



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CICATA-IPN

CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



**SOBREVIVENCIA DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS
MICROENCAPSULADO EN FUNCION DE LA COMBINACION DE
LA COMBINACION DE PREBIÓTICOS Y UNA CUBIERTA
ENTÉRICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN TECNOLOGIA AVANZADA

PRESENTA:
Ing. MATILDE VILLA GARCÍA

DIRECTOR DE TEIS:
DRA. RUTH PEDROZA ISLAS

México D. F., Julio de 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D. F. el día 24 de Junio del año 2009 la que suscribe **Matilde Villa García** alumna del programa de **Maestría en Tecnología Avanzada** con número de registro **B071731** adscrito a **C.I.C.A.T.A-IPN** manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la **Dra. Ruth Pedroza Islas** y cede los derechos del trabajo intitulado "**Sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado en función de la combinación de prebióticos y una cubierta entérica**" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN. Legaria 649, Col. Irrigación, 11500 D.F. México. Teléfono 015557296300 ext 67769 Fax e-mail: mati_vg@yahoo.com.mx, ruth.pedroza@uia.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Matilde Villa García
Nombre y Firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:00 horas del día 24 del mes de junio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA - Legaria para examinar la tesis de titulada:

Sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado en función de la combinación de prebióticos y una cubierta entérica

Presentada por el alumno:

<u>Villa</u>	<u>García</u>	<u>Matilde</u>						
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre(s)</small>						
		B	0	7	1	7	3	1

Con registro:

aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

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

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dra. Ruth Pedrosa Islas

Dr. José Guzmán Mendoza

Dr. Miguel Ángel Aguilar Frutis

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Dr. Rubén Magreño Terrazas

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, CICATA-Legaría y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero para la realización de mis estudios de maestría.

Me siento agradecida por todas las personas que durante este periodo de preparación han estado presentes en mi vida aportándome trabajo, inspiración, retos y alegrías.

En especial a la Dra. Ruth Pedroza Islas por su apoyo, comprensión, pero sobre todo por su guía personal y académica, que fortalecieron los cimientos de compromiso y dedicación haciéndome una mejor persona y profesionista.

Al Dr. Eduardo San Martín Martínez por su apoyo y asesoría permitiendo llegar al final de esta trabajo.

A los miembros del jurado: Ruth Pedroza Islas, Dr. San Martín Martínez, Dr. José Guzmán, Dr. Miguel Ángel Aguilar Frutis, Dr. Rubén Moreno Terrazas Por haber aceptado a revisar este trabajo, así como sus valiosas correcciones, comentarios y sugerencias que contribuyeron a mejorar esta tesis.

También quisiera expresar mi reconocimiento y mi gratitud a las siguientes personas por su extraordinario apoyo y sus contribuciones.

Al Dr. José Luis Fernández Muñoz, por sus sugerencias y asesorías. A Abel Tinoco y Mónica Centeno por su ayuda y apoyo en el uso y manejo de laboratorio, así como experiencia y acertados comentarios plasmados en

este trabajo. A Dr Guzmán por su experiencia en la microscopia, pero sobre todo por que su apoyo y paciencia no tiene límites. A Dr. Miguel Ángel Aguilar Frutis, por su paciencia y apoyo pero sobre todo por su compañía en esta jornada. Al Dr. Rubén, Moreno y M. Máyela de la Rosa de la UIA por asesoría en el área de microbiología, Al Dr. Antonio Martínez Ferez, que atravez de la distancia enriqueció a esta tesis.

A Miguel Ángel Aguilar por su trabajo de microscopia, asesoría y apoyo en el laboratorio. Al personal de la biblioteca de CICATA-Legaría por su apoyo y eficiencia en la búsqueda de revisión bibliográfica.

A la coordinación del Post-grado CICATA-Legaria, Al Dr. Antonio Calderon, Leticia Cardona, Laura Vega y Pablo por su atención y ayuda.

A CICATA-IPN por las facilidades otorgadas para el desarrollo mi posgrado.

A Alicia, Ramon, Cuco, Don Miguel, Isabel, que con su presencia aportaron compañía y apoyo durante mi estancia en los laboratorios.

Un especial agradecimiento a Horacio Vieyra y Julia Colín por acompañarme durante este periodo haciéndome ver que las cosas son menos difíciles si se esta acompañado, gracias por su amistad, criticas, sugerencias que me hicieron ser una mejor persona.

INDICE GENERAL

	Contenido	Página
	INDICE DE TABLAS	
	INDICE DE FIGURAS	
	RESUMEN	
	ABSTRACT	
	INTRODUCCIÓN	
1.	ANTECEDENTES	16
1.1	Aspectos históricos	16
1.2	Descripción de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
1.3	Beneficios que ofrece	19
1.4	Importancia comercial y en la salud	19
1.5	Situación Actual y Problemática tecnología de los probióticos	20
1.6	Prebióticos	23
1.6.1	Polidextrosa	26
1.6.2	Inulina	28
1.6.3	Aguamiel	29
1.6.4	Oligosacaridos	31
1.7	Microencapsulación de probióticos	32
1.8	Crecimiento de poblaciones bacteriana	37
2.	JUSTIFICACIÓN	43
3.	HIPOTESIS	44
4.	OBJETIVOS	44
5.	MATERIALES Y METODOS	45
5.1	Materiales	45
5.2	Métodos	45
5.2.1	Acondicionamiento y cinética de bacteria probiótica : <i>Lactobacillus acidophilus</i>	45
5.2.1.1	Densidad óptica	46
5.2.1.2	Numero más probable	46
5.2.1.3	Impedancia eléctrica (MPI)	46
5.2.2	Producción de biomasa de bacteria probiótica	47
5.2.3	Mezclas polisacáridos-proteínas (binaras y ternaria) con y sin tratamiento térmico	47
5.2.3.1	Determinación del coeficiente de difusividad efectiva (D_e), Energía de Activación y microestructura	48
5.2.4	Mezclas polisacáridos-proteínas y prebióticos de acuerdo al diseño experimental	49
5.2.5	Microencapsulación y viabilidad de lactobacillos	50
5.2.5.1	Preparación del inculo y dispersiones	50
5.2.5.2	Microencapsulación: Secado por aspersion	51

5.2.5.3	Viabilidad después del secado (microcapsulados)	51
5.2.5.4	Estabilidad a condiciones simuladas de tracto intestinal: Fluido Gastrico (FGS) y Fluido intestinal (FIS)	51 52
5.2.6	Microestructura de los encapsulados	52
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
6.1	Cinética y producción de biomasa de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	53
6.2	Caracterización de las películas de soluciones binarias y ternarias (con y sin Tratamiento Térmico) y análisis de microestructura	55
6.2.1	Curvas de secado isotérmico	56
6.2.2	Coeficientes de difusividad efectiva	57
6.2.3	Determinación de energía de activación	58
6.2.4	Microestructura de las películas obtenidas	59
6.3	Mezclas polisacáridos-proteínas y prebióticos de acuerdo al diseño experimental	60
6.4	Microencapsulación y viabilidad de <i>Lactobacillus</i> después del secado	61
6.5	Estabilidad a condiciones simuladas de fluido gástrico (FGS)	64
6.6	Estabilidad a condiciones simuladas de fluidos intestinales (FIS)	66
7.	CONCLUSIONES	68
8.	BIBLIOGRAFIA	69

INDICE TABLAS

	Contenido	Página
Tabla 1.	Diferencia de pH en el tracto gastrointestinal.	22
Tabla 2.	Comparación de elementos entre miel de maguey, miel de abeja y azúcar.	30
Tabla 3.	Formulaciones de las dispersiones acuosas mezclas binaras y ternarias.	45
Tabla 4.	Formulaciones de las dispersiones acuosas con prebióticos de acuerdo al diseño experimental Simplex Centroides.	50
Tabla 5.	Condiciones de operación del secado por aspersión.	51
Tabla 6.	Valores de difusividad efectiva (D_e) para cada muestra y temperatura de secado ensayadas.	58
Tabla 7.	Energías de activación de las mezclas de biopolímeros.	58
Tabla 8.	Valores de la energía de activación de las mezclas con probióticos en base al diseño experimental.	60

INDICE FIGURAS

	Página
Figura 1. Inoculación de placas con hallazgos positivos y negativos de Microorganismos.	38
Figura 2. Electrodo inmerso en una celda con medio de cultivo inoculado y espectro de impedancia.	42
Figura 3. Comportamiento de la fase estacionaria monitoreada por pH Y densidad óptica.	53 54
Figura 4. Ajuste de Boltzmann y determinación de pendientes de la curva por NMP y método de impedancia.	55
Figura 5. Variación del contenido de humedad con el tiempo de secado para la muestra: WPI:P, a diferentes temperaturas de secado.	56
Figura 6. Imagen SEM, de las películas obtenidas, WPI:P y perfil del crecimiento laminar	60
Figura 7. Imágenes SEM de las formulas: $P_{0.00}I_{3.00}A_{0.00}$, $P_{2.25}I_{1.50}A_{0.00}$ y $P_{0.00}I_{0.00}A_{0.00}$.	61
Figura 8. Conteo de bacterias viables por NMP después del secado por aspersion usando la cubierta entérica y los prebióticos de acuerdo al diseño experimental.	62
Figura 9. Imágenes SEM de las formulas: $P_{0.76}I_{2.00}A_{2.38}$, $P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$ y $P_{0.00}I_{0.00}A_{0.00}$.	63
Figura 10. Pruebas del NMP de las formulas: 5: $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$ (a) y 8: $P_{1.48}I_{0.90}A_{4.62}$ (b) con tratamiento de pectinasa.	64
Figura 11. Efecto de fluidos gástricos simulados (FGS) e intestinales (FIS) sobre las bacterias microencapsuladas.	64

ANEXO

Tabla 1. Tabla del Numero más probable en replicas de cinco por niveles de dilución

RESUMEN

El presente trabajo muestra la importancia de los probióticos específicamente de *Lactobacillus acidophilus* en la salud del huésped, haciendo énfasis en preservar la viabilidad en un lugar específico (colon) con el uso de una matriz polimérica, prebióticos y un proceso de secado por aspersion como un método de protección ante efectos deletéreos.

La matriz polimérica es una mezcla de carboximetilcelulosa (CM), pectina (P) y proteína aislada de suero lácteo (WPI), a la cual se le realizó una caracterización de mezclas binarias y una terciaria con y sin proceso de desnaturalización (D y SD), en base a curvas de secado determinando su energía de activación (E_a) así como microestructura de las películas generadas. Por otra parte este mismo análisis se realizó con la presencia de prebióticos en base a un diseño Simplex centroide.

Una vez conocida las características de la película se procedió a realizar la activación y cinética de la bacteria probiótica (*Lactobacillus acidophilus*) para conocer el tiempo en el cual se encontraba en la fase estacionaria, el monitoreo de cinética se realizó por medio de pH, Densidad óptica, Numero más probable (NMP), y método de impedancia, dando como resultado que la fase de interés se encuentra a las 18 h, coincidiendo el resultado en los 4 métodos de medición anteriormente descritos.

Una vez obtenidos los microorganismos en fase estacionaria se realizó la microencapsulación por secado por aspersion, continuando con pruebas de viabilidad después del secado, resistencia a fluidos gástricos e intestinales simulados así como su microestructura de los polvos obtenidos.

Los resultados de las E_a de las mezclas binarias y ternaria reflejan que las mezclas D exhiben mayor energía de activación (40.14 y 37.19 KJ/mol)

comparada con las SD, la presencia de prebióticos proporciona una Ea de 38.7 KJ/mol reflejando para $P_{0.00}I_{3.00}A_{0.00}$ y $P_{2.25}I_{1.50}A_{0.00}$ reflejando que esta disminución se debe a las propiedades de los materiales y formación estructural de la microcapsula.

En el efecto del secado, la sobrevivencia se monitoreo por NMP e impedancia reflejando que las muestras $P_{0.76}I_{2.00}A_{2.38}$, $P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$ y el control ($P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$) tienen mayor capacidad de protección reportando 6.5×10^6 NMP de microorganismos, y una resistencia alta confirmando que a niveles altos de microorganismo este parámetro es disminuido. Por otra parte en la estabilidad a condiciones simuladas de fluido gástrico e intestinal, nos indica que las capsulas que proporcionaron mayor protección fueron: $P_{2.25}I_{0.00}A_{7.00}$, $P_{3.00}I_{0.51}A_{2.38}$ (2.5×10^7 , 1.5×10^7 respectivamente) y $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$ (3.3×10^8), esto datos son sobresalientes ya que se encuentran entre 3 y 4 ciclos logarítmicos mas con respecto a las otras formulas desarrolladas y dos ciclos mayores respecto al control (1.3×10^5). Con respecto a la microestructura encontramos que la mezcla con mayor viabilidad tiene una estructura en forma de hojuelas con bordes definidos y ligeramente suaves, su apariencia es ligeramente compacta favoreciendo la protección y liberación de bacterias probióticas.

Con estos datos podemos concluir que el uso de prebióticos aunados a una matriz polimérica protegen la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* de las condiciones de estrés por el proceso de microencapsulación y transito a través del tracto gastrointestinal, asegurando que las bacterias sean liberadas en cantidad suficiente en un lugar especifico (colon) proporcionando beneficios al huésped

ABSTRACT

In this work it is shown the importance of the *Lactobacillus acidophilus* probiotic in the health of a host. It was emphasized the preserving, and its viability in a specific site (the colon) by means of a polymeric matrix, probiotics, and an aspersion drying process, considered as a protection technique against deleterious effects.

The polymeric matrix is a mixture of carboxymetilcellulose (CM), pectin (P), and milky whey isolated protein (WPI). Binary and thirdnary mixtures were prepared with and without a desnaturalization process, (D and SD). According to the drying behavior, the activation energy was estimated (Ea). Furthermore, the microstructure of the films obtained was also studied. In addition, this same analysis was performed with the presence of probiotics considering a centroid simplex design.

Once the characteristics of the films were known, the activation of the probiotic bacterium (*Lactobacillus acidophilus*) was realized, and its kinetics was studied. From the measurements it was possible to estimate the time in which the bacterium is found in a stationary phase. The kinetics of the bacterium was observed by measuring the pH, the optical density, the most probable number, and the electric impedance. The results indicate that the phase of interest is found at about 18 hours, as indicated by the four methods above mentioned.

Once the micro-organisms were got in the stationary phase, the micro-encapsulation was performed by means of an aspersion drying. Going on with the viability proofs, after the drying, simulated intestine and gastric fluid resistance, as well as the microstructure of the powders got, was studied.

The results of the activation energy of the binary and thirdnary mixtures show that the D mixtures have a higher activation energy (40.14 y 37.19 KJ/mol), when compared with the SD mixtures. The presence of probiotics led to an Ea of 38.7

KJ/mol for $P_{0.00}I_{3.00}A_{0.00}$ and $P_{2.25}I_{1.50}A_{0.00}$. The drop in the E_a is due to the properties of the materials as well as to the structural formation of the microcapsule.

Concerning the drying effect, the survival was studied by NMP and impedance spectroscopy, showing that samples $P_{0.76}I_{2.00}A_{2.38}$, $P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$ and $P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$ (the control) have the better protection capacity, reaching as much as 6.5×10^6 NMP micro-organisms. Impedance measurements seem to support these results. On the other hand, concerning the stability under simulated conditions of the intestine and gastric fluid, it was shown that the capsules that showed the best protection were $P_{2.25}I_{0.00}A_{7.00}$, $P_{3.00}I_{0.51}A_{2.38}$ (2.5×10^7 , 1.5×10^7 respectively), and $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$ (3.3×10^8). These data resulted interesting, since they are about three or four orders of magnitude larger when compared with other prepared formulas. In addition, they are about two orders of magnitude larger when compared with the control (1.3×10^5). Concerning the microstructure, it is found that the mixture with the largest viability show a microstructure simulating flakes with soft and well defined edges. Its appearance is slightly compacted favoring the release and protection of the probiotic bacteria.

In conclusion, this research indicates that the use of probiotics and a polymeric matrix protect the viability of the *Lactobacillus acidophilus* against the stress conditionings, because of the micro-encapsulation process. They also protect its transit through the gastrointestinal tract. The results indicate that the bacteria are liberated in sufficient amount in a specific site (the colon), providing lots of benefits to the host.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de alimentos funcionales constituye una oportunidad real de contribuir a mejorar la calidad de la dieta, actualmente la población se esta enfocando en llevar una vida saludable, y colateralmente le esta dando importancia a la microflora intestinal en especial a la colonica, es por ello que en este trabajo se resalta la importancia y beneficios que aportan los probióticos (bacterias) sobre la salud del huésped.

Lactobacillus acidophilus es una bacteria fermentativa productora de ácido láctico y requiere de una fuente de carbono para su crecimiento, en pH de ligera acidez. Es capaz de proporcionar efectos nutritivos y terapéuticos en el ser que la hospeda (hombre o animal), por lo cual es considerada como una bacteria probiótica. Sin embargo para obtener los efectos benéficos se recomienda una ingesta de por lo menos 10^7 CFU (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo de producto consumido.

La viabilidad de estos microorganismos es mínima porque tienen que pasar por diversos obstáculos, desde su activación (liofilizados), procesamiento, y consumo hasta su llegada al colon donde se adhieren a la mucosa intestinal en cantidades suficientes y ejercen sus beneficios.

La microencapsulación por secado por aspersion y el uso de prebióticos es una alternativa para proteger a los microorganismos de las condiciones deletéreas tales como jugos gástricos y biliares, oxígeno, pH, procesamiento, y almacenamiento, obteniendo una supervivencia mayor y asegurando su llegada hasta el colon.

Los prebióticos utilizados para esta acción son gomas, carbohidratos, celulosas, lípidos, proteínas, etc. sin embargo existen diversos materiales tales como la inulina, trehalosa, polidextrosa y oligosacaridos que por sus propiedades físicas y

químicas también podrían ser considerados como prebióticos co-encapsulantes de alta calidad.

La investigación propuesta se enfocó en la determinación del efecto de la acción combinada de tipo de prebiótico (inulina, trehalosa, polidextrosa y oligosacárido) y una cubierta entérica previamente desarrollada con proteína aislada de suero de leche (WPI), Carboximetilcelulosa (CMC) y pectina (P) sobre la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* después del proceso de microencapsulación, así como su estabilidad a condiciones simuladas de tracto gastrointestinal (Fluidos gástricos e intestinales).

1. ANTECEDENTES

1.1 Aspectos históricos

Desde tiempos remotos se han atribuido propiedades benéficas a la presencia de probióticos, los cuales eran definidos como microorganismos viables que tienen efectos benéficos al huésped que los ingiere (Ortega *et al.*, 2001).

Posteriormente con el desarrollo de la microbiología, diversos investigadores enfocados al estudio de las bacterias lácticas, descubrieron y atribuyeron efectos benéficos debido a las modificaciones inducidas en la composición de la flora intestinal, con estos antecedentes Elie Metchnikoff continuó trabajando con estas bacterias y en 1908 afirmó que el consumo de yogurt con lactobacilos (bacterias lácticas) promovía la disminución de bacterias patógenas y por lo tanto prolongaba la longevidad del huésped. Por estos hallazgos obtuvo el premio Nobel en ese mismo año (Ortega *et al.*, 2001).

Con el precedente de las investigaciones de Metchnikoff y otras posteriores incluyendo las de Tisserand, existió la inquietud de darle nombre a la relación que existía entre una bacteria láctica y los beneficios que ofrece, por lo que en 1965 Lily y Stillwell acuñaron el concepto de “probióticos”, procedente del griego que significa “a favor de la vida”; el cual para describir cualquier sustancia u organismo que contribuyera al balance microbiano intestinal (Giochetti *et al.*, 2007).

El concepto probiótico no había sido modificado, sin embargo Havenar y Huis in't Veld (1992) lo ampliaron sugiriendo que: “estos productos proceden de cultivos – mixtos o simples- de microorganismos vivos que aplicados a hombres y animales los afectan de manera benéfica” (Havenar y Huis in't Veld MJH, 1992). Sin embargo Shaafsma menciona que la sugerencia anterior limita los efectos benéficos de la flora microbiana, por lo cual en 1996 hace una nueva aportación al concepto afirmando que: “Los cultivos lácteos (probióticos) tienen un efecto benéfico sobre la salud y la nutrición del huésped” (Chen *et al.*, 2005; Pasin, 2002; Ortega *et al.*, 2001; Spanhaak *et al.*, 1998).

Hasta el año 1996 se consideraba que el concepto ya estaba más que aceptado, por lo que Shrezenmier y Vrese (2001), sugirieron que se le realizara una revisión, para finalmente definir a los probióticos como un preparado o producto que contiene microorganismos definidos viable en cantidad suficiente ejerciendo efectos benéficos sobre la salud del huésped tales como la prevención de condiciones patológicas específicas (Chen *et al.*, 2005; Iyer y Kailasapathy, 2005; Ortega *et al.*, 2001; Liong y Nagendra, 2005; Picot y Lacroix, 2004; Favaro-Trinicad y Grosso, 2002).

Esta definición acentúa la importancia de mantener una suficiente población de microorganismos viables en el organismo, específicamente en el intestino grueso (colon), e indica que los benéficos pueden incluir un mejoramiento en el balance microbiano asociados con otros efectos en la salud (Giocheti *et al.*, 2007).

Los primeros reportes del uso de microorganismos probióticos se encuentran en el Génesis, donde describe que la larga vida de Abraham se atribuía al consumo de leches acidificadas, posteriormente los efectos benéficos en el balance microbiano intestinal fueron evaluados en animales domésticos subsecuentemente Fuller enfatizó la necesidad de un suplemento alimenticio microbiano vivo como complemento alimenticio en seres humanos (Giocheti *et al.*, 2007; Havenar y Huis in't Veld MJH, 1992; Ortega *et al.*, 2001).

Los efectos de consumir alimentos probióticos fueron mejorar las propiedades de la microflora y colateralmente externar beneficios en la salud. Las primeras bacterias probióticas consideradas para tal efecto fueron las bacterias ácido lácticas, en especial las del género *acidophilus*, el primer estudio realizado con estas bacterias fue en yogurt por Metchnikoff en 1906, posteriormente se realizaron investigaciones sobre otras posibles bacterias con el mismo efecto y su aplicación y desarrollo en nuevos productos (Ortega *et al.*, 2001).

Actualmente las bacterias del géneros: Estreptococos, Bifidobacterias y Lactobacillus, así como sus especies (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermentis*) tienen efecto probiótico y por otra parte se han generado y desarrollado “nuevos probióticos”; los cuales incluyen microorganismos como levaduras: *Saccharomyces boulardii* y otro tipo de bacterias: *Clostridiurs* sp, y *Bacillus subtilis* que también poseen el mismo efecto (Pelczar, 1982; Giochetti *et al* 2007).

1.2 Descripción *Lactobacillus acidophilus*

El género Lactobacillus, posee diversas especies, entre ellas *Lactobacillus acidophilus*. Esta bacteria ácido láctica es de origen humano, posee una morfología tipo cocos (forma redonda) o bacilos (forma de bastón), se considera facultativa lo que significa que puede crecer en presencia de oxígeno como en ausencia, sin embargo es considerada microaerófila, lo que implica que grandes concentraciones de oxígeno pueden ser tóxicas (Pelczar, 1982; Briceño *et al.*, 2001).

Con respecto a temperatura de crecimiento, requiere de 45 °C para crecer óptimamente; se desarrolla fácilmente en medios mucho más ácidos por lo cual es considerada ácido-bilio resistente (pH 4-5 o menores), lo que representa una gran ventaja sobre las bacterias patógenas ya que éstas no toleran los valores de pH bajos, también es considerada una bacteria proteolítica debido a su capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos, además de poseer características fermentativas. (Pelczar, 1982; Briceño *et al.*, 2001; <http://www.uses.edu.ar/institutos/ieia/cae>).

Su capacidad de fermentación se debe a la capacidad de utilizar la lactosa produciendo ácido láctico; otros productos derivados de su actividad son gas y peróxido de hidrógeno, así como la producción de sustancias antimicrobianas llamadas bacteriocinas las cuales promueven la disminución del pH luminal del colon inhibiendo el crecimiento de agentes patógenos, incluso durante la digestión, también ayudan en la producción de niacina, ácido fólico y piridoxina (B6).

1.3 Beneficios que ofrece

En las últimas décadas se han obtenido numerosas evidencias científicas que demuestran que los probióticos aportan grandes beneficios a la salud humana (Guarner y Shaafsman, 1998). Por ejemplo estudios clínicos han comprobado la utilidad de varios probióticos en la prevención y tratamiento de diarreas (infantiles, agudas y asociadas con el uso de antibióticos); también son eficaces en tratamientos de signos y síntomas que acompañan la intolerancia a la lactosa, enfermedades inflamatorias intestinales, modulación de sistema inmune y cáncer de colon (Giochetti *et al.*, 2007; Ortega, 2005).

En casos de diarrea, se ha demostrado que el tratamiento con *Lactobacillus GG* administrado como polvo deshidratado o en yogurt fermentado, fue capaz de reducir significativamente el número de evacuaciones y diarrea. Este efecto está asociado con el aumento de células secretoras de antígeno específico-inmunoglobulina (IgA) durante la convalecencia. También se ha demostrado que agregando a la fórmula de un lactante *Bifidobacteria bifidum* y *Streptococo thermophilus*, puede reducirse la incidencia de diarrea aguda y reinfección por rotavirus en pacientes hospitalizados (Saavedra y *et al.*, 1994).

Por otra parte, Fabia y colaboradores (1993) han demostrado una importante disminución en la concentración de *Lactobacillus* en biopsias de colon de pacientes con colitis ulcerativa activa. En pacientes con enfermedad del Crohn, la disminución de la concentración de bifidobacterias en materia fecal y la administración de probióticos, provocó un aumento en la respuesta inmunológica del IgA a nivel intestinal (Giochetti *et al.*, 2007).

1.4 Importancia comercial y en la salud

Los primeros productos con la presencia de bacterias benéficas fueron los lácteos, observándose que la interacción de los microorganismos con el ácido láctico

genera modificación de pH o acidez del medio promoviéndose la precipitación de las proteínas para dar origen a innumerables productos tales como el yogurt y el queso. Por otra parte se han desarrollado nuevas formas de consumo y utilización de microorganismos tales como presentaciones farmacéuticas de bacterias lácticas que ayudan a mejorar la flor intestinal y de forma antagónica disminuir la presencia de bacterias patógenas (Ortega *et al.*, 2001; Lian *et al.*, 2002, Crittenden *et al.*, 2006).

Con respecto a importancia en la salud, el consumo de bacterias probióticas proporciona efectos terapéuticos y nutritivos. En los primeros se encuentran: intolerancia a la lactosa, efectos inhibidores en células tumorales, inmunomodulación, tratamiento contra desordenes gastrointestinales, disminución del colesterol, mejora la constipación de la diarrea, así como disminución de alergia producida por alimentos; específicamente en dermatitis y en los segundos, ayudan a aumentar la disponibilidad de minerales, incrementan la digestibilidad de proteínas y son capaces de sintetizar vitaminas, en especial las del complejo B (Muthukumarasamy *et al.*, 2006; Iyer y Kailasapathy, 2005; Ortega *et al.*, 2001; Lian *et al.*, 2003; Ann *et al.*, 2007; Hernandez *et al.*, 2007).

Sin embargo algunos de los efectos promotores de la salud producidas por el consumo de estas bacterias puede variar de acuerdo a la especie, además debe existir un balance entre la microflora y el huésped, este último presenta varios mecanismos de defensa, entre los que se incluye la barrera epitelial, factores mecánicos (perístasis y descamación) de adhesión bacteriana como la pared de la mucosa y la secreción de inmunoglobulinas (IgA), la cual representa una barrera inmunológica primaria contra patógenos (Giochetti *et al.*, 2007).

1.5 Situación Actual y Problemática tecnología de los probióticos

En la actualidad aunque el concepto “probiótico” se haya aceptado es controversial, principalmente porque aun no se han definido por completo los

mecanismos por los cuales los probióticos ejercen efectos antagónicos sobre los microorganismos patógenos intestinales, así como sus beneficios hacia el huésped Giochetti *et al.*, 2007).

Sin embargo, las investigaciones con respecto a ellos han aumentado y los resultados han sido confiables y motivantes, de tal forma que el conocimiento de sus beneficios ha contribuido al interés en alimentos funcionales, con propiedades benéficas a la salud, tales como productos probióticos en su forma clásica (yogurt y leche) así como en nuevas aplicaciones en productos lácteos e incluso en productos cárnicos (Giochetti *et al.*, 2007).

Los probióticos, específicamente bacterias probióticas no solo han tenido que enfrentar su aceptación por el público, si no que además para su producción y uso dirigido a humanos y animales deben reunir características específicas tales como: ser probadas y seguras, no deben provocar ninguna reacción inmune contra cepas probióticas, no debe ser patógena, toxica, alergénica, mutagénica o carcinógena, ni en si misma, ni por subproductos de fermentación o componentes celulares, debe ser genéticamente estable, no transferir plásmidos, fácil producción y reproducible, así como viable en los procesos de manufactura y consumo. (Pelczar, 1982; Jaweltz *et al.*, 1975; Lian *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2001; Giochetti *et al.*, 2007; <http://www.wipimedia.org>).

Recientes investigaciones sugieren que los organismos probióticos (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermentis*) deben ser seguros y metabolitamente activos dentro del tracto gastrointestinal, por lo tanto una vez que se ingieran las bacterias probióticas deben sobrevivir al tránsito a través de este sistema y alcanzar, en cantidades suficientes el colon, lugar específico donde pueden colonizar y proporcionar los efectos benéficos (Lian *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Lian *et al.*, 2003).

Sin embargo no siempre o en pocas cantidades, las bacterias llegan a este lugar ya que tienen que atravesar diversos obstáculos entre ellos los cambios agresivos de pH a través del sistema gastrointestinal (Ann *et al.*, 2007; Chandramouli *et al.*, 2004), como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Diferencias de pH en el sistema gastrointestinal

Sistema gastrointestinal	pH
Saliva	6.8 – 7.0
Secreciones gástricas	1.5 – 3.0
Bilis	7.8 – 8.0
Jugos pancreático	8.0 – 8.4
Secreciones intestinales	7.8 – 8.0

Con respecto a la cantidad suficiente, diversos autores y la Internacional Dairy Federation consideran que para obtener los beneficios terapéuticos de estos microorganismos se deben consumir aproximadamente 10^5 - 10^6 CFU (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo de producto, además de ser consumidas regularmente. Sin embargo Talwalkar y Kailasapathy (2004) mencionan que el requerimiento estándar mínimo de bacterias probióticas debe de ser de 10^6 - 10^7 cfu g^{-1} ; por lo tanto el consumo requerido no es del todo exacto ni universal. (Hernández *et al.*, 2007; Van de Castele *et al.*, 2006; Ozer *et al.*, 2005; Picot y Lacroix, 2003),

Además de tener viabilidad en condiciones acidas deben ser viables con una alta densidad celular, procesamiento y almacenamiento, en cultivo; debe de poseer las condiciones de sustrato (nutrientes), temperatura, pH y condiciones anaerobias para desarrollarse y obtener cantidades suficientes para su aislamiento, aplicación y desarrollo. Durante el procesamiento se deben considerar las condiciones óptimas de manufactura obteniéndose una población final dentro de los requisitos recomendados. Con respecto al almacenamiento es importante establecer las condiciones ideales (temperatura y empaque) donde la viabilidad del producto no sea afectada por condiciones de frío o calor de tal manera que los microorganismos sean disponibles para su posterior aplicación ya sea para ser

activado o para la aplicación en producto terminado directo al consumidor (Ortega *et al* 2001).

1.6 Prebióticos

El beneficio de los probióticos, así como su viabilidad podría ser mínima o nula si no son protegidos o manejados adecuadamente, ante los obstáculos deletéreos antes de llegar al colon(Ozer *et al.*, 2005; Picot y Lacroix, 2003; Liong y Nagendra, 2005).

Se puede proteger, transportar y al mismo tiempo ofrecer condiciones necesarias para el desarrollo de bacterias probióticas con el uso prebióticos, que son ingredientes alimenticios que favorecen el crecimiento y/o actividad de una bacteria específica o de un número de especies bacterianas en el colon, proporcionando efectos benéficos a la salud del huésped (Liong y Nagendra, 2005; Chen *et al.*, 2005; Gerdes, 2005; Ozer *et al.*, 2005; Picot y Lacroix, 2003).

Se ha encontrado que los prebióticos son fuente de carbono y de energía de los probióticos por ser carbohidratos de cadena corta, algunas veces reconocidos como oligosacáridos, no digeribles por las enzimas del epitelio intestinal o de las glándulas anexas debido a su estructura química, y llegan al intestino grueso donde alcanzan estar disponibles para la fermentación por las bacterias sacarolíticas, que son especialmente Lactobacillus y Bifidobacterias, dando origen a compuestos que ejercen efectos funcionales sobre la mucosa del tubo digestivo (Salazar *et al.*, 2005).

Los prebióticos que actualmente se reconocen son los fructooligosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, algunos péptidos, cierto tipo de lípidos y ácidos grasos insaturados, carbohidratos y proteínas no digeribles Sin embargo los únicos que satisfacen estrictamente el concepto de prebióticos son los oligosacáridos mientras que los más utilizados actualmente son los fructooligosacáridos (Rosado, 2002).

Específicamente los prebióticos se utilizan en la industria alimentaria y farmacéutica como:

- Promotores de crecimiento:
almidones, oligosacáridos, gomas, almidones modificados (Desmon, 2002).
- Materiales protectores y termoprotectantes
Polímeros de proteínas de suero solubles, oligosacáridos, maltodextrinas, oligofruktosa (Picot y Lacroix, 2003; Ann *et al.*, 2007; Ozer *et al.*, 2005; Akalin *et al.*, 2004; Liong y Nagendra, 2005), Trehalosa, solidos de leche libres de grasa, adinotal (Desmon, 2002).
- Transportadores
Gelatina, goma arábica, suero de leche, almidón soluble (Liong y Nagendra, 2005).
- Encapsulantes
Alginato de calcio, k-carragenina, gomas, almidón, citosan (Picot y Lacroix, 2003; Iyer y Kailasapathy, 2005; Chandramouli *et al.*, 2004; Ann *et al.*, 2007).

Estos prebióticos coadyuvan para encapsular bacterias probioticas de forma simple, conjunta o como co-encapsulantes con el objetivo de proporcionar un efecto protector ante los efectos físicos, químicos, medio ambiente, así como a condiciones de almacenamiento, procesamiento y fluidos gastrointestinales (Picot y Lacroix, 2003; Ann *et al.*, 2007; Lian *et al.*, 2003).

Estudios demuestran que el consumo de una amplia variedad de prebióticos puede mejorar la salud del intestino, aunque no hubiera probióticos presentes. Sin embargo cuando se combinan ambos “simbiosis”, tiene efectos sinérgicos promoviendo el crecimiento de las cepas existentes de las bacterias benéficas en el colon (Gerdes, 2005).

La simbiosis ocurre cuando la microflora colónica es capaz de producir ácidos grasos de cadena corta, así como ácido láctico que provoca la disminución del pH en el ecosistema colónico el cual inhibe el crecimiento y actividad de patógenos (Gerdes, 2005), dando como consecuencia el origen de las condiciones óptimas para la sobrevivencia, implantación y desarrollo de cultivos probióticos y bacterias benéfica para el huésped (Liong y Nagendra, 2005; Ozer *et al.*, 2005; Gerdes, 2005).

También se ha comprobado que la simbiosis de un prebióticos y un probiótico, así como la microencapsulación han sido favorables para aumentar la viabilidad de los microorganismos durante el paso a través del tracto digestivo, sin embargo el uso de una cubierta entérica como co-encapsulante pudiera ser un elemento que le proporcione una mayor o total protección a los probióticos (Gerdes, 2005; Iyer y Kailasapathy, 2005; Liong y Nagendra, 2005; Chen *et al.*, 2005).

Chen *et al* (2005), obtuvieron una mayor sobrevivencia de probióticos utilizando una mezcla de 3% prebióticos (FOS), 1% promotores de crecimiento (péptidos) y 1 % alginato de sodio como material de cobertura, durante un mes de almacenamiento y las pruebas utilizando fluidos gástricos y sal de bilis obteniendo un conteo de 10^6 - 10^7 cfu g⁻¹, estos tres elementos ejercieron una mejor protección a los probióticos por el potencial de sinergia que existen entre ellos (Chen *et al.*, 2005).

Hoy en día, muchos prebióticos oligosacáridos en el mercado incluyen, fructooligosacáridos, inulina, galacto-oligosacáridos, lactulosa e isomaltosacáridos (Ozer *et al.*, 2005).

Varios derivados de la lactosa, como la lactulosa, lactitol y lactosucrosa, también funcionan como prebióticos. La tagatosa, un nuevo endulzante de volumen y de bajas calorías, también es posible obtener prebióticos derivados del almidón, en

este grupo de incluye a los malto e isomalto oligosacáridos, povidexrosa y ciertos almidones resistentes (Gerdes, 2005).

Por el lado de las gomas la mayoría funcionan como prebióticos, con excepción de las gomas de celulosa, CMC Y MCC, las cuales no pueden ser empleadas pues el intestino no cuenta con suficiente actividad de celulasa (Gerdes, 2005).

Existen otros cuyo estudio resulta interesante continuar investigando tales como: povidexrosa, oligosacáridos y agua miel, este ultimo rico en azuceres que debido a sus propiedades físicas y químicas también podría ser considerados como prebióticos de alta calidad.

1.6.1 Povidexrosa

Es un polímero de glucosa compacto de uniones aleatorias que contiene pequeñas cantidades de sorbitol y ácido cítrico, posee un grado de polimerización (D.P.) de 12, tiene una singular característica, es ramificado de glucosa lo que permite estar disponible con los enlaces glucosídicos favoreciéndolo a la hidrólisis por enzimas del sistema digestivo humano. (Ribeiro *et al.*, 2003; Flood *et al.*, 2004; [http://www. Mujerdeelite.com](http://www.Mujerdeelite.com))

Este carbohidrato es obtenido de Ajo, cebolla y achicoria con un 90 % de fibra, por lo cual es considerado como una fibra dietética, tiene relativamente un alto peso molecular, es soluble en agua y tiene una velocidad de fermentación baja y colateralmente una densidad energética menor, es un polvo no cristalino, puede usarse como estabilizador de alimentos para prevenir la cristalización de azúcar y polioles, sin embargo no es un endulzante; es utilizado en la industria alimenticia por poseer solo 1 Kcal por gramo siendo ideal para personas con problemas de obesidad o diabetes. (Mitchel, 1996; Ribeiro *et al.*, 2003; [http://www. Daniscosweeteners.com](http://www.Daniscosweeteners.com)).

Una desventaja de los prebióticos es a rápida fermentación con consecuente producción de gases y acumulación de ácido láctico en la parte proximal del intestino grueso produciendo incomodidad. La povidexrosa es de lenta fermentación, haciendo que la producción de gas sea menor y sin acumulación de ácido láctico minimizando el estrés gastrointestinal (Gerdes, 2005; Flood *et al.*, 2004).

Entre algunos de los efectos benéficos en el organismo se encuentran: no es digerible en el intestino delgado, pero se fermenta parcialmente en el intestino grueso, originando el crecimiento de bacterias benéficas (probióticas), suaviza la materia fecal, disminución de pH, producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), facilita la evacuación, atenuación de la glucosa sanguínea e incremento en la absorción de calcio (Harada, 1995).

Un estudio de Jie y colaboradores (2000) muestra que la povidexrosa tienen un efecto dosis-dependiente con bifidobacterias y lactobacilos, es decir a menor concentración menor es la actividad de las bacterias y viceversa, así una dosis de 4 g por día tiene efectos positivos en la reducción del pH fecal, lo que indica que existe un cambio en la actividad proteolítica a fermentativa sacaróica. Esta disminución de pH sirve para la inhibición de patógenos (Danisco, 2006).

Por otra parte Ishizuka *et al* (2003), usó un modelo con utilizando ratas, donde demostró que povidexrosa reduce considerablemente la formación de un agente carcinógeno. El efecto fue más pronunciado en el recto donde existe reducción de hasta un 65%, a lo cual los autores concluyeron que la ingestión de povidexrosa puede impedir la carcinogénesis colorrectal (Danisco, 2006).

En la industria alimentaría la povidexrosa puede ser usada como agente de masa, espesante con forma, estabilizante, humectante y agente de firmeza, además como un agente de volumen, proporcionando cuerpo y textura en alimentos de

panadería, productos dietéticos y elaboración de confitería (Hicsasmaz *et al.*, 2003; Flood *et al.*, 2004; Danisco, 2006).

Entre sus ventajas se le puede atribuir como un sustituto de grasa permitiendo mejorar la sensación en la boca, es estable y no tiene problemas de apariencia, textura, viscosidad, sabor o afectación en la vida de anaquel, se puede aplicar en cualquier bebida o alimento con características similares a la sacarosa (<http://www.Daniscosweeteners.com>; <http://www.alimentacion.enfasis.com>).

Recientemente, las fibras dietarias como la povidexrosa han sido notadas por tener un importante rol en funciones gastrointestinales, específicamente en el intestino bajo y superior. Sin embargo, sus propiedades no son del todo conocidas por lo cual sería interesante conocer su potencial como protectante de materiales orgánicos tales como microorganismos aumentando su viabilidad durante el procesamiento de secado por aspersion (Harada *et al.*, 1995; Saarela *et al.*, 2006).

1.6.2 Inulina

La inulina es un polisacárido lineal de moléculas D-fructosa unidas por un enlace β (2,1), puede tener pequeñas cantidades de glucosa, se encuentra en raíces, tubérculos y es muy abundante en alcachofa, maguey; tiene un pm aproximado de 5000, es un cristal giroscópico en el aire húmedo, soluble en H₂O Caliente (Badui, 1982; Gerdes, 2005; <http://www.elportaldelasalud.com>).

Tanto como la inulina (2 a 60 unidades de fructosa) y los FOS (2 A 10 unidades de fructosa) son considerados como fibras y pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares por la reducción de colesterol sérico; ambas regulan la inmunidad y no afectan la glucosa en la sangre. En el colon, una parte de la inulina se transforma en ácidos grasos de cadena corta, o sea sustancias muy energéticas que tienen importantes efectos de nutrición de la mucosaintestinal (Gerdes, 2005; Fernandez, 2007; <http://www.casapia.com>).

Un estudio reciente en la Unión Europea ha mostrado que varios biomarcadores de riesgo de cáncer de colon fueron positivamente modulados por un tratamiento simbiótico de inulina y bacterias probióticas. Esto representa la primera vez que se demuestra un efecto de respuesta a la dosis de un prebiótico formulado en un alimento procesado y demostrado *in vivo* en voluntarios humanos saludables (Gerdes, 2005).

En previos estudios muestran que el uso de inulina soporta grandes cantidades de bacterias totales comparada con el uso de oligosacáridos de soya, isomaltooligosacaridos o lactulosa en poblaciones de bifidobacterias y lactobacillus (Ozer *et al.*, 2005).

Entre los beneficios que ofrece la inulina como prebiótico se encuentran:

- Reducción de los niveles de azúcar en la sangre.
- Mejora el aprovechamiento en el organismo de vitaminas en especial las del complejo B.
- Favorece la absorción de calcio, magnesio y eliminación de azufre.
- En la actualidad se esta investigando su posible efecto anticancerígeno en el intestino (Fernández, 2007).

1.6.3 Aguamiel

El aguamiel o miel de maguey es obtenido principalmente de los agaves mezcaleros y los pulqueros, dependiendo del tipo de agave se puede obtener mieles claras u oscuras, esta miel esta compuesta por una considerable cantidad de carbohidrato entre los que se encuentran: sacarosa, fructuosa, melezitosa, rafinosa, melibosa, fructanos e inulinas (fibras solubles). Además de los compuestos anteriormente mencionados cuenta con una diversidad bacteriana, especialmente de lactobacilos en una proporción de 3.2×10^8 UFC/ml, por lo que es considerado como un prebiótico interesante (Escalante *et al.*, 2008; <http://www.faroc.com.mx>).

Entre los benéficos que el agua miel ofrece a la salud se encuentran: ayudar al metabolismo a quemar grasa, poseer bajo Índice Glicérico (IG: velocidad con la que cada alimento ingerido libera glucosa), favorecer el desarrollo de la flora intestinal, reducción del colesterol, fortalecimiento de las defensas del organismo, prevención de osteoporosis, mejora la digestión; incluso es recomendable para personas con problemas de obesidad y diabetes por su bajo porcentaje de carbohidratos (6.3 g) y alto porcentaje de fibra (1.5 g) (Cruz-Guerrero, *et al* 2006; <http://www.faroc.com.mx>).

Por otra parte posee un poder endulzante 1.5 mayor que el azúcar, originando un ahorro en el uso y consumo de endulzantes, su contenido de proteínas es 170 mg mas compara con la miel de abeja, con respecto al contenido de fibra, calcio, vitamina, potasio y kilocalorías (cKal) es sobresaliente comparada con el azúcar normal y la miel anteriormente mencionada tal y como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de elementos entre miel de Maguey, miel de Abeja y Azúcar.

PORCION 10 g	ckal	PROTEINA (mg)	FIBRA S. (gr)	VIT (mg)	CALCIO (mg)	POTASIO (mg)
M. Maguey	21.0	200	1.5	7.0	24.5	89.0
M. de Abeja	30.4	30	.02	.05	0.6	5.2
Azúcar	40.0	0	0	0	0.1	0.2

El agua miel tanto en su forma natural (sin pasteurizar) como la tratada (pasteurizada), tiene referencias de ser prebiótica, en el primer caso, tiene una importante participación en el desarrollo de microorganismos que dan origen a la fermentación de una bebida tradicional mexicana no destilada (pulque), esta fermentación se produce por la presencia de azucares (sucrosa, glucosa, fructosa) y microorganismos de la miel (Lactobacilos) aunada a la flora nativa del pulque (S.

cerevisiae, *Z. móviles*, *L. mesentorides*) generando derivados como el etanol, inulina y dextranas (Escalante *et al.*, 2008).

En el segundo caso: pasteurizada, sus efectos benéficos radican en la presencia de azúcares, los cuales tienen un efecto benéfico en la flora gastrointestinal, además de tener bajo índice glicémico (<http://www.faroc.com.mx>).

considerando sus características y sus beneficios a la salud, se visualiza al agua miel como un prebiótico potencial debido a su funcionalidad, sin embargo no todas sus propiedades han sido investigadas, entre las que se encuentran su potencial termoprotector de sustancias o microorganismos benéficos y su efecto bactericida contra microorganismos patógenos en el interior del sistema gástrico, así como la innovación y desarrollo de nuevos productos a partir de él (Rodríguez-Huezo, 2007).

Actualmente los probióticos (*Lactobacillus acidophilus*), prebiótico y fibras (aguamiel y povidex) se les considera como “alimentos funcionales” por el aporte de beneficios a la salud, Las fibras dietarias son partes comestibles de plantas o carbohidratos análogos que resisten la digestión y absorción en el intestino delgado con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso. La combinación de estos productos han tenido mayor interés por la población y se han introducido fuertemente al mercado. Esta clase de productos han alcanzado un valor adicional si las fibras pueden proteger a las células probióticas bajo condiciones de procesamiento, formulación y/o almacenamiento (Saarela *et al.*, 2006).

1.6.4 Oligosacáridos

Los oligosacáridos son estrictamente definidos como carbohidratos que contienen entre 3 y 10 monosacáridos enlazados covalentemente por medio de enlaces glucosídicos, estos están presentes en la leche humana en una proporción de 5-10 g/L definidos como D-glucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina, L-fucosa y ácido

N-acetil nerurminico, estos oligosacáridos son divididos en neutrales y ácidos, los primeros referidos a que no contienen alguna carga de residuo de monosacáridos, caso contrario para los segundos que cuentan con uno o mas residuos de acido siálico que es cargado negativamente (Mehra, 2006).

su importancia radica en realizar funciones biológicas que están estrechamente relacionados con la formación estructural de los seres humanos y animales lactantes, además contribuyen a el crecimiento de la flora intestinal benéfica en el colon, estimulación postnatal del sistema inmune y provee defensas contra infecciones bacterianas y virales (Mehra, 2006).

Investigaciones de Kunz y sus colaboradores indicaron que los oligosacáridos de la leche humana tienen la capacidad de resistir la digestión, una parte de ellos son absorbidos y otra permanece en la circulación en tiempo y en concentración suficiente para ejercer efectos sistémicos, por lo cual y debido a los benéficos anteriormente mencionados son considerados como prebióticos (Kunz, 2006).

Otra fuente de oligosacáridos son oligosacáridos prebióticos (galactosa, glucosa, fructosa, xilosa, arabinosa, GOS y FOS), sin embargo no son suficientes para abastecer una demanda que va en aumento, por lo cual existe la necesidad de aislar oligosacáridos de fuentes animales tales como cabra, ovejas y vacas, aunque en menor proporción comparada con los de la leche humana.

1.7 Microencapsulación de probióticos

La viabilidad y actividad de las bacteria lácticas presentes en el cultivo iniciador y en el producto final, están determinadas por una serie de factores, entre ellos, la velocidad de multiplicación de los cultivos lácticos; capacidad de producción de ácido láctico y acético, contenido de sólidos totales, temperatura y tiempo de incubación, cantidad de inóculo utilizado, residuos de antibióticos, desinfectantes o detergentes (Briceño 2005; Picot y Lacroix, 2003),

Incluso la acides, pH, contenido de oxígeno disuelto, potencial redóx, y peroxidación de hidrógeno, oxidación, reacciones químicas, ácido de bilis y enzimas digestivas, han sido identificados como factores que afectan la viabilidad durante la elaboración y almacenamiento del producto conteniendo microorganismos probióticos (Ann *et al.*, 2007; Lian *et al.*, 2003; Favaro-Trinidad y Grosso, 2002; Ozer *et al.*, 2005; Iyer y Kailasapathy, 2005; Desmond *et al.*, 2002; Akalin *et al.*, 2004; Picot y Lacroix, 2003; Cerdeira *et al.*, 2005).

Diferentes métodos incrementan la resistencia de las bacterias probióticas a las condiciones adversas, entre las que se encuentran:

- Cepas resistentes y adaptadas al stress, así como una apropiada selección.
- de cultivos resistentes a ácido y bilis.
- Buen manejo de la fermentación.
- Zonificación de bacterias.
- Uso de envases con permeabilidad al oxígeno.
- Microencapsulación.
- Incorporación de micro-nutrientes (prebióticos) tales como péptidos y aminoácidos.

Algunos de estos métodos ayudan a reducir la toxicidad que presentan ante la presencia de oxígeno, ya que los probióticos por ser microorganismo anaerobios y exponerse a este se genera una oxidación provocando la muerte de las células (Picot y Lacroix, 2003; Ann *et al.*, 2007; Iyer y Kailasapathy, 2005; Chandramouli *et al.*, 2004; Cerdeira *et al.*, 2005, Talwalkar y Kailasapathy, 2004).

La microencapsulación anteriormente mencionada, puede ser en forma física, química o mecánica, en el cual las partículas formadas contienen un material activo (probiótico) cubierto por otro tipo de material (prebiótico) el cual le provee una protección de las influencias deletéreas y del ambiente, así como la liberación

controlada y conveniente de los ingredientes (Favaro-Trinidad y Grosso, 2002; Pedroza, R., 2002).

Esta es una propuesta para incrementar la viabilidad de los probióticos, ya que puede proteger su sensibilidad a los altos niveles de oxígeno, manufactura, almacenamiento, congelación, condiciones ácidas o alcalinas, y durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal (Picot y Lacroix, 2003; Iyer y Kailasapathy, 2005; Chandramouli *et al.*, 2004; Crittenden *et al.*, 2006; Ann *et al.*, 2007; Favaro-Trinidad y Grosso, 2002).

Alternativamente el secado por aspersión es un método físico de microencapsulación, su principio radica en la transformación de un fluido en un material sólido atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado caliente, ocasionando una alta evaporación del líquido de las capsulas permitiendo que el material a encapsular quede atrapado en un medio encapsulante (Yañez 2002).

Este método de secado genera polvos con altos niveles de microorganismos viables, además de ser una forma conveniente para propósitos de almacenamiento y aplicaciones en el desarrollo de alimentos funcionales. (Desmond *et al.*, 2002).

Diversos autores han utilizado este método con el objetivo de aumentar la viabilidad de los probióticos durante procesos tales como:

- Procesamiento

Utilizando: alginato de calcio para *Lactobacillus acidophilus* (Chandramouli *et al.*, 2004), FOS y maltodextrinas, el primero en yogures para la protección de *S. thermophilus* y *L. delbruedkii* así como bifidobacterias (*B. animalis* y *B. longum*) (Akalin *et al.*, 2004); y ambos sobre *L. casei* (Liong y Nagendra,

2005), inulina y lactulosa par aumentar la viabilidad de *L. acidophilus* y *B. bifidum* en yogurt. (Ozer *et al.*, 2005).

- Almacenamiento

En este proceso se ha hecho uso de almidón de maíz (Riordan *et al.*, 2001), lactulosa, rafinosa, inulina(Ann *et al.*, 2007), trehalosa, sucrosa, lactosa (Cerdeira *et al.*, 2005), FOS, fructooligosacaridos, péptidos, y alginato de sodio (Akalin *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005)

- Condiciones gástricas y soluciones de bilis simuladas

Haciendo uso de gelatina, almidón soluble suero de leche o goma arábica para proteger a *B. longum* y *B. infantis* (Lian *et al.*, 2002 y 2003), elaboración de una película –proteína-carbohidrato-emulsión de aceite- conteniendo canola vegetal, caseinato y FOS (Crittenden *et al.*, 2006), acetato de celulosa ftalato en *L. acidophilus* y *B. lactis* (Favaro-Trinidad y Grosso, 2002).

Gardiner *et al.*, (2000), compararon la sobrevivencia de *L. paracasei* y *L. salivarius* durante el secado por aspersión, obteniendo 3.2×10^9 y 5.2×10^7 CFU/g de producto respectivamente, posteriormente evaluaron la viabilidad a 4°C por dos meses obteniendo una disminución aproximada de 1 ciclo logarítmico (7.2×10^7 a 9.5×10^6 CFU/g) para *L. salivarius*, concluyen también que es de suma importancia la selección de los Probióticos, así como las condiciones para el procesamiento tales como los parámetros termotolerantes, determinación de la temperatura optima de salida y el contenido de la mezcla de el polvo además de la importancia de almacenamiento y temperatura para obtener una mayor viabilidad de los microorganismos probióticos (Gardiner *et al.*, 2000).

Lian (2003) evaluó la sobrevivencia de bifidobacterias después de el secado, utilizando gelatina, goma arábica y almidón como medios transportadores, en el cual encontró que exhibe menor sensibilidad al secado por aspersión y muestra

una alta sobrevivencia de 82.6 % después de el secado en crema de leche (Lian *et al.*, 2003).

Una publicación interesante donde evalúan la viabilidad de *L. acidophilus* en 1.5% de FOS, lactulosa y rafinosa después de 24 h de incubación, obteniendo una respuesta de 7.21×10^9 UFC/g, 9.17×10^9 UFC/g, 6.83×10^9 UFC/g respectivamente, posteriormente se determino la viabilidad en una simple (Sureteric™*sans*) y doble Microencapsulación (prebiótico y Sureteric™*sans*), obteniendo que esta ultima induce una escasa reducción en la viabilidad de las células, comparada con lo observado por los controles sin protección (1.47×10^{11}) y con los de una simple capa de Sureteric™*sans*. (6.30×10^{10}), incluso también es efectiva a condiciones acidas durante 5 h, tolerante al calor por 3 y 4 h, y durante el almacenamiento A 251°C, las bacterias doblemente encapsulados con FOS mantienen un conteo de ululas de 9.023×10^9 UFC/g. este estudio constituye el primer reporte del uso de sustratos prebióticos como materiales de revestimiento con resultados positivos.

Actualmente los probióticos (*Lactobacillus acidophilus*), prebiótico y fibras (aguamiel y povidexrosa) se les considera como “alimentos funcionales” por el aporte de beneficios a la salud, Las fibras dietarías son partes comestibles de plantas o carbohidratos análogas que resisten la digestión y absorción en el intestino delgado con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso. La combinación de estos productos han tenido mayor interés por la población y se han introducido fuertemente al mercado. Esta clase de productos han alcanzado un valor adicional si las fibras pueden proteger a las células probióticas bajo condiciones de procesamiento, formulación y/o almacenamiento (Saarela *et al.*, 2006).

El crecimiento de los probióticos en varios medios a base de cereales son reportados por diversos autores (Jaskari *et al.*, 1998, Kontula *et al.*, 1998,

Claralampopoulos *et al.*, 2002b, Laine *et al.*, 2003, Helleland *et al.*, 2004), pero en nuestro conocimiento no hay publicaciones en el efecto de fibras de cereales en la viabilidad de probióticos y estabilidad durante el procesamiento o en productos alimenticios. De aquí el enfoque a las investigaciones de la combinación de prebióticos, secado por aspersion y fibras prebióticas como protectantes de bacterias benéficas probióticas (Saarela *et al.*, 2006).

1.8 Crecimiento de poblaciones bacteriana

El crecimiento de una población bacteriana se puede expresar en función de: el aumento de masa del cultivo o el aumento del número de células, los cuales son equivalentes entre si.

Las medidas de masa bacteriana se pueden realizar por métodos turbidimétricos (ópticos), cuyo principio es la medición de la luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano donde crecen microorganismos reflejando turbidez, esta es proporcional a la masa de las partículas en suspensión (células) y puede estimarse usando un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda específica (λ) y obtener valores de densidad óptica (OD).

Por otra parte las medidas de número de células: Número más probable (NMP), miden el número de bacterias viables por unidad de volumen, su fundamento radica en la teoría estadística, donde produce el resultado analítico observado con mayor frecuencia. Los resultados se calculan a partir del número de hallazgos positivos y negativos de microorganismos (Fig. 1) producidos por siembras realizadas con diluciones decimales múltiples en medios sólidos de cultivo, el estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en diluciones seriadas y el uso de una tabla probabilística (ANEXO, Tabla 1) Entre las ventajas que este método ofrece se encuentran:

-Determinación de solo organismos vivos y activos metabólicamente.

-Es un método rápido, confiable y económico comparado con los métodos tradicionales (cuenta viable en placa).

-Proporciona una recuperación uniforme de las poblaciones microbianas aumentando su detección (Woomer, 1994; Chacon et al., 2005; **Error! Referencia de hipervínculo no válida.**; <http://www.uprm.edu>).

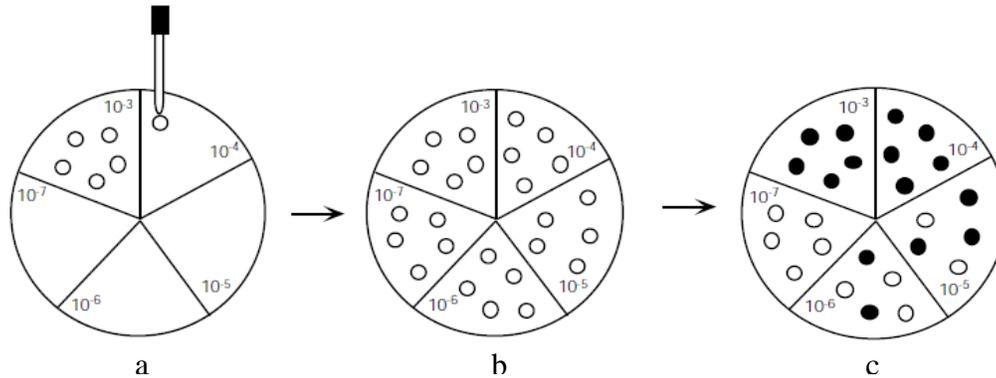


Fig. 1. Inoculación de placas (a y b), hallazgos positivos y negativos de microorganismos (c).

Sin duda los dos métodos anteriormente descritos son eficaces para determinar concentraciones totales de microorganismos, sin embargo requieren de prolongados tiempos de revelación (24 a 48 h) en el caso del número más probable o técnicas de conteo en placa. Con el fin de superar este problema, se han innovado y retomado métodos que proveen respuestas rápidas (en el orden de 20 min) en fundamento de los efectos físicos (acústico, laser light, scattering, fluorescencia, resonancia magnética nuclear, espectroscopia, calorimetría, ópticos, piezoeléctricos) (Grossi *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2005).

En bioingeniería, la impedancia medida entre un par de electrodos de un sistema bipolar de medición puede modelarse como un circuito en serie, como el que se muestra en la Fig. 1. En donde R_i y C_i representan la componente resistiva y capacitiva de la interfase electrodos-electrolito, respectivamente. La participación de estas componentes se describe como la impedancia de interfase, Z_i . Mientras que R_m y C_m , son la resistencia y capacitancia del medio (electrolito), respectivamente, el cual se describe como la impedancia del medio, (Z_m).

Respecto a la impedancia Z_i , la zona que llamamos interfase, físicamente abarca desde las rugosidades más grandes del electrodo hasta la doble capa molecular de fondo, (descrita más adelante). Su comportamiento es complejo y se relaciona con las características geométricas macroscópicas y microscópicas del electrodo, con las características del electrolito o con las condiciones de trabajo empleadas, como por ejemplo la intensidad de corriente aplicada o su frecuencia.

La segunda impedancia (Z_m), que representa al medio entre interfases, posee un comportamiento complejo y presenta unas variaciones muy características de sus componentes dieléctrica u aislante y conductora cuando se le aplica una corriente eléctrica de frecuencia variable. Por supuesto, estas características dependen del medio electrolítico empleado, de las partículas biológicas (o no) presentes en el medio o de las condiciones de trabajo empleadas.

La mayor parte de los estudios de impedancia de medios biológicos en suspensión se hacen con microorganismos en medios líquidos, y en condiciones estáticas (no hay crecimiento) y con medios no favorables para el desarrollo de los mismos. Hoy día, la microbiología de impedancia se agrega como una nueva área donde la impedancia de interfase y la del medio contienen información útil.

A la microbiología de impedancia le interesa la interfase porque muestra ser a veces un mejor transductor de las variaciones del medio y esto puede ser una herramienta de análisis del crecimiento de microorganismos, mediante el monitoreo de las componentes electroquímicas de interfase. También interesa el medio porque se conoce que está íntimamente ligado con la actividad metabólica de los microorganismos y a su presencia física.

Cuando se sumerge un electrodo metálico en una solución electrolítica, aparece en el límite de las dos fases (el electrodo y la solución), una zona con características distintas a ambas fases. Esta zona, que mantiene una diferencia de

potencial, se denomina interfase electrodo-electrolito. La impedancia eléctrica de esa zona se conoce como impedancia de interfase o impedancia de polarización. Warburg es reconocido como el primer investigador en identificar la difusión hacia y desde una interfase electrodo-electrolito como una impedancia eléctrica. El representó a la misma como una combinación serie de una resistencia y una capacitancia, cada una inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la frecuencia.

La doble capa. Al sumergir un electrodo metálico en la solución electrolítica, hay una redistribución de cargas en ambos lados del límite de las fases. Aparece una diferencia

de potencial entre el metal y la solución, esto por dos causas principales: por la aparición de cargas superficiales libres o inducidas en exceso (o defecto) respecto del seno de cada fase, o por la formación de una capa de dipolos orientados hacia la superficie del electrodo.

Al conjunto de cargas y dipolos orientados suele describirse como doble capa eléctrica o simplemente doble capa.

Por otro lado el medio electrolito que se considera es una impedancia compleja Z_m libre de todo efecto de electrodos que puede ser una solución coloidal de partículas; moléculas orgánicas y/o inorgánicas, microorganismos, células aisladas, microesferas, y/o un sistema biológico, (hueso, músculo cardiaco, sangre, u otro).

Sin embargo, al considerar nuevamente el circuito eléctrico de la Fig. 1, cuando la frecuencia de la señal aplicada a los electrodos es relativamente baja (< 1 MHz), C_m es despreciable, comparada con C_i , de modo que el circuito equivalente puede ser simplificado a aquél como se muestra en la Fig. 1b., en donde $R_s = R_m + R_i$ y $C_s = C_i$.

La Tabla siguiente muestra en análisis realizado a las muestras correspondientes a la viabilidad de secado de los materiales estudiados en esta tesis. Estos valores fueron obtenidos por medio del programa Zview, ajustando un circuito RC en serie a los espectros de impedancia adquiridos en una región de frecuencia de 10 a 20,000 Hz. Al parecer, existe una mejor correlación con la capacitancia de interfase, que con la resistencia R_1 . La impedancia se mide en Ohms, mientras que la capacidad posee unidades de Farads. La Figura 2a y 2b ilustra el gráfico correspondiente a la impedancia total adquirida para una muestra con viabilidad 1.

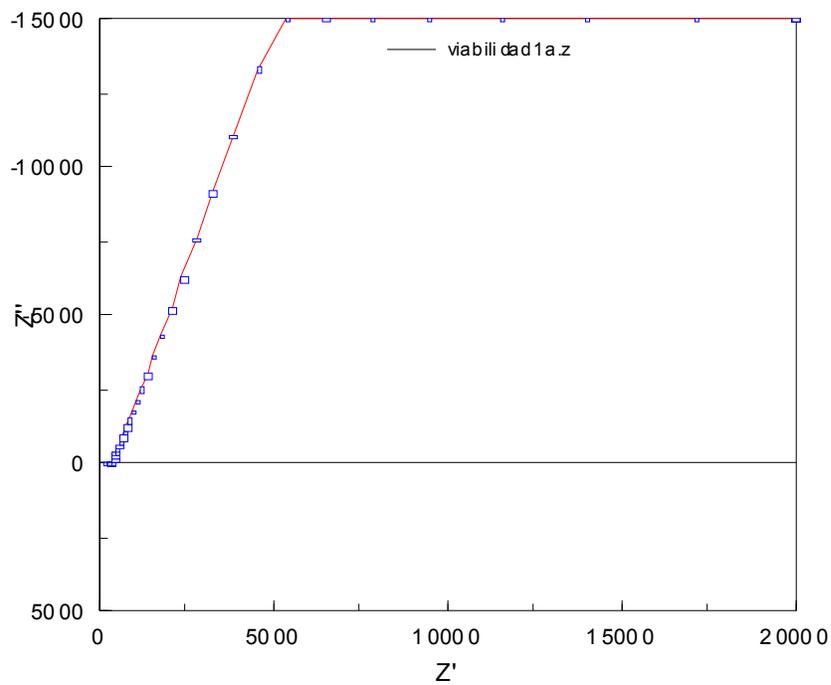


Fig. 2a. Parte real e imaginaria de la impedancia total de la muestra con viabilidad 1.

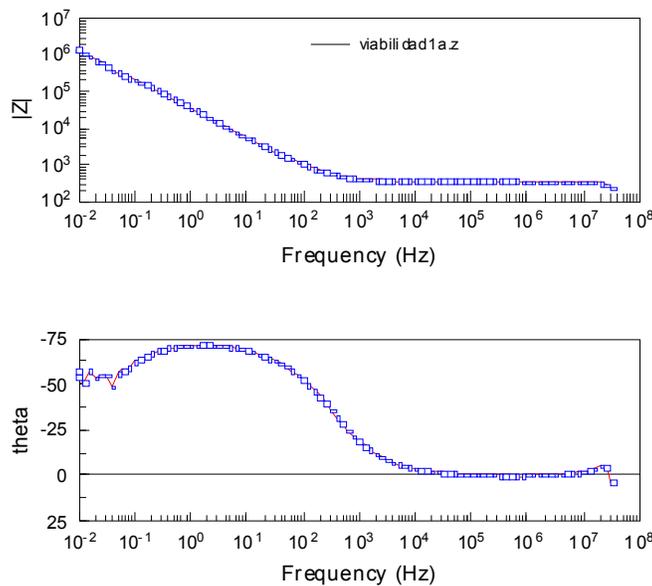


Fig. 2b. Valor absoluto de la impedancia total y diferencia de fase para la muestra con viabilidad 1.

Este método es considerado como una alternativa al conteo de placa o el número más probable y es usado como una técnica estándar de control de calidad en varias ciudades y para diferentes productos alimenticios entre ellos carne, vegetales, vinos, lácteos, pescados, productos farmacéuticos y cosméticos (Grossi *et al.*, 2008), ofreciendo ventajas como:

- Obtención de rápidos resultados
- Emplearse en medios ópticamente opacos, sin necesidad de diluciones que enlentecen los tiempos de detección
- Uso en medios de cultivos, los cuales minimizan el estrés de las bacterias
- Enumeración de grupos de bacterias (Walker *et al.*, 2005;)

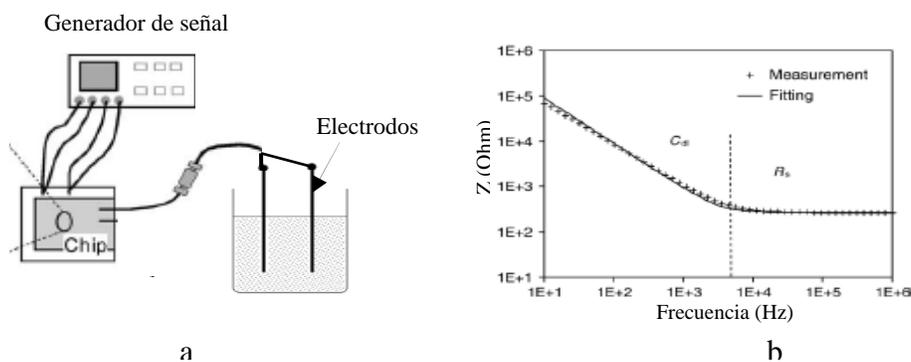


Fig. 2c. Electrodo inmersos en una celda con medio de cultivo inoculado (a), Espectro de impedancia (b)

2. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo alimentos funcionales constituye una oportunidad real de contribuir a mejorar la calidad de las dietas y la selección de alimentos que pueden afectar positivamente la salud y el bienestar del individuo. Actualmente la población esta tomando interés por tener una vida saludable consumiendo productos naturales, o con niveles bajos incluso nulos de conservadores, paralelamente también se esta dando importancia a la microflora intestinal en especial a la colonica.

El uso y consumo de “organismos probióticos” como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterias* en yogurt y otros alimentos fermentados, pueden tener efectos benéficos en el tratamiento de varias enfermedades. Sin embargo, estudios recientes revelan que la viabilidad de bacterias probióticas es afectada por condiciones físicas y químicas durante el procesamiento, almacenamiento y consumo originando una población de bacterias con frecuencia baja. Estas bacterias pueden ser protegidas y potencializadas con el uso de prebióticos además de una técnica adecuada de Microencapsulación los cuales pueden aumentar la viabilidad de microorganismos a través del tracto gastrointestinal hasta su llegada al colon.

Se han realizado diferentes microencapsulaciones de bacterias probioticas con materiales prebióticos, los cuales actúan como transportadores, protectores y sustratos alimenticios, sin embargo, hasta el momento no existe un estudio en donde se use una cubierta con potencial entérico aunada a prebióticos (co-encapsulantes) para aumentar la viabilidad de los microorganismos.

El presente trabajo pretende estudiar si la simbiosis entre *Lactobacillus acidophilus* y diferentes prebióticos (inulina, trehalosa y polidextrosa), en combinación con una cubierta de potencial entérico, tiene el mismo tipo de respuesta sobre la viabilidad de la bacteria.

3. HIPOTESIS

El uso combinado de una cubierta entérica y un prebiótico puede aumentar la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado, expuesto a condiciones de Fluidos Gástricos Simulados (FGS), Fluidos Intestinales (FIS) y almacenamiento, sin diferencia por efecto del tipo de prebiótico.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto de la acción combinada del tipo de prebiótico y una cubierta entérica, sobre la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado en condiciones simuladas de tracto gastrointestinal.

PARTICULARES

1. Evaluar las propiedades físicas (difusividad efectiva, secado isotérmico, energía de activación (Ea), de las mezclas biopoliméricas (binarias y terciarias).
2. Evaluar las propiedades físicas (difusividad efectiva, secado isotérmico, energía de activación (Ea), de las mezclas polisacáridos-proteínas y prebióticos en base a un diseño experimental.
3. Determinar la viabilidad de las microcapsulas después del secado por aspersión.
4. Determinar la viabilidad del probiótico microencapsulado en disoluciones de Fluidos Gástricos Simulados (FGS) y Fluidos Intestinales (FIS).
5. Evaluar la viabilidad del probiótico en el proceso de microencapsulado, en condiciones de FGS, FIS y almacenamiento.
6. Determinar las propiedades de microestructura en las microcápsulas

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales

Los materiales utilizados para esta tesis fueron: cepa probiótica pura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* Florafit NCFM (Danisco Mexicana S. A. de C. V., México), proteína aislada de suero de leche (WPI) con 95-97 % de proteína (Bipro Davisco Foods Internacional Inc, EUA) como agente emulsificante, pectina cítrica (P) (Grindsted RS 400, Danisco Mexicana, S. A. de C. V., México) y carboximetilcelulosa sódica (Aqualon Cellulose gum CMC, 7LF PH, Hércules Incorporated, EUA) como agentes formadores de películas, polidextrosa (Litesse, Danisco Mexicana S. A. de C. V., México), inulina (Quantun Natura S. A. de C. V., México) y aguamiel concentrado (Agroindustrias FAROC S de R. L. de C.V., Coahuila) como agentes prebióticos.

5.2 Métodos

5.2.1 Acondicionamiento y cinética del cultivo de bacteria probiotica: *Lactobacillus acidophilus*

El cultivo puro liofilizado de (Florafit NCFM), se inoculo en caldo MRS (Difco™ Lactobacilli MRS brogh, EUA) a 37 °C por 24 hr en condiciones anaerobias, este mismo procedimiento se realizo tres veces sucesivamente con el objetivo de adaptarlo al medio de cultivo (caldo MRS), y finalmente utilizarlo como inculo.

Una asada del cultivo reconstituido se sembró en placas de agar MRS (Difco™ Lactobacilli MRS Agar, EUA) incubándolo a 37 °C por 24 hr en condiciones anaerobias, posteriormente se realizo un aislado por estría cruzada encubándolo en las mismas condiciones.

La curva de crecimiento o cinética se realizo con el objetivo de conocer la fase estacionaria *Lactobacillus acidophilus*, tomando 20 UFC de las placas de aislamiento e inoculandose en 50 ml de caldo MRS, se homogenizaron y

posteriormente se adicionaron en un matraz erlenmeyer con 650 ml de caldo, esta solución se incubo a 37 °C por 15 hr y se transfirió a un quimiostato (Multigen F-2000) a 37 °C a 70 rpm en condiciones anaerobias. El monitoreo de la cinética del microorganismo (fase lag, log y estacionaria) se obtuvo por medio de pH, Técnica turbidometrica: Densidad óptica, Impedancia eléctrica (MIP) y Numeración bacteriana: Numero más probable (NMP).

5.2.1.1 Densidad óptica

La densidad óptica se determino considerando la metodología propuesta por Mosilhey, 2003. Del medio con microorganismos se tomo una alícuota (200 µl) y se diluyo en agua peptonada esteril (1800 µl) para posteriormente ser evaluada en un espectrofotómetro digital (Cary 50 Conc UV-Visible, Australia) a una densidad óptica de 600 nm (OD_{600nm}).

5.2.1.2 Numero más probable

Se utilizo un mililitro de caldo de cultivo con bacterias inoculadas, realizándose diluciones seriadas hasta 10^{-10} , de cada dilución se sembraron 5 replicas de 5 µl en caldo nutriente estéril (MRS) distribuido en placas con cuadrantes encubandolas a 37°C/24 h, los valores de población se calcularon de acuerdo a la metodología sugerida por Woomer, 1994, mediante tablas estandarizadas en replicas de cinco niveles de dilución, considerándose como resultados positivos el desarrollo de microorganismos. Los datos de esta técnica se compararon con los de densidad óptica para obtener una correlación de ambos métodos.

5.2.1.3 Impedancia eléctrica (MPI)

Para esta metodología se utilizo la sugerida por Hause, 1981, utilizando un analizador de impedancia (SOLARTRON) el cual aplico una señal alterna con un frecuencia de 0.01 a 10000 Hz a un par de electrodos de acero inoxidable

embebidos en 25 ml de caldo de cultivo con bacterias inoculadas a 1 cm profundidad obteniéndose respuestas en función de sus componentes: real (R_i) e imaginaria (X_i).

5.2.2 Producción de biomasa de la bacteria probiótica

Una vez identificada la fase estacionaria se produjo biomasa de *Lactobacillus acidophilus*, considerando la metodología de la cinética y un tiempo 10 hr de producción continua, después de este tiempo las bacterias se separaron por centrifugación a 2500 rpm/10 minutos, el sobrenadante se descarto y las bacterias se resuspendieron dos veces consecutivamente en una solución salina isotónica (SSI, NaCl al 0.85%) obteniéndose un pellet que se mantuvo en refrigeración (4°C) para su posterior inoculación en mezclas de polisacáridos-proteínas.

5.2.3 Mezclas polisacáridos-proteínas (binaras y ternaria) con y sin tratamiento térmico

Se prepararon dispersiones acuosas al 5% (p/v) de cada uno de los polisacáridos (Tabla 3), estas mezclas (binaria y terciaria) se dejaron en reposo durante 17 h para su completa hidratación. La WPI fue sometida a dos tipos de tratamiento: dispersión sin tratamiento térmico (SD) y dispersión con calentamiento (80°C/30 min)(D) de acuerdo a la sugerido por McHugh *et al*, (1994). Los materiales una vez disueltos por separado, se mezclaron de acuerdo a las composiciones expuestas en la tabla 1. Posteriormente estas mezclas biopoliméricas se sometieron a un secado isotérmico utilizando un analizador de humedad (Hr83, Mettler-Toledo S.A. de C.V., México) con exactitud de ± 0.01 g, colocando 1 mL de dispersión en la platina de aluminio provista de un molde circular de diámetro interno 21.9 mm y 3.0 mm de profundidad, con el propósito de homogenizar el área de contacto del líquido con la platina. Cada dispersión fue secada a 50, 72 y 92 °C durante 120 min (Montes *et al.*, 2008).

Tabla 3. Formulaciones de las dispersiones acuosas mezcla binarias y ternaria.

Mezcla	WPI SD y D (g)	P (g)	CMC (g)
WPI _{3.52} P _{1.47}	3.52	1.47	0.00
WPI ₄ CMC ₁	4.00	0.00	1.00
P _{3.07} CMC _{1.92}	0.00	3.07	1.92
WPI _{3.03} P _{0.75} CMC _{1.21}	3.03	0.75	1.21

WPI: proteína aislada de suero de leche, P: pectina cítrica, CMC: carboximetilcelulosa sódica, SD: dispersión sin tratamiento térmico, D: con tratamiento térmico.

5.2.3.1 Determinación del coeficiente de difusividad efectiva (D_e), Energía de activación, Microestructura.

Coeficiente de difusividad efectiva

Para modelar el periodo de velocidad decreciente en el secado de las dispersiones, se utilizó la ecuación de la segunda ley de Fick, donde el coeficiente de difusividad efectiva (D_e) es una función que depende de la temperatura (Pérez-Alonso, 2003, Montes et al, 2008).

Determinación de la energía de activación (E_a)

Los valores de E_a se calcularon a partir de los datos de D_e obtenidos para cada mezcla de acuerdo a la siguiente ecuación tipo Arrhenius (Pérez-Alonso et al. 2004):

$$D_e = D_0 \exp [-E_a/RT]$$

donde R corresponde a la constante universal de los gases (8.314×10^{-3} kJ/mol K), D_0 es el factor de Arrhenius en m^2/s , E_a es la energía de activación en kJ/mol y T la temperatura absoluta (K).

Microestructura de las películas

La microestructura de las películas obtenidas tras el proceso de deshidratación se estudió mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) (JEOL-JSM-6390LV Jeol LTD, Inglaterra) con voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras fueron colocadas en un portamuestras en una posición de 90° utilizando una cinta adhesiva de doble cara, se recubrieron con una fina capa de oro usando un evaporador (Denton Vacuum, LLC 1259 Moorestown, USA) durante 120 segundos y se aplicó una corriente de 40 mA.

5.2.4 Mezclas polisacáridos-proteínas y prebióticos de acuerdo al diseño experimental con tratamiento térmico

La metodología para esta prueba fue en base a un diseño experimental: Simplex Centroid, considerando 3 variables independientes (prebióticos: povidex (A), inulina (B) y aguamiel (C)), y dos niveles (máximo y mínimo) para cada una de las variables, originando un bloque con 10 unidades experimentales aleatorizadas (Tabla 4) y un control (sin adición de prebióticos).

A cada una de ellas se les adiciono una dispersión acuosa al 5% (p/v) que servirá como cubierta entérica desarrollada por Norma, 2008, compuesta por Carboximetilcelulosa (CMC), pectina y proteína aislada de suero lácteo (WPI) esta última sometida a tratamiento térmico (80°C/30 min) para obtener una mezcla homogénea polisacáridos-proteína y prebiótico.

Tabla 4. Formulaciones de las dispersiones acuosas con prebióticos de acuerdo al diseño experimental Simplex Centroide.

Unidad Experimenta l	Prebiótico		
	A	B	C
1	0.76	2.00	2.38
2	4.50	0.00	0.00
3	0.00	0.00	1.40
4	0.00	3.00	0.00
5	0.00	1.50	7.00
6	2.25	0.00	7.00
7	3.00	0.51	2.38
8	1.48	0.90	4.62
9	2.25	1.50	0.00
10	0.76	0.51	9.30
CTRL	0.00	0.00	0.00

A: polidextrosa, B: inulina, C: Aguamiel, CTRL: Control sin adición de prebióticos

El análisis de las propiedades (secado isotérmico, coeficiente de difusividad efectiva y energía de activación) de las dispersiones acuosas con prebióticos se realizara de acuerdo a los puntos 2.2.3.1.

5.2.5 Microencapsulación y viabilidad de lactobacilos

5.2.5.1 Preparación del inoculo y dispersiones

De las bacterias producidas masivamente y en etapa estacionaria se tomaron asadas y se suspendieron en un frasco de dilución con 75 ml de agua estéril, esta dispersión (inoculo) se midió con un espectrofotómetro digital (Cary 50 Conc UV-Visible, Australia) a una OD_{600nm} ajustando a 1.5 absorbancia, lo que indico que la dispersión contuvo 10^9 UFC/ml, esta cantidad de bacterias fue corroborada con el uso de la técnica de numero más probable (NMP) haciendo diluciones en agua peptonada.

Las dispersiones se elaboraron de acuerdo al punto 2.2.4, las cuales tuvieron una primera homogenización con un agitador de hélice (Ika Labor Technik RW 20 h) por

5 min, posteriormente se adiciono el inoculo y se procedió a una segunda homogenización de 3 min y a una prueba de NMP.

5.2.5.2 Microencapsulación: Secado por aspersion

Las dispersiones con el inoculo fueron secadas en un secador (Mobile Minor Niro-Atomiser, Copenhagen, Denmark) bajo las condiciones indicadas en la tabla 5 obteniendo microcapsulas con probióticos embebidos en la matriz polimérica.

Tabla 5. Condiciones de operación del secado por aspersion

Parámetros	Condiciones
Temperatura de entrada (°C)	130
Temperatura de salida (°C)	60
Presión de aire (bar)	1
Diámetro de la boquilla (mm)	0.05

5.2.5.3 Viabilidad después secado (microencapulados)

Esta evaluación se realizo de acuerdo a lo sugerido por Norma, 2008; 1 g de los polvos obtenidos fueron hidratados en agua bidestilada estéril (30 ml), a esta solución se le ajusto un pH de 4.1 y se adiciono 0.03 g de pectinasa posteriormente fue sometida a tratamiento térmico (baño maría) 30°C/120' con agitación. A 1 ml de esta solución se realizaron diluciones seriadas y siembra en placa por la metodología del número más probable, por otra parte 25 ml de esta misma solución se le realizo prueba de impedancia de acuerdo a lo descrito en el punto 2.2.1.3.

5.2.5.4 Estabilidad a condiciones simuladas de tracto intestinal: Fluido gástrico simulado (FGS) y Fluido intestinal simulado (FIS).

Fluidos gástricos simulados (FGS)

Se preparo fluido gástrico simulado de acuerdo a la Farmacopea de Estados Unidos, con un pH de 1.2, a esta solución (30 ml) se le adiciono 1 gr de las

microcapsulas obtenidas por secado por aspersión, se agito para obtener una solución homogénea además de una adecuada hidratación del polvo, prosiguiendo de un tratamiento térmico a 30°C/22', este tiempo sugiere el tiempo de transito gastrointestinal de acuerdo a Velayo *et al.*, 2005, posteriormente una alícuota de esta solución se le realizaron disoluciones seriadas para la prueba NMP, asi como mediciones de impedancia referidas en los puntos 2.2.1.2 y 2.2.1.3 respectivamente.

Fluidos intestinal simulados (FiS)

A las muestras procesadas con Fluidos gástricos se les adiciono de manera inmediata 30 ml de fluidos intestinales (pH 7.5) para lograr una mayor similitud con el proceso de digestión estos fluidos fueron preparados con lo referido en la Farmacopea de Estados Unidos, la solución tuvo un tratamiento térmico (30°C) y tiempo de trabajo 4h 43' sugerido por Velayo *et al.*, posteriormente se tomo una alícuota (1ml) y realizaron pruebas de NMP e impedancia.

2.2.6. Microestructura de los encapsulados

La morfología de la microcápsula será evaluada utilizando la técnica de Rosenberg y Young (1993). Las muestras se fijarán en portamuestras con una cinta metálica adhesiva de doble cara, posteriormente se recubrirán con una fina capa de oro usando un evaporador por 120 segundos, aplicando una corriente de 40 mA. Las observaciones se realizarán por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), con una aceleración de 10 Kv.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cinética y producción de biomasa de la bacteria probiótica: *Lactobacillus acidophilus*

La bacteria probiótica fue cultivada en caldo MRS para determinar el tiempo en el que se presenta la fase estacionaria, de acuerdo a Meng *et al.*, 2008 en esta fase las bacterias desarrollan mecanismo de resistencia al estrés incluyendo los subsecuentes al procesamiento y almacenamiento. Para *Lactobacillus acidophilus* esta fase se presentó a las 18 hr después de haberse inoculado en el quimiostato reflejando un pH de 3.7 y una densidad óptica de 2.79, como indica la figura 3, el conteo por NMP indica que en esta etapa existieron 6.54×10^{12} UFC, sugiriendo que existe mayor de microorganismos viables y resistente, este comportamiento es similar al que reporta Mosilhey, 2003.

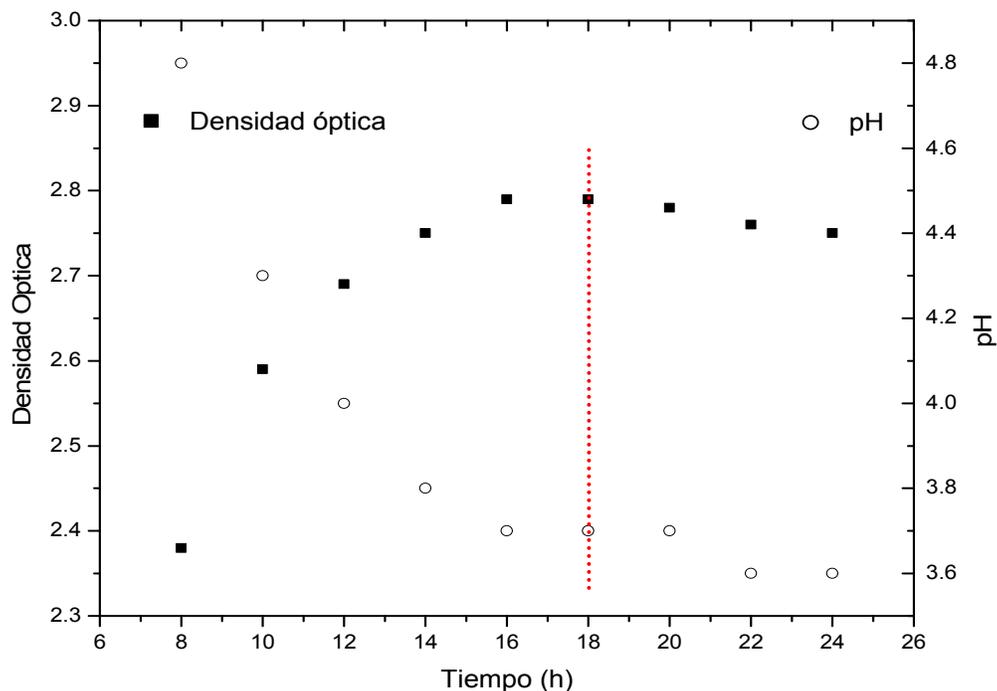


Fig. 3. Comportamiento de la fase estacionaria monitoreada por Densidad óptica (•) y pH (o).

Los datos obtenidos del conteo por NMP con respecto al tiempo, nos proporciona el tiempo en el cual las bacterias están se encuentran en etapa estacionaria tal y como lo muestra la figura 4., a estos datos se les realizó un ajuste matemático en base al modelo de Boltzmann expresando un ajuste de 0.98, el punto de inicio de la fase estacionaria se estimo por extrapolación de la pendiente de la fase logarítmica y estacionaria con la ecuación de la recta: $Y=A + Bx$, el origen de la fase se encontró al tiempo 16.26 h, conociendo el origen y inicio del descenso se obtuvo una media con valor de 18.01 h para determinar el momento idóneo de crecimiento de las bacterias en la fase en la que desarrollan mejores condiciones de resistencia, así como los parámetros para la obtención de biomasa de manera continua, este valor es comparable con el obtenido la densidad óptica, pH numero mas probable e impedancia figura 4 b, concluyendo que estas tres técnicas son equivalentes y confiable para el monitoreo de de bacterias específicamente *Lactobacillus acidophilus*.

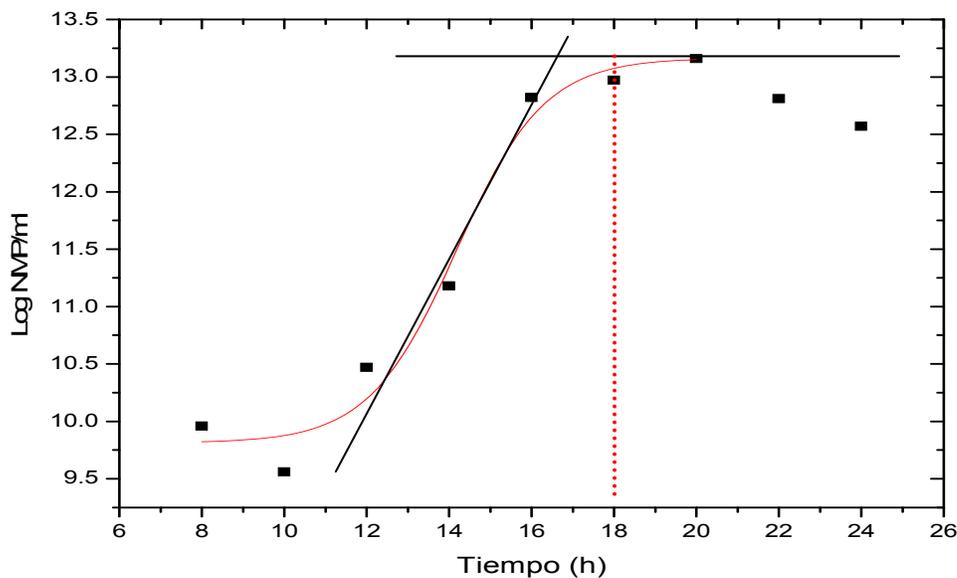


Fig. 4. Ajuste de Boltzmann y determinación de pendientes de la curva por NMP

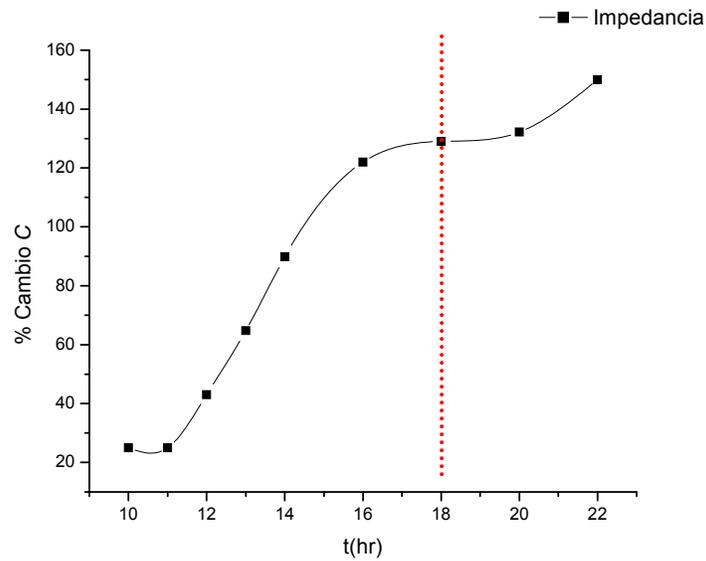


Fig. 4b. Comportamiento de la fase estacionaria monitoreada por método de impedancia .

6.2 Caracterización de las películas de soluciones binarias y ternarias (con y sin tratamiento térmico) y análisis de microestructura

6.2.1 Curvas de secado isotérmico

En la figura 5 se representa la variación del contenido de humedad frente al tiempo de secado (h) para la mezcla WPI3.52P1.47 durante el tratamiento isotérmico a las diferentes temperaturas ensayadas (se presentan los resultados del desarrollo experimental de esta mezcla por ser la que alcanzó el mayor valor de E_a). En cada una de las tres líneas obtenidas se observan dos zonas bien diferenciadas a diferentes valores de tiempo para cada una de ellas. Así, para la temperatura de 92°C , se observa un comportamiento decreciente lineal durante los primeros 20 minutos de tratamiento térmico, continuando hasta los 30 minutos con una velocidad menor hasta llegar a su equilibrio donde la difusión de la humedad es mínima debido a que el contenido de agua está fuertemente ligado a las partículas sólidas por lo que su liberación es gradual y lenta (Báez- González et al., 2004; Montes et al., 2008, Temmerman et al., 2009). Por comparación de

las diferentes curvas a cada temperatura se observa que la pendiente de la zona lineal aumenta a medida que aumenta la temperatura de secado, lo que implica un menor tiempo de secado como era de esperar.

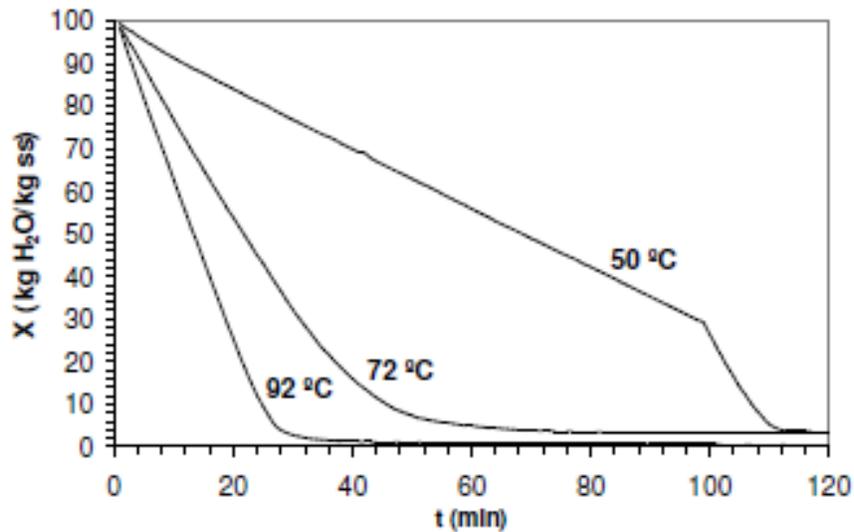


Fig. 5. Variación del contenido de humedad con el tiempo de secado para la mezcla WPI 3.52P1.47 a diferentes temperaturas de secado

6.2.1 Curvas de velocidad de secado isotérmico

Por otra parte, la variación de la velocidad de secado frente al contenido de humedad de la mezcla WPI3.52P1.47 para las 3 temperaturas ensayadas se representa en la figura 6. En estas curvas se observa que la disminución de la velocidad de secado es pequeña durante los mayores valores del contenido de humedad, pero después, la velocidad de secado cae monótonamente a cero cuando el contenido de humedad decrece. La forma de esta gráfica implica que no se ha formado una película densa al inicio del secado, tal como se ha reportado para el suero de leche (Pérez Alonso, 2004).

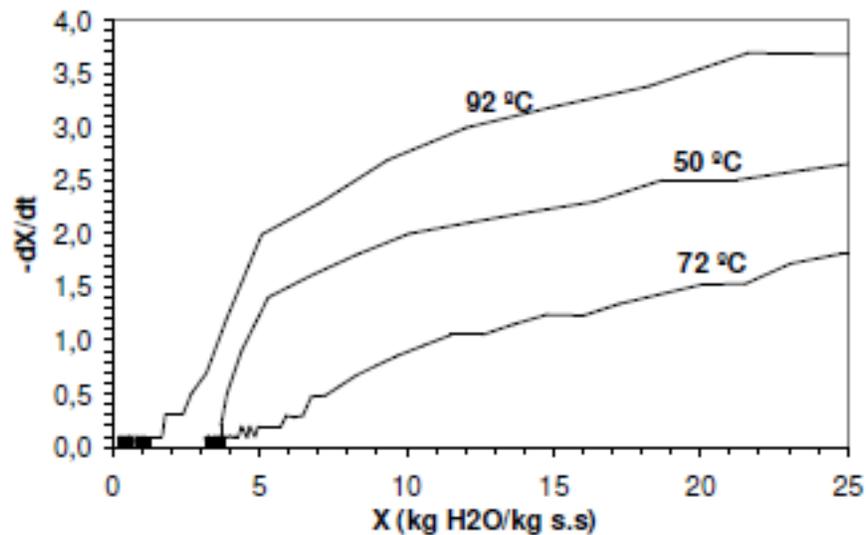


Figura 6. Curva de secado isotérmico para la mezcla de WPI3.52P1.47 a cada temperatura de secado ensayada.

6.2.2 Coeficientes de difusividad efectiva

La tabla 6 recoge los valores de D_e de las mezclas ensayadas con tratamiento térmico (D) y en ausencia del mismo (SD). Para la mezcla WPI3.52P1.47 se observa una difusividad efectiva de $0.06517 \text{ m}^2/\text{s}$ y $0.05253 \text{ m}^2/\text{s}$ con y sin tratamiento térmico previo, respectivamente. Estos resultados implican la existencia de una disminución de las resistencias internas y por lo tanto que la formación de la película es más rápida y menos densa en ausencia de tratamiento térmico (Montes et al., 2008).

Tabla 6. Valores de difusividad efectiva (D_e) para cada muestra y temperatura de secado ensayadas.

	T (°C)	D_e (m^2/s)	
		D	SD
WPI _{3.52} P _{1.47}	50	0.01187	0.01959
	72	0.03833	0.03270
	92	0.06517	0.05253
WPI ₄ CMC ₁	50	0.00371	0.01192
	72	0.00208	0.30265
	92	0.01565	0.05394
WPI _{3.03} CMC _{0.75} P _{1.21}	50	0.01199	0.12146
	72	0.03238	0.34000
	92	0.05849	0.60997

6.2.3 Determinación de la energía de activación.

Los valores de la E_a para cada mezcla se presentan en la tabla 9, donde se distingue el efecto de la aplicación de tratamiento térmico previo a las proteínas de suero lácteo. Se observa que la aplicación de un tratamiento térmico para la mezcla WPI_{3.52}P_{1.47} tuvo un efecto favorable al dar lugar a valores de E_a más elevados (40.14 kJ/mol) y por tanto generar películas más resistentes a la oxidación. En el caso de la mezcla WPI₄CMC₁, ocurrió lo contrario, obteniéndose valores de E_a medios, lo que indica que el tipo de polisacárido en interacción con la proteína disminuyó los valores de E_a . Por último, cuando la P y la CMC se encontraron presentes en la mezcla con proteínas, no se observó efecto del tratamiento térmico de la proteína sobre la E_a (37.19 vs. 37.92 kJ/mol). Tabla 7. Valores de energías de activación de las mezclas de biopolímeros ensayadas.

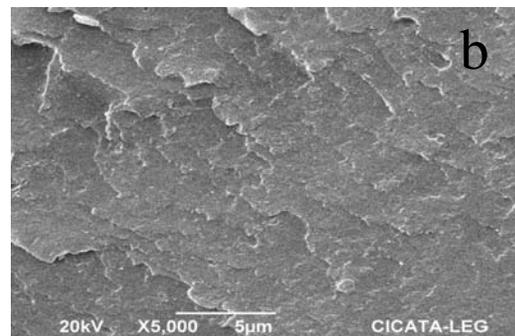
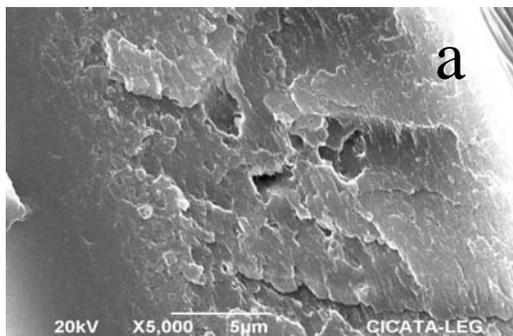
Tabla 7. Valores de energías de activación de las mezclas de biopolímeros ensayadas.

	Energía de activación (kJ/mol)	
	D	SD
WPI _{3.52} P _{1.47}	40.14	27.97
WPI ₄ CMC ₁	31.30	35.41
WPI _{3.03} CMC _{0.75} P _{1.21}	37.19	37.92
P _{3.07} CMC _{1.92}	36.85	

Los resultados obtenidos indican que la mezcla WPI3.52P1.47 con tratamiento térmico puede equipararse en comportamiento a las mezclas de WPI con goma de mezquite y maltodextrina reportadas por Rodríguez-Huezo et al (2007), con la ventaja adicional de que la mezcla de WPI y P propuesta tiene potencial de cubierta entérica, lo que permitiría proveer una buena barrera a la oxidación y/o transportar ingredientes con actividad biológica (Espinoza, 2008).

6.2.4 Microestructura de las películas obtenidas

Las imágenes SEM de la microestructura de las películas obtenidas con la mezcla WPI3.52P1.47 se muestran en la figura 6, donde se puede observar la aparición de formaciones laminares en todos los casos. Las imágenes sugieren que el tratamiento térmico de WPI favoreció la interacción de los componentes generando estructuras laminares compactas y de bordes suaves (figura 6a) coincidiendo con los datos de energía de activación con valores altos. En cambio, cuando no se aplicó el tratamiento térmico a WPI, la formación de láminas fue más evidente, delineadas, no compactas y con bordes bien definidos, simulando escamas (fig 6b). Es notable observar la estructuración y crecimiento de las películas durante su deshidratación en forma de capas sucesivas, tal como se muestra en las figuras 6c y 6d correspondientes a una fractura de las películas estudiadas.



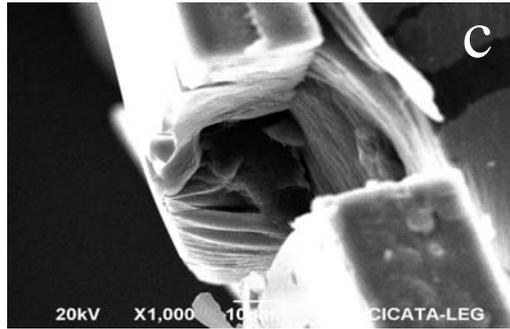


Figura 6. Imágenes SEM de las películas obtenidas: a) mezcla WPI3.52P1.47 (D), b) mezcla WPI3.52P1.47, (SD), c) y d) Perfil de crecimiento laminar.

6.3 Mezclas polisacáridos-proteínas y prebióticos de acuerdo al diseño experimental con tratamiento térmico

Las mezclas derivadas del uso del diseño experimental, aunada a una película entérica sugerida por Norma et al, 2008, expusieron las energías de activación mostradas en la tabla ., esta energía fue derivada de los coeficientes de difusión (datos no mostrados) de las mezclas a diferentes temperaturas.

Tabla 8. Energía de activación de las mezclas con prebióticos en base al diseño experimental

Fórmula	Valor Codificado	Valor Experimental			Energía de Activación (KJ/mol)
		Factor A	Factor B	Factor C	
$P_{0.76}I_{2.00}A_{2.38}$	(16, 67, 17)	0.76	2.00	2.38	36.7
$P_{4.50}I_{0.00}A_{0.00}$	(100, 0, 0)	4.50	0.00	0.00	37.8
$P_{0.00}I_{0.00}A_{1.40}$	(0, 0, 100)	0.00	0.00	1.40	35.7
$P_{0.00}I_{3.00}A_{0.00}$	(0, 100, 0)	0.00	3.00	0.00	38.7
$P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$	(0, 50, 50)	0.00	1.50	7.00	38.4
$P_{2.25}I_{0.00}A_{7.00}$	(50, 0, 50)	2.25	0.00	7.00	36.7
$P_{3.00}I_{0.51}A_{2.38}$	(67, 17, 17)	3.00	0.51	2.38	37.4
$P_{1.48}I_{0.90}A_{4.62}$	(33, 33, 33)	1.48	0.90	4.62	37.5
$P_{2.25}I_{1.50}A_{0.00}$	(50, 50, 0)	2.25	1.50	0.00	38.7
$P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$	(17, 17, 67)	0.76	0.51	9.30	36.9
$P_{0.00}I_{0.00}A_{0.00}$	(0, 0, 0)	0.00	0.00	0.00	33.5

Factor A: Polidextrosa, Factor B: Inulina, Factor C: Aguamiel

Puede observarse que la mezcla que tiene mayor energía de activación es la fórmula $P_{0.00}I_{3.00}A_{0.00}$ y $P_{2.25}I_{1.50}A_{0.00}$ reportando valores de 38.7 KJ/mol para cada una,

destacando que la primera tiene 3% de Inulina y la segunda está compuesta por povidona e inulina con 2.25% y 1.5 % respectivamente, esto nos sugiere que el factor povidona es determinante para obtener películas resistentes, con respecto a la estructura se puede observar que tienen similitudes, su formación es laminar con bordes ligeramente definidos, en la Fig. 7(b) se observa que existe un acomodo más suave y espaciado entre las laminas, esto puede ser debido a la presencia de inulina (fibra) haciendo que existan ligeros espacios intersticiales y por lo tanto la estructura sea menos compacta. Por otra parte se puede observar que la formula control ($P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$) es la que tiene menor E_a , con respecto a todas las formulas lo que hace referencia a que la presencia de uno o mas materiales (prebióticos) tienen un efecto en la resistencia ya sea en mayor o menor cantidad dependiendo de la concentración y el tipo de material, la microestructura de esta película puede observarse en la Fig 7 (c).

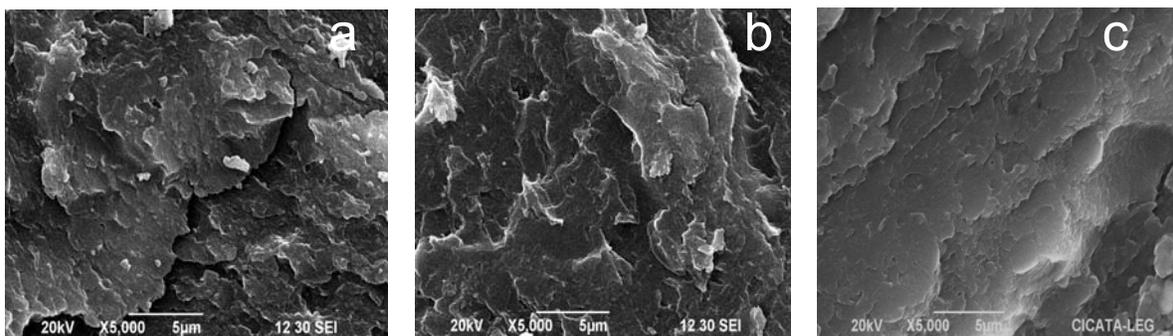


Figura 7. Imágenes SEM de las formulas: $P_{0.00}I_{3.00}A_{0.00}$ (a), $P_{2.25}I_{1.50}A_{0.00}$ (b) y $P_{0.00}I_{0.00}A_{0.00}$ (c).

6.4 Microencapsulación y viabilidad de *Lactobacillus* después del secado

La viabilidad de las soluciones con las mezclas poliméricas sometidas al secado por aspersión nos indican que la mejor mezcla con mayor capacidad de protección son: $P_{0.76}I_{2.00}A_{2.38}$ y $P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$ como lo indica la fig 8. con 6.5×10^6 UFC para ambas sobre formulaciones restantes, como se observa en las formulaciones estas capsulas poseen los tres componentes prebióticos a lo que se le puede atribuir su resistencia, debido a las características de los ingredientes, por ejemplo la inulina le da características de porosidad y estabilidad a las dispersiones antes

del secado y después del secado, sin embargo la presencia del aguamiel en la solución puede ser un factor importante en la viabilidad (Huezo, *et al.*, 2007), formando una matriz polimérica constituida por azúcares en estado vítreo la cual actúa como barrera física entre las partículas previniendo la agregación y degradación del material durante el secado teniendo un efecto positivo sobre la viabilidad (Jonge., *et al.*, 2007).

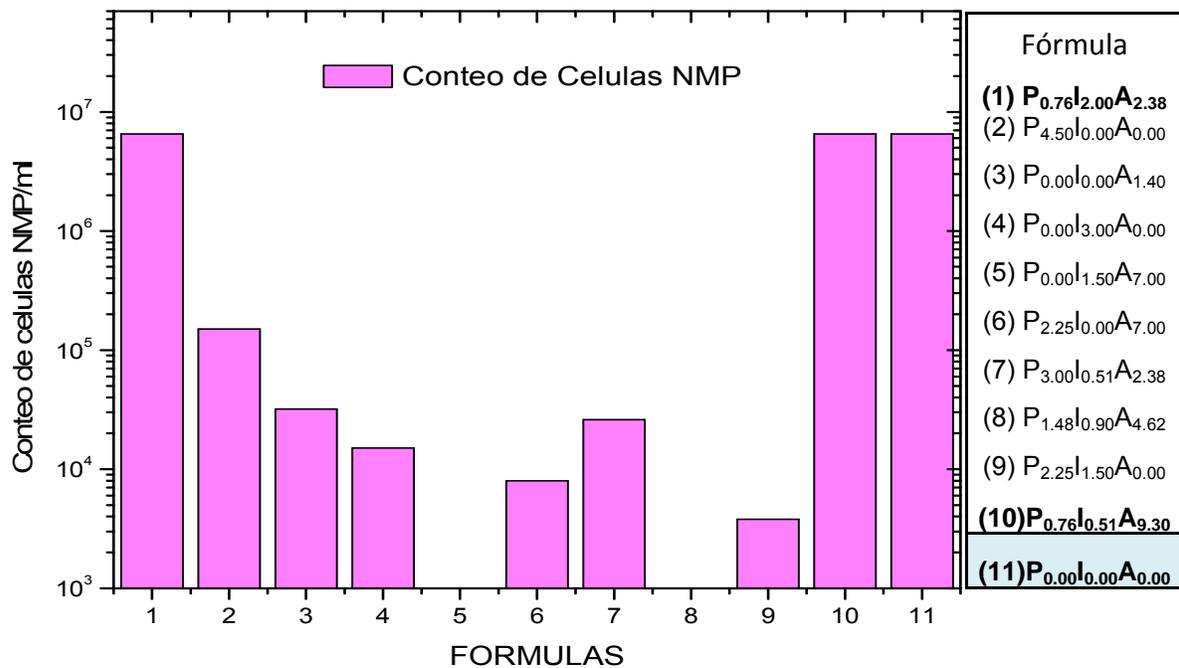


Figura 8. Conteo de bacterias viables por NMP después del secado por aspersión usando la cubierta entérica y los prebióticos de acuerdo al diseño experimental.

Después del secado la morfología de las capsulas parecen semejantes como lo indica la fig. 9, a su vez podemos decir que la combinación de estos tres ingredientes no significa que sea la mejor formula después del secado, ya que la muestra $P_{0.00}I_{0.00}A_{0.00}$ (control), también posee el mismo numero de UFC, por lo tanto la presencia de estos materiales pueden ser despreciables para el efecto de protección, haciendo sobresaliente que el suero de leche (WPI) presente en la matriz polimérica funciona como un protectante ante el proceso de secado por aspersión, además se puede observar que su relieve morfológico es similar al de las dos anteriormente descritas.

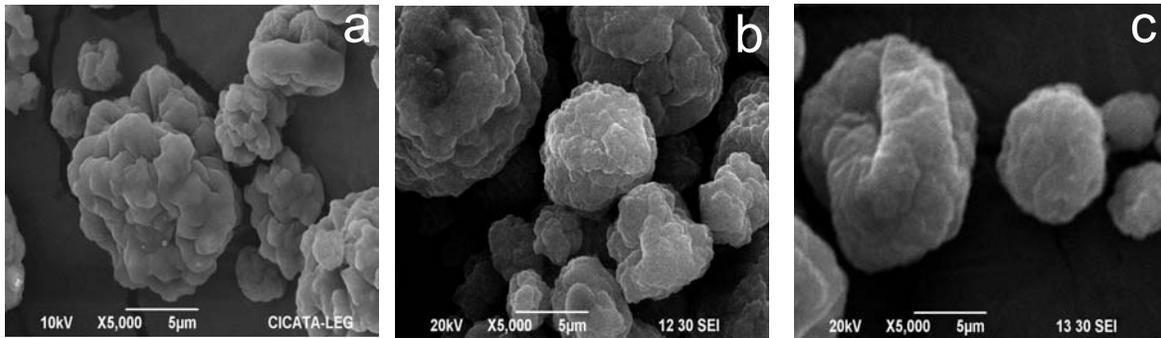


Figura 9. Imágenes SEM de las formulas: $P_{0.76}I_{2.00}A_{2.38}$ (a), y $P_{0.76}I_{0.51}A_{9.30}$ (b) y $P_{0.00}I_{0.00}A_{0.00}$ (c).

Las muestras: $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$ (5) y $P_{1.48}I_{0.90}A_{4.62}$ (8) ofrecen un nulo crecimiento de las bacterias, pero no significa que su estas hayan muerto durante el proceso de secado inferimos que este efecto se produjo por la presencia de agua miel en mayor proporción para la formula 5, existe en proporción de un 7% y en el caso de la fórmula 8 se encuentra un 4.6%, sin embargo este valor es relativamente bajo comparado con la muestra 6 ($P_{2.25}I_{0.00}A_{7.00}$) que tiene un valor de 7 %,sin embargo esta ultima carece de una proporción de inulina y la muestra 8 posee un porcentaje de 0.9% a lo que sugerimos que la sinergia de inulina y aguamiel así como elevadas cantidades de este protegen a los microorganismos ante el secado formando una matriz vítrea. Ante la esta incertidumbre de viabilidad sugiriendo que los microorganismo se encontraban extintos por el efecto del secado se les realizo un prueba de pectinasa, con el objetivo de verificar la presencia de células vivas tal y como lo muestran las placas inoculadas y cuantificadas por el NMP (fig. 10) mostrando una supervivencia de 2.5×10^7 y 3.3×10^8 NMP de microorganismos para $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$ (5) y $P_{1.48}I_{0.90}A_{4.62}$ (8) respectivamente y, reafirmando que la interacción entre la inulina y aguamiel, así como altos porcentajes de este proporcionan un efecto mas protectorio a los microorganismo evitando su cuantificación después del secado.

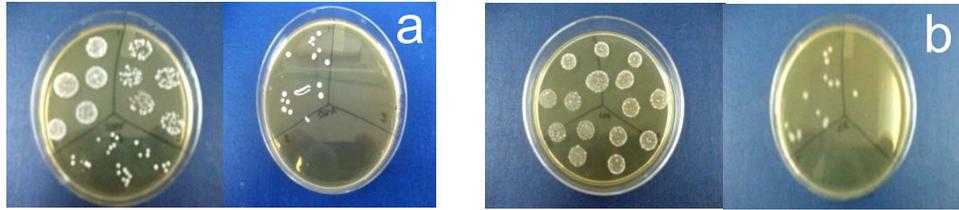


Figura 10. Pruebas del NMP de las formulas: 5:P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00} (a) y 8:P_{1.48}I_{0.90}A_{4.62} (b) con tratamiento de pectinasa

6.5 Estabilidad a condiciones simuladas de fluidos gástricos (FGS)

Una de las condiciones para que una bacteria sea considerada como probiótica es la sobrevivencia a través del tracto gastrointestinal, y poder fijarse en un sitio específico (colon) para ejercer su beneficio, sin embargo uno de los obstáculos a los que se encuentran es el cambio pH, iniciando desde la saliva (4.5), estomago (1.2-2.0) e intestino (7.8-8.0), ante esto fue importante saber cual de nuestras formulas es más resistente a la exposición de fluidos simulados de tracto gastrointestinal exponiendo los datos mostrados en la figura 11.

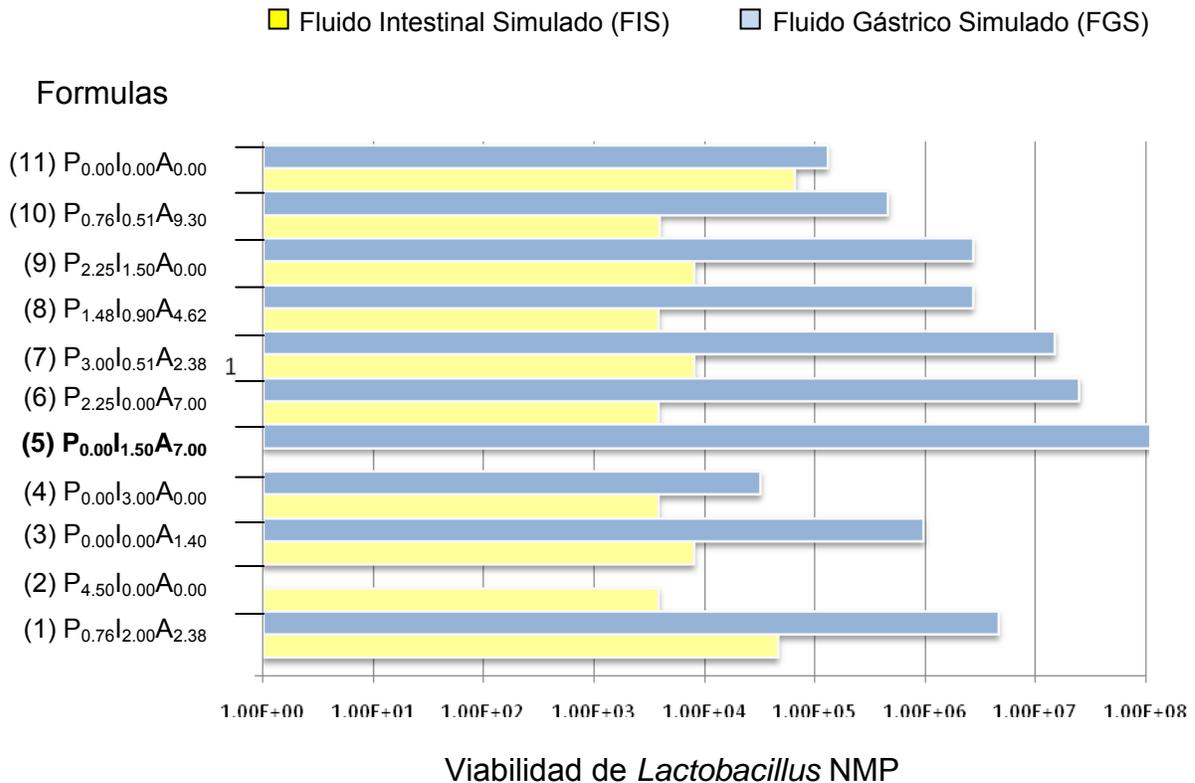


Fig. 11. Efecto de fluidos gástricos simulados (FGS) e intestinales (FIS) sobre las bacterias microencapsuladas.

Puede observarse que la formula $P_{0.76}I_{2.00}A_{2.38}$ tiene mayor resistencia a los fluidos gastrointestinales mostrando un 4.6×10^4 UFC, comparadas con las demás formulas que en general tuvieron una liberación entre $3.8-8.0 \times 10^3$, al parecer la presencia de prebióticos no tiene un efecto significativo comparada con el control (sin prebióticos) cuya viabilidad expone 6.6×10^4 UFC, sin embargo estos valores aunque estén relativamente bajos, no significa que las bacterias hayan muerto ante la exposición de este estrés ácido (pH 1.2), si no que la capsula en la que están embebidas no se ha disgregado completamente y que los componentes de la matriz polimérica están interactuando entre si, justificando esta la baja presencia de bacterias después de la prueba.

En lo que se refiere a la capsula $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$, no muestra liberación de los microorganismo esto puede ser porque en su composición posee una elevada concentración del prebiótico aguamiel (7%), destacando que esta formulación tiene un mayor efecto de protección a las condiciones acidas, este mecanismo sugiere que el aguamiel en altas concentraciones y la interacción con los demás ingredientes tiene un efecto protector probablemente porque actúa como un termoprotector durante el secado haciendo que la matriz formada tenga un ordenamiento vítreo que actúa como una barrera resistente a efectos de pH. de acuerdo a lo reportado por Huerdo *et al.* 2007, otro mecanismo por el cual el aguamiel afecta la viabilidad de las células, es por el efecto simbiótico entre el prebiótico, proporcionando al probiótico una resistencia mayor a factores ambientales.

Con respecto a la Ea de activación la formula $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$ reporta un valor alto de 38.7 KJ/mol comparada con 33.57 KJ/mol de el control, sin embargo como anteriormente se comento la viabilidad a fluidos gástricos la posee el control, así que en este aspecto el valor de la energía no funge como un parámetro de selección para la elección de materiales protectivos, y se puede inferir que la presencia de proteína de suero aislado en la matriz polimérica encapsulada ofrece

una mejor protección a condiciones de ácidos, el bajo valor de E_a no significa que sea menos resistente, sin embargo podemos decir que existe una buena interacción de materiales que impiden el daño a las bacterias, haciendo despreciables la presencia de un prebiótico en la formulación

6.6 Estabilidad a condiciones simuladas de fluidos intestinal (FIS)

En base a los datos ofrecidos de la prueba de fluidos gástricos, donde nos sugiere que la mejor capsula ante su acción fue la $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$, sin mostrar células cuantificables, podemos observar en el gráfico 11. Que esta fórmula poseyó el número más alto de células viables en un valor de 3.3×10^8 UFC, donde confirmamos el efecto del prebiótico aguamiel, debido a su concentración a su comportamiento durante el secado, es decir ofrece un efecto protector a fluidos gástricos y comienza su liberación en fluidos intestinales (pH, de 7.5), por otra parte el control ofrece solo un ciclo más de microorganismos liberados (1.3×10^5 UFC), a lo que se consideramos un nivel bajo de viabilidad sugiriendo que los microorganismos en la capsula no habían sido completamente liberados, ante esta suposición se realizaron pruebas de pectinasa exhibiendo valores de 1.3×10^5 UFC, corroborando que los microorganismos en las capsulas habían sido completamente liberados, sin embargo la baja viabilidad puede deberse a que la microcapsula no ofrece un efecto protector ante el proceso de secado ya que el valor casi se mantiene constante al paso de los fluidos simulados.

Las formulas $P_{2.25}I_{0.00}A_{7.00}$ y $P_{3.00}I_{0.51}A_{2.38}$ Pueden considerarse también como buenas capsulas ante los efectos deletéreos de los fluidos simulados, aunque en menor proporción (2.5×10^7 y 1.5×10^7 respectivamente) en las cuales no se observa una diferencia significativa, comparada con la capsula $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$.

Con base a los datos obtenidos anteriormente podemos concluir que la formula $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$ asegura que la bacteria probiótica resista a condiciones de estrés a

durante el secado, además lo protege de las condiciones ácidas y enzimáticas del tracto gastrointestinal simulado, asegurando que el probiótico llegue viable y cantidad suficiente a un sitio específico (colon).

6. CONCLUSIONES

- Las mezclas de biopolímeros ensayadas han dado lugar a películas densas y laminadas, con valores de E_a que variaron en función del tipo de mezcla.
- La aplicación de un tratamiento térmico previo a WPI tuvo un efecto favorable al dar lugar a valores de E_a más elevados y por tanto generar películas más resistentes.
- La mezcla $WPI_{3.52}P_{1.47}$ con desnaturalización previa de WPI mostró los valores de E_a más elevados por lo que sería la más adecuada para ser utilizada como cubierta entérica.
- Los métodos de NMP e impedancia son rápidos y confiables para monitorear el crecimiento de microorganismo, además son equivalentes entre DO, y pH.
- La incorporación de prebióticos y la determinación de la E_a son importantes factores para la selección de materiales y aumentar la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus*.
- La mejor sobrevivencia se obtuvo usando la cubierta entérica aunada a los prebióticos, inulina y aguamiel: $P_{0.00}I_{1.50}A_{7.00}$, exhibiendo una alta energía de activación.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Agustin, M., 2003. The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Australian Journal of dairy tech* 58(2): 156.
2. Ann, E., Kim, Y., Oh, S., Imm, J-Y., Park, D-J., Han, K., Kim, S., 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International Journal of Food Science y Technology* 42: 411-19.
3. Akalin, A., Fenderya, S., Akbulut, N., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *International Journal of Food and Technology* 39: 613-21.
4. Ayranci, E., Tune, S., 2003. A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reaction in fresh foods. *Food Chemistry* 80: 423-31.
5. Badui, S., 1982. *Diccionario en Tecnología de Alimentos*. 1ª Edición. México: Alhambra Mexicana.
6. Briceño, A., Martínez, R., García, K., 2001. Viabilidad y Actividad de la Flora Láctica (*Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*) del yogurt en Venezuela. *Acta Científica Venezolana* 52: 46-54.
7. Brook, I., 1999. Bacterial Interference. *Criv Rev Microbiol* 25: 155-72.
8. Cerdeira, M., Martini, S., Herrera, M., 2005. Microencapsulating Properties of Trehalose and of its Blends with Sucrose and Lactose. *Food Engineering and Physical Properties* 70(6): 401-08.
9. 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 Microbiological Methods* 56: 27-35.
10. Chen, N-K., Chen, M-J., Liu, J-R., Lin, C-W., Chiu, H-Y., 2005. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials. *Journal of Food Science* 70(5): 260-66.
11. Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Augustin, M., 2006. Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3): 2280-82.

12. Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J, Naylor C. P., Macfarlane, G. T., 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28: 1221-27.
13. Desmond. C. Ross, R., Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C., 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology* 93: 1003-11.
14. Favaro-Trindade, C., Grosso, C., 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (BB-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation* 19(4): 485-94.
15. Fernández, A., 2007. Inulina, Un gran prebiótico. *Cuerpo, Mente* 118
16. Gardiner, G., O' Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M., Fitzgerald, G., Collins, J., Ross, R., Stanton, C., 2000. Comparative Survival Rates of Human- Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6): 2605-12.
17. Gerdes, S., 2005. Synbiotic Synergy of Pro-and Prebiotics Food Product Design. *Food Thechnoloy Biotechnology* (45)(2)34-67
18. Giochetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Campieri, M., 2007. Uso de Probióticos en Diarrea Infecciosa y Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Vanguardia Médica* 4(15): 20-25.
19. Guarner, F., Shaafsma, G., 1998. Probiotics. *International Journal Food Microbiology* 39: 237-38
20. Havenaar, R., Huis In't Veld MJH, 1992. Probiotics: a general view in: Lactic acid bacteria in health and disease. Vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science.
21. Hernandez, A., Robles, V., Angulo, O., De la Cruz, J., García, H., 2007. Preparation of a Whey-Based Probiotic Product with *Lactobacillus rauteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Food Technology Biotechnology* 45(1): 27-31.
22. Iyer, C., Kailasapathy, K., 2005. Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acid and Bile Salt Conditions and in Yogurt. *Journal of Food Science* 70(1): 18-23.
23. Jaweltz, E., Melnich, J., Adelberg, E., 1975. Manual de Microbiología Medica. 6ª Edición. México: El manual Moderno, S. A.

24. Lian, W-C., Hisiao, H-C., Chou, C-C., 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology* 74: 79-86.
25. Lian, W-C., Hisiao, H-C., Chou, C-C., 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology* 86: 293-301.
26. Liong, M., Nagendra, P., 2005. Optimization of Growth of *Lactobacillus casei* ASCC 292 and Production of Organic Acids in the Presence of Fructooligosaccharide and Maltodextrin. *Journal of Food Science* 70(2): 113-20.
27. Mitchel, H., 1996. The role of the bulking agent polydextrose in fat replacement. In *Handbook of Fat Replacers*, pp. 235-249 [S Roller and SA Jones, editors]. Boca Raton: CRC Press.
28. Muthukumarasamy, P., Wojtas, P., Holley, R., 2006. Stability of *Lactobacillus rauteri* in Different Types of Microcapsule. *Journal of Food Science* 71(1): 20-24.
29. O'Riordan, K., Andrews, D., Conway, P., 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology* 91: 1059-66.
30. Ortega, R., Marcos, A., Aranceta, J., Mateos, J., Rayejo, A., Serra, L., 2001. *Alimentos Funcionales Probióticos*. 1ª Edición. México: Medica Panamericana.
31. Ozer, D., Akin, S., Ozer, B., 2005. Effect of Inulin and Lactulose on Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium Bifidum* BB-02 in Acidophilus-Bifidus Yoghurt. *Food Science Thecnology International* 11(1): 19-24.
32. Pasin, G., 2002. Yogurt: Proteínas de Suero y Probióticos. *Dairy Export Cuncil* 3-6.
33. Pedroza, I. R., 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para larvas de Especies Acuícolas. *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícolas* 438-47.
34. Pelczar, M. J., Reid, R. D., Chan, E. C. S., 1982. *Microbiología*. 4ª Edición. España: McGraw-Hill.

35. Picot, A., Lacroix, C., 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal condition and in yoghurt. *International Dairy Journal* 14: 505-15.
36. Rosado, K., Ondoraza, M., 2002. Prebióticos y Probióticos, Efecto e Implicaciones en Fisiología de la Nutrición, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)* 2002: 52(1).
37. Rosenberg, M., Young, S., 1993. Whey proteins as microencapsulation agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. *Food Structure* 12: 31-41.
38. Saavedra, J., Baurra, N., Oung, F, Perman, J., Yolken, R., 1994. Feeding of Bifidobacteria Bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 334: 1046-49.
39. Salazar, B., Montoya, O., Sepúlvera J., 2005. Viabilidad de un aislado nativo de *Lactobacillus brevis* en una bebida láctea fermentada. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*. 55(4): 1-4.
40. Spanhaak, S., Hevenaa, R., Schaafsma, G., 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and Immune parameters in humane. *Eur Jcli Nutr* 52: 889-907.
41. Stanton, C., Desmond C., Fitzgerald, D., Roos, R., 2003. Probiotic health benefits-rality or Myth?. *Autralian Journal of Dairy Technology* 5(82): 107.
42. Talwalkar, A., Kailasapathy, K., 2004. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal* 14: 143-49.
43. Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T, **Error! No se encontraron elementos de tabla de contenido.** Van Assche, P., Swings, J. y Huys, G., 2006. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal* 16: 1470-76.
44. Alimentos funcionales: inulina, oligofructosa y polidextrosa como prebióticos; <http://www.elportaldelasalud.com>.
45. Las fibras prebióticas; <http://www.casapia.com>.

46. [Trehalosa; http://www.wipimedia.org](http://www.wipimedia.org).

ANEXO

Tabla 6. El numero más probable para series de diluciones en réplicas de cinco por niveles de dilución (Woomer, 1994).

Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada	Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada
1-2-3-4-5-6		1-2-3-4-5-6	
1-0-0-0-0-0	1.9	5-5-4-2-0-0	2159
1-1-0-0-0-0	4.0	5-5-4-3-0-0	2716
2-0-0-0-0-0	4.4	5-5-5-0-0-0	2305
2-1-0-0-0-0	6.8	5-5-5-0-1-0	3126
3-0-0-0-0-0	7.7	5-5-5-1-0-0	3282
3-1-0-0-0-0	10	5-5-5-1-1-0	4532
3-2-0-0-0-0	13	5-5-5-2-0-0	4922
4-0-0-0-0-0	12	5-5-5-2-1-0	6918
4-1-0-0-0-0	16	5-5-5-3-0-0	7797
4-2-0-0-0-0	21	5-5-5-3-1-0	10702
4-3-0-0-0-0	27	5-5-5-3-2-0	13826
5-0-0-0-0-0	23	5-5-5-4-0-0	12753
5-0-1-0-0-0	31	5-5-5-4-1-0	16902
5-1-0-0-0-0	33	5-5-5-4-2-0	21589
5-1-1-0-0-0	45	5-5-5-4-3-0	27150
5-2-0-0-0-0	49	5-5-5-5-0-0	23054
5-2-1-0-0-0	69	5-5-5-5-0-1	31225
5-3-0-0-0-0	78	5-5-5-5-1-0	32720
5-3-1-0-0-0	107	5-5-5-5-1-1	45261
5-3-2-0-0-0	138	5-5-5-5-2-0	49224
5-4-0-0-0-0	127	5-5-5-5-2-1	69148
5-4-1-0-0-0	169	5-5-5-5-3-0	78127
5-4-2-0-0-0	216	5-5-5-5-3-1	107022
5-4-3-0-0-0	270	5-5-5-5-3-2	138269
5-5-0-0-0-0	230	5-5-5-5-4-0	127528
5-5-0-1-0-0	312	5-5-5-5-4-1	169028
5-5-1-0-0-0	327	5-5-5-5-4-2	215899
5-5-1-1-0-0	453	5-5-5-5-4-3	271557
5-5-2-0-0-0	488	5-5-5-5-4-4	334051
5-5-2-1-0-0	692	5-5-5-5-5-0	230546
5-5-3-0-0-0	780	5-5-5-5-5-1	328192
5-5-3-1-0-0	1070	5-5-5-5-5-2	492238
5-5-3-2-0-0	1383	5-5-5-5-5-3	781272
5-5-4-0-0-0	1275	5-5-5-5-5-4	1312535
5-5-4-1-0-0	1690		

* Esta es la densidad poblacional estimada asumiendo 1 ml de inóculo. Este valor debe ser ajustado por el factor de dilución y el volumen de inóculo (por ejemplo, si usted inoculó en cada placa un volumen de 10 µl, entonces el valor de la tabla debe ser corregido multiplicándolo por 100 [10 X 100 = 1,000 µl ó 1 ml]).

