



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Efecto del tipo de encapsulación sobre la viabilidad y
funcionalidad de un simbiótico.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

Q.A. Víctor Sergio Serrano Casas

Comité tutorial
Dra. Ma. de Lourdes Pérez Chabela
Dra. Amelia Farres González-Sarabia
Dr. Alfonso Totosa Sánchez

Ciudad de México a 10 de marzo de 2016

El Posgrado de Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT con la referencia 001465.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Pérez Chabela con el apoyo de la Beca No. 300614 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados:

“Efecto del tipo de encapsulación sobre la viabilidad y funcionalidad de un simbiótico”

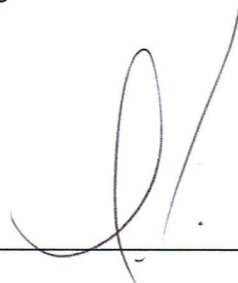
que presentó

Q.A. Víctor Sergio Serrano Casas

El día 10 de marzo del 2016

Directora:

Dra. María de Lourdes Pérez Chabela



Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

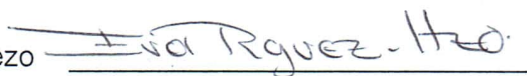
H. Jurado:

Presidente: Dra. Edith Cortés Barberena



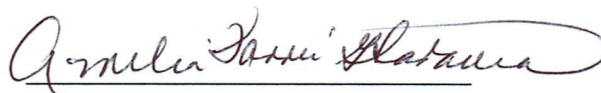
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Secretario: Dra. María Eva Rodríguez Huevo



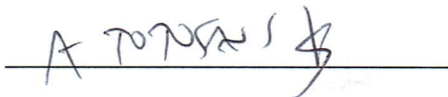
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

Sinodal: Dra. Amelia Farrés González Sarabia



Universidad Nacional Autónoma Metropolitana

Sinodal: Dr. Alfonso Totosaus Sánchez



Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de la beca para la realización de mis estudios de Maestría en Biotecnología.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por recibirme como estudiante de Posgrado, en especial al área de Biotecnología.

Doy un agradecimiento especial a la Dra. María de Lourdes Pérez Chabela por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por todo lo que me ha enseñado y las oportunidades que me ha brindado, tanto para mi crecimiento personal, como el profesional; por sus consejos y dedicación en este proyecto y por darme todas las herramientas necesarias para realizarlo. Sin duda ha sido muy especial para mí trabajar juntos en este proyecto.

Al Dr. Alfonso Totosaus por el esfuerzo dedicado en la revisión, por sus asesorías en la parte estadística y por abrirme las puertas de su laboratorio cuando lo he necesitado.

A la Dra. Edith Cortés por su apoyo en el uso de citometría de flujo, por toda la atención brindada, por su asesoría y esfuerzo en la construcción y revisión de este trabajo.

A la Dra. Eva Rodríguez por todo el trabajo y esfuerzo que implicó la técnica de secado por aspersión, por su apoyo con el equipo, asesoría y por la revisión de este trabajo.

A la Dra. Amelia Farrés por trabajar una vez más en un proyecto juntos, por el apoyo y revisión de este trabajo.

Al Dr. Demetrio Ambriz por el apoyo en el uso del microscopio de fluorescencia.

**A cada una de las personas que han estado presentes
en este viaje y que forman parte de mi vida y de lo que soy.**

Índice

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Bacterias Ácido Lácticas	12
2.2 Bacterias Ácido Lácticas Termotolerantes	13
2.3 Probióticos	15
2.4 Prebióticos	17
2.4.1 Clasificación de Prebióticos	19
2.4.1.1 Los fructanos	19
2.4.1.2 Galactooligosacáridos.....	19
2.4.2 Los co-productos agroindustriales como fuente de prebióticos y fibra.....	20
2.5 Simbióticos.....	23
2.6 Objetivos y definición de la encapsulación.....	25
2.6.1 Métodos de dispersión para la microencapsulación.....	27
2.6.1.1 Congelación y secado por aspersion	27
2.6.1.2 Gelificación enzimática por emulsión.....	28
2.6.1.3 Gelificación por polimerización interfacial	28
2.6.1.4 Extrusión	28
2.6.1.5 Gelificación iónica por emulsión.....	29
2.6.1.5 Secado por aspersion	29
2.6.2 Materiales utilizados para microencapsulación	30
2.6.2.1 Goma de gelana y goma de xantana	30
2.6.2.2 κ -carragenina	30
2.6.2.3 Ftalato acetato de celulosa	30

2.6.2.4 Quitosano	31
2.6.2.5 Almidón	31
2.6.2.6 Proteínas de la leche	31
2.6.2.7 Alginatos	32
2.6.2.8 Goma arábica	33
2.6.3 Encapsulación de bacterias lácticas probióticas y simbióticos.....	34
2.7 Viabilidad de bacterias probióticas.....	36
2.7.1 Citometria de flujo	37
2.7.1.1 Estudios de viabilidad utilizando citometria de flujo	37
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo general	41
4.2 Objetivos particulares.....	41
5. METODOLOGÍA.....	42
PRIMER ETAPA. Formación y caracterización de las dispersiones de biopolímeros para llevar a cabo la microencapsulación.....	43
5.1 Bacterias ácido lácticas.....	43
5.2 Obtención de harinas de co-productos agroindustriales	43
5.3 Caracterización de las dispersiones.....	44
5.4 Microencapsulación	44
5.4.1 Microencapsulación por emulsión.....	44
5.4.2 Microencapsulación por secado por aspersion	45
SEGUNDA ETAPA. Caracterización de las microcápsulas, tamaño de partícula, viabilidad y funcionalidad en la vida de anaquel y resistencia a condiciones gástricas.....	45
5.5 Determinación del tamaño de partícula de microcápsulas.....	45

5.5.1 Microcápsulas obtenidas por secado por aspersión	45
5.5.2 Microcápsulas obtenidas por gelificación iónica	45
5.6 Viabilidad de bacterias encapsuladas	46
5.6.1 Citometría de flujo.....	46
5.7 Funcionalidad de Bacterias	47
5.7.1 Resistencia a condiciones ácidas	47
5.8Diseño experimental y análisis estadístico.....	48
5.8.1 Primera Etapa.....	48
5.8.2 Segunda Etapa	48
6. Resultados y Discusión	51
PRIMER ETAPA. Formación y caracterización de las dispersiones de biopolímeros para llevar a cabo la microencapsulación.....	51
6.1 Caracterización de las dispersiones. Viscosidad	51
SEGUNDA ETAPA. Caracterización de las microcápsulas, tamaño de partícula, viabilidad y funcionalidad en la vida de anaquel y resistencia a condiciones gástricas.....	53
6.2 Rendimiento de Encapsulación.....	53
6.3 Tamaño de Partícula.....	56
6.4. Viabilidad de los simbióticos	58
6.5 Funcionalidad de los simbióticos.....	61
6.5.1 Resistencia de los simbióticos a condiciones gástricas	69
7. CONCLUSIONES.....	74
8. BIBLIOGRAFÍA	75

ABSTRACT

Symbiotics are a mixture of probiotics and prebiotics with a beneficial effect on host health. Microencapsulation of these components emerges as the necessity to preserve viability and functionality, besides improved their storage capacity and resistant throughout gastrointestinal tract. This study was divided in two stages.

The first one was the formulation of a symbiotic encapsulated, employing four thermotolerant lactic acid bacteria strains and two co-products flours with prebiotic capacity. Two encapsulation methods were evaluated: ionic gelification and spray dry encapsulation with sodium alginate and Arabic gum. In the second stage the obtained microcapsules was characterized according to their particle size, viability and symbiotic functionality, related to the in vitro gastric acid conditions survival.

Results showed that both encapsulation techniques are good technological tools to preserve lactic acid bacteria until 30 days. Flow cytometry is a good technique to evaluate viability, founding high alive bacteria percents until the last day of study. Encapsulated symbiotics by both techniques demonstrated to resist simulated stomach gastric acid conditions. In conclusion, both encapsulation techniques are excellent options to protect symbiotics, being superior the spray dry encapsulation with *Enterococcus faecium* (UAM18) with higher survival rate. The flours obtained from agroindustrial co-products demonstrated to be an excellent prebiotic for the employed bacteria.

RESUMEN

Los simbióticos son mezclas de probióticos y prebióticos que tienen efectos benéficos para la salud del hospedero. La microencapsulación de estos componentes surge a partir de la necesidad de preservar su viabilidad y funcionalidad, la cual le confiere la capacidad de almacenamiento y de resistir el paso a través del tracto gastrointestinal. Este estudio consistió en dos etapas. La primera fue la obtención del simbiótico encapsulado, para tal efecto se utilizaron cuatro cepas de bacterias ácido lácticas termotolerantes probióticas y dos harinas de co-productos evaluadas como prebióticas. Se utilizaron dos métodos de encapsulación: gelificación iónica y secado por aspersion y se caracterizaron las dispersiones de biopolímeros utilizados como material encapsulante: alginato de sodio y goma arábica. Posteriormente, una segunda etapa consistió en la caracterización de las microcápsulas obtenidas: eficiencia de encapsulación, tamaño de partícula, viabilidad y funcionalidad del simbiótico y resistencia a condiciones ácidas gástricas *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que los dos métodos de microencapsulación son buenas herramientas tecnológicas, teniendo altos porcentajes de eficiencia y preservando a los simbióticos de forma funcional durante 30 días. La citometría de flujo es una buena técnica para evaluar viabilidad, y permitió detectar altos porcentajes de bacterias vivas hasta el último día del estudio. Los simbióticos encapsulados por cualquiera de las dos técnicas demostraron resistir las condiciones gástricas simuladas del estómago. En conclusión, los dos métodos de encapsulación son excelentes opciones para la protección del simbiótico, siendo superior el secado por aspersion, así mismo con *Enterococcus faecium* (UAM18) se obtuvieron los datos más altos de sobrevivencia, las harinas obtenidas de co-productos agroindustriales demostraron ser excelentes prebióticos para las bacterias utilizadas.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de alimentos funcionales ha aumentado debido al nuevo enfoque de alimentación, que busca un beneficio más allá de los nutrientes que puede ofrecer un producto. Se han investigado las ventajas y los efectos benéficos producidos por las bacterias ácido lácticas probióticas y sustratos prebióticos emergentes a partir de co-productos agroindustriales, lo cual ha incrementado el interés, tanto por la industria, como por los investigadores, en el desarrollo de alimentos simbióticos, evaluando su efecto selectivo y sinérgico.

Las bacterias ácido lácticas termotolerantes probióticas tiene múltiples ventajas tecnológicas frente a otros probióticos, ya que se pueden utilizar en procesos y productos que lleven un proceso térmico, sin afectar la viabilidad de la cepa. Se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas termotolerantes: *L. plantarum* UAM17, *E. faecium* UAM18, *A. viridans* UAM21b y *P. pentosaceus* UAM22a cumplen con los criterios para considerarse como probióticas. Así mismo, se han evaluado como ingredientes prebióticos las harinas de co-productos agroindustriales de bagazo de manzana y cáscara de tuna, las cuales se ha observado que estimulan el crecimiento de estos microorganismos.

La tecnología de la encapsulación permite influir positivamente en la funcionalidad de los probióticos. La gelificación iónica y secado por aspersion permite proporcionar a los probióticos una barrera física para resistir las condiciones ambientales adversas a través del tracto gastrointestinal, hasta su liberación en el intestino delgado. El alginato, que es de los materiales más utilizados, indica una sobrevivencia hasta del 80 al 95% de bacterias probióticas; así mismo la goma arábica se ha utilizado en el proceso de secado por aspersion con buenos resultados de sobrevivencia de los probióticos termotolerantes. Por lo anterior, resulta de interés conocer el efecto de la encapsulación sobre la viabilidad y funcionalidad de un simbiótico.

2. ANTECEDENTES

2.1 Bacterias Ácido Lácticas

Existe una larga historia del uso de microorganismos con propiedades benéficas; los humanos han venido consumiendo cultivos de bacterias vivas durante siglos en forma de leche u otros alimentos y bebidas fermentadas. Particularmente, el uso de bacterias ácido lácticas es del que se tiene más estudio en donde se han analizado los ingredientes activos y su funcionalidad (Kolida y Gibson, 2011).

Las bacterias ácido lácticas se clasifican según su morfología celular y la vía de fermentación utilizada para metabolizar la glucosa. No están muy extendidas, sus hábitats naturales son diversas plantas y son también una parte de la microbiota gastrointestinal (Abadías y col., 2008). Estas bacterias se han encontrado en los alimentos fermentados tradicionales y actualmente se usan en procesos fermentativos controlados a nivel industrial. Son importantes para la industria alimentaria debido a su capacidad para transformar los azúcares fermentables en ácido láctico, etanol y otros metabolitos, los cuales cambian las características del producto al reducir el pH y la creación de condiciones desfavorables para el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos ya sea en productos alimenticios, como en la microbiota intestinal humana. Se dividen en homofermentativas, que producen ácido láctico como metabolito principal y heterofermentativas, que también producen etanol y dióxido de carbono. (Axelsson, 2004). Algunas cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados se han utilizado como probióticos debido a su resistencia al paso por el tracto gastrointestinal, así como la adhesión al epitelio y la prevención del crecimiento o la invasión de bacterias patógenas en el intestino. Entre los géneros de bacterias ácido lácticas más importantes, se encuentran *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus* (Rivera y Gallardo, 2010).

2.2 Bacterias Ácido Lácticas Termotolerantes

Existe un grupo dentro de las bacterias ácido lácticas que tienen la capacidad de resistir condiciones adversas. Esta adaptación o resistencia al estrés es de las más estudiadas debido a que se han encontrado en ciertos alimentos fermentados desde hace muchos años y en la actualidad, el interés está enfocado a su uso en procesos industriales que no afecten viabilidad, como lo son la liofilización, o secado por aspersion (Van de Guchte y col., 2002).

La termotolerancia de estas bacterias proviene de su capacidad de sintetizar proteínas del choque térmico (*Heat shock proteins: Hsp*); las cuales son expresadas en respuesta a cambios en las condiciones ambientales donde las células sufren estrés. Existen diversos factores por los cuales se inducen este tipo de proteínas, entre los que destacan la hipoglucemia, anoxia, calor, etanol, peróxido de hidrógeno, iones pesados e infecciones por ciertos virus. Colectivamente las proteínas del estrés proveen protección a la célula durante y/o después de recobrase de la agresión del estrés del medio ambiente y pueden normalizar su actividad metabólica (Guerreiro y Raynes, 1990).

Niamsup y col. (2003) caracterizaron taxonómicamente cinco cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de heces de pollo. Las cepas resultaron ser anaerobias facultativas, Gram-positivas, catalasa negativas, no móviles y no formadoras de esporas. Se identificaron como lactobacilos heterofermentativos con una temperatura óptima de crecimiento de 42°C. Las temperaturas más altas permisivas de crecimiento fueron 50°C. Debido al análisis filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA de las cinco cepas, estas fueron clasificadas en el grupo del *Lactobacillus casei/Pediococcus*. Tomados en conjunto, los resultados de este estudio muestran que las cinco cepas aisladas a partir de heces de pollo representaron una nueva especie dentro del género *Lactobacillus*, para lo cual se propuso la especie *thermotolerans*.

Bensalah y col. (2009) identificaron a nivel especie a cuarenta cepas relacionadas con cocos Gram-positivos termotolerantes aislados de *Leben*, una bebida

tradicional de leche fermentada en la zona árida del oeste de Argelia. Los cocos de bacterias lácticas termotolerantes (bacterias ácido lácticas-T) se identificaron como pertenecientes a especies de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, y otras especies de *Enterococcus*. Estas cepas tuvieron la capacidad de resistir 30 min a 63°C, además dos especies de *Lactococcus* crecieron a un pH de 9.6 y una concentración de NaCl de 6.5%, un patrón inesperado en especies de este género. Este estudio demostró que las cepas de enterococos son predominantes en la población de bacterias ácido lácticas termotolerantes.

Tashiro y col. (2011) aislaron y caracterizaron una bacteria productora de ácido D-láctico, identificada como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. Cuando se compara con otras cepas productoras de ácido D-láctico, se encontró que la cepa en estudio exhibió una alta termotolerancia y mayor producción a temperaturas de 50°C. En comparación con los microorganismos mesófilos, el uso de microorganismos termotolerantes en biorreactores es ventajoso por tres razones: se evita la contaminación con mesófilos en el cultivo, se disminuye el costo de agua de refrigeración para el mantenimiento de la temperatura en el fermentador y existe una mayor disponibilidad de sacarificación y fermentación a temperaturas altas.

Ramirez-Chavarín y col. (2013) evaluaron la capacidad probiótica de bacterias ácido lácticas; cuatro cepas de *Pediococcus pentosaceus*, tres cepas de *Lactobacillus plantarum*, dos cepas de *Enterococcus faecium* y una cepa de *Aerococcus viridans* fueron aisladas e identificadas de productos cárnicos cocidos. Realizaron pruebas de tolerancia a pH bajo, tolerancia al ácido taurocólico y a la bilis, coagregación, autoagregación y la adherencia a células HEp - 2 de células epiteliales. Se observó que las diez cepas tienen una buena capacidad de adherencia a las células epiteliales, sin embargo un factor determinante fue la intolerancia a pH bajo y sales biliares, sobre todo en las cepas de *Lactobacillus plantarum*. Esto lleva a la propuesta de que sistemas como la microencapsulación

son una alternativa para mejorar la supervivencia de probióticos cuando se expone a condiciones ácidas, sales biliares y tratamientos térmicos (Ding y Shah, 2007).

2.3 Probióticos

Una de las primeras citas del término probiótico fue realizada por Vergin (1954), quien sugería que el equilibrio microbiano intestinal puede ser afectado tras el uso de antibióticos y que podría ser restaurado por una dieta de probióticos incluidos en los alimentos fermentados. El término fue reintroducido en 1965 por Lilly y Stillwell quienes definieron a los probióticos como "sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos", el antónimo de antibióticos. Actualmente la definición más aceptada es de la FAO (Food and Agriculture Organization), la cual define a los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico sobre la salud del hospedero (FAO/WHO, 2001).

Para que un microorganismo sea definido como probiótico, este debe cumplir ciertos criterios (Dunne y col., 2001; Tannock, 1998):

- ✓ Ser microorganismos aislados del tracto gastrointestinal humano, al ser más seguros para el consumo y efectivos en el ecosistema intestinal.
- ✓ Generalmente se busca que a los microorganismos utilizados se les otorgue la clasificación GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA. Deben ser seguros en los alimentos y durante el uso clínico en individuos inmunodeficientes.
- ✓ Tienen que ser resistentes a la acidez gástrica y a la toxicidad de ácidos biliares. Un pH gástrico bajo es uno de los principales mecanismos de defensa del hospedero frente a microorganismos ingeridos, incluyendo probióticos.
- ✓ Los probióticos deben adherirse a las células intestinales humanas y a la mucosa intestinal. Esto mejora la sobrevivencia y la multiplicación en el intestino y puede promover la exclusión competitiva de posibles patógenos potenciales de la mucosa gastrointestinal.

- ✓ Deben producir sustancias antimicrobianas contra patógenos intestinales para la restauración de una composición de la microbiota saludable.
- ✓ Los probióticos deben ser preparados a gran escala y en una forma viable.

El objetivo del uso de probióticos es intentar restablecer las deficiencias en el ecosistema gastrointestinal, sin añadir nada que no esté presente bajo condiciones naturales. Los probióticos suprimen la acción de los microorganismos patógenos por diferentes mecanismos. Estos establecen una competencia tanto por los nutrientes, como por los sitios de adherencia a las células del tracto digestivo, producen metabolitos tóxicos para otros microorganismos y crean en el intestino condiciones adversas para el desarrollo de los patógenos (OMGE, 2008).

Los probióticos inducen un conjunto de efectos metabólicos benéficos en el intestino. Ellos suprimen o disminuyen las reacciones que dan lugar a la producción de metabolitos tóxicos y carcinogénicos, estimulan las reacciones enzimáticas relacionadas con los procesos de detoxificación de sustancias producidas o ingeridas, son capaces de estimular sistemas enzimáticos o sustituir a los no presentes por deficiencias genéticas, además, pueden sintetizar vitaminas u otros nutrientes ausentes o no presentes en cantidades suficientes en la dieta (Prats, 2007).

Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más usadas como probióticos, sin embargo, existen otros géneros que cumplen con las características para ser utilizados con este fin (tabla 1).

Tabla 1. Algunos ejemplos de microorganismos que son considerados probióticos (Senok y col., 2005).

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Otros
<i>L. acidophilus</i>		
<i>L. casei</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L.rhamnosus</i>		

2.4 Prebióticos

Un prebiótico se define como “un ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios específicos tanto en la composición, como en la actividad de la microbiota del tracto gastrointestinal, otorgando al hospedero bienestar y salud” (Gibson y Roberfroid, 2004).

La definición actualmente aceptada en 2008 por la ISAPP (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics) define "Un prebiótico es un ingrediente alimenticio fermentado selectivamente, que como resultado provoca cambios específicos, en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, lo que confiere beneficio(s) a la salud del hospedero" (Rastall, 2010).

Los criterios para la clasificación de un prebiótico son:

- Compuestos con resistencia a la acidez gástrica, la hidrólisis por las enzimas digestivas de mamíferos y la absorción gastrointestinal;
- La fermentación de estos componentes por la microbiota intestinal;

- La estimulación selectiva del crecimiento y / o actividad(es) de uno o un número limitado de bacterias intestinales benéficamente asociados con la salud y el bienestar (Roberfroid, 2010).

Los dos principales sustratos fermentables de origen alimenticio son los carbohidratos no digeribles y proteínas que escapan a la digestión en el intestino delgado. De éstos, la fermentación de hidratos de carbono es más favorable energéticamente, lo que conduce a un gradiente de la utilización del sustrato especialmente a través del colon.

Los principales sustratos para el crecimiento bacteriano son carbohidratos no digeribles que resisten la hidrólisis superior intestinal y la absorción. Los carbohidratos no digeribles comprenden almidón resistente y dextrinas resistentes, fibra alimentaria (pectinas, arabinogalactanos, la goma arábica, la goma guar y la hemicelulosa), oligosacáridos no digeribles (por ejemplo: rafinosa, estaquiosa, fructanos de inulina (FI), galactanos y mananos), así como porciones de los disacáridos no digeridos (por ejemplo: lactosa) y alcoholes de azúcar (por ejemplo: lactitol). El almidón resistente, las fibras dietéticas y también algunos oligosacáridos no digeribles se fermentan por una amplia gama de las bacterias del colon, aunque el grado de su hidrólisis varía. Sin embargo, algunos oligosacáridos no digeribles que entran en el colon son rápida y selectivamente fermentados (por ejemplo: rafinosa, y galactanos) por un pequeño número de bacterias (bifidobacterias y lactobacilos) (Gibson, 2004).

El efecto prebiótico ha demostrado asociarse con modulación de biomarcadores y actividades del sistema inmune. Se ha demostrado que, en la nutrición infantil, el efecto prebiótico incluye un cambio significativo de composición de la microbiota intestinal, especialmente un aumento de las concentraciones fecales de bifidobacterias. Esto mejora la calidad de las heces de forma concomitante (pH, frecuencia y consistencia), reduce el riesgo de gastroenteritis e infecciones, mejora el bienestar general y reduce la incidencia de los síntomas alérgicos tales como eczema atópico. Los datos recientes, tanto de los modelos experimentales y de estudios en humanos, apoyan los efectos benéficos de los productos

alimentos particulares con propiedades prebióticas en la homeostasis energética, la regulación de la saciedad y la ganancia de peso corporal (Roberfroid, 2010).

2.4.1 Clasificación de Prebióticos

2.4.1.1 Los fructanos

La inulina es un polisacárido de la forma $\text{Glc } \alpha\text{-(1-2)-} [\beta \text{ Fru 1-2}]_n$, en la que $n > 10$. La estructura base de la inulina, los fructooligosacáridos (una versión de menor peso molecular) han sido los oligosacáridos más documentados por su efecto sobre bifidobacterias intestinales y son considerados importantes sustratos prebióticos. Se producen en grandes cantidades en varios países y se agregan a varios productos como galletas, bebidas, yogures, cereales para el desayuno, y los edulcorantes. El término fructooligosacárido se puede utilizar para representar dos diferentes tipos, ya sea de derivados de inulina por hidrólisis, o por síntesis a partir de sacarosa. Los derivados de la inulina, FOS, son de la forma $\text{Glc } \alpha\text{-(1-2)-} [\beta \text{ Fru 1-2}]_n$, en la que $n = 2-9$. Los FOS derivados de sacarosa están en gran parte compuestos por una mezcla de tres oligosacáridos, es decir: (Glc-Fru_2) , (Glc-Fru_3) , y (Glc-Fru_4) (Gibson, 2004).

Estudios realizados en cultivo por lote en donde muestras fecales fueron incubadas con inulina, FOS, almidón, povidona, fructosa, y pectina durante 12 horas, han demostrado que hay un mayor número de bifidobacterias cuando se utiliza FOS e inulina, lo que indica la naturaleza prebiótica de estos sustratos y a su vez la preferencia de estos con respecto a la glucosa (Rastall, 2010; Roberfroid, 2010).

2.4.1.2 Galactooligosacáridos

Los Galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos que contienen galactosa que de la forma $\text{Glc } \alpha\text{-(1-4)-} [\text{Gal } \beta \text{ 1-6}]_n$, en la que $n = 2-5$ y se producen a partir de medios de reacción con exceso de lactosa mediante la actividad transgalactosidasa de la enzima β -galactosidasa (Gänzle, 2012).

El término galactooligosacáridos tiende a ser utilizado genéricamente para cualquier mezcla de oligosacáridos derivados de la actividad por transgalactosilación de las β -galactosidasas. Los primeros informes de la fabricación y la evaluación de GOS utilizando la síntesis de éstos por una reacción de transgalactosilación se produjeron utilizando β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Tzortzis, 2005).

2.4.2 Los co-productos agroindustriales como fuente de prebióticos y fibra

El desperdicio de co-productos agroindustriales es una problemática a nivel mundial; en particular durante el procesamiento de frutas para la producción de pulpa, alrededor de 65-70% en peso de la materia prima se pierde, lo que lleva a problemas ambientales graves (Lousada y col., 2006). Sin embargo, se ha demostrado que algunas fibras provenientes de co-productos de fruta muestran propiedades funcionales tales como de retención de agua, formación de gel y capacidades de intercambio catiónico (Lamsal y Faubion, 2009).

El término fibra dietética se refiere a los compuestos orgánicos de las plantas que no pueden ser degradados por las enzimas humanas y no son absorbidos en el intestino delgado. Gran parte de la fibra dietética que consumimos proviene de las paredes celulares de frutas, vegetales, granos, leguminosas y cereales (Fischer, 2009). Los sustratos que ofrecen las frutas y hortalizas como la fibra dietética, minerales, vitaminas y antioxidantes son ideales para el cultivo de los probióticos, ya que contienen nutrientes benéficos (Rivera y col., 2010).

La fibra consiste en polisacáridos no amiláceos, que incluyen celulosa, hemicelulosa, pectina, β -glucanos, gomas y lignina. Frutas, hortalizas, cereales y legumbres son los alimentos más ricos en estos componentes (Gibson, 2004). De acuerdo con la Asociación Dietética Americana (American Dietetic Association) (2008), si se consume en las cantidades recomendadas, las fibras pueden ayudar a controlar el peso, reducir la presión arterial y mejorar los niveles de colesterol en suero y las funciones intestinales. Algunas fibras tienen efectos prebióticos, que afectan positivamente al individuo por la estimulación selectiva del crecimiento de

una o más bacterias en el colon, provocando la mejora de la salud del huésped (Gibson, 2004).

La adición de un ingrediente complejo tal como pulpa de fruta o de fibra dietética total de fruta, en la formulación de un producto probiótico es un reto, debido principalmente a la presencia de compuestos antimicrobianos en la fruta y a su acidez (Espírito y col., 2012). La tendencia a utilizar los co-productos de frutas puede contribuir a obtener, productos de valor agregado, capaces de aumentar la ingesta diaria de fibra dietética y mejorar la viabilidad de las bacterias.

Bigetti y col. (2010) estudiaron la supervivencia de *Lactobacillus casei* (LC-1) cuando crece a partir de cuatro fibras prebióticas deshidratadas usadas como sustrato: inulina, salvado de avena, harina de plátano verde y fibra de manzana. Los porcentajes de células viables fueron 76% para la harina de plátano y 79% de salvado de avena, que se tradujo en una mayor recuperación de probióticos después de la fermentación con los sustratos. La fibra de manzana mostró 64% de viabilidad y la inulina de 55%. En diferentes temperaturas de almacenamiento, el salvado de avena tuvo la mayor estabilidad, así como en condiciones gastrointestinales simuladas, donde LC-1 creció junto al salvado de avena y tenía mayor viabilidad que en la forma libre. El desarrollo de un simbiótico basado en el salvado de avena con LC-1 en una bebida láctea se presentó como una innovación ya que en la evaluación sensorial fue bien aceptada por los consumidores.

Espírito y col. (2012) evaluaron el efecto de la suplementación de la fibra dietética total de manzana, plátano y fruta de la pasión provenientes de co-productos del procesamiento de frutas, en yogures de leche descremada y co-fermentada por cuatro cepas probióticas: *Lactobacillus acidophilus* L10 y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL04, HN019 y B94. Se determinó el perfil de ácidos grasos, acidez total valorable y recuento bacteriano. Las fibras de manzana y plátano aumentaron la viabilidad de los probióticos hasta la cuarta semana de almacenamiento en frío; todas las fibras fueron capaces de aumentar el contenido de ácidos grasos de cadena corta y el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de los yogures en

comparación con sus respectivos controles. Se observó un efecto sinérgico entre el tipo de fibra y la cepa probiótica en el contenido de ácido linoleico conjugado, y la cantidad de ácido α -linolénico, obteniendo mejores resultados con fibra de plátano.

Díaz-Vela y col. (2013) evaluaron la cáscara de tuna y cáscara de piña como ingredientes funcionales provenientes de co-productos agroindustriales. Se determinó su composición, capacidad antioxidante, y su potencial prebiótico; este último utilizando dos cepas de bacterias ácido lácticas termotolerantes: *Pediococcus pentosaceus* UAM22 y *Aerococcus viridans* UAM21, utilizando a *Lactobacillus rhamnosus* GG como probiótico comercial y *Escherichia coli* K12 como referencia. Se observó que las harinas de cáscara como ingredientes prebióticos fueron metabolizadas por las cepas empleadas como fuente de carbono presente en el medio de cultivo, teniendo un mayor consumo la cepa de *P. pentosaceus* respecto a las otras empleadas.

Parra-Matadamas y col. (2015) evaluaron la capacidad prebiótica de la cáscara y el albedo de toronja, cáscara de tuna y cáscara de piña cuando se utiliza como sustrato de bacterias ácido lácticas probióticas (*P. pentosaceus* UAM21 y *A. viridans* UAM22). Se observó que existe una buena viabilidad de las cepas con estas fuentes de carbono, siendo la cáscara de toronja el sustrato con una mayor tasa de crecimiento de las cepas en un menor tiempo de duplicación; frente a las otras fuentes de carbono. También se confirmó una producción aceptable de ácidos grasos de cadena corta de las fuentes prebióticas utilizadas, por lo que se encontraron como buenas fuentes de carbono para las bacterias probióticas utilizadas.

Pérez-Chabela y col. (2015) incorporaron harina de cáscara de tuna y bagazo de manzana (residuo de sidreras) en la dieta de ratas cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), los resultados mostraron que los dos co-productos estimulan el crecimiento de la microbiota en el ciego; aumentan la cantidad de ácidos grasos de cadena corta así como el crecimiento de los animales, concluyendo que la

cáscara de tuna y el bagazo de manzana son buenos candidatos para ser usados como prebióticos en animales vivos.

2.5 Simbióticos

El concepto simbiótico se introdujo por primera vez, junto con el de prebióticos y se definió como "mezclas de probióticos y prebióticos que afectan benéficamente al hospedero al aumentar la supervivencia microbiana mediante la implantación de suplementos dietéticos microbianos en el tracto gastrointestinal, estimulando selectivamente el crecimiento y /o activando el metabolismo de una o un número limitado de bacterias, lo que mejora el bienestar y promueve la salud del hospedero" (Gibson y Roberfroid, 1995).

Los simbióticos deben tener un enfoque sinérgico, por lo que el probiótico es elegido específicamente de acuerdo a los efectos benéficos sobre el hospedero, pero el prebiótico es elegido para estimular el crecimiento y la actividad específica del microorganismo seleccionado. Aquí, el probiótico se selecciona para tener una mayor afinidad por el prebiótico y se elige para mejorar su supervivencia y el crecimiento en el hospedero. También puede aumentar los niveles de la microbiota gastrointestinal benéfica, pero el objetivo principal es la ingestión de probióticos (Kolida y Gibson, 2011).

El mecanismo de acción de los simbióticos es la unión tanto de los efectos benéficos de los probióticos y los efectos específicos de los prebióticos para la cepa con la que está en conjunto, ya que parte de la colonización exógena de los probióticos combinados con prebióticos aumenta la acción de los primeros en el tracto intestinal. Posteriormente, se desencadena la acción de los probióticos en el individuo a quien sea administrada la fórmula simbiótica (Raizel y col., 2011). Los componentes probióticos y prebióticos de la formulación deben ser probados por sí solos, en primera instancia, seguidos de pruebas en conjunto. Este tipo de experimentos proporcionan información sobre cada uno de los componentes y si puede mediar un efecto sobre la microbiota fecal cuando se utilizan solos, así

como si la combinación simbiótica puede mediar un efecto superior (Kolida y Gibson, 2011).

Grimoud y col. (2010) evaluaron la capacidad probiótica de cinco cepas de bifidobacterias, y de seis cepas de lactobacilos, así como la capacidad de crecer con tres tipos de glucooligosacáridos comerciales: oligodextran, oligoalteran y oligodextran resistente; para evaluar sus combinaciones como posibles simbióticos. Se observó que el género *Bifidobacterium* fue más eficaz para metabolizar los glucooligosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, se observó que el oligodextran fue el prebiótico más fácil de metabolizar por todas las cepas. También se determinó la capacidad de resistencia a condiciones gástricas, donde las cinco bifidobacterias que crecieron en oligodextran y oligoalteran fueron resistentes a las condiciones gástricas e intestinales artificiales, pero sólo tres de los lactobacilos usando oligodextran fueron resistentes. Los autores concluyeron que estos ensayos mostraron el potencial de los prebióticos para estimular el crecimiento de las cepas probióticas y se espera ampliar la proyección de modelos *in vivo* antes de su uso potencial en aplicaciones con humanos.

Obasola y col. (2014) evaluaron la capacidad de tres prebióticos: inulina, lactulosa y ácido lactobiónico para estimular el crecimiento de cinco cepas de probióticos: *Lactobacillus acidophilus* NCTC 1723, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* NCTC 12712, *Lactobacillus brevis* NCIMB, *Lactobacillus acidophilus* NCFM y *Lactobacillus reuteri* NCIMB 11951 y su resistencia a condiciones gástricas. Ellos observaron que tres lactobacilos probióticos no podían utilizar cualquiera de los prebióticos, ya que tenían un crecimiento inferior al 20% en comparación con el crecimiento en glucosa. Sólo *Lactobacillus acidophilus* NCFM y *Lactobacillus reuteri* NCIMB 11951 fueron las cepas que pudieron crecer utilizando lactulosa; siendo mejor sustrato que la inulina. Una variabilidad similar se observó con la capacidad de los prebióticos para proteger los probióticos del estrés de los ácidos biliares. Tanto *L. acidophilus* NCFM y *L. reuteri* NCIMB 11951 fueron capaces de crecer en ácido cólico y taurocólico 2 mM cuando se incubaron en combinaciones simbiótica con lactulosa (1%) o ácido lactobiónico (1%). En

conclusión, los autores afirmaron que en estos experimentos existe evidencia clara de que no todas las combinaciones de simbióticos pueden resultar en un aumento de la supervivencia de probióticos; así mismo éstos pueden ofrecer protección a los probióticos contra la toxicidad del ácido biliar limitada, dependiendo de su naturaleza.

Erdem y col. (2015) desarrollaron un chocolate negro simbiótico enriquecido con *Bacillus indicus* HU36 como probiótico y maltodextrina y fibra de limón como prebiótico; el objetivo del estudio fue determinar los efectos de estos componentes en la sobrevivencia de la cepa y calidad organoléptica del producto. Se encontró que *B. indicus* tuvo una tasa de sobrevivencia entre el 88% y 91% en la muestras. Además de que las bacterias y la fibra dietética no mostraron ningún efecto negativo sobre el producto, respecto a las propiedades de color y sensoriales; además de la mejora significativa en algunas características sensoriales como dulzura y firmeza. En conclusión, este estudio mostró que *B. indicus* HU36 puede ser utilizado de manera eficiente para la producción de chocolate amargo probiótico (más de 5 log UFC/g de producto). La fibra dietética no mostró efectos negativos, como mal sabor, aroma o sabor no deseado, ni sobre el color.

Uno de los retos tecnológicos de bacterias probióticas y simbióticos es el aseguramiento de su viabilidad en el paso a través del tracto gastrointestinal; es así como ha surgido la aplicación de la encapsulación como una herramienta para dar resistencia a estas condiciones adversas (Kent y Doherty, 2014).

2.6 Objetivos y definición de la encapsulación

La encapsulación es un proceso fisicoquímico y mecánico para atrapar una sustancia dentro de un material con el fin de producir partículas con diámetros que van desde milímetros hasta unos pocos nanómetros. La encapsulación de componentes bioactivos se puede utilizar en muchas aplicaciones en la industria alimentaria: el control de la reacción oxidativa, enmascarar sabores, colores y olores, proporcionando una liberación sostenida y controlada, que extienda la vida útil. La sustancia encapsulada, llamada material del núcleo, se dispersa en una

matriz llamada recubrimiento o cáscara. Este material de soporte debe ser de calidad alimentaria y capaz de formar una barrera para proteger la sustancia encapsulada (Chen y Chen, 2007).

El desarrollo de sistemas de administración para los compuestos biológicamente activos en los sistemas alimentarios es un tema importante en la tecnología moderna de los alimentos. En los últimos años, se ha utilizado la microencapsulación como una herramienta útil para la estabilización de las células probióticas en aplicaciones de alimentos funcionales. Se puede mejorar la viabilidad de las células probióticas durante el procesamiento, el almacenamiento, el consumo posterior y el tránsito gastrointestinal (Anal y Singh, 2007).

Varias tecnologías se pueden aplicar en la encapsulación de probióticos y cada uno de ellos proporciona microcápsulas con diferentes características en términos de tamaño y alcance. Por ejemplo, la emulsificación permite la producción de una amplia gama de tamaño de partículas desde 0.2 hasta 5000 μm mientras que la extrusión tiene un intervalo más pequeño de tamaño, pero no proporciona partículas con diámetros inferiores a 300 μm (Champagne y Fustier, 2007).

Las micropartículas obtenidas tienen que ser insolubles en agua para mantener su integridad en la matriz del alimento y en la parte superior del tracto gastrointestinal y, por último, deben permitir la liberación progresiva de las células durante la fase intestinal (Burgain y col., 2011).

En la figura 1 se muestra la tecnología de encapsulación, que generalmente se lleva a cabo en tres etapas. El primer paso consiste en la incorporación del componente bioactivo en una matriz que puede ser líquida o sólida. En el caso de que el núcleo sea líquido, la incorporación será una disolución o una dispersión en la matriz mientras que si el núcleo es sólido, la incorporación será una aglomeración o adsorción. Para el segundo paso, la matriz líquida se dispersa mientras que una solución se pulveriza sobre la matriz sólida. El último paso consiste en la estabilización, ya sea por un proceso químico (polimerización), por

un proceso fisicoquímico (gelificación) o un proceso físico (evaporación, solidificación, coalescencia) (Burgain y col., 2011).

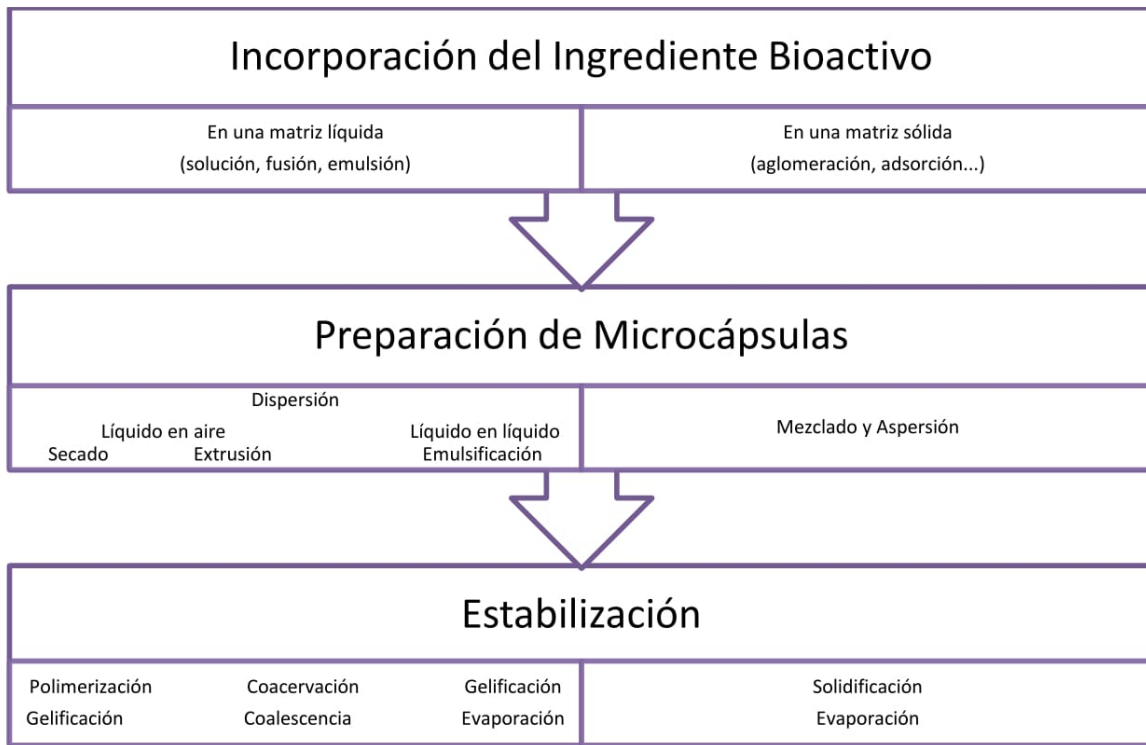


Figura 1. Plan general que describe los pasos para producir microcápsulas (Burgain y col., 2011).

2.6.1 Métodos de dispersión para la microencapsulación

2.6.1.1 Congelación y secado por aspersión

Este método combina pasos de liofilización y secado por aspersión. Las células se encuentran en una solución que se atomiza en frío a través de un líquido criogénico como nitrógeno líquido. Este paso genera una dispersión de gotitas congeladas, las cuales pasan a un secador de congelación. Tiene la ventaja de proporcionar un tamaño controlado, las desventajas incluyen un gran uso de energía, tiempo de procesamiento largo y un costo que es 30-50 veces más caro que el secado por atomización (De Vos y col., 2010).

2.6.1.2 Gelificación enzimática por emulsión

En algunos países, el uso de las gomas en productos lácteos no está permitido, la solución es el uso de proteínas de la leche, en las que los probióticos se encapsulan por medio de una gelificación enzimática inducida, ya que tienen excelentes propiedades de gelificación y son vehículos naturales para los probióticos. Este método da partículas esféricas insolubles en agua (Chen y Chen, 2007; Kailasapathy, 2009).

2.6.1.3 Gelificación por polimerización interfacial

La técnica requiere la formación de una emulsión: en donde la fase discontinua contiene una suspensión acuosa con las células probióticas y la fase continua es un disolvente orgánico. Para iniciar la reacción de polimerización, se añade un agente biocompatible que es soluble en la fase continua. Las gotas obtenidas son cubiertas por una membrana delgada y fuerte (Chen y Chen, 2007; Kailasapathy, 2009).

2.6.1.4 Extrusión

La extrusión es una técnica física para encapsular células utilizando hidrocoloides (alginato y carragenano) como materiales de encapsulación. La microencapsulación de células probióticas por extrusión consiste en proyectar la solución que contiene las células a través de una boquilla a alta presión. Si la formación de gotitas se produce de una manera controlada (en oposición a secado por aspersión), la técnica se conoce como granulación. La extrusión es un método simple y barato que utiliza una operación suave que no causa daño a las células probióticas y mantiene una alta viabilidad. La tecnología no implica disolventes nocivos y puede realizarse bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La desventaja más importante de este método es que es difícil de utilizar en las producciones de gran escala debido a la lenta formación de las microesferas (De Vos y col., 2010).

2.6.1.5 Gelificación iónica por emulsión

La emulsificación es una técnica química para encapsular células probióticas vivas usando alginato, carragenina y pectina como materiales de encapsulación. El principio de esta técnica se basa en la relación entre la fase continua y discontinua; así como el uso de un emulsificante, un agente tensoactivo y un agente solidificante. Las cápsulas obtenidas tienen un diámetro pequeño, sin embargo esto dependerá de la variación de la velocidad de agitación y la relación agua/aceite (Kailasapathy, 2009).

En el método de emulsión de Sheu y Marshall (1993) las microcápsulas se forman por la formación de una emulsión de agua en aceite, por lo general estabilizada con agentes tensoactivos, tales como Tween 80, donde el alginato está disuelto en la fase acuosa. A continuación, el alginato lleva a cabo una gelificación externa por medio de la adición de una solución de cloruro de calcio a la emulsión. Sin embargo, no tan comúnmente, las microcápsulas pueden estar formadas por gelificación interna (Poncelet y col., 1992), en donde junto con el alginato en solución, se contiene carbonato de calcio. Un ácido orgánico se añade a esta emulsión y a medida que penetra en la fase acuosa, reacciona con el carbonato de calcio para formar iones calcio y ácido carbónico, dando como resultado la gelificación del alginato.

2.6.1.5 Secado por aspersion

El secado por aspersion es probablemente el método más económico y eficaz usado en la industria para la deshidratación de materiales líquidos o estabilización de microorganismos para su encapsulación. El proceso implica la inyección del medio a alta velocidad a temperaturas de hasta 200°C, que luego a través de una boquilla conduce a la formación de gránulos. En consecuencia, este proceso da como resultado la exposición del medio de secado a altas temperaturas durante un corto período de tiempo, que puede ser perjudicial para la integridad de células bacterianas vivas. Durante el secado por aspersion, las células bacterianas encuentran el estrés por calor, además de los otros factores como la exposición al oxígeno y el estrés osmótico. El efecto de secado por aspersion en la membrana

celular también puede conducir a un aumento de la permeabilidad de la célula, lo cual puede resultar en la pérdida de componentes intracelulares en el medio (Zamora y col., 2006; Meng y col., 2008).

2.6.2 Materiales utilizados para microencapsulación

2.6.2.1 Goma de gelana y goma de xantana

La goma de gelana es un polisacárido microbiano derivado de *Pseudomonas elodea* que está constituido por una unidad repetitiva de cuatro monómeros que son glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa. Se ha utilizado una mezcla de goma xantana-gelana para encapsular células probióticas ya que presenta una alta resistencia a condiciones ácidas (Chen y Chen, 2007).

2.6.2.2 κ-carragenina

La κ-carragenina es un polímero natural que se utiliza comúnmente en la industria alimentaria. La tecnología que emplea el compuesto requiere una temperatura comprendida entre 40°C y 50°C en el que las células se añaden a la solución de polímero. Al enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se produce la gelificación y, a continuación, las micropartículas se estabilizan mediante la adición de iones de potasio. La encapsulación de células probióticas en la κ-carragenina mantiene las bacterias en un estado viable, pero los geles producidos son frágiles y no son capaces de resistir las tensiones (Chen y Chen, 2007).

2.6.2.3 Ftalato acetato de celulosa

Debido a que tiene una naturaleza segura, el ftalato acetato de celulosa se utiliza para controlar la liberación de fármacos en el intestino. La ventaja de este componente es que no es soluble a pH ácido (menos de cinco) pero es soluble a un pH superior a seis. La encapsulación de bacterias probióticas utilizando ftalato acetato de celulosa proporciona una buena protección para los microorganismos en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (Burgain y col., 2011).

2.6.2.4 Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de unidades de β -(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que se puede polimerizar en presencia de aniones y polianiones. Este componente no ha mostrado un buen rendimiento para aumentar la viabilidad celular por encapsulación y preferiblemente se utiliza como cubierta. De hecho, la encapsulación de bacterias probióticas con alginato y un recubrimiento de quitosano proporcionan una protección en condiciones simuladas de tracto gastrointestinal y por lo tanto, es una buena forma de entrega de células bacterianas viables para el colon (Chavarri y col., 2010).

2.6.2.5 Almidón

El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos. El almidón se compone principalmente de amilosa, un polímero lineal de unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos α -(1-4) y de amilopectina, un polímero ramificado de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos α -(1-4) y ramificaciones α -(1-6). El almidón resistente es el almidón que no es digerido por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado. El almidón resistente puede llegar al colon donde se fermenta y esta especificidad proporciona una buena característica de entrega para una mejor liberación de las células bacterianas en el intestino grueso. Además, por su funcionalidad prebiótica, el almidón resistente puede ser utilizado por las bacterias probióticas en el intestino grueso. Finalmente, el almidón resistente es una superficie ideal para la adhesión de las células probióticas a los gránulos de almidón lo cual puede mejorar la entrega de los probióticos en un estado metabólicamente activo en el intestino (Anal y Singh, 2007; Burgain y col., 2011).

2.6.2.6 Proteínas de la leche

Las proteínas lácteas son vehículos naturales para las células probióticas y debido a sus propiedades estructurales y físicoquímicas pueden ser utilizadas como un sistema de entrega. Por ejemplo, las proteínas tienen excelentes propiedades de

gelificación y esta especificidad ha sido explotada recientemente para encapsular las células probióticas debido a su biocompatibilidad. Una aplicación de este material es para encapsular probióticos que son añadidos en formulas infantiles (Kent y Doherty, 2014).

2.6.2.7 Alginatos

Hasta la fecha, en la literatura se encuentra que el agente de encapsulación más común es el alginato, un polisacárido lineal que consiste en ramificaciones 1 → 4 de β-(D) ácido glucurónico (G) y α-(L) ácido manurónico (M), derivados de algas pardas o fuentes bacterianas (Figura 2). Está disponible comercialmente en una amplia gama de pesos moleculares, de decenas a cientos de kiloDaltons y es especialmente adecuado para la encapsulación bacteriana debido a sus condiciones de gelificación. Se considera como GRAS (generalmente reconocido como seguro). Cabe destacar que, debido a la presencia de grupos carboxilo en ambos monómeros, el alginato lleva una carga negativa por encima de su pKa (3.3 a 3.5) (Cook y col., 2012).

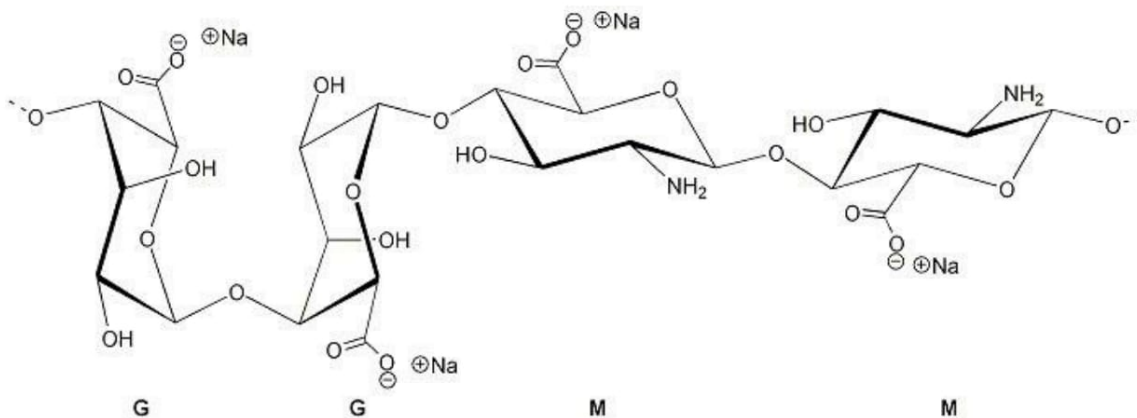


Figura 2. Estructura del alginato de sodio.

Al entrar en contacto con metales divalentes (por ejemplo calcio, cadmio o zinc), forman lo que se ha descrito como una "estructura de caja de huevos" entre cuatro residuos de (G) (Stokke y col., 2000). Esta capacidad ha sido aprovechada para formar microcápsulas utilizando un proceso de extrusión. Esto implica la caída de una solución de alginato concentrado, más comúnmente a través de una aguja, en

una solución de cloruro de calcio, por lo que gelifica externamente el polímero en una microcápsula. El tamaño de las microcápsulas formadas mediante la gelificación externa se rige por el tamaño de las gotas formadas durante el proceso de extrusión, que van desde partículas de tan solo unas decenas de micras, hasta milímetros (Chandramouli y col., 2004).

2.6.2.8 Goma arábica

La goma arábica es un exudado natural proveniente principalmente de árboles de *Acacia senegal*, y en menor medida de los árboles *Acacia seyal* (Yadav y col., 2007). Tiene un color ámbar y está compuesta generalmente por residuos galactosilo (42% w/w), arabinosil (27% w/w), ramnosil (15% w/w), glucuronosil (14.5% w/w) y 4-O-metil glucuronosil (1.5 w/w) (Islam y col., 1997). Esta combinación le permite tener excelentes propiedades emulsionantes, las cuales son explotadas por la industria alimentaria como encapsulador de sabores, estabilizador de emulsiones y espesante.

El Comité Mixto de Expertos FAO / OMS para los Aditivos Alimentarios (Join Expert Committee for Food Additives; JECFA), define a la goma arábica como “un exudado desecado de tallos y ramas de *Acacia senegal* (L.) Willdenow o *Acacia seyal* (Fam. Leguminosae)” (FAO, 1999a).

La goma árabica se disuelve fácilmente en agua fría y caliente en concentraciones de hasta 50%. Debido a su estructura ramificada compacta y por lo tanto al pequeño volumen hidrodinámico, las soluciones de goma arábica se caracterizan por una baja viscosidad, lo que permite el uso de altas concentraciones de goma en diversas aplicaciones (Dziezak, 1991). El pH de las soluciones es normalmente de alrededor de 4.5 hasta 5.5, pero la viscosidad máxima se encuentra a pH 6.0 (Verbeken y col., 2003).

2.6.3 Encapsulación de bacterias lácticas probióticas y simbióticos

Chavarri y col. (2010) utilizaron una mezcla de alginato y quitosano para encapsular *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* como probióticos y la quercetina como prebiótico por el método de extrusión; con el objetivo de mejorar la supervivencia de las bacterias probióticas y manteniendo intacto el prebiótico durante la exposición a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal. El rendimiento de encapsulación de células viables fue muy bajo. Debido a esto, la quercetina y *L. gasseri* o *B. bifidum* fueron microencapsulados por separado; donde se observó que fueron resistentes a las condiciones gástricas simuladas (pH 2.0, 2 horas) y la solución bilis (3%, 2 horas), dando como resultado la mejora de la supervivencia en comparación con las bacterias libres.

Totosaus y col. (2013) encapsularon cuatro cepas de bacterias ácido lácticas (*Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*) en mezclas de hidrocoloides de alginato, alginato-gelana y alginato-κ-carragenina-algarrobo por la técnica de emulsión, estudiando las propiedades texturales de los geles formados por los materiales encapsulantes y la viabilidad de las cepas utilizadas. La microscopía electrónica de barrido mostró que el alginato formó un núcleo sólido, pero poroso; y que la adición de gelana resultó en una superficie lisa con núcleo poroso. La viabilidad de las bacterias fue mayor cuando se utilizaron mezclas de alginato con otros hidrocoloides aún después de 30 días de almacenamiento a 4°C; por lo que la encapsulación de bacterias ácido lácticas tuvo un efecto positivo en su viabilidad.

Sathyabama y col. (2014) estudiaron el efecto de la encapsulación de dos cepas probióticas aisladas de heces humanas: *Staphylococcus succinus* (MAbB4) y *Enterococcus faecium* (FIdM3) y dos prebióticos: la remolacha azucarera y la achicoria, los cuales fueron encapsulados por separado con ambas cepas usando como matriz alginato de sodio por medio de gelificación iónica. Se evaluó la supervivencia de células en condiciones *in vitro* y los resultados indicaron una mejora significativa en la supervivencia de las células co-encapsuladas cuando se expusieron a condiciones ácidas (pH 2.0-3.0) y bilis (0.3, 0.6 y 0.8 g/100 ml). Las

células encapsuladas mostraron del 98.75% a 88.75% de supervivencia en el entorno gástrico simulado. La viabilidad se mantuvo durante todo el período de almacenamiento durante treinta días a 4°C.

Pérez-Chabela y col. (2013) determinaron la viabilidad de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas termotolerantes: *Aerococcus viridans* UAM21, *Enterococcus faecium* UAM10a, *Lactobacillus plantarum* UAM17, y *Pediococcus pentosaceus* UAM11; después de su microencapsulación por secado por aspersión utilizando goma arábica y su adición a un batido cárnico. Se observó que las cepas sobrevivieron bien al proceso de secado utilizando una temperatura de entrada de 100°C y una temperatura de salida de 60°C. Previamente se habían identificado estas cepas como termotolerantes, con valores D arriba de los 70°C. El valor D es el tiempo de reducción decimal a cierta temperatura para destruir el 90% de la cuenta total de microorganismos por efecto de la misma.

Arslan y col. (2015) encapsularon a *Saccharomyces boulardii*; una cepa que se ha usado en algunas formulaciones de alimentos en los últimos años debido a sus propiedades probióticas. Sin embargo, no es suficientemente estable para el procesamiento de alimentos y los sistemas gastrointestinales. En este estudio, *S. boulardii* fue microencapsulado con seis materiales de pared diferentes (gelatina, proteína de suero concentrado, almidón modificado, maltodextrina, proteína de chícharo y goma arábica) y se utilizó el secado por aspersión con dos temperaturas de entrada diferentes: 80°C y 125°C. Los resultados mostraron que los materiales con mejor rendimiento de encapsulación fueron la proteína de suero y la goma arábica. La supervivencia del *S. boulardii* a condiciones gástricas fue mayor en la temperatura de secado más alta. La supervivencia en condiciones gástricas mostró que la goma arábica es el mejor material de la pared seguido de gelatina y proteína de chícharos. En conclusión, el secado por aspersión es un método efectivo que puede reemplazar células libres en la formulación de alimentos y asegurar su viabilidad frente a las condiciones gástricas.

Rajam y Anandharamakrishnan (2015) encapsularon una cepa de *Lactobacillus plantarum* MTCC 5422 con fructooligosacáridos (FOS) como material de la pared,

para producir un simbiótico mediante secado por aspersión. Los FOS se utilizaron en combinación con proteína de suero encapsular la bacteria probiótica. Se encontró una buena viabilidad de las bacterias después del secado, durante el almacenamiento y en condiciones gástricas e intestinales simulados. Por lo tanto, el secado por aspersión usando FOS como material encapsulante tiene aplicaciones potenciales en la industria alimentaria funcional.

Khem y col. (2016) evaluaron la influencia del pH y el calor cuando se encapsuló por secado por aspersión a una cepa de *Lactobacillus plantarum* A17 en una serie de matrices de proteína de suero con diversos grados de desnaturalización. Ellos observaron que las microcápsulas de proteína de suero obtenidas a pH 7 (nativo) y pH 4, tuvieron una tasas de supervivencia de 69.0% y 39.3% respectivamente; así como aquellas que fueron obtenidas a pH 7 con tratamiento térmico de 75°C durante 1 min y 78°C durante 10 min mostraron tasas de supervivencia durante el secado por pulverización de, 40.3% y 25.0%, respectivamente. Se observó una mayor supervivencia significativa del probiótico en la matriz de suero de proteína nativa, donde la estructura de la proteína era más compacta y globular. Después de la exposición al ácido a pH 4, la supervivencia de *L. plantarum* A17 se redujo a 39%. Por lo tanto, se concluyó que un menor grado de desnaturalización de la proteína antes del secado por aspersión beneficia la supervivencia de *L. plantarum* A17 durante su encapsulación. Por último, se determinó que las condiciones del secado (temperatura de salida de 70°C) no contribuyeron significativamente a una mayor desnaturalización de la matriz de la proteína de suero.

2.7 Viabilidad de bacterias probióticas

La definición actual de la OMS de los probióticos les caracteriza como complementos alimenticios viables, por lo que la determinación fiable de la viabilidad en los productos es esencial, tanto en estudios en seres humanos, como en el control de la calidad del producto. En la mayoría de los análisis de regulación, el método de recuento en placa se ha utilizado tradicionalmente para controlar la viabilidad de las bacterias, pero hay varios inconvenientes. El método

de recuento en placa requiere medios de cultivo específicos y tiempos de incubación relativamente largos, y se ve obstaculizada por dificultades técnicas en condiciones de incubación para las diferentes especies. Para muchas especies de probióticos que residen en el tracto intestinal humano, ni siquiera hay un medio de crecimiento adecuado y conocido; estas dificultades pueden llevar a una subestimación de las cuentas de probióticos reales; pero no obstante se pueden medir como viables usando ensayos citológicos (Van Loveren y col., 2012).

2.7.1 Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de las células o partículas suspendidas en un líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz (Nunez, 2001).

Una suspensión celular se inyecta al fluido laminar donde las células pasan por un capilar hasta llegar a un rayo láser. Cuando este rayo incide en la célula, la luz sale dispersada hacia adelante y hacia los lados, lo cual genera información sobre tamaño, granularidad y morfología celular. Si la célula va marcada por un fluorocromo o es autofluorescente, la luz fluorescente se procesa a través de distintos fotomultiplicadores, en el sistema procesador de datos y son analizadas por un software (Bogh y Duling, 1993).

La citometría de flujo se ha empleado junto con marcadores o fluorocromos específicos para evaluar la viabilidad de bacterias en productos alimenticios

2.7.1.1 Estudios de viabilidad utilizando citometría de flujo

Yáñez (2007) evaluó la sobrevivencia por citometría de flujo de *Lactobacillus delbrueckii* spp. cuando fue encapsulado por polimerización interfacial con goma arábica, goma de semillas de mezquite, goma gelana y sus mezclas; utilizando el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight y el citómetro de flujo FaCs Sort (Beckton

Dickinson). Los porcentajes de viabilidad obtenidos demostraron que existió una reducción de la viabilidad entre el 47% y 80% debido al proceso de encapsulación, y que la mejor biocompatibilidad con gelana al 0.5% y la combinación goma arábica- gelana 0.5% en una relación 1:1.

Geng y col. (2014) utilizaron un método analítico para determinar la viabilidad de bifidobacterias en productos lácteos a partir del desarrollo de un anticuerpo monoclonal de alta eficiencia (95.5%) contra *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* para su detección por citometría de flujo. Los resultados de viabilidad en cuatro productos lácteos comerciales que contienen *B. lactis* mostraron una buena correlación con el método de cuenta en placa estándar, además de disminuir el tiempo de análisis a 2 horas, respecto a las 72 horas normales de un cultivo de esta cepa. Este estudio demostró que el uso de la tecnología de citometría de flujo podría ser una solución rápida para el análisis específica de probióticos en productos lácteos.

Guzzon y Larcher (2015) aplicaron la citometría de flujo en el monitoreo microbiológico durante el proceso de elaboración del vino para diferenciar levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* vivas y muertas. Esta discriminación de las poblaciones se consiguió utilizando dos colorantes fluorescentes (flouresceína y yoduro de propidio) que miden la actividad metabólica y la integridad de la membrana de la levadura. Este enfoque analítico se aplicó por primera vez para el control de calidad de la levadura seca activa y al comparar los resultados del estudio con las técnicas de cuenta en placa del Codex Enológico Internacional de la Organización Internacional de la Viña y el Vino, se demostró que el análisis por citometría de flujo es una valiosa alternativa, dada la facilidad de ejecución y la alta calidad de los resultados obtenidos en términos de reproducibilidad, repetibilidad, e intervalo de confianza.

Raymond y Champagne (2015) evaluaron la precisión y exactitud de la citometría de flujo en la cuantificación de poblaciones de bacterias probióticas (*Lactobacillus rhamnosus* R0011) en dos formas secas comerciales, y su enumeración en una matriz de chocolate. Se observó que con la citometría de flujo eran dos veces

más precisas (reproducibles) las cuentas totales, que en los recuentos tradicionales por microscopía. Con la citometría fue posible determinar los niveles de las células muertas en cultivos frescos, que no es posible con las metodologías tradicionales de UFC. No hubo interferencia de los sólidos de chocolate en el análisis de citometría por lo que esta tecnología puede servir para identificar el nivel de inoculación correcta de una muestra, y el recuento de bacterias viables posterior a la fabricación de los productos.

3. JUSTIFICACIÓN

El interés por parte del consumidor en incluir en su alimentación algunas alternativas que contribuyan a mejorar su estado de salud y bienestar ha llevado a que la industria alimentaria presente oportunidades para el mercado de los alimentos funcionales, ya que éstos contribuyen a prevenir y contrarrestar el riesgo de algunas enfermedades, al ser incluidos como parte de una dieta saludable.

La ventaja de las bacterias ácido lácticas termotolerantes probióticas es la capacidad de sobrevivir a temperaturas altas, lo que les permite ser utilizadas en técnicas de microencapsulación como lo es el secado por aspersion sin afectar su funcionalidad; así mismo tienen potencial para ser utilizadas en productos en donde se lleve a cabo un proceso térmico en su elaboración. Por otra parte los co-productos agroindustriales son desechos que si no son bien tratados, pueden llegar a ser contaminantes, por lo que utilizarlos como prebióticos les da un valor agregado.

Con la encapsulación del probiótico y del prebiótico con potencial simbiótico, aseguramos su viabilidad hasta la llegada al intestino, donde inducen un conjunto de efectos metabólicos benéficos para el hospedero.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Conocer el efecto de dos tipos de encapsulación sobre la viabilidad y funcionalidad de un simbiótico.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar la viabilidad de cuatro bacterias ácido lácticas termotolerantes probióticas (*Lactobacillus plantarum* UAM17, *Enterococcus faecium* UAM18, *Aerococcus viridans* UAM21b y *Pediococcus pentosaceus* UAM22a) y de harinas de dos diferentes co-productos agroindustriales (cáscara de tuna y bagazo de manzana) usando microencapsulación por gelificación iónica y secado por aspersión.
- Evaluar la funcionalidad de cuatro bacterias ácido lácticas termotolerantes probióticas (*Lactobacillus plantarum* UAM17, *Enterococcus faecium* UAM18, *Aerococcus viridans* UAM21b y *Pediococcus pentosaceus* UAM22a) y de harinas de dos diferentes co-productos agroindustriales (cáscara de tuna y bagazo de manzana) por gelificación iónica y secado de aspersión.

5. METODOLOGÍA

La estrategia experimental se describe de manera general en la figura 3 y se dividió en dos etapas. La primera consistió en la formación y caracterización de las dispersiones de biopolímeros para llevar a cabo la microencapsulación por gelificación iónica y secado por aspersión. La segunda etapa consistió en la caracterización de las microcápsulas, evaluando el tamaño de partícula, viabilidad y funcionalidad durante la vida de anaquel y resistencia a condiciones gástricas.

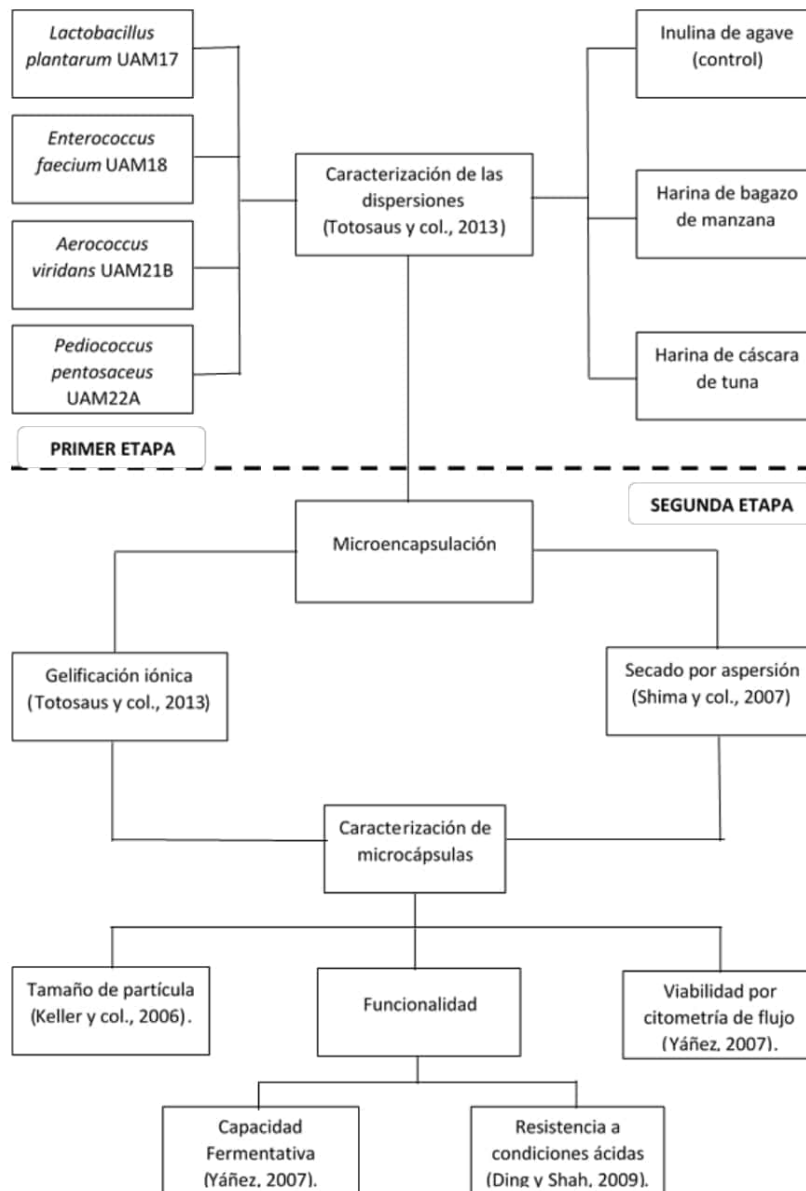


Figura 3. Estrategia Experimental.

PRIMER ETAPA. Formación y caracterización de las dispersiones de biopolímeros para llevar a cabo la microencapsulación.

5.1 Bacterias ácido lácticas

Se utilizaron cuatro cepas de bacterias, *Lactobacillus plantarum* UAM17, *Enterococcus faecium* UAM18, *Aerococcus viridans* UAM21b y *Pediococcus pentosaceus* UAM22a, las cuales fueron reportadas como probióticas por Ramírez-Chavarin y col. (2013).

Las cepas fueron descongeladas y transferidas a caldo MRS (De Man y col., 1960) estéril para posteriormente ser incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 20 ± 2 horas. Posteriormente se midió la absorbancia de la suspensión celular en un espectrofotómetro a 600 nm, en un intervalo de absorbancias que correspondieran a concentraciones alrededor de 10^8 UFC/mL. Se procedió a centrifugar la suspensión celular en una centrífuga SOLBAT modelo J40 a 4000 rpm durante 15 minutos; obteniendo un botón celular.

5.2 Obtención de harinas de co-productos agroindustriales

El bagazo de manzana (*Malus domestica* var. *rayada*), se recolectó de las Bodegas Delicias, en Zacatlán, Puebla; la cáscara de tuna (*Opuntia ficus-indica* L.), se recolectó en los establecimientos de fruta fresca en Iztapalapa, Ciudad de México. Los dos co-productos agroindustriales llevaron un proceso de secado a 65°C durante el tiempo que fue necesario para eliminar la humedad (ocho horas aproximadamente) o hasta que se presentó un peso constante. Posteriormente, se molió en un procesador de alimentos convencional y por último, el producto obtenido se tamizó con malla No. 100, 80 y 50 para homogenizar el tamaño de partícula, estos fueron empacados al vacío y almacenados en un lugar seco y fresco a temperatura ambiente hasta su uso (Chávez-Zepeda y col., 2009).

La inulina de agave (inulinas comerciales: Nano Nutrition, S. de R. L. de C. V.; Naucalpan, Edo. de México), se utilizó como control; y está compuesta por 98% de fibra soluble y 2% de monosacáridos.

5.3 Caracterización de las dispersiones

Para las dispersiones de los biopolímeros utilizados y las mezclas con las harinas prebióticas, fueron determinadas sus viscosidades por triplicado a $19\pm 1^\circ\text{C}$ en un viscosímetro (Brookfield DV-II+Pro, USA), usando un spin de 0.5 a 20 rpm (Totosaus y col., 2013).

5.4 Microencapsulación

5.4.1 Microencapsulación por emulsión

Se realizó la técnica reportada por Totosaus y col. (2013) la cual está basada en la formación de una emulsión agua en aceite (W/O). Consistió en preparar 100 mL de dispersión (fase acuosa) de alginato de sodio (2% w/v), adicionando el botón celular obtenido por centrifugación, resultado del crecimiento de las cepas puras en caldo MRS 20 horas a 37°C , equivalente a 1×10^8 UFC/mL y 1% de la harina de bagazo de manzana, o harina de cáscara de tuna. Posteriormente a la mezcla se agregó CaCO_3 (0.04M). De manera separada, se prepararon 200 mL de aceite de maíz (Golden Hills, México) con 2.5 mL de tween 80 (fase oleosa). En agitación constante, la fase acuosa fue adicionada a la fase oleosa permitiendo la formación de la emulsión W/O, en seguida se agregaron 40 mL del mismo aceite mezclado con ácido acético glacial (0.35 M) para iniciar el proceso de gelificación. Este sistema se mantuvo en agitación durante 20 min para la completa formación de las cápsulas. Finalmente, se decantó la fase oleosa, las cápsulas fueron lavadas con agua destilada y dos veces con una solución buffer de fosfatos (pH 7.2) para eliminar los residuos de aceite. Las cápsulas fueron almacenadas a 4°C para su posterior análisis.

5.4.2 Microencapsulación por secado por aspersion

Cada suspensión bacteriana se centrifugó a 2000 g durante 15 min y el sedimento celular se resuspendió en 100 mL de solución estéril de goma arábica (20%, w / v) para la encapsulación. El secado por aspersion se llevó a cabo en el secador Spray-Lab-GCDL-1 con una temperatura de entrada de 120 °C y una temperatura de salida de 80°C a un flujo de entrada al aspersor de 5.1 mL/min y una presión de aire de 2 bares. Las muestras de polvo obtenidas se colocaron en frascos previamente esterilizados y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis de viabilidad y funcionalidad (Shima y col., 2006).

SEGUNDA ETAPA. Caracterización de las microcápsulas, tamaño de partícula, viabilidad y funcionalidad en la vida de anaquel y resistencia a condiciones gástricas.

5.5 Determinación del tamaño de partícula de microcápsulas

5.5.1 Microcápsulas obtenidas por secado por aspersion

El análisis de tamaño de partícula de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersion se realizó en un analizador de partículas Scirocco MS200 utilizando la unidad para polvos. La celda se cargó con 1 g de la muestra a analizar y se utilizó un flujo de aire de 1.5 y una alimentación de la muestra de 75%. La determinación se realizó por triplicado y se utilizó el software Mastersize 2000 para su análisis.

5.5.2 Microcápsulas obtenidas por gelificación iónica

Se determinó el tamaño de partícula a través de microscopía óptica (Nova-9515196), utilizando un portaobjetos y un ocular con reglilla micrométrica; se calibró la reglilla para el objetivo 10X y se hicieron mediciones del diámetro de las microcápsulas por triplicado (Keller y Goldman, 2006)

5.6 Viabilidad de bacterias encapsuladas

Se determinó la viabilidad de las cepas encapsuladas por citometría de flujo a través del kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight (*Molecular Probes*, Oregon), el cual cuenta con los tintes SYTO 9 y yoduro de propidio. De acuerdo con la metodología reportada por Pimentel-González y col. (2009) cuando se usa SYTO 9 las células viables se tiñen de color verde, esto debido a que penetra la membrana, tiñendo las cadenas de RNA. El yoduro de propidio atraviesa la membrana de células muertas o dañadas (en células viables y sanas es impermeable) y oxida al SYTO 9, dando una coloración roja. Para observar esta coloración se utiliza luz ultravioleta polarizada con una longitud de onda de 600 nm. Se prepararon soluciones de los tintes SYTO 9 (ácido nucleico verde fluorescente) y yoduro de propidio (ácido nucleico rojo fluorescente), disolviendo cada uno de los colorantes en 2.5 mL de agua destilada. En seguida, se preparó una mezcla 1:1 de ambos colorantes, y 225 μ L de esta mezcla fueron adicionados a 225 μ L de microcápsulas disueltas en una solución PBS. Después de adicionada la mezcla de colorantes a la muestra, ésta se dejó incubar durante quince minutos. La concentración final de los fluorocromos fue de 6 μ M para el SYTO9 y 30 μ M para el yoduro de propidio.

5.6.1 Citometría de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur Beckton-Dickinson. La suspensión de microcápsulas teñidas se colocó en la cámara de flujo del citómetro y al pasar por el haz de láser, se emite una luz fluorescente y dispersa, que es separada de acuerdo a su longitud de onda. Estas señales luminosas son integradas y analizadas por el software *Cell Quest* v.3.1 emitiendo porcentajes de células dañadas y no dañadas de acuerdo a los dos fluorocromos empleados. Posteriormente se procedió al análisis con ayuda del programa *Flowing Software*, en los gráficos *dot plot* se graficó el log de la fluorescencia verde vs log de la fluorescencia roja y se procedió a dividir el área de emisión de fluorescencia respuesta en tres zonas (Figura 4), como lo indica el kit de viabilidad c; R3 a células dañadas o muertas, R2 es la zona de emisión de células vivas y R1 es la

zona ocupada por células que no fueron discriminadas por el láser, o restos de material de encapsulación (Yáñez, 2007).

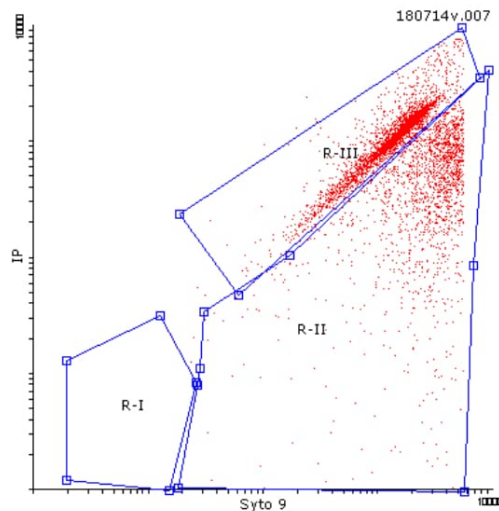


Figura 4 . Yoduro de propidio presente en bacterias muertas o dañadas.

5.7 Funcionalidad de Bacterias

La funcionalidad de bacterias libres y microencapsuladas se evaluó dando seguimiento a su capacidad fermentativa a través de la modificación del pH de caldo MRS a 37°C (Yáñez, 2007). Las microcápsulas fueron añadidas en una dilución de 10^{-3} . Se determinó la cuenta inicial por cuenta en placa en agar MRS y la cinética de pH se siguió hasta un tiempo de ocho horas.

5.7.1 Resistencia a condiciones ácidas

Se inocularon bacterias libres como control y las bacterias encapsuladas en tubos de caldo MRS a una concentración de 10^8 UFC/mL. Posteriormente se ajustó el pH a 2.0 con ácido clorhídrico 5.0 M; se incubaron en un baño a 37°C durante dos horas y se monitorearon cada treinta minutos. Para la liberación de la bacteria, se agitó vigorosamente utilizando un vórtex; se realizó cuenta en placa en agar MRS, incubando las cajas a 37°C por 48 horas en una jarra de anaerobiosis usando sobres de GasPak (Ding y Shah, 2009).

5.8 Diseño experimental y análisis estadístico

5.8.1 Primera Etapa

Para la primera etapa del estudio, se realizaron análisis de varianza para la caracterización de las dispersiones de los biopolímeros. El modelo que fue utilizado, de acuerdo a Montgomery (2006) es:

$$Y_i = \mu + \alpha_i \varepsilon_i \quad (\text{Ecuación 1}).$$

Dónde:

y_i = es la viscosidad al i-ésimo nivel del tipo de sustrato prebiótico.

μ = es la media global del modelo.

α_i = es el efecto del tipo de sustrato (j= inulina, bagazo de manzana, cáscara de tuna)

ε_i = es el error experimental.

5.8.2 Segunda Etapa

En la segunda etapa de este estudio consistió en la caracterización de las microcápsulas obtenidas, el modelo que fue utilizado de acuerdo a Montgomery (2006) se muestra en las ecuaciones utilizadas:

Para el rendimiento de encapsulación:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dónde:

y_{ijk} = es el rendimiento de la encapsulación al i-ésimo nivel del tipo de cepa probiótica, para el j-ésimo nivel del tipo de sustrato prebiótico y el k-ésimo nivel de tipo de encapsulación.

μ = es la media global del modelo

α_i = es el efecto de la bacteria probiótica (i= UAM17, UAM18, UAM21b, UAM22a)

β_j = es el efecto del tipo de probiótico (j= inulina, bagazo de manzana, cáscara de tuna)

γ_k = es el efecto del tipo de encapsulación (k=secado por aspersión, gelificación iónica)

ε_{ijk} = es el error experimental.

Para el tamaño de partícula

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Dónde:

y_{ij} = es el tamaño de partícula al i-ésimo nivel del tipo de cepa y para el j-ésimo nivel del tipo de encapsulación.

μ = es la media global del modelo

α_i = es el efecto de la cepa (i= UAM17, UAM18, UAM21b, UAM22a)

β_j = es el efecto del tipo de sustrato prebiótico (j=inulina, cáscara de tuna, bagazo de manzana)

ε_{ij} = es el error experimental.

Para determinar la viabilidad del simbiótico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Dónde:

y_{ijk} = es el porcentaje de sobrevivencia al i-ésimo nivel del tipo de cepa probiótica, para el j-ésimo nivel del tipo de sustrato prebiótico y el k-ésimo nivel de tipo de encapsulación.

μ = es la media global del modelo

α_i = es el efecto de la bacteria probiótica (i= UAM17, UAM18, UAM21b, UAM22a)

β_j = es el efecto del tipo de probiótico (j= inulina, bagazo de manzana, cáscara de tuna)

γ_k = es el efecto del tipo de encapsulación (k=secado por aspersión, gelificación iónica)

ε_{ijk} = es el error experimental.

Para cuantificar la tasa de sobrevivencia se realizó el cálculo del porcentaje de resistencia a condiciones ácidas mediante la siguiente ecuación:

$$R = \frac{N}{N_0} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 5})$$

En donde N_0 es la cuenta total inicial y N la cuenta total al final de las dos horas en medio acidificado a pH 2.0. Para determinar la resistencia a condiciones gástricas del simbiótico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Dónde:

y_{ijk} = es el porcentaje de resistencia a la acidez al i -ésimo nivel del tipo de sustrato prebiótico, para el j -ésimo nivel del tipo de encapsulación y el k -ésimo nivel de tiempo de almacenamiento.

μ = es la media global del modelo

α_i = es el efecto del tipo de probiótico (i = inulina, bagazo de manzana, cáscara de tuna)

β_j = es el efecto del tipo de encapsulación (j =secado por aspersion, gelificación iónica)

γ_k = es el efecto del tiempo de almacenamiento (k = día 1, día 15, día 30)

ε_{ijk} = es el error experimental.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por análisis de varianza y medias de Duncan. Todos los datos fueron analizados usando el software estadístico SAS.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMER ETAPA. Formación y caracterización de las dispersiones de biopolímeros para llevar a cabo la microencapsulación.

6.1 Caracterización de las dispersiones. Viscosidad

La viscosidad es un parámetro importante a evaluar para las dispersiones encapsulantes. En el caso de la gelificación iónica por emulsión, la viscosidad y la velocidad de agitación influyen en el tamaño de las microcápsulas, en las que se permite obtener diámetros menores a 1000 μm , además de contar con los beneficios de bajo costo y no toxicidad (Rosas- Flores, 2008).

En el secado por aspersión, es importante el control del parámetro de viscosidad. Se utilizan biopolímeros con bajas viscosidades, como la goma arábica, que facilitan el flujo de alimentación, y aseguran que la dispersión no obstruya el aspersor en el momento de la encapsulación de la bacteria y su sustrato (Burgain y col., 2011).

En la tabla 2 se muestran los resultados de la viscosidad de las dispersiones utilizando gelificación iónica. Existe un aumento en la viscosidad de dispersiones de alginato de sodio al 2% cuando son añadidas las harinas prebióticas. La mezcla con mayor viscosidad es cuando se añade la inulina con una viscosidad de 230 cP. Esto es debido a que la inulina tiene la capacidad de ser un espesante alimenticio, usado incluso en la industria para tal efecto (Wang, 2009). Con las harinas tanto de cáscara de tuna (180.67 cP), como de bagazo de manzana (179.43 cP), el aumento de viscosidad podría deberse a los carbohidratos solubles e insolubles contenidos en las dispersiones, que se reportan como 11.01% y 59.81% para el bagazo de manzana y 30.67% y 33.48% para la cáscara de tuna (Cerde-Tapia, 2014; Díaz-Vela y col., 2013).

Cai y col. (2014) reportaron viscosidades de 21 640 cP en dispersiones de alginato de sodio con CaCO_3 como agente para la gelificación interna; ya que se ha

observado que esta fuente de Ca^{2+} forma mejores microcápsulas respecto a estabilidad y funcionalidad. Rosas-Flores y col. (2013) reportaron que a diferentes velocidades de agitación en la elaboración de las cápsulas por emulsión, la viscosidad va disminuyendo, teniendo ellos mejores resultados a 800 rpm donde encuentran una viscosidad de 21 122 cP. Comparando estos resultados con las dispersiones usadas para este proyecto, se observa que el aumento de la viscosidad al utilizar harinas prebióticas se debe al contenido de carbohidratos solubles e insolubles presentes, los cuales pueden interactuar con el proceso de encapsulación.

Tabla 2. Viscosidad de las dispersiones de alginato de sodio para gelificación iónica.

Tratamiento	Viscosidad η (cP)
Alginato 2%	135.43±19.41 ^d
Alginato 2% + Inulina 1%	230.00±38.41 ^a
Alginato 2% + Manzana 1%	176.43±24.55 ^c
Alginato 2% + Tuna 1%	180.67±25.63 ^b

a, b, c, d Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para el material

En la Tabla 3 se muestran la viscosidad aparente de las dispersiones utilizando secado por aspersion. En el caso de las dispersiones de goma arábica usadas para el secado por aspersion, se observó una mayor viscosidad aparente cuando se utiliza bagazo de manzana (2.56 cP), que cuando se utiliza la harina de cáscara de tuna (1.23 cP). Esto podría deberse a los restos pectínicos contenidos en el bagazo que aumentan el nivel de viscosidad en la dispersión (Cerde-Tapia, 2014).

Comparando los dos tipos de biopolímeros utilizados para las encapsulaciones, se observan viscosidades aparentes menores con la goma arábica cuando se utilizan las harinas prebióticas, respecto a las dispersiones con alginato de sodio. Esto se debe a la naturaleza química de las dispersiones, en donde las uniones en el alginato de sodio son más fuertes entre el ácido galacturónico y manurónico (Cook y col., 2012) respecto a los residuos galactosilo, arabinosil, ramosil y glucuronosil

que forman parte de la goma arábica y le dan la propiedad de tener una baja viscosidad, lo que permite el uso de altas concentraciones de ésta (Islam y col., 2007).

Tabla 3. Viscosidad aparente de las dispersiones de goma arábica para secado por aspersión.

Tratamiento	Viscosidad η (cP)
Goma arábica 20%	1.27±0.04 ^b
Goma arábica 19%+ Inulina 1%	2.69±0.30 ^d
Goma arábica 19% + Manzana 1%	2.56±0.51 ^c
Goma arábica 19% + Tuna 1%	1.23±0.15 ^a

a, b, c, d Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para la material.

Cabe mencionar que los dos tipos de encapsulación utilizados requieren un proceso térmico para la elaboración de las dispersiones; se ha observado que cuando contienen carbohidratos solubles se aumentan propiedades funcionales como la viscosidad, lo cual es otra posible explicación del aumento de ésta al ser añadidas las harinas prebióticas (FAO, 1999b).

SEGUNDA ETAPA. Caracterización de las microcápsulas, tamaño de partícula, viabilidad y funcionalidad en la vida de anaquel y resistencia a condiciones gástricas.

6.2 Rendimiento de Encapsulación

El rendimiento de encapsulación es un parámetro que permite conocer la eficiencia con la cual las bacterias probióticas fueron encapsuladas en el proceso fisicoquímico, mediante una relación de cuenta en placa antes y después de la encapsulación.

En la Tabla 4 se muestran los resultados del rendimiento de encapsulación utilizando secado por aspersión y gelificación iónica. Se observa que existe una

diferencia significativa en el rendimiento de encapsulación dependiendo de la cepa que se utilice, teniendo mejores rendimientos UAM18 (90.91% para manzana y 85.94% para tuna), seguida de UAM22a (90.50% para manzana y 86.14% para tuna), UAM21b (90.0% para manzana y 85.24% para tuna) y por último UAM17 con el menor rendimiento (88.94% para manzana y 83.78% para tuna). Respecto al sustrato prebiótico, se encuentran diferencias significativas que muestran un mayor rendimiento con el bagazo de manzana, respecto al de la cáscara de tuna.

Tabla 4. Rendimientos de encapsulación utilizando secado por aspersion y gelificación iónica

Cepa	Sustrato	Rendimiento de Encapsulación (%)	
		Secado aspersion	Gelificación iónica
<i>L. plantarum</i> Uam17	Inulina	90.30 ^{d, f, A}	87.36 ^{d, f, B}
	Tuna	88.02 ^{d, g, A}	83.78 ^{d, g, B}
	Manzana	89.48 ^{d, e, A}	88.94 ^{d, e, B}
<i>E. faecium</i> Uam18	Inulina	91.79 ^{a, f, A}	87.92 ^{a, f, B}
	Tuna	89.59 ^{a, g, A}	85.94 ^{a, g, B}
	Manzana	91.12 ^{a, e, A}	90.91 ^{a, e, B}
<i>A. viridans</i> Uam21b	Inulina	91.00 ^{c, f, A}	87.82 ^{c, f, B}
	Tuna	88.98 ^{c, g, A}	85.24 ^{c, g, B}
	Manzana	90.75 ^{c, e, A}	90.00 ^{c, e, B}
<i>P. pentosaceus</i> Uam22a	Inulina	91.44 ^{b, f, A}	88.13 ^{b, f, B}
	Tuna	89.72 ^{b, g, A}	86.14 ^{b, g, B}
	Manzana	91.19 ^{b, e, A}	90.50 ^{b, e, B}

a, b, c, d Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para la cepa

e, f, g Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para el sustrato

A, B Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para el tipo de encapsulación

Se ha reportado que el bagazo de manzana tiene un porcentaje de carbohidratos totales de 77.46% de los cuales el 11.10% pertenece a fibra soluble, la cual está

compuesta por fructooligosacáridos (Cerde-Tapia, 2014); en el caso de la cáscara de tuna, los valores son de 22.16% de carbohidratos totales y de la cual 30.67% es fibra soluble (Díaz-Vela y col., 2013). Los fructooligosacáridos han sido utilizados como componentes del material de encapsulación de algunas bacterias probióticas. Rajam y Anandharamakrishnan (2015) evaluaron la eficiencia de encapsulación por secado por aspersión de una cepa de *L. plantarum* y fructooligosacáridos. Los resultados mostraron que las microcápsulas con fructooligosacáridos como componentes de pared, presentaron una eficiencia de encapsulación de 70-72%. Los fructooligosacáridos contenidos tanto en el bagazo de manzana como en la cáscara de tuna podrían tener un efecto positivo en la encapsulación ya que pueden formar parte del material de pared, y aumentar el rendimiento del proceso.

Chavarri y col. (2010) reportaron una eficiencia de encapsulación del 19.5% para una cepa de *Lactobacillus* y un rendimiento de 22.2% para una cepa de *Bifidobacterium* encapsuladas con quercetina en una mezcla de alginato-quitosano; ellos observaron bajos rendimientos debido a las interacciones del probiótico con el prebiótico, así como problemas de encapsulación al ser la quercetina, una molécula que necesita un mayor tamaño de las microcápsulas. Rosas-Flores y col. (2013) reportaron una eficiencia del 93.83% cuando es encapsulada una cepa de *Lactobacillus* por gelificación iónica por emulsión usando alginato de sodio. Cai y col. (2014) reportaron rendimientos de encapsulación de 37.9% para una cepa de *Lactobacillus*, sin embargo mencionan que su porcentaje es bajo debido a la vulnerabilidad de la cepa al ácido acético glacial utilizado en la preparación de las microcápsulas.

El material de encapsulación utilizado y las harinas prebióticas usadas para los dos métodos de encapsulación influyen positivamente en el proceso, ya que se obtuvieron rendimientos mayores al 80%; los cuales son mayores a los citados anteriormente. Los dos métodos de encapsulación presentan altos porcentajes de rendimiento, el secado por aspersión fue ligeramente superior a la gelificación iónica. También se observó que la cepa UAM18 y el bagazo de manzana son

buena combinación simbiótica al tener el rendimiento más alto (90.91%). Esto puede ser debido a una alta capacidad de la cepa de sobrevivencia al proceso térmico del secado, así como la interacción con el bagazo de manzana que influye en el proceso de encapsulación.

6.3 Tamaño de Partícula

El tamaño de las microcápsulas y su distribución son propiedades físicas importantes que influyen directamente en aspectos sensoriales y de aceptación del consumidor cuando estas se usan en formulaciones para alimentos.

Respecto al sustrato prebiótico, en el secado por aspersión se observaron diferencias significativas en el tamaño de las microcápsulas, con cáscara de tuna, que presentaron un mayor diámetro (UAM17 con 25.25 μm , UAM18 con 44.36 μm , UAM21b con 27.19 μm y UAM22a con 29.00 μm) respecto a las formadas con bagazo de manzana con menor tamaño (UAM17 con 12.81 μm , UAM18 con 16.59 μm , UAM21b con 21.98 μm y UAM22a con 21.98 μm). Esto podría deberse a la interacción con la goma arábica y los carbohidratos insolubles que propician un tamaño mayor. El secado por aspersión, al tener menos fuentes de variación, permite obtener menores tamaños de partícula que la gelificación iónica. En el caso de ésta última, el bagazo de manzana y la inulina no tienen diferencias significativas en sus tamaños, mientras la cáscara de tuna es la que tiene un menor tamaño. Cabe mencionar que por la técnica utilizada, es probable que ciertos carbohidratos como los fructooligosacáridos contenidos en las harinas prebióticas, pudieran formar parte del material de pared, por lo que los tamaños de partícula son mayores a los del secado por aspersión (tabla 5).

La encapsulación de harinas prebióticas junto con las bacterias probióticas aumenta el diámetro de las cápsulas, a diferencia de cuando sólo se encapsula a la cepa. Un factor importante es el porcentaje de fibra soluble, el cual influye en la incorporación de la harina prebiótica dentro de la microcápsula. Chavarri y col. (2010) reportaron tamaños de partícula de $542.71 \pm 4.33 \mu\text{m}$ de diámetro para una cepa de *Lactobacillus* que fue encapsulada junto con quercetina como prebiótico y

de $523.09 \pm 3.9 \mu\text{m}$ de diámetro para microcápsulas de *Bifidobacterium* y quercetina; todas ellas utilizando una mezcla alginato-quitosano como material de pared. Rosas-Flores y col. (2013) reportaron tamaños de 100-120 μm cuando utilizan velocidades de agitación durante la encapsulación de 400 rpm y encontraron que a mayor agitación, hay un menor tamaño de la microcápsula, pero lo que también implica una menor viabilidad de la bacteria. Cai y col. (2014) reportaron tamaños de partícula de microcápsulas de alginato de sodio y CaCO_3 de $223 \pm 21 \mu\text{m}$ cuando es encapsulada una cepa de *Lactobacillus*; también observaron que el tamaño es menor que cuando se utiliza Ca-EDTA como fuente de calcio.

Tabla 5. Tamaños de partícula de la microcápsulas encapsuladas mediante secado por aspersión y gelificación iónica.

Cepa	Material	Aspersión (μm)	Gelificación (μm)
<i>L. plantarum</i> UAM17	Manzana	12.81 ± 0.56 ^{d, C}	92.31 ± 4.79 ^{ab, A}
	Tuna	25.25 ± 1.00 ^{d, A}	69.23 ± 8.31 ^{ab, B}
	Inulina	19.70 ± 0.59 ^{d, B}	92.31 ± 4.79 ^{ab, A}
<i>E. faecium</i> UAM18	Manzana	16.59 ± 0.31 ^{a, C}	89.01 ± 8.30 ^{a, A}
	Tuna	44.36 ± 0.21 ^{a, A}	85.71 ± 9.59 ^{a, B}
	Inulina	19.05 ± 0.99 ^{a, B}	85.71 ± 4.78 ^{a, A}
<i>A. viridans</i> UAM21b	Manzana	21.98 ± 1.63 ^{b, C}	82.42 ± 4.79 ^{c, A}
	Tuna	27.19 ± 0.98 ^{b, A}	82.42 ± 4.79 ^{c, B}
	Inulina	14.66 ± 0.07 ^{b, B}	75.82 ± 9.54 ^{c, A}
<i>P. pentosaceus</i> UAM22a	Manzana	21.98 ± 1.63 ^{c, C}	89.23 ± 8.30 ^{bc, A}
	Tuna	29.00 ± 0.65 ^{c, A}	82.42 ± 9.54 ^{bc, B}
	Inulina	19.78 ± 0.23 ^{c, B}	95.60 ± 4.81 ^{bc, A}

a, b, c, d Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para la cepa.

e, f, g Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para el sustrato.

En encapsulaciones por secado por aspersión; algunos autores como Fritzen-Freire y col. (2012), encapsularon bacterias ácido lácticas con inulina; encontrando que el tamaño de partícula promedio fue de $17.79 \pm 6.5 \mu\text{m}$. En el caso de Rajam

y Anandharamakrishnan (2015), encapsularon *L. plantarum* junto con fructooligosacáridos; ellos reportaron tamaños de partícula de 15.44 μm cuando utilizan sólo los fructooligosacáridos como material de pared, 7.34 μm cuando lo usan combinado con suero de proteína y 6.68 μm cuando esta combinado con suero de proteína desnaturalizado.

Comparando los resultados citados con los obtenidos en este proyecto, se observan diámetros muy similares con las distintas formulaciones de simbióticos; esto debido a que el secado por aspersion al ser una técnica con pocas fuentes de variación, permite tener tamaños de partícula de algunos pocos micrómetros y con una desviación estándar menor, respecto a la gelificación iónica. Es así como las microcápsulas exhiben una amplia gama de tamaños que varían dependiendo del método de encapsulación. Esto fue una tendencia esperada, ya que la técnica del secado permite una mejor homogenización del tamaño de partícula debida al aspersor del equipo; en cambio el proceso de gelificación tiene más variables que influyen en su tamaño, como la velocidad de agitación, las velocidades de adición de las fases acuosa/oleosa, la regulación de la temperatura del proceso y la adición del agente gelificante (Champagne y Fustier, 2007).

6.4. Viabilidad de los simbióticos

Los porcentajes de viabilidad por citometría se encuentran en la tabla 6. El análisis de varianza muestra que la viabilidad de las bacterias se mantiene a través de los 30 días de almacenamiento de las microcápsulas. La cepa con mayor porcentaje es UAM22a, llegando a tener hasta un 89% cuando se combina con harina de cáscara de tuna y usando el secado por aspersion como encapsulación. Las cepas UAM17, UAM18 y UAM21b no tienen diferencias significativas entre ellas.

Tabla 6. Viabilidad de bacterias analizada por Citometría de Flujo

Cepa	Material	Encapsulado	Sobrevivencia (%)	
			Día 1	Día 30
<i>L. plantarum</i> UAM17	Manzana	Aspersión	89.39±0.43 ^{b,d,A,C}	87.97±1.04 ^{b,d,D}
		Gelificación	82.17±0.05 ^{b,d,B,C}	78.32±1.95 ^{b,d,d}
	Inulina	Aspersión	73.78±1.05 ^{b,e,A,C}	64.38±0.12 ^{b,D}
		Gelificación	84.20±2.08 ^{b,e,B,C}	84.05±0.13 ^{b,e,D}
	Tuna	Aspersión	92.36±1.05 ^{b,c,A,C}	87.73±0.60 ^{b,c,D}
		Gelificación	79.58±5.15 ^{b,c,B,C}	76.97±1.30 ^{b,c,D}
<i>E. faecium</i> UAM18	Manzana	Aspersión	87.04±0.52 ^{b,d,A,C}	86.09±0.52 ^{b,d,D}
		Gelificación	79.63±1.47 ^{b,d,B,C}	75.60±0.66 ^{b,d,D}
	Inulina	Aspersión	75.65±1.58 ^{b,e,A,C}	72.09±0.72 ^{b,e,D}
		Gelificación	83.83±2.96 ^{b,e,B,C}	77.91±1.21 ^{b,e,D}
	Tuna	Aspersión	93.18±3.16 ^{b,c,A,C}	90.26±0.24 ^{b,c,D}
		Gelificación	82.47±4.82 ^{b,c,B,C}	79.66±0.47 ^{b,c,D}
<i>A. viridans</i> UAM21b	Manzana	Aspersión	92.03±2.63 ^{b,d,A,C}	90.81±0.98 ^{b,d,D}
		Gelificación	81.03±4.05 ^{b,d,B,C}	78.38±2.04 ^{b,d,D}
	Inulina	Aspersión	68.96±0.52 ^{b,e,A,C}	65.37±0.56 ^{b,e,D}
		Gelificación	77.70±0.58 ^{b,e,B,C}	75.41±0.80 ^{b,e,D}
	Tuna	Aspersión	94.10±0.09 ^{b,c,A,C}	88.90±0.21 ^{b,c,D}
		Gelificación	86.37±0.71 ^{b,c,B,C}	81.88±0.92 ^{b,c,D}
<i>P. pentosaceus</i> UAM22a	Manzana	Aspersión	86.13±2.63 ^{a,d,A,C}	77.29±0.31 ^{a,d,D}
		Gelificación	85.95±3.66 ^{a,d,B,C}	78.34±0.63 ^{a,d,D}
	Inulina	Aspersión	89.82±5.33 ^{a,e,A,C}	79.18±1.05 ^{a,e,D}
		Gelificación	79.82±4.84 ^{a,e,B,C}	76.51±2.21 ^{a,e,D}
	Tuna	Aspersión	95.62±1.58 ^{a,c,A,C}	89.64±1.23 ^{a,c,D}
		Gelificación	90.53±2.35 ^{a,c,B,C}	88.13±2.75 ^{a,c,D}

a, b Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P>0.05$) diferentes para el tipo de cepa.

c, d, e Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P>0.05$) diferentes para material de encapsulado.

A, B Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($P>0.05$) diferentes para el tipo de encapsulado.

C, D Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($P>0.05$) diferentes para tiempo.

En lo que respecta al sustrato prebiótico utilizado, la cáscara de tuna refleja porcentajes superiores a los obtenidos con bagazo de manzana e incluso con la inulina que se utiliza como control. Como se ha discutido antes, la harina de cáscara de tuna tiene un mayor porcentaje de carbohidratos solubles respecto al bagazo de manzana, lo cual se refleja en una cantidad alta de monómeros que pueden ser más fácilmente metabolizados por las bacterias

En los dos tipos de encapsulación se muestran valores superiores al 65% de viabilidad, siendo el secado por aspersion el método con mejores resultados, pues se alcanza hasta 90%. En el parámetro del tiempo, se observa una diferencia significativa entre los días 1 y 30 de monitoreo, lo cual tiene sentido, ya que se esperaba una baja disminución del porcentaje de viabilidad por las condiciones del almacenamiento.

Se han utilizado métodos de fluorescencia para determinar la viabilidad de forma cualitativa. Pérez-Chabela y col. (2013) utilizaron microscopía de fluorescencia para evaluar viabilidad de cepas probióticas adicionadas a un batido cárnico usando el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight donde observaron un gran número de células no dañadas (teñidas de verde) para *L. plantarum* y *P. pentosaceus* después de su encapsulación por aspersion y durante su almacenamiento. Pimentel y col. (2009) utilizaron el kit de viabilidad L13152 LIVE/DEAD BacLight para teñir una cepa de *L. rhamnosus* encapsulada en una doble emulsión con suero dulce, observando bacterias vivas teñidas de color verde a través de microscopía de fluorescencia.

Existen pocos estudios que evalúan la viabilidad de bacterias ácido lácticas por citometría de flujo. Generalmente se han planteado como una buena estrategia para determinar viabilidad de forma rápida frente a las técnicas tradicionales de microbiología y suma una ventaja al momento de escalarlo a procesos industriales. Geng y col. (2014) utilizaron citometría de flujo para evaluar la viabilidad de bifidobacterias en cuatro productos lácteos; estos se marcaron con una sonda fluorescente verde 5,6-CFDA (excitación 518 nm), se cuantificó el número de células viables y se comparó con la cuenta tradicional en placa. El

método de citometría de flujo permitió una rápida cuantificación de *B. lactis* en un lapso de 2 h en lugar de 72 h en las placas de Petri. Se reportan viabilidades entre 7 y 8 log UFC/mL en los productos lácteos y una correlación de 0.954 cuando se comparó con las cuentas en placas.

Raymond y Champagne (2015) utilizaron el kit de viabilidad Live/Dead BacLight (*Molecular Probes Inc.*, Eugene, Oregón, EE.UU.), en el análisis de citometría para determinar la presencia de una cepa de *Lactobacillus* en una barra de chocolate y lo compararon con la cuenta en placa tradicional. Ellos observaron que la citometría de flujo fue más precisa que las placas tradicionales; también evaluaron la diferencia entre manejar cultivos frescos y liofilizados para el proceso de encapsulación por secado por aspersión. En los cultivos liofilizados, la citometría de flujo estimó una supervivencia en 66%, mientras que los métodos tradicionales evaluaron un 37%. En general se observó una pérdida de células viables de aproximadamente 0.2 log por g, además que el chocolate no interfiere en su recuento por citometría, ya que se determinó un contenido de 10^7 UFC/ g de producto.

En este estudio, la cuenta en placa se determinó en 48 horas, mientras la técnica de citometría de flujo y preparación de la muestra tomó un tiempo aproximadamente de 2 horas; por lo que la técnica también parece ser más eficaz. Una opción para verificar y comparar la efectividad de la técnica, sería compararla con una cuenta en placa tradicional.

6.5 Funcionalidad de los simbióticos

En un primer análisis estadístico, se evaluó la relación de la funcionalidad de las cepas a través de la capacidad de acidificación del medio MRS a 37°C, tomando el pH final después de 8 horas. Se observó que existen diferencias significativas entre UAM18 al presentar pHs más bajos respecto a las demás cepas. UAM17 y UAM22a no presentan diferencias entre sí, mientras UAM21b es aquella que presenta una menor disminución de pH. La acidificación del medio es un

parámetro intrínseco de cada cepa que la determina su capacidad de producción de ácido láctico.

En un segundo análisis estadístico se evaluó la cuenta total de la cepa en las mismas condiciones de fermentación durante 8 horas. Para esta parte, se encontraron diferencias significativas entre UAM21b con un mayor crecimiento, seguido de UAM18 y UAM22a sin diferencias significativas entre sí y por último UAM17 con el menor de los crecimientos.

Posteriormente se analizó cada una de las cepas con sus parámetros correspondientes para ver el efecto del tipo de encapsulado, tipo de sustrato, tiempo de monitoreo, acidificación y cuenta final. En las tablas 7, 8, 9 y 10 se muestran estos resultados para las cepas UAM17, UAM18, UAM21b y UAM22a respectivamente.

Las cuatro cepas siguen una misma tendencia para el parámetro de acidificación. No se presentan diferencias entre el tipo de encapsulado; esto quiere decir que las bacterias acidifican el medio MRS (con pHs que van desde 4.3-4.5) de la misma forma si provienen de una cápsula de alginato de sodio o de goma arábica. Esto puede explicarse debido a que al romperse la microcápsula, la bacteria va a crecer y acidificar el medio por igual. Yáñez (2007) reportó que cuando las bacterias se encuentran encapsuladas, el descenso de pH es menor que cuando las células están libres. Esto se debe principalmente al tipo de material de encapsulación que se ocupe; puesto que, dependiendo de su naturaleza, puede permitir o no la difusión y liberación de agentes específicos (Shulkin y Stöver, 2002).

Respecto al sustrato prebiótico, se observan valores más bajos de pH cuando se utiliza el bagazo de manzana, respecto a la cáscara de tuna. Y respecto al tiempo, no se observan diferencias significativas entre el día 1 y día 30 de almacenamiento, lo cual es positivo en este estudio debido a que se puede determinar que el almacenamiento no afecta su capacidad fermentativa.

Al igual que en el parámetro de acidificación, las cuatro cepas siguen una misma tendencia para el parámetro de cuenta total. El tipo de encapsulación no produce

diferencias en el crecimiento de las cepas en el medio MRS, respecto al sustrato probiótico se observa un crecimiento mayor con cáscara de tuna, seguido del bagazo de manzana. Se observan diferencias significativas en la población respecto al tiempo de almacenamiento, pues se encuentra una mayor cuenta total en el día 1 que en el día 15. Sin embargo se puede observar que la capacidad de crecimiento se mantiene durante el almacenamiento.

El crecimiento diáuxico es un tipo de cinética descubierta por Monod, en donde un microorganismo crece exponencialmente debido al consumo de una fuente de carbono preferida y posteriormente al agotarse esta fuente, el microorganismo deja de crecer y entra en una fase de retraso. Seguido a esto, el microorganismo se adapta al medio y comienza un crecimiento más lento donde empieza a consumir una segunda fuente de carbono no tan preferida. Este tipo de crecimiento se llega a dar cuando se tienen varias fuentes de carbono como sustrato (Chu, 2015) como lo puede llegar a ser la harina de co-productos agroindustriales. Además, se ha observado que en este tipo de sustratos, las bacterias ácido lácticas tienen un crecimiento más lento en comparación con sustratos simples; sin embargo se obtiene una biomasa similar (Gullón y col., 2008). Esta diferencia se atribuye a las preferencias de las cepas por los monosacáridos, que por carbohidratos con un mayor grado de polimerización (Gopal y col., 2001).

Otro parámetro importante para evaluar el crecimiento de una bacteria en un sustrato prebiótico es el porcentaje de fibra soluble, ya que nos indica la cantidad de carbohidratos fermentables por éstas. En el caso de la inulina de Agave, el 98% pertenece a este tipo de carbohidratos (fructooligosacáridos) (Rastall, 2010) por lo que resulta un excelente sustrato prebiótico para las bacterias ácido lácticas al poseer la enzima β -fructofuranosidasa capaz de hidrolizar este tipo de enlaces y metabolizarlos (Rossi y col., 2005). Es por esta razón que en este estudio fue utilizado como control ya que un comportamiento similar de las harinas prebióticas es una buena señal de su utilidad como sustrato prebiótico. Cerda-Tapia (2014) evaluaron la capacidad prebiótica del bagazo de manzana y reportaron

comportamientos similares a los obtenidos con inulina, por lo que se concluyó que el bagazo de manzana se presenta como un buen sustrato prebiótico para las bacterias ácido lácticas; éste presenta carbohidratos del tipo pectínico, los cuales son solubles en agua, permitiendo la fermentación de estos por los microorganismos probióticos (Schneeman, 1987).

Además de la pectina, otros constituyentes principales de fibra dietética encontrados en la manzana son la celulosa y hemicelulosa, de los que se ha demostrado que son buenos sustratos de fermentación de las bacterias (Van Laere y col., 2000). Para el caso de la harina de cáscara de tuna, Díaz-Vela y col. (2013) reportaron un 30.79% de fibra soluble e indicaron que es un buen sustrato para bacterias ácido lácticas, así mismo reportaron un mayor consumo de carbohidratos cuando se comparó con glucosa.

Tabla 7. Parámetros de funcionalidad (pH y cuenta total) de *L. plantarum* UAM17.

Encapsulación	Prebiótico	pH Día 1	pH Día 30	Cuenta final (Log UFC/mL) Día 1	Cuenta final (Log UFC/mL) Día 30
Gelificación iónica	Inulina	5.42±0.15 a, c, e	5.45±0.03 a, c, e	6.353±0.035 A, E, F	6.464±0.028 A, E, G
	Tuna	5.46±0.15 a, d, e	5.54±0.01 a, d, e	5.379±0.010 A, C, F	5.177±0.029 A, C, G
	Manzana	5.56±0.01 a, c, e	5.48±0.03 a, c, e	6.049±0.027 A, D, F	6.283±0.020 A, D, G
Secado por Aspersión	Inulina	5.47±0.05 a, c, e	5.52±0.03 a, c, e	6.414±0.030 A, E, F	6.328±0.021 A, E, G
	Tuna	5.48±0.06 a, d, e	5.49±0.09 a, d, e	5.419±0.027 A, C, F	5.198±0.011 A, C, G
	Manzana	5.48±0.06 a, c, e	5.47±0.06 a, c, e	6.176±0.006 A, D, F	6.087±0.022 A, D, G

^{a, b} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para tipo de encapsulado sobre pH.

^{A, B} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el tipo de encapsulado sobre la cuenta final.

^{c, d} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el sustrato prebiótico sobre el pH.

^{C, D, E} Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el sustrato prebiótico.

^{e, f} Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el pH final.

^{F, G} Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para la cuenta final.

Tabla 8. Parámetros de funcionalidad (pH y cuenta total) de *E. faecium* UAM18.

Encapsulación	Prebiótico	pH Día 1	pH Día 30	Cuenta final (Log UFC/mL) Día 1	Cuenta final (Log UFC/mL) Día 30
Gelificación iónica	Inulina	5.47±0.06 a, c, e	5.47±0.06 a, b, e	6.266±0.023 A, E, F	6.054±0.049 A, E, G
	Tuna	5.55±0.01 a, d, e	5.51±0.04 a, c, e	6.442±0.011 A, C, F	5.871±0.019 A, C, G
	Manzana	5.48±0.06 a, c, e	5.44±0.01 a, b, e	6.109±0.011 A, D, F	5.598±0.001 A, D, G
Secado por Aspersión	Inulina	5.51±0.02 a, c, e	5.51±0.06 a, c, e	6.584±0.016 A, E, F	6.377±0.040 A, E, G
	Tuna	5.53±0.01 a, d, e	5.55±0.03 a, d, e	5.332±0.020 A, C, F	5.276±0.011 A, C, G
	Manzana	5.52±0.05 a, c, e	5.51±0.11 a, c, e	6.407±0.025 A, D, F	6.283±0.020 A, D, G

a, b Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para tipo de encapsulado sobre pH.

A, B Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el tipo de encapsulado sobre la cuenta final.

c, d Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el sustrato prebiótico sobre el pH

C, D, E Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el sustrato prebiótico.

e, f Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el pH final.

F, G Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para la cuenta final.

Tabla 9. Parámetros de funcionalidad (pH y cuenta total) de *A. viridans* UAM21b.

Encapsulación	Sustrato prebiótico	pH Día 1	pH Día 30	Cuenta final (Log UFC/mL) Día 1	Cuenta final (Log UFC/mL) Día 30
Gelificación iónica	Inulina	5.48±0.06 a, c, e	5.52±0.01 a, c, e	6.327±0.094 A, E, F	5.841±0.031 A, E, G
	Tuna	5.50±0.08 a, d, e	5.51±0.08 a, d, e	5.344±0.012 A, C, F	5.175±0.050 A, D, G
	Manzana	5.49±0.04 a, c, e	5.53±0.02 a, c, e	6.718±0.022 A, D, F	6.517±0.045 A, D, G
Secado por Aspersión	Inulina	5.48±0.02 a, c, e	5.49±0.05 a, c, e	6.869±0.059 A, E, F	6.601±0.019 A, E, G
	Tuna	5.50±0.04 a, d, e	5.47±0.06 a, d, e	5.386±0.010 A, C, F	5.072±0.023 A, C, G
	Manzana	5.44±0.01 a, c, e	5.48±0.07 a, c, e	6.317±0.037 A, D, F	6.061±0.035 A, D, G

a, b Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para tipo de encapsulado sobre pH.

A, B Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el tipo de encapsulado sobre la cuenta final.

c, d Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el sustrato prebiótico sobre el pH.

C, D, E Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el sustrato prebiótico.

e, f Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el pH final.

F, G Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para la cuenta final.

Tabla 10. Parámetros de funcionalidad (pH y cuenta total) de *P. pentosaceus* UAM22a.

Encapsulación	Sustrato prebiótico	pH Día 1	pH Día 30	Cuenta final (Log UFC/mL) Día 1	Cuenta final (Log UFC/mL) Día 30
Gelificación iónica	Inulina	5.29±0.35 a, c, e	5.49±0.02 a, c, e	6.474±0.062 A, E, F	6.213±0.016 A, E, G
	Tuna	5.49±0.05 a, d, e	5.48±0.06 a, d, e	5.588±0.034 A, E, F	5.377±0.013 A, E, G
	Manzana	5.48±0.06 a, c, e	5.52±0.01 a, c, e	6.890±0.023 A, D, F	6.581±0.012 A, D, G
Secado por Aspersión	Inulina	5.50±0.08 a, c, e	5.45±0.06 a, c, e	6.507±0.009 A, E, F	6.142±0.011 A, E, G
	Tuna	5.53±0.02 a, d, e	5.51±0.04 a, d, e	6.298±0.024 A, C, F	6.015±0.020 A, C, G
	Manzana	5.52±0.04 a, c, e	5.42±0.03 a, c, e	6.562±0.020 A, D, F	6.226±0.028 A, D, G

a, b Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para tipo de encapsulado sobre pH.

A, B Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el tipo de encapsulado sobre la cuenta final.

c, d Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el sustrato prebiótico sobre el pH.

C, D, E Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el sustrato prebiótico.

e, f Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el pH final.

F, G Medias con la misma letra en el mismo renglón no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para la cuenta final.

6.5.1 Resistencia de los simbióticos a condiciones gástricas

Se evaluó la sobrevivencia de las cepas dentro de las microcápsulas cuando son sometidas a condiciones gástricas estomacales a un pH de 2.0 en caldo MRS. Este parámetro es importante ya que se evalúa en condiciones simuladas la resistencia de la cápsula, ya que se espera llegue al duodeno, donde ejerce su función benéfica. Los resultados de % de resistencia a la acidez obtenidos se encuentran en las tablas 11, 12, 13 y 14.

Cuando la bacteria no se encapsula sólo sobrevive un 27.34 % de la cuenta inicial a las condiciones ácidas estomacales, mientras que con la encapsulación por secado por aspersion el porcentaje está por arriba del 78% de la cuenta inicial.

El análisis de varianza nos muestra que existe diferencia significativa entre los porcentajes de resistencia a la acidez de la cepa. UAM22a es la que tiene la capacidad de mayor sobrevivencia (78-82%), respecto a UAM18 (76-81%), UAM21b (69-80%) y UAM17 (56-81%) con la más baja. A cada una de las cepas se les realizó un análisis de varianza para determinar las diferencias significativas cuando se usan los diferentes sustratos prebióticos, tipo de encapsulación y tiempo de exposición a condiciones gástricas; dónde se observó que en todos los casos se sigue la misma tendencia. Respecto al sustrato prebiótico, cuando se usa la cáscara de tuna, esta presenta mejores porcentajes de sobrevivencia que la inulina y esta a su vez que al bagazo de manzana. El tiempo de exposición a las condiciones ácidas presenta una tendencia inversamente proporcional, lo cual se esperaba ya que a mayor tiempo, el porcentaje de resistencia de las bacterias encapsuladas es menor.

En cuanto al método de encapsulación, el secado por aspersion presenta diferencias significativas mayores de resistencia que cuando se usa la encapsulación con gelificación iónica.

Tabla 11. Resistencia a condiciones ácidas de *L. plantarum* UAM17.

Encapsulación	Sustrato	Tiempo (min)			
		30	60	90	120
Sin encapsular	--	59.34 ^{d, g, A}	49.60 ^{d, g, B}	39.59 ^{d, g, C}	25.36 ^{d, g, D}
	Inulina	90.86 ^{b, f, A}	89.31 ^{b, f, B}	80.26 ^{b, f, C}	75.80 ^{b, f, D}
Gelificación iónica	Tuna	95.80 ^{a, f, A}	92.25 ^{a, f, B}	86.32 ^{a, f, C}	81.69 ^{a, f, D}
	Manzana	81.53 ^{c, f, A}	78.43 ^{c, f, B}	73.74 ^{c, f, C}	56.61 ^{c, f, D}
	Inulina	89.45 ^{b, e, A}	84.99 ^{b, e, B}	71.43 ^{b, e, C}	69.20 ^{b, e, D}
Secado por aspersión	Tuna	92.25 ^{a, e, A}	86.32 ^{a, e, B}	80.87 ^{a, e, C}	77.64 ^{a, e, D}
	Manzana	91.87 ^{c, e, A}	91.17 ^{c, e, B}	86.82 ^{c, e, C}	79.65 ^{c, e, D}

a, b, c, d Medias con la misma letra no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para sustrato.

e, f, g Medias con la misma letra no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el tipo de encapsulación

A, B, C, D Medias con la misma letra no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el tiempo de almacenamiento.

Tabla 12. Resistencia a condiciones ácidas de *E. faecium* UAM18.

Encapsulación	Sustrato	Tiempo (min)			
		30	60	90	120
Sin encapsular	--	62.59 ^{d, g, A}	51.78 ^{d, g, B}	43.54 ^{d, g, C}	27.56 ^{d, g, D}
	Inulina	97.08 ^{b, f, A}	91.84 ^{b, f, B}	86.81 ^{b, f, C}	80.82 ^{b, f, D}
Gelificación iónica	Tuna	91.29 ^{a, f, A}	88.80 ^{a, f, B}	84.52 ^{a, f, C}	77.54 ^{a, f, D}
	Manzana	91.85 ^{c, f, A}	88.80 ^{c, f, B}	85.99 ^{c, f, C}	79.88 ^{c, f, D}
	Inulina	95.15 ^{b, e, A}	90.49 ^{b, e, B}	86.38 ^{b, e, C}	79.70 ^{b, e, D}
Secado por aspersión	Tuna	92.16 ^{a, e, A}	89.17 ^{a, e, B}	78.95 ^{a, e, C}	78.13 ^{a, e, D}
	Manzana	27.56 ^{d, g, D}	90.00 ^{c, e, B}	85.92 ^{c, e, C}	78.01 ^{c, e, D}

a, b, c, d Medias con la misma letra no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para sustrato.

e, f, g Medias con la misma letra no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el tipo de encapsulación

A, B, C, D Medias con la misma letra no son significativamente ($p>0.05$) diferentes para el tiempo de almacenamiento.

Tabla 13. Resistencia a condiciones ácidas de *A. viridans* UAM21b.

Encapsulación	Sustrato	Tiempo (min)			
		30	60	90	120
Sin encapsular	--	61.61 ^{d, g, A}	50.70 ^{d, g, B}	42.94 ^{d, g, C}	26.52 ^{d, g, D}
	Inulina	93.30 ^{b, f, A}	90.78 ^{b, f, B}	86.66 ^{b, f, C}	78.64 ^{b, f, D}
Gelificación iónica	Tuna	94.84 ^{a, f, A}	92.38 ^{a, f, B}	86.95 ^{a, f, C}	72.70 ^{a, f, D}
	Manzana	80.98 ^{c, f, A}	79.52 ^{c, f, B}	75.37 ^{c, f, C}	69.88 ^{c, f, D}
	Inulina	93.17 ^{b, e, A}	90.37 ^{b, e, B}	85.93 ^{b, e, C}	77.99 ^{b, e, D}
Secado por aspersión	Tuna	93.01 ^{a, e, A}	90.47 ^{a, e, B}	85.43 ^{a, e, C}	79.09 ^{a, e, D}
	Manzana	91.93 ^{c, e, A}	90.73 ^{c, e, B}	85.96 ^{c, e, C}	80.58 ^{c, e, D}

a, b, c, d Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para sustrato.

e, f, g Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para el tipo de encapsulación

A, B, C, D Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para el tiempo de almacenamiento.

Tabla 14. Resistencia a condiciones ácidas de *P. pentosaceus* UAM22a.

Encapsulación	Sustrato	Tiempo (min)			
		30	60	90	120
Sin encapsular	--	62.18 ^{d, g, A}	51.33 ^{d, g, B}	43.43 ^{d, g, C}	27.34 ^{d, g, D}
	Inulina	79.96 ^{b, e, D}	89.68 ^{b, f, B}	85.83 ^{b, f, C}	78.44 ^{b, f, D}
Gelificación iónica	Tuna	92.30 ^{a, f, A}	90.12 ^{a, f, B}	85.29 ^{a, f, C}	78.22 ^{a, f, D}
	Manzana	91.89 ^{c, f, A}	88.45 ^{c, f, B}	85.62 ^{c, f, C}	78.66 ^{c, f, D}
	Inulina	94.08 ^{b, e, A}	90.21 ^{b, e, B}	86.68 ^{b, e, C}	79.96 ^{b, e, D}
Secado por aspersión	Tuna	92.46 ^{a, e, A}	89.87 ^{a, e, B}	85.94 ^{a, e, C}	78.37 ^{a, e, D}
	Manzana	92.70 ^{c, e, A}	90.57 ^{c, e, B}	86.81 ^{c, e, C}	82.64 ^{c, e, D}

a, b, c, d Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para sustrato.

e, f, g Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para el tipo de encapsulación

A, B, C, D Medias con la misma letra no son significativamente ($p > 0.05$) diferentes para el tiempo de almacenamiento.

Empleando la encapsulación por gelificación iónica, Ding & Shah (2009) reportaron viabilidad de bacterias encapsuladas desde 7.37 hasta 6.16 Log UFC/mL cuando estas son sometidas a condiciones ácidas (pH=2.0) durante 2h. En 2010, Chavarri y col. encontraron sobrevivencias de 6.95 y 6.78 log UFC/mL para *L. gasseri* y *B. bifidobacterium* encapsuladas con una mezcla de alginato-quitosano después de ser sometidas condiciones gástricas (9 g/L de NaCl, 3 g/L de pepsina y pH de 2.0) durante dos horas. Por su parte, Cai y col. (2014) reportaron una resistencia a condiciones ácidas del 22.2% de la cuenta inicial de bacterias encapsuladas cuando son sometidas durante 2 horas a condiciones gástricas (0.2% de NaCl y 0.32% de pepsina a pH 2.0). En lo que a gelificación respecta, se observan valores menores si se compara con el secado por aspersión como técnica de encapsulación.

En 2015, Rajam y Anandharamakrishnan evaluaron la resistencia a condiciones ácidas (Medio MRS ajustado a pH 2.0) de una cepa de *L. plantarum* encapsulada con FOS, suero de proteína y suero de proteína desnaturalizado como material de pared usando la tecnología del secado por aspersión; ellos observaron que el grado de protección de las células encapsuladas depende del tipo de la matriz que proporciona la pared. Cuando se usaron únicamente FOS, hubo una alta pérdida de viabilidad cuando las bacterias se expusieron al medio ácido gástrico simulado; cuando se combinó con suero de proteína y suero de proteína desnaturalizado, se observó una ligera reducción de la viabilidad celular relativa después de 1 h de incubación en medio gástrico, después de lo cual hubo una viabilidad estable. Esto puede ser debido a la formación de una capa protectora en la superficie de las partículas de proteínas de suero; por lo que se determinó que la combinación de estos componentes como material de encapsulación proporcionan una mejor protección a *L. plantarum* en las condiciones gástricas simuladas.

Un factor que influye positivamente a la resistencia a las condiciones gástricas, además del material de encapsulación, es la introducción de la harina prebiótica, ya que se observa que aumenta el porcentaje de resistencia, siendo mejor sustrato la cáscara de tuna, respecto al bagazo de manzana. La mejor

combinación de simbiótico que tuvo un mayor porcentaje de sobrevivencia fue la cepa UAM22a junto con harina de cáscara de tuna y secado por aspersión como método de encapsulación.

7. CONCLUSIONES

El desarrollo de un producto con potencial simbiótico encapsulado a partir de bacterias ácido lácticas termotolerantes probióticas y harinas prebióticas de co-productos agroindustriales resulta de gran interés en la industria alimentaria debido a la amplia gama de opciones para su aplicación en diversos productos.

En este estudio se desarrollaron formulaciones de simbióticos encapsulados por dos vías: gelificación iónica y secado por aspersion, los cuales fueron métodos efectivos que permitieron mantener la viabilidad y funcionalidad del simbiótico a través de la vida de anaquel de 30 días, así como de conferirle resistencia a condiciones ácidas gástricas.

El método de encapsulación con mejores resultados dentro de los parámetros evaluados fue el secado por aspersion al ser una técnica mejor estandarizada; la cepa UAM18 con mejores datos de sobrevivencia y la harina de cáscara de tuna en los parámetros de prebiótico respecto a viabilidad, resistencia a condiciones gástricas y un menor tamaño de partícula del simbiótico encapsulado.

Por las razones anteriores, se concluye que la microencapsulación es una tecnología eficaz que puede ser utilizada para asegurar el funcionamiento óptimo de un simbiótico y que puede ser aplicada no sólo en matrices lácteas como se ha introducido inicialmente en el mercado, sino en productos que requieran llevar un proceso térmico sin que el simbiótico se deteriore y conserve su función desde el almacenamiento hasta llegar al consumidor.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123:121–129.

Axelsson, L. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Clasification and Physiology*. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. Third edition, Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, USA, 18-37.

American Dietetic Association (2008). Position of the American Dietetic Association: Health implications of dietary fiber. *Journal of the American Dietetic Association*, 108:1716–1731.

Anal, A., 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.

Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* with different walls materials by spray drying. *Food Science and Technology*, 63:685-690.

Bensalah, F., Delorme, C., Renault, P. (2009). Characterisation of Thermotolerant Cocci from Indigenous Flora of 'Leben' in Algerian Arid Area and DNA Identification of Atypical *Lactococcus lactis* Strains. *Current Microbiology*, 59:139–146.

Bigetti, K., Magnani, M., San Martin, J., Tardeli, C., Garcia, C. (2010) Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11:415–421.

Bogh, L., Duling, T. (1993). Flow Cytometry Instrumentation in Research and Clinical Laboratories. *Clinical Laboratory Science*, 6(3):167-173.

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

Cai, S., Zhao, M., Fang, Y., Nishiari, K., Phillips, G., Jiang, F. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calcium sources. *Food Hydrocolloids*, 39:295-300.

Cerda-Tapia, A. (2014) *Evaluación In vitro e in vivo del bagazo de manzana como prebiótico*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.

Champagne, C., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2):184–190.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiology Methods* 56:27–35.

Chavarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F., Marzo, F., Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142:185–189.

Chávez-Zepeda, L. P., Cruz-Méndez, G., Gracia de Caza, L., Díaz-Vela, J. y Pérez- Chabela, M. L. (2009). Utilización de sub-productos agroindustriales como fuente de fibra para productos cárnicos. *Nacameh*, 3(2):71-82.

Chen, M., Chen, K. (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. *Wiley-Blackwell*, 83–107.

Chu, D. (2015) In silico evolution of diauxic growth. *Chu BMC Evolutionary Biology*, 15:211-228.

Cook, T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release* 162:56–67.

De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 23(1):130-135.

De Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4):292–302.

Diaz-Vela, J., Totosaus, A., Cruz-Guerrero, A., Perez-Chabela, M.L. (2013). In vitro evaluation of the fermentation of added-value agroindustrial by-products: cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) peel and pineapple (*Ananas comosus*) peel as functional ingredients. *International Journal of Food Science and Technology*, 48:1460–1467.

Ding, W.K., Shah, N.P. (2009). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Food Microbiology and Safety*, 74:53-61.

Ding, W.K., Shah, N.P., (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72:446–450.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinic Nutrition*, 73(Suppl.):386S–392.

Dziezak, J.D. (1991). A focus on gums. *Food Technology*, 45:116–132.

Erdem, Ö., Gültekin-Özgülven, M., Berktaş, I., Ersan, S., Erzgi, H., Karadağ, A., Özcelik, B., Güneş, G., Cutting, S. (2014). Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus*HU36, maltodextrin and lemon fiber: Optimization by response surface methodology. *LTW- Food Science and Technology*, 56:187-193.

Espírito, A., Cartolano, N., Silva, T., Soares, F., Gioielli, L., Perego, P., Converti, A., Oliveira, M. (2012). Fibers from fruit by products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International Journal of Food Microbiology*, 154:135–144.

FAO. (1999a) Gum Arabic. *Food and nutrition paper 52, addendum*. FAO, Roma.

FAO. (1999b) Los carbohidratos en la alimentación humana. *Informe de una consulta mixta FAO/OMS de expertos*. FAO, Roma; 88.

FAO/WHO. (2001). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.

Fischer, J. (2009). Fruit Fibers. En: Sungsoo, S., Samuel, P. *Fiber Ingredients. Food applications and Health Benefits*. CRC Press. USA, 427-435.

Fritzen-Freire, C., Prudêncio, E., Amboni, R., Pinto, S., Negrão-Murakami, S., Murakami, F. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics, *Food Research International*, 45:306–312.

Geng, J., Chiron, C., Combrisson, J. (2014). Rapid and specific enumeration of viable Bifidobacteria in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study. *International Dairy Journal*, 37:1-4.

Gänzle, M. (2012). Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal*, 22:116-122.

Gibson, G, Roberfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125:1401-1412.

Gibson, G., Probert, H., Loo, J., Rastall, R., Roberfroid, M. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Reserve Reviews*, 17:259-275.

Gibson, G. (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2(18):287–298.

Gopal, P.K., Sullivan, P.A., Smart, J.B. (2001). Utilisation of galactooligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal*, 11:19-25.

Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, P., Theodorou, V., Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*, 16:493-500.

Guerreiro, V. Jr, Raynes, D.A. (1990). Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. *Journal of Animal Science*, 68:2779-2783.

Gullón, P., Moura, P., Esteves, M.P., Girio, F.M., Domínguez, H., Parajó, C.J. (2008). Assessment of the fermentability of xylooligosaccharides from rice husk by probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:7482-7487.

Guzzon, R., Larcher, R. (2015). The application of flow cytometry in microbiological monitoring during winemaking: two case studies. *Annual Microbiology*, 65:1865–1878.

Islam, A. M., Phillips, G. O., Slijivo, A., Snowden, M. J., & Williams, P. A. (1997). A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 11:493–505.

Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4(6):1-19.

Keller, E., Goldman, D.R. (2006). Light Microscopy. *Basic Methods in Microscopy. Protocols and concepts from cells: A laboratory Manual*. Spector & Goldman eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kent, R., Doherty, S. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulación using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International*, 64:567–576.

Khem, S., Bansal, V., Small, D., May, B. (2016). Comparative influence of pH and heat on whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum* A17 during spray drying. *Food Hydrocolloids*, 54:162-169.

Kolida, S., Gibson, G. (2011). Synbiotics in Health and Disease. *Annual Review of Food Science Technology*, 2:373–393.

Lamsal, B.P., Faubion, J.M. (2009). The beneficial use of cereal and cereal components in probiotic foods. *Food Reviews International*, 25:103–114.

Lilly, D., Stillwell, R. (1965). Probiotics: growth promoting substances produced by microorganisms. *Science*, 147:747–748.

Lousada Jr., J.E., Costa, J.M.C., Neiva, J.N.M., Rodriguez, N.M. (2006). Physical–chemical characterization of tropical fruit by-products for use in animal feed. *Revista Ciência agrônômica*, 37:70–76.

Meng, X., Stanton, C., Fitzgerald, G., Daly, C., Ross, R. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry Journal*, 106:1406–1416.

Montgomery, D. (2006) *Diseño y análisis de experimentos*. 2ª Edición, México, D.F. 685.

Niamsup, P., Nengah, S., Tanaka, M., Sone, T., Hanada, S., Kamagata, Y., Lumyong, S., Assavanig, A., Asano, K., Tomita, F., Yokota, A. (2003) *Lactobacillus thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:263–268.

Nunez, R. (2001). Flow cytometry: Principles and Instrumentation. *Currency Issues Molecular Biology*, 3(2):39-45.

Obasola, O., Corcoran, O., Morgan, W. (2014) Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *Journal of functional foods*, 10:75-84.

OMGE (2008). Probióticos y prebióticos. España: *World Gastroenterology Organization*.

Parra-Matadamas, A., Mayorga-Reyes, L., Pérez-Chabela, M.L. (2015) *In vitro* fermentation of agroindustrial by-products: grapefruit albedo and peel, cactus pear peel and pineapple peel by lactic acid bacteria. *Journal Food Research Journal*, 22(2):859-865.

Pérez-Chabela, M.L., Cerda-Tapia, A., Díaz-Vela, J., Delgadillo, C., Díaz, M., Aleman, G. (2015). Physiological Effects of Agroindustrial Co-Products: Cactus (*Opuntia ficus*) Pear Peel Flour and Stripe Apple (*Malus domestica*) Marc Flour on Wistar Rats (*Rattus norvegicus*). *Pakistan Journal of Nutrition*, 14(6):346-352.

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

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

Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J., Neufeld, R., Fournier, A. (1992). Production of alginate beads by emulsification internal gelation. *Methodology Applied Microbiology and Biotechnology*, 38:39–45.

Prats, C. (2007). Probióticos: una alternativa natural como promotores de salud. *CENIC Ciencias Biológicas*, 38(1):49-53.

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

Ramirez-Chavarin, M.L., Wachter, C., Eslava-Campos, C.A., Perez-Chabela, M.L. (2013). Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. *International Food Research Journal*, 20(2):991-1000.

Raizel, R., Santini, E., Kopper, A., Domingos, A. (2011). Effects of probiotics, prebiotics and synbiotics consumption on the human organism. *Revista de Saúde Pública*, 2:66-74.

Rastall, R. (2010). Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture. *Annual Review of Food Science Technology*, 1:305–339

Raymond, Y., Champagne, C. (2015). The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiology*, 46:176-183.

Rivera, Y., Gallardo, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology Journal*, 27:1–11.

Roberfroid, M. (2010). Prebiotic effects. Metabolic and health benefits. *The Nutrition Society British Journal of Nutrition*, S:1-63.

Rosas-Flores, W., Ramos-Ramírez, E., Salazar-Montoya, J. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus hevelticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. *Carbohydrate Polymers*, 98:1011-1017.

Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S. y Matteuzzi, D. (2005) Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10):6150-6158.

Sathyabama, S., Ranjith, M., Bruntha, P., Vijayabharathi, R., Brindha, V. (2014) Co encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *Food Science and Technology*, 57:419-425.

Senok, A., Ismaeel, A., Botta A. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clinic Microbiology Infections* 11:958–966.

Sheu, T., Marshall, R. (1993) Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. *The Journal of Food Science*, 58:557–561.

Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M., & 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.

Schneeman, B.O. (1987) Soluble and insoluble fibre-different physiological response. *Food Technology*, 2:81–82

Shulkin A., Stöver, H. (2002). Polymer microcapsules by polyaddition between styrene-maleic anhydride copolymers and amines. *Journal Membrane Science*, 209:412-432.

Stokke, B., Draget, K., Smidsrod, O., Yuguchi, Y., Urakawa, H., Kajiwara, K. (2000). Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 1. Ca-alginate gels. *Macromolecules*, 33:1853–1863.

Tannock, G. (1998). Studies on the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. *International Dairy Journal*, 8:527–533.

Tashiro, Y., Kaneko, W., Sun, Y., Shibata, K., Inokuma, K., Zendo, T., Sonomoto, K. (2011). Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89:1741–1750.

Totosaus, A., Ariza-Ortega, T., Pérez-Chabela, M.L. (2013). Lactic acid bacteria microencapsulation in sodium alginate and other gelling hydrocolloids mixtures. *Journal of Food and Nutrition Research*, 52(2):107-120.

Tzortzis, G., Goulas, A.K., Gee, J.M., Gibson, G.R. (2005). A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *Journal Nutrition*, 135:1726-1731.

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4):187-206.

Van Laere, K.M.J., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H.A. y Voragen, A.G.J. (2000). Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:1644–1652.

Van Loveren, H., Sanz, Y., Salminen, S., (2012). Health Claims in Europe: Probiotics and Prebiotics as Case Examples. *Annuary Review of Food Science Technology*, 3:247–261.

Verbeken, D., Dierckx, S., Dewettinck, K. (2003). Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 63:10–21.

Vergin, F. (1954). Anti- und Probiotika. *Hippokrates*, 25:116-119.

Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42:8–12.

Yadav, M., Igartuburu, J., Yan, Y., Nothnagel, E. (2007). Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, 21:297–308.

Yáñez, J. (2007). *Microencapsulación de Lactobacillus sp., empleando mezclas de biopolímeros de gomas arábica, gelana y de semillas de mezquite, por polimerización interfacial*. Tesis doctoral CINVESTAV-IPN, México.

Zamora, L. M., Carretero, C., & Pares, D. (2006). Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology International*, 12:77–84.