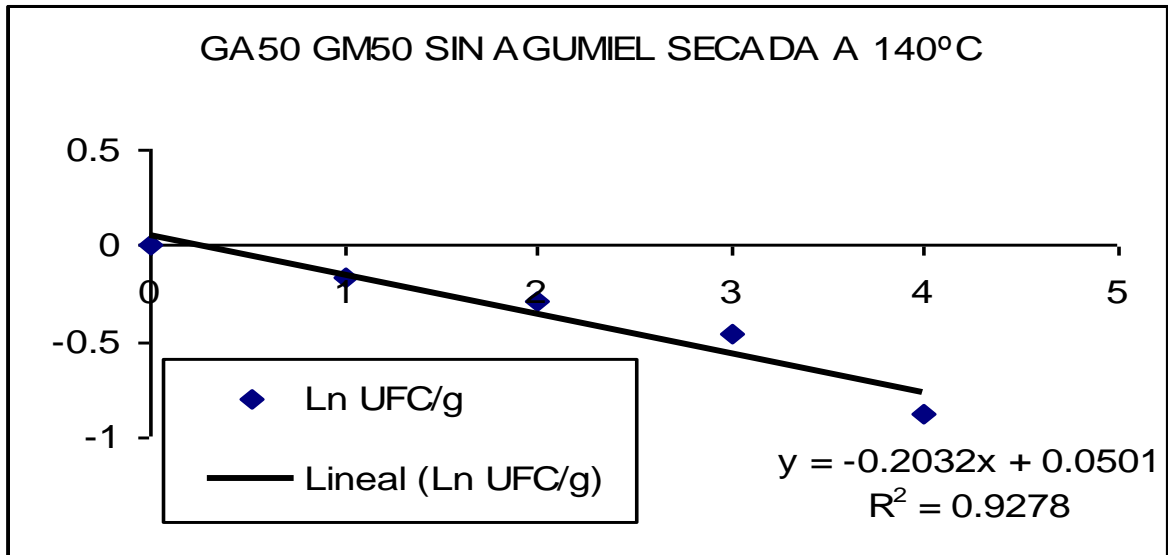
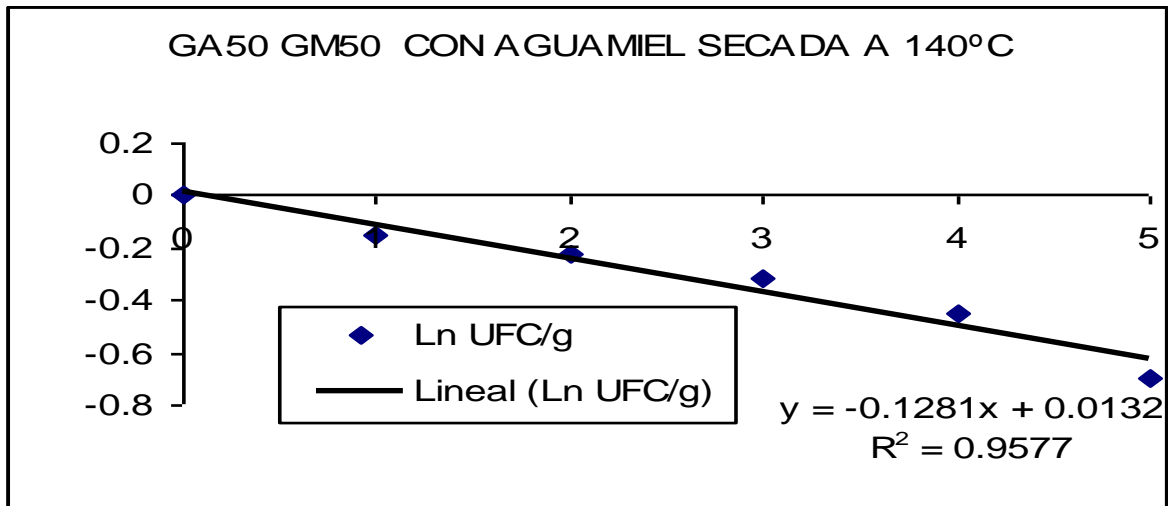


T=155C	GA17GM6MD17	C/A	S/A	
tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización	ln(Normalización)
0	1	0	1	0
1	0.86154164	-0.14903189	0.77117008	-0.25984633
2	0.77411714	-0.25603207	0.75394177	-0.28244014
3	0.7301852	-0.31445707	0.60074184	-0.50958998
4	0.72614823	-0.32000111	0.47557825	-0.74322384
5	0.63687266	-0.45118554	0.44270436	-0.81485308
k	0.0647	0.0808	0.1093	0.1643
r	0.9104	0.9341	0.9493	0.9683
Tvidamedia	7.72797527	8.57673267	4.57456542	4.2178941

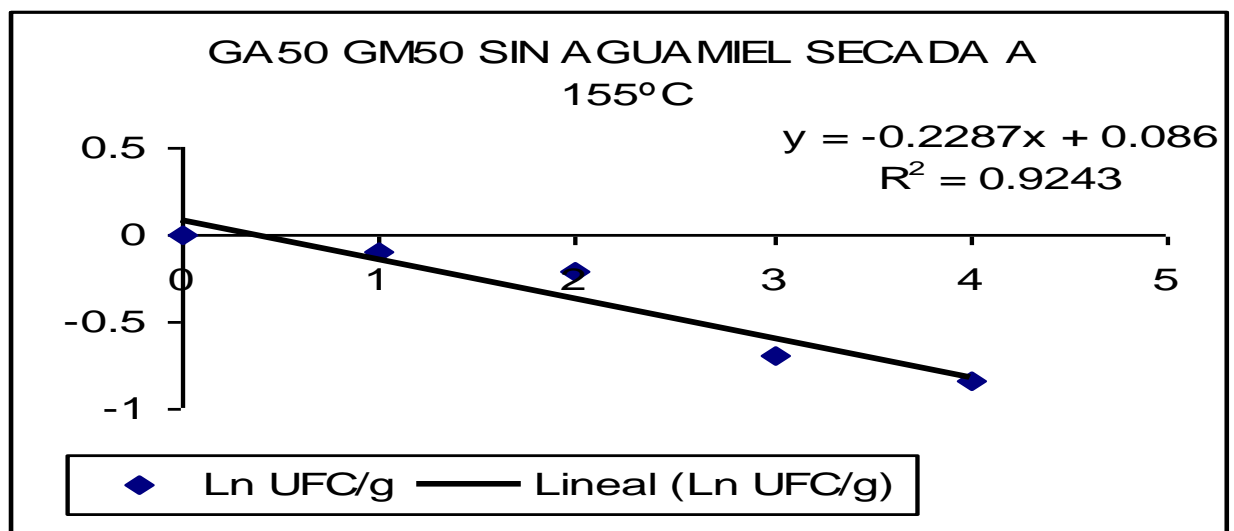
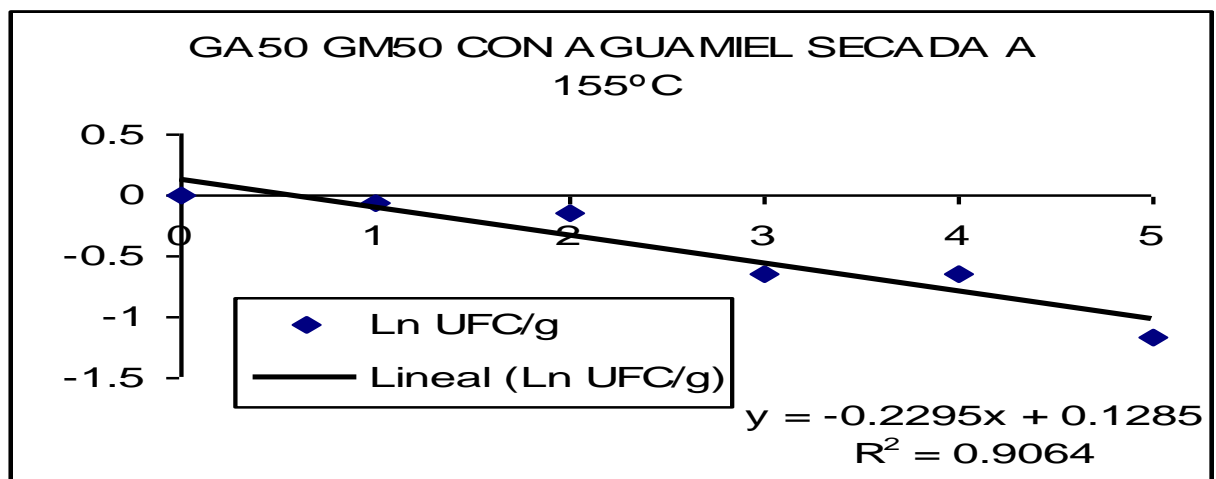


T=130C	GA50GM50		C/A	S/A	
	tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización	ln(Normalización)
	0	1	0	0	0
	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	k	1	0	0	0
	r	1	0	0	0
	Tvidamedia	0.5	0	0	0
		orden cero	1er orden	orden cero	1er orden

T=140C	GA50GM50		C/A	S/A	
	tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización	ln(Normalización)
	0	1	0	1	0
	1	0.86028929	-0.150486559	0.84397605	-0.16963116
	2	0.79646332	-0.227574203	0.75155032	-0.28561711
	3	0.73002123	-0.314681661	0.63681394	-0.45127776
	4	0.63838896	-0.448807524	0.41675568	-0.87525514
	5	0.49656427	-0.700042351	0	0
	k	0.0928	0.1281	0.1828	0.2032
	r	0.9805	0.9577	0.9175	0.9278
	Tvidamedia	5.38793103	5.409836066	2.73522976	3.41043307
		orden cero	1er orden	orden cero	1er orden

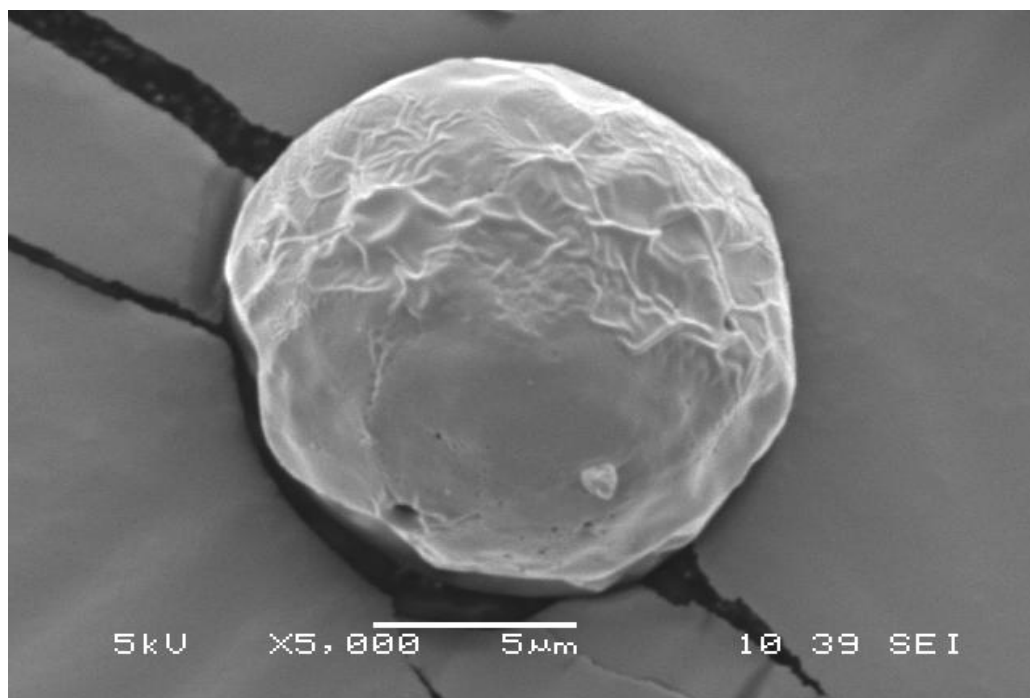


T=155C	GA50GM50		C/A	S/A	
	tiempo	Normalización	ln(Normalización)	Normalización	ln(Normalización)
	0	1	0	1	0
	1	0.9318883	-0.07054232	0.90592025	-0.098804
	2	0.86115687	-0.14947859	0.80499739	-0.21691624
	3	0.52713052	-0.64030709	0.49810809	-0.69693818
	4	0.5209191	-0.65216053	0.42981081	-0.84441015
	5	0.31366032	-1.15944465	0	0
	k	0.1428	0.2295	0.1924	0.2287
	r	0.9378	0.9064	0.9328	0.9243
	Tvidamedia	3.50140056	3.01960784	2.5987526	3.03017053

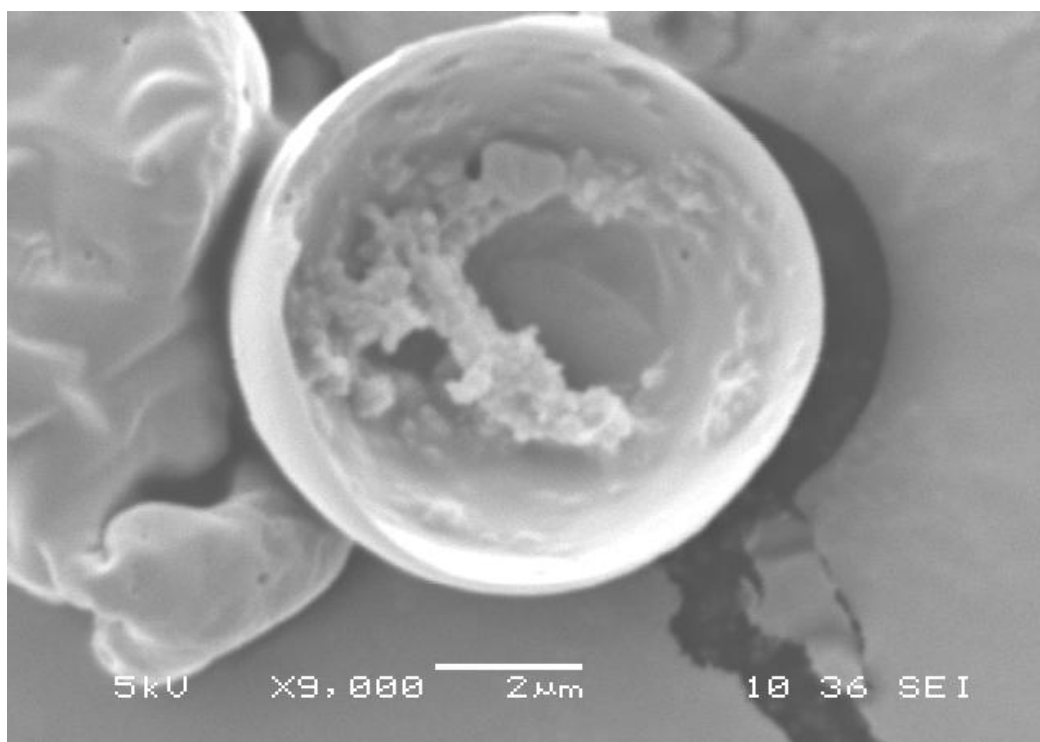




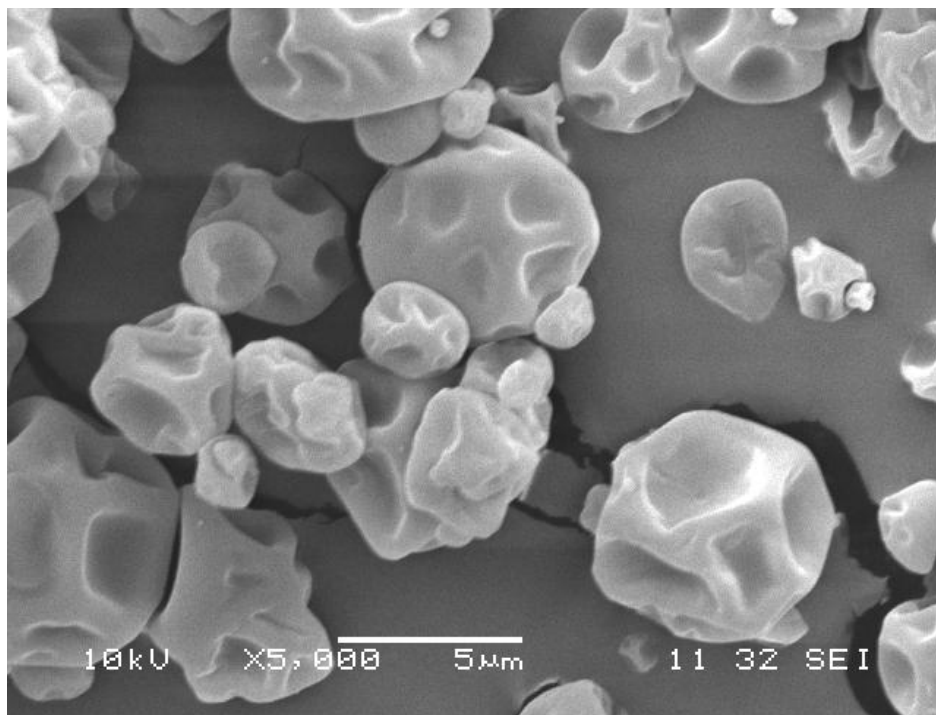
**ANEXO C MICROGRAFIAS DE LOS POLVOS MOSTRANDO LA MICROESTRUCTURA INTERNA Y EXTERNA**



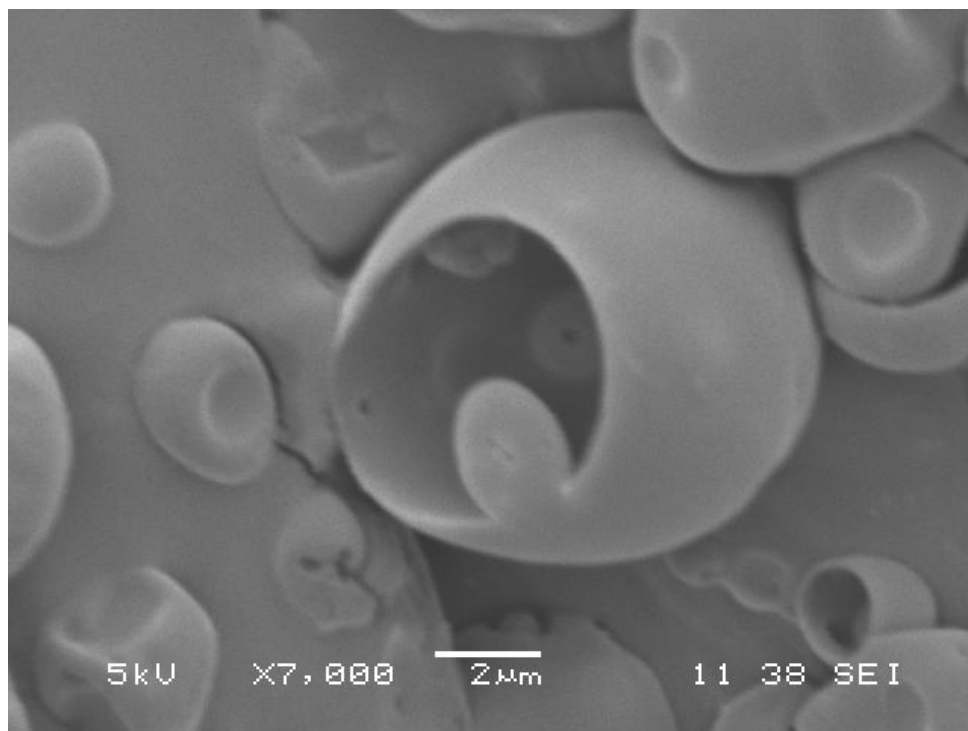
SL17 GM17MD66 SIN AGUAMIEL SECADA A 130 °C



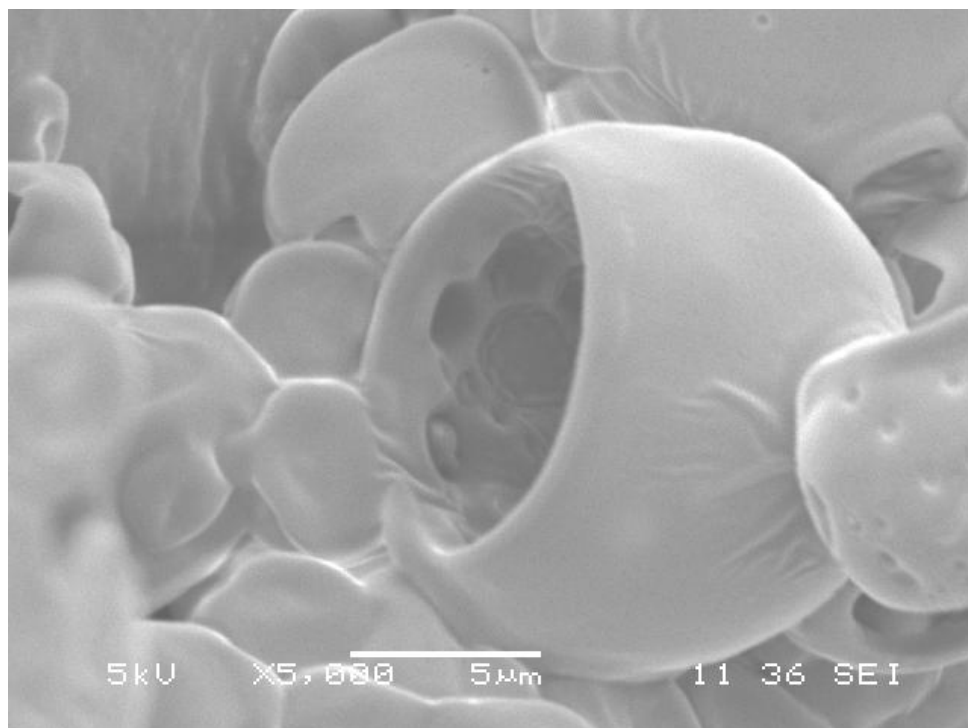
SL17 GM17MD66 CON AGUAMIEL SECADA A 140 °C



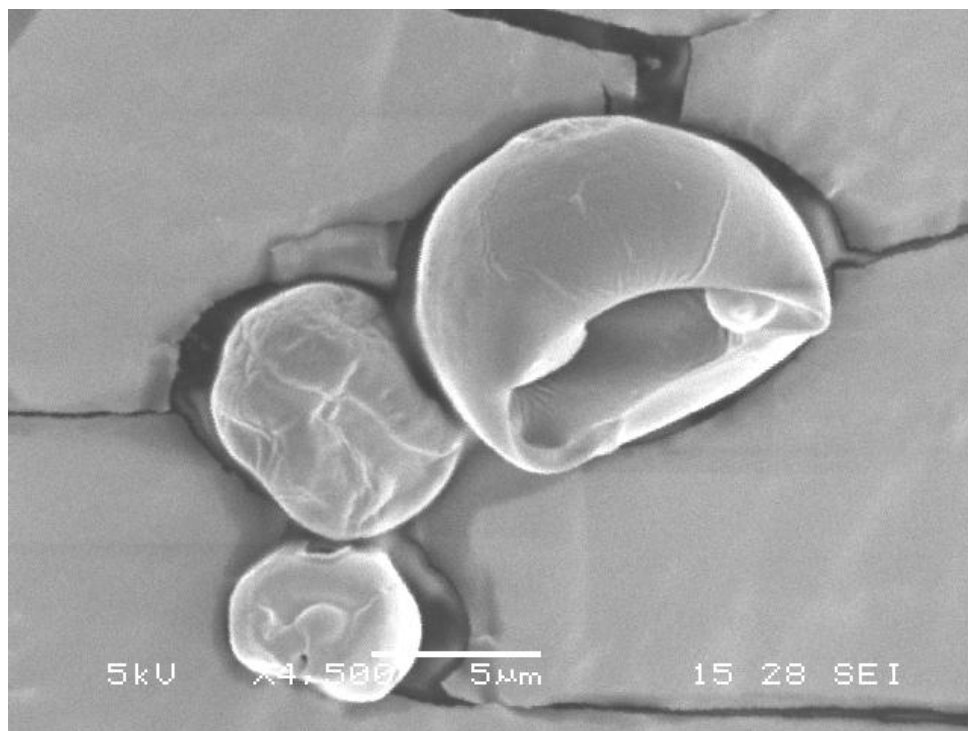
SL17 GM17MD66 CON AGUAMIEL SECADA A 140 °C



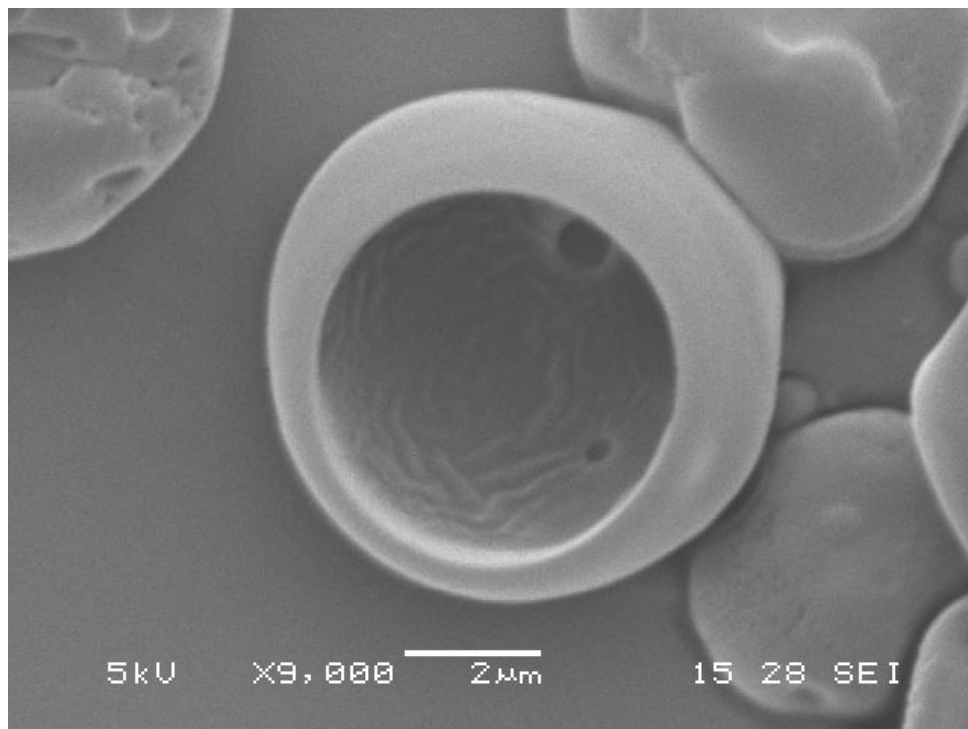
GA17 GM66-MD17 CON AGUAMIEL SECADA A 140 °C



GA17 GM66-MD17 CON AGUAMIEL SECADA A 155 °C



GA50 GM50 CON AGUAMIEL SECADA A 140 °C



GA50 GM50 SIN AGUAMIEL SECADA A 140 °C











