

# **UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

## **DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO CAMPUS TUXTEPEC**

**Efecto del método de encapsulación de *Lactobacillus paracasei*  
subsp. *paracasei* utilizando como material de pared almidón poroso  
de maíz (*Zea mays*)**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**Maestra en Biotecnología**

**PRESENTA:**

**I.AG. Jerelly Lizbeth Hernández Alvarado**

**Directora: Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello**

**Co-Director: Dr. Adrian Zaragoza Bastida**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBt/100
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 17 de octubre de 2019

**C. JERELLY LIZBETH HERNÁNDEZ ALVARADO**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Erick Adrián Juárez Arellano	UNPA	Presidente
Dra. Nallely Rivero Pérez	UAEH	Vocal
Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello	UNPA	Secretario
Dr. Andrés Aguirre Cruz	UNPA	1er Suplente
Dra. Delia Esther Páramo Calderón	UNPA	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú



**Dr. Adolfo López Torres**  
Jefe de la División de Estudios  
de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello – Directora de tesis  
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arrenal – Jefe de Servicios Escolares  
C.c.p. Archivo



DEPARTAMENTO DE SERVICIOS  
ESCOLARES CAMPUS TUXTEPEC



**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vice-rector Académico  
Vo. Bo.

VICE-RECTORIA  
ACADEMICA

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/364
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 6 de noviembre de 2019

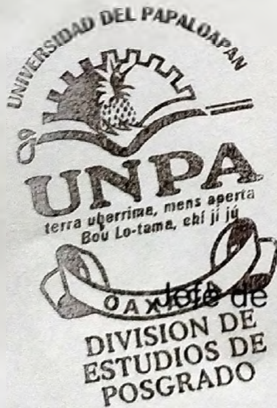
**L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Jerelly Lizbeth Hernández Alvarado**, matrícula **17140005**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Efecto del método de encapsulación de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* utilizando como material de pared almidón poroso de maíz (*Zea mays*)**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chi jí jú



**Dr. Adolfo López Torres**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Jerelly Lizbeth Hernández Alvarado - Estudiante

C.c.p. Archivo



CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.

C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.

Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.

C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.

Tel. 01(281)8729230

## DEDICATORIA

- A mi madre** Por ser una pieza fundamental en mi vida, por impulsarme todos los días a conseguir mis metas y sembrar en mí nuevos sueños, por los consejos, la paciencia y la confianza que siempre me brindó. Por entender mi rumbo de vida y mis aspiraciones. Gracias por dejarme volar, aunque tus miedos sean grandes. TE AMO MAMÁ.
- A mi padre** Por ser un apoyo importante para mí, porque siempre he sabido que puedo contar contigo. Eres muy importante en mis logros, espero no defraudarte.
- A mi hermana** Por creer en mí, por darme ánimos, impulsarme. Gracias por ser mi ejemplo, por cuidarme y quererme como lo haces. Siempre estaré para ti y sé que tú para mí.
- A mis tíos** Lupe, Heredia, gracias por cuidarme, por ser un par de padres más con quienes siempre puedo contar. Gracias por darme todo el cariño y tiempo necesarios, los amo.
- A mis abuelos** A pesar de que ya no se encuentran presentes en mi vida, sé que tendría todo su apoyo y amor.
- A Dios** Por conducirme hasta esta etapa de mi vida, poniendo siempre a las personas correctas y los momentos indicados.

## AGRADECIMIENTOS

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada, y el apoyo a los proyectos de investigación.

**Al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Hidalgo** por permitirnos realizar una estancia académica y parte del proyecto.

**Al Instituto Tecnológico Nacional de México campus Veracruz**, en especial a los laboratorios de Ingeniería de Alimentos y al laboratorio de Nanotecnología pertenecientes a la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA), por permitirnos realizar una parte del proyecto.

**Al Instituto Politécnico Nacional**, específicamente a la Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

**A mis directores de tesis** por guiarme en este camino, por su paciencia, su tiempo, su dedicación. Dra. Rubí, gracias por aceptarme como su alumna y ayudarme a aprender lo más posible del mundo del almidón, además por sus consejos de vida. Dr. Adrian, por encaminarme en el mundo de la investigación, por confiar en mí, por tomarse su tiempo para enseñarme lo necesario y también gracias por no sólo tratarme como una alumna, si no por darme consejos de vida.

**A mi comité tutorial, Dra. Delia y Dr. Alejandro**, por siempre darme todo el apoyo, el tiempo y la confianza; por despejar mis dudas, por guiarme, hacer observaciones para mejorar el trabajo y por los conocimientos transmitidos en el aula. Gracias por el seguimiento académico durante estos dos años y sobre todo muchas gracias por el apoyo emocional que me brindaron.

**A mis revisores, Dr. Erick y Dra. Nallely**, por sus observaciones pertinentes para la culminación satisfactoria de este documento.

**A Dr. Lucio** por TODO el tiempo que dedicó para brindarme su ayuda en temas que se me complicaron, metodologías nuevas, gracias por sus clases de secado y por todos los consejos; por salvarnos y ser un integrante más del gran equipo de trabajo. Mis mejores deseos para usted y su familia.

**A Dra. Heidi y Dr. Apolonio** por estar al pendiente de los avances a distancia y el apoyo para realizar parte de este proyecto.

**A cada jefe de posgrado en turno** por su apoyo en cada etapa, por su tiempo y disponibilidad en cada trámite.

**Al Dr. Julian, Dr. Andrés**, por el apoyo al facilitar equipo y material de laboratorio. Gracias también por sus enseñanzas en el aula.

**A Mis profesores, Dr. Edgar, Dra. Blanca** por compartir sus conocimientos, su tiempo y por la dedicación que tuvieron en el aula.

**A Misa** por ser mi compañero de aventuras científicas desde hace tres años. Gracias por tu apoyo en el laboratorio, por tu compañía, por ser cómplice de una u otra travesura. Estoy segura que llegarás lejos y que eres capaz de lograr lo que te propongas.

**A Betty**, mi amiga y cómplice de todas las experiencias durante estos dos años. Gracias por escucharme, aconsejarme, alimentarme, distraerme, compartir tu tiempo y tus experiencias conmigo. Gracias por el inicio de una gran amistad.

**A mis compañeros de generación** por los momentos compartidos durante estos dos años.

**A mis hermanas académicas: Edith** por brindarme tu ayuda y darme ánimos en momentos difíciles, gracias por compartir experiencias y consejos académicos, pero también personales. Te quiero; **Rosario**, por los regaños y por brindarme tu ayuda.

**A Tania**, por esa amistad tan bonita que formamos, por siempre ofrecerme tu apoyo incondicionalmente, te quiero mucho.

**A mi equipo Haemonchus: Liz, Saudy, Mariel y Miguel** por toda la ayuda, la compañía, las risas y las idas al OXXO, son los mejores compañeros y amigos de laboratorio, por cierto, gracias por los inolvidables chistes jarochos.

**A Alfredo** por preocuparse y apoyarme en esta etapa, darme la mano en los momentos necesarios.

**A Gerardo** por creer en mí, darme aliento cuando lo necesité y siempre estar para mí a la distancia.

**Y a cada persona que me encontré en este camino, gracias por dejarme un aprendizaje, una experiencia o simplemente un buen momento.**

*Gracias*

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Probióticos .....	3
2.1.1 Género <i>Lactobacillus</i> .....	4
2.1.2 <i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> .....	6
2.2. Encapsulación.....	7
2.2.1 Métodos de encapsulación .....	7
2.2.2 Materiales de encapsulación .....	14
2.2.3 Modificación enzimática.....	18
3. JUSTIFICACIÓN .....	21
4. OBJETIVOS .....	22
4.1. General .....	22
4.2. Específicos.....	22
5. Hipótesis .....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
6.1. Materiales.....	24
6.2. Modificación enzimática del almidón de maíz .....	24
6.3. Caracterización morfológica, fisicoquímica y molecular del almidón nativo y modificado. ....	25
6.3.1 Visualización por Microscopía Electrónica de Barrido .....	25
6.3.2 Contenido de amilosa aparente .....	26
6.3.3 Difracción de Rayos X .....	26
6.3.4 Calorimetría diferencial de barrido.....	27
6.3.5 Análisis Rápido de Viscosidad.....	27
6.3.6 Poder de hinchamiento y solubilidad .....	28
6.4. Activación de la cepa bacteriana.....	28

6.4.1	Tinción de Gram .....	29
6.4.2	Prueba de catalasa.....	29
6.5.	Resistencia térmica de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> .....	29
6.6.	Obtención de biomasa para la encapsulación.....	30
6.7.	Obtención de microcápsulas. ....	30
6.7.1	Preparación de la mezcla de alimentación .....	30
6.7.2	Encapsulación mediante secado por aspersion .....	31
6.7.1	Obtención de cápsulas mediante liofilización .....	32
6.8.	Eficiencia de encapsulación .....	33
6.9.	Caracterización morfológica de microcápsulas .....	34
6.9.1	Microscopía Electrónica de Barrido .....	34
6.9.2	Distribución de tamaño de partícula .....	34
6.10.	Caracterización fisicoquímica de microcápsulas.....	34
6.10.1	Humedad.....	34
6.10.2	Actividad de agua.....	35
6.10.3	Propiedades de flujo.....	35
6.10.4	Temperatura de transición vítrea.....	36
6.11.	Resistencia a condiciones gástricas .....	37
6.12.	Resistencia a condiciones intestinales.....	37
6.13.	Pérdida de viabilidad durante el almacenamiento.....	38
6.14.	Análisis estadístico .....	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
7.1.	Caracterización del almidón de maíz nativo y modificado.....	40
7.1.1	Morfología de los gránulos de almidón mediante Microscopía Electrónica de Barrido.....	40
7.1.1	Contenido de amilosa .....	47
7.1.2	Difracción de Rayos X .....	49
7.1.3	Perfil de formación de pasta .....	52
7.1.4	Calorimetría diferencial de barrido.....	55
7.1.5	Solubilidad e hinchamiento.....	59
7.2.	Activación de cepa bacteriana .....	62
7.3.	Resistencia térmica de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> .....	63
7.4.	Microcápsulas .....	65

7.4.1	Eficiencia de encapsulación .....	65
7.4.2	Rendimientos.....	69
7.5.	Caracterización morfológica de microcápsulas .....	71
7.5.1	Microscopía Electrónica de Barrido .....	71
7.5.2	Distribución de tamaño de partícula .....	75
7.6.	Caracterización fisicoquímica.....	78
7.6.1	Contenido de humedad y actividad de agua.....	78
7.6.2	Propiedades de flujo .....	80
7.6.3	Temperatura de transición vítrea .....	83
7.7.	Resistencia a condiciones gástricas.....	86
7.8.	Resistencia a condiciones intestinales .....	91
7.9.	Pérdida de viabilidad durante el almacenamiento.....	93
8.	CONCLUSIÓN .....	99
9.	PERSPECTIVAS DEL TRABAJO .....	100
10.	REFERENCIAS.....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , almidón de maíz nativo e hidrolizado con $\alpha$ -amilasa pancreática porcina durante 2, 4, 6 y 8 h.....	42
<b>Figura 2.</b> Almidón poroso obtenido a partir de dos etapas de hidrólisis a diferentes tiempos. Primera etapa con $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo durante 2 y 8 h. Segunda etapa con amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i> durante 8, 12 y 16 h..	43
<b>Figura 3.</b> Almidones de maíz porosos obtenidos por una etapa de hidrólisis con $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo durante 2, 4 o 6 h con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i> durante 12 h. ....	45
<b>Figura 4.</b> Difractogramas obtenidos mediante DRX. Almidón nativo de maíz y almidones modificados durante 2, 4 y 6 h con $\alpha$ -amilasa, con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h. ....	51
<b>Figura 5.</b> Perfiles de formación de pasta de almidón nativo y almidones modificados durante 2, 4 y 6 h con $\alpha$ -amilasa, con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h. ....	54
<b>Figura 6.</b> Termogramas obtenidos por CDB de almidón nativo y almidones modificados durante 2, 4 y 6 h con $\alpha$ -amilasa con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h.....	57
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de solubilidad de almidón nativo de maíz y almidones modificados durante 2, 4 y 6 h con $\alpha$ -amilasa, con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h.....	61
<b>Figura 8.</b> Índice de hinchamiento de almidón nativo y almidones modificados durante 2, 4 y 6 h con $\alpha$ -amilasa, con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h. ....	61
<b>Figura 9.</b> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> . Observación macroscópica y microscópica. ....	62
<b>Figura 10.</b> Viabilidad de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> sometida a diferentes temperaturas durante 15 min. ....	64
<b>Figura 11.</b> Viscosidad de mezclas de alimentación utilizadas en secado por aspersion.....	70
<b>Figura 12.</b> Microcápsulas generadas mediante secado por aspersion y liofilización utilizando como material de pared almidón nativo, almidón poroso, maltodextrina y	

(AG) almidón gelatinizado. Micrografías obtenidas con una amplificación de 100X .....	73
<b>Figura 13.</b> Partículas generadas mediante secado por aspersión y liofilización utilizando como material de pared almidón nativo, almidón poroso, maltodextrina y almidón gelatinizado. Micrografías obtenidas con una amplificación de 3500X. ....	74
<b>Figura 14.</b> Distribución de tamaño de partícula de microcápsulas obtenidas por secado por aspersión. ....	77
<b>Figura 15.</b> Distribución de tamaño de partícula de microcápsulas con materiales de recubrimiento obtenidas por diferente método de encapsulación .....	77
<b>Figura 16.</b> Pérdida de viabilidad en condiciones gástricas. ....	89
<b>Figura 17.</b> Viabilidad de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> en jugos intestinales. ....	92
<b>Figura 18.</b> Viabilidad de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> durante el almacenamiento a 4 °C. ....	94

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Beneficios de diferentes especies pertenecientes al género <i>Lactobacillus</i> . .....	5
<b>Tabla 2.</b> Métodos utilizados para la encapsulación de probióticos. ....	9
<b>Tabla 3.</b> Tipo de enzima y tiempos de hidrólisis utilizados para la obtención de almidón poroso.....	20
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de propiedades de flujo de acuerdo al índice de Carr y al índice de Hausner. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Características estructurales del almidón modificado con $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo durante 2, 4, 6 y 8 horas. ....	44
<b>Tabla 6.</b> Características estructurales del almidón modificado en dos etapas con diferentes tiempos en cada una. ....	44
<b>Tabla 7.</b> Características morfológicas del almidón modificado con diferentes tiempos de hidrólisis con $\alpha$ -amilasa. ....	44
<b>Tabla 8.</b> Contenido de amilosa y amilopectina en almidón nativo y modificado de maíz sometido a diferentes tiempos de hidrólisis. ....	48
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de cristalinidad en almidón nativo y almidones modificados sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis. ....	51
<b>Tabla 10.</b> Propiedades de formación de pasta del almidón nativo y almidones modificados sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis. ....	54
<b>Tabla 11.</b> Propiedades térmicas del almidón nativo y almidones modificados sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis. ....	58
<b>Tabla 12.</b> Pérdida de viabilidad de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> por exposición a altas temperaturas durante 15 min. ....	64
<b>Tabla 13.</b> Eficiencia de encapsulación de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> con almidón nativo y poroso utilizando como técnicas de encapsulación secado por aspersión o liofilización. ....	68
<b>Tabla 14.</b> Rendimientos de encapsulación con almidón nativo o poroso utilizando secado por aspersión y liofilización como métodos de encapsulación. ....	70
<b>Tabla 15.</b> Porcentaje de humedad y actividad de agua de microcápsulas obtenidas por secado por aspersión y liofilización con almidón nativo y poroso. ....	79

<b>Tabla 16.</b> Densidad de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión y liofilización con almidón nativo y poroso. ....	82
<b>Tabla 17.</b> Densidad de los materiales utilizados para la encapsulación de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> con almidón nativo y poroso utilizando secado por aspersión o liofilización como métodos de encapsulación. ....	82
<b>Tabla 18.</b> Temperaturas de transición vítrea de las partículas obtenidas por liofilización y secado por aspersión. ....	85
<b>Tabla 19.</b> Temperatura de transición vítrea de diferentes materiales utilizados para la encapsulación.....	85
<b>Tabla 20.</b> Porcentaje de pérdida de viabilidad de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> en condiciones gástricas con distintos tiempos de exposición. ....	90
<b>Tabla 21.</b> Pérdida de viabilidad de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> en presencia de jugos intestinales in vitro. ....	92
<b>Tabla 22.</b> Coeficientes de regresión para la viabilidad de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> durante el almacenamiento a 4 °C.....	93

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AG	Almidón gelatinizado
AM	$\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo
AMG	Amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i>
AN	Almidón nativo de maíz
AP	Almidón poroso de maíz
ARV	Análisis Rápido de Viscosidad
$a_w$	Actividad de agua
BAL	Bacterias ácido lácticas
CDB	Calorimetría Diferencial de Barrido
CI	Índice de Carr
DDTP	Distribución de Tamaño de Partícula
DRX	Difracción de Rayos X
HCl	Ácido Clorhídrico
HR	Relación de Hausner
I <sub>2</sub>	Yodo
IG	Intervalo de gelatinización
JGS	Jugos Gástricos Simulados
JIS	Jugos Intestinales
KI	Yoduro de potasio
LF	Liofilización
MD	Maltodextrina
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MRS	De Man Rogosa y Sharpe
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampón de fosfato salino)
SA	Secado por aspersion
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
$\rho_B$	Densidad a granel
$\rho_\tau$	Densidad compactada

## RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos, principalmente bacterias, no patógenas, utilizados en forma de suplemento alimenticio, que, tras ser ingeridos en cantidades suficientes, mejoran el equilibrio microbiano intestinal y provocan efectos benéficos sobre la salud de quienes los ingieren. Como la mayoría de las bacterias, los probióticos son susceptibles a condiciones extremas como altas temperaturas y cambios de pH. Una manera de proteger a los probióticos de estos factores ambientales es a través de la encapsulación. Existen muchos métodos y materiales para encapsular, de manera continua se prueba la combinación de ambos para obtener mejores resultados. En el caso de los materiales de pared se busca que sean económicos y altamente disponibles. El almidón es uno de los polisacáridos que cumple con estas características, además que su diversidad es amplia y sus propiedades funcionales dependen de la fuente botánica. El objetivo de este trabajo fue evaluar la liofilización y el secado por aspersion como métodos de encapsulación, sobre la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* en condiciones de almacenamiento y condiciones gástricas utilizando como material de soporte almidón poroso de maíz. Para lo cual se realizó una hidrólisis enzimática del almidón de maíz para la generación de almidón poroso (AP), la cual fue en dos etapas utilizando diferentes enzimas amilolíticas en cada una ( $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa). Se probaron diferentes tiempos (2, 4 y 6 h) de hidrólisis en la primera etapa con  $\alpha$ -amilasa (A). En la segunda etapa sólo se hidrolizó el material obtenido durante 12 h con amiloglucosidasa (AM). El almidón poroso que se utilizó para la encapsulación fue obtenido a través de una hidrólisis de 2 h con  $\alpha$ -amilasa, seguida de 12 h con amiloglucosidasa (2A12AMG). El almidón obtenido tuvo un contenido de amilopectina similar (70.78 %) al almidón nativo (69.84 %), por lo que la hidrólisis enzimática bajo las condiciones empleadas no afectó a la mayoría de las propiedades funcionales del almidón nativo. Tuvo una mayor cristalinidad (23.3 %) en comparación con el nativo (20.7 %) y un diámetro de poro de  $\sim 1.14 \mu\text{m}$ , una viscosidad máxima de 3398 cP, al mismo tiempo que una mayor viscosidad final (4406.5 cP), lo que aumenta la reorganización del almidón en la etapa de retrogradación. Además, las propiedades térmicas fueron mejoradas, obteniendo

una  $T_p$  más alta (71.26 °C) que la del nativo (66.9 °C) y una  $\Delta H$  mayor (11.41 J/g) indicando una cristalinidad mayor y mejor organización de los cristales. Para la encapsulación se probaron dos métodos: secado por aspersion (SA) y liofilización (LF), utilizando el almidón poroso (2A12AMG) como material de soporte y dos diferentes materiales de recubrimiento: maltodextrina (MD) y almidón gelatinizado (AG) al 3 %. El método de encapsulación fue determinante en la eficiencia de encapsulación, con la liofilización las eficiencias obtenidas fueron mejores (~61 %), mientras que en secado por aspersion las eficiencias van desde 35.67 hasta 41.60 %, dependiendo de los materiales de encapsulación utilizados. La liofilización generó partículas con un contenido de agua menor (0.23 - 0.73 %) al secado por aspersion (3.18 - 6.13 %), sin embargo, con ambos métodos se obtuvieron productos considerados secos. Las partículas obtenidas por liofilización presentaron mejores propiedades de flujo y tamaños de partícula mayores, en comparación con los obtenidos con el secado por aspersion, en donde, la mayoría de los tratamientos presentaron el tamaño correspondiente al gránulo de almidón utilizado. La supervivencia en condiciones gástricas fue mejor en los tratamientos obtenidos por secado por aspersion utilizando almidón poroso (AP-SA) y con almidón poroso en conjunto con maltodextrina (MD-AP-SA); y en todos los tratamientos liofilizados, obteniendo pérdidas de viabilidad menores del 13 % a los 120 min de exposición a estas condiciones, mientras que *L. paracasei* subsp. *paracasei* de forma libre, pierde su viabilidad a los 60 min. La viabilidad durante el almacenamiento a 4 °C durante 2 meses, se mantuvo estable en los tratamientos obtenidos por secado por aspersion, mientras que para los liofilizados se registraron pérdidas no mayores al 12 %.

## ABSTRACT

Probiotics are microorganisms, mainly bacteria, not pathogenic, used in the form of a dietary supplement, which, after ingesting in sufficient quantities improve the microbial balance of the intestinal and cause beneficial health effects for those who ingest them. As most bacteria, probiotics are susceptible to extreme conditions such as high temperatures and pH changes. One way to protect probiotics from these environmental factors is through encapsulation. There are many methods and materials to encapsulate and continuously the combination of both is tested for best results. Wall materials are sought to be economical and highly available. Starch is one of the polysaccharides that meets these characteristics, in addition to its diversity being wide and its functional properties depend on the botanical source. The aim of this work was to evaluate freeze-drying and spray drying as encapsulation methods on the viability of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in storage conditions and gastric conditions using corn porous starch as a support material. For which an enzymatic hydrolysis of corn starch was performed for the generation of porous starch (AP), which was in two stages using different amyolytic enzymes in each ( $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase). Different times (2, 4 and 6 h) of hydrolysis were tested in the first stage with  $\alpha$ -amylase (A). In the second stage only the material obtained for 12 h with amyloglucosidase (AM) was hydrolyzed. The porous starch that was used for encapsulation was obtained through a hydrolysis of 2 h with  $\alpha$ -amylase, followed by 12 h with amyloglucosidase (2A12AMG). The starch obtained had a similar amylopectin content (70.78 %) than native starch (69.84 %), so enzymatic hydrolysis under the conditions used did not affect most of the functional properties of native starch. Porous starch had a higher crystallinity (23.3 %) compared to native (20.7 %) and a diameter pore of  $\sim 1.14 \mu\text{m}$ , a maximum viscosity of 3398 cP, at the same time as a higher final viscosity (4406.5 cP), which increases the reorganization of starch in the retrograde stage. In addition, the thermal properties were improved, obtaining a higher  $T_p$  (71.26 °C) than of the native (66.9 °C) and a higher  $\Delta H$  (11.41 J/g) indicating greater crystallinity and better organization of the crystals. Two methods were tested for encapsulation: spray drying (SA) and freeze drying (LF), using porous starch (2A12AMG) as support

material and two different coating materials: maltodextrin (MD) and gelatinized starch (AG) (3 %). The encapsulation method was decisive in encapsulation efficiency, with the freeze-drying efficiencies obtained were better (~61 %), while in spray drying the efficiencies range from 35.67 to 41.60 %, depending on the materials of encapsulation used. Freeze drying generated particles with a lower water content (0.23 - 0.73 %) spray drying (3.18 - 6.13 %), however both methods obtained products considered dry. The particles obtained by freeze drying had better flow properties and larger particle sizes compared to those obtained with spray drying, where most treatments had the size corresponding to the granule starch used. Survival under gastric conditions was better in treatments obtained by spray drying using porous starch (AP-SA) and porous starch in conjunction with maltodextrin (MD-AP-SA); and in all freeze-dried treatments, obtaining viability losses of less than 13 % at 120 min of exposure to these conditions, while *L. paracasei* subsp. *paracasei* free-form lost its viability at 60 min. The viability during storage at 4 °C for 2 months remained stable in spray drying treatments, while freeze-dried treatments no more than 12 % were recorded for freeze-dried treatments.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos, principalmente bacterias, no patógenas, utilizados en forma de suplemento alimenticio, que, tras ser ingeridos en cantidades suficientes, mejoran el equilibrio microbiano intestinal y provocan efectos benéficos sobre la salud de quienes los ingieren. Se ha comprobado que distintas cepas con efecto probiótico confieren un beneficio a la salud por distintos mecanismos (Patel y Dunpont, 2015). Para que sea posible obtener beneficios probióticos, los microorganismos deben ser capaces de sobrevivir durante su paso por el tracto digestivo y poder proliferar en algunas porciones específicas del intestino (FAO, 2006).

La encapsulación de probióticos permite proteger a los microorganismos de condiciones ambientales y a su paso por el tracto gastrointestinal que son desfavorables para ellos, con la finalidad de que se liberen viables y metabólicamente activos en el intestino (Nazarro *et al.*, 2012; Gbassi y Vandamme, 2012; Rodríguez *et al.*, 2016)

Entre los métodos más actuales y comunes se encuentran la liofilización y el secado por aspersión. Ambos métodos permiten la obtención de polvos, con baja humedad, de modo que puedan conservarse durante más tiempo, además cada uno tiene condiciones de operación que son importantes monitorear para aumentar la eficiencia del proceso y obtener altos valores de viabilidad (Meng *et al.*, 2008). Por ejemplo, la encapsulación por liofilización se debe llevar a cabo a bajas temperaturas, agitación controlada, concentraciones bajas de oxígeno y un pH moderado (Martín, *et al.*, 2015). Por otro lado, en secado por aspersión, la etapa crítica del proceso se centra en la temperatura de salida del aire de secado (Huang *et al.*, 2017).

Otro aspecto importante en la encapsulación son los materiales utilizados los cuales son polímeros naturales o sintéticos que aportan protección a los microorganismos. Algunos de los más utilizados son el alginato y algunas gomas, sin embargo, debido

al costo y biodisponibilidad se buscan opciones más económicas como los almidones (Gbassi y Vandamme, 2012).

Debido a las propiedades funcionales del almidón su uso como material de pared se ve restringido, por lo que es posible modificar el almidón para la obtención de nuevos materiales de encapsulación. Sin embargo, las fuentes de obtención de almidón son diversas, mismas que varían en sus características, algunas fuentes botánicas como el maíz, el sorgo y el mijo presentan de forma nativa diminutos canales, que conectan la superficie del gránulo con el centro, esta característica favorece la obtención de almidones con poros cuyo tamaño depende del tratamiento enzimático realizado. Debido a que el maíz es una fuente convencional de almidón y además a su alta disponibilidad, las modificaciones enzimáticas se realizan a partir de almidón de maíz como modelo de estudio (Fannon *et al.*, 2003; Qi y Tester, 2019).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el método de encapsulación (secado por aspersión y liofilización) de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* utilizando como material de pared almidón poroso de maíz (*Zea mays*).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Probióticos

La palabra probiótico de acuerdo con la etimología griega significa “en pro de la vida”. Este término tiene sus orígenes en el trabajo realizado por Eli Metchnikoff en 1907, quien sugería la posibilidad de modificar la microbiota de nuestro organismo con el fin de reemplazar microorganismos patógenos con algunos benéficos; posteriormente en 1965, Lilly y Stillwell utilizaron el término para referirse a los factores que promovían el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, el término se popularizó hasta 1989 cuando Fuller describe a los probióticos como “aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician al hospedero mejorando el balance microbiano en su microbiota intestinal” (Leahy *et al.*, 2005; Mayorga-Reyes *et al.*, 2010).

Actualmente, un probiótico está definido por la FAO (2006) como “aquel microorganismo vivo que cuando es administrado en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud en el hospedero”, la dosis mínima de consumo que se ha recomendado por la FDA y la industria alimenticia es de  $10^6$  UFC/ mL (Tripathi y Giri, 2014).

Los mecanismos de acción de los probióticos son cuatro (Patel y Dupont, 2015):

- a. Producción de sustancias inhibitorias del crecimiento de patógenos como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos grasos de cadena corta (láctico, propiónico, butírico, etcétera.)
- b. Competencia con microorganismos patógenos para la adhesión a la superficie epitelial.
- c. Competencia por nutrientes con los patógenos.
- d. Estimulación de la inmunidad de la mucosa debido a que se afectan diferentes tipos de células involucradas en la respuesta inmune local y sistémica, como lo son las células epiteliales, dendríticas, células T, células reguladoras, células B productoras de inmunoglobulina A, células asesinas naturales.

Por lo anterior, el uso de probióticos previene infecciones gastrointestinales, suprime alergias, controla los niveles de colesterol en sangre, modula el sistema inmune y previene varios tipos de cáncer (Mayorga-Reyes *et al.*, 2010). También son capaces de actuar contra enfermedades autoinmunes e inflamatorias debido a que la población microbiana puede mantener un equilibrio inmunológico de la mucosa intestinal (Dominguez-Bello y Blaser, 2008).

Las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han sido los más utilizados en la industria alimenticia debido a que se ha comprobado su seguridad y beneficios (Linares *et al.*, 2016).

### **2.1.1 Género *Lactobacillus***

La clasificación clásica de las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* está definida con base a sus características fermentativas, encontrando tres grupos: homofermentativas estrictas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas estrictas, siendo las de mayor interés en la industria de los alimentos las pertenecientes al último grupo (Stiles y Holzapfel, 1997).

El género *Lactobacillus* comprende alrededor de 113 especies, pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae* y al orden *Lactobacillales*. Los *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas no esporuladas y su morfología es en forma de bacilo; sus características fisiológicas y bioquímicas se pueden identificar debido a que son bacterias inmóviles, catalasa y oxidasa negativa, además de ser anaerobios facultativos presentando un mejor crecimiento en atmósferas anaerobias o que contengan como mínimo el 10 % de CO<sub>2</sub> (Martínez-Peña *et al.*, 2012). Se encuentran dentro de las bacterias ácido lácticas debido a su capacidad para producir ácido láctico, estas bacterias se han propuesto como opciones predominantes industrialmente para reemplazar el uso de los antibióticos (Ahn *et al.*, 2002).

Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que bacterias del género *Lactobacillus* tiene beneficios, también se han probado *in vivo* en animales de consumo y se ha observado mejoras, algunos de estos resultados se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Beneficios de diferentes especies pertenecientes al género *Lactobacillus*.

Cepa	Modelo	Resultados	Referencia
<i>L. casei</i> ASCC 292 y <i>L. acidophilus</i>	<i>In vitro</i>	Son capaces de asimilar el colesterol y resistir a ácidos y sales biliares en comparación con otras especies del mismo género.	Liong y Shah, 2005
<i>L. acidophilus</i> HM1, <i>L. fermentum</i> HM3 y <i>L. buchneri</i> FD2	<i>In vitro</i>	Muestran actividad antioxidante e inhiben la actividad de células cancerígenas de colon, de mama y de hígado.	Shokryazdan <i>et al.</i> , 2017
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>L. salivarius</i>	<i>In vitro</i>	Las bacterias alteran la expresión de citoquinas en células presentes en las amígdalas cecales de pollos de engorda.	Brisbin <i>et al.</i> 2012
Género <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i>	<i>In vivo</i>	Estos géneros se encuentran en mayor proporción en personas sanas que en pacientes con urticaria crónica.	Rezazadeh <i>et al.</i> , 2018
<i>L. acidophilus</i> NCFM y <i>B. lactis</i> Bi-07	<i>In vivo</i>	Mejoran y mantienen la integridad de las células epiteliales del intestino, mejora el sistema inmune y el metabolismo, además de reducir poblaciones bacterianas patógenas.	Wang <i>et al.</i> , 2018

A pesar de proporcionar beneficios a la salud, se conoce que los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son de los más susceptibles a ácidos biliares, al ser bacterias Gram positivas (Ding y Shah, 2007). Debido a esto muchas cepas después de su administración oral tienen una pérdida considerable de su viabilidad por lo que les resulta difícil mantener su actividad metabólica (Linares *et al.*, 2016) por lo que la microencapsulación se considera una buena opción para la protección contra las condiciones a las que se enfrentan (Cook *et al.*, 2012).

### **2.1.2 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei***

*L. paracasei* subsp. *paracasei* ha demostrado ser segura para el consumo humano debido a que su consumo no provoca daños al organismo, además de ser sensible a antibióticos (Zhang *et al.*, 2013). Esta es una de las justificaciones del por qué se ha estudiado en bioensayos *in vitro* e *in vivo*, mediante los cuales se ha demostrado su potencial probiótico.

*L. paracasei* subsp. *paracasei* es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* afectando la membrana plasmática de este patógeno por medio de sus metabolitos producidos (Bendali *et al.*, 2011). También, se ha propuesto como una terapia para la gastroenteritis o para el síndrome de intestino irritable (IBD) debido a que protege las células epiteliales, aumenta la mucosa intestinal, regula las distintas citoquinas (IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-10 y IL-17A) involucradas en procesos de inflamación y fortalecen la microbiota intestinal (especies de *Bacteroidaceae* y *Enterobacteriaceae*) (Bendali *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2019).

En el mismo sentido, reportes científicos han descrito que *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* tiene efectos en la reducción de los niveles de colesterol, la presión, prevención del desarrollo de lesiones gástricas, inmunomodulación, mejora en alergias, efecto anti osteoporosis y evita la acumulación de grasa en tejidos (Chiang y Pan, 2012).

En general, para que los microorganismos probióticos tengan un efecto sobre la salud, deben sobrevivir durante su paso por el tracto digestivo y proliferar en el intestino; esto significa que deben resistir a las condiciones gástricas y crecer en presencia de sales biliares, por lo que su viabilidad durante el paso por el tracto gastrointestinal puede ser protegida al incluirlos en alimentos vehículos o encapsularlos con materiales que les otorgue una protección adecuada (FAO, 2006).

## **2.2. Encapsulación**

La encapsulación está definida como la tecnología de recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en cápsulas que liberan su contenido en periodos o condiciones controladas (Champagne y Fustier, 2007). La encapsulación de probióticos permite que las células sean protegidas para reducir sus daños o su muerte, de modo que se liberen eficazmente en el intestino (Martín *et al.*, 2015).

Esta tecnología permite proteger a los microorganismos de condiciones ambientales y en su paso por el tracto gastrointestinal que son desfavorables para ellos, como el pH, producción de peróxido de hidrógeno y temperaturas de almacenamiento; asegurando así que se liberen viables y metabólicamente activos en el intestino (Nazarro *et al.*, 2012; Gbassi y Vandamme, 2012; Rodríguez *et al.*, 2016).

El término microcápsulas está determinado por el tamaño de las partículas obtenidas, se consideran microcápsulas las que tengan un tamaño de 1-1000  $\mu\text{m}$ , a su vez el tamaño depende de la composición y propiedades fisicoquímicas del material pared, además de la técnica de encapsulación utilizada (Sandoval-Peraz *et al.*, 2016).

### **2.2.1 Métodos de encapsulación**

Los métodos de encapsulación se pueden clasificar en físicos y físico-químicos. Dentro de los métodos físico-químicos se encuentra la coalescencia, inclusión molecular y la encapsulación por liposomas; en los físicos se encuentran el recubrimiento por lecho fluizado, extrusión, enfriamiento por liposomas, secado por aspersión y liofilización (Pérez-Leonard *et al.*, 2013).

La mayoría de estas técnicas por lo general implican mezclas líquidas que deben ser secadas en el proceso de encapsulación, en este caso las probables aplicaciones de altas temperaturas están asociadas a una reducción de la viabilidad cuando se trabaja con microorganismos (Rodríguez-Barona *et al.*, 2016).

Para elegir el método más adecuado se debe de tomar en cuenta qué condiciones afectan la viabilidad del probiótico, cuáles serán las condiciones de almacenamiento de las microcápsulas, qué condiciones de liberación son las que se desean, cuál material encapsulante se utilizará y el costo de producción. La encapsulación de probióticos se debe llevar a cabo a bajas temperaturas, agitación controlada, concentraciones bajas de oxígeno y un pH moderado (Martín *et al.*, 2015). Dentro de los métodos con los que se obtienen polvos se encuentran la liofilización y el secado por aspersion, sin embargo, existen otros métodos que se han utilizado para la encapsulación de probióticos, utilizando distintos materiales de pared como se resume en la tabla 2.

**Tabla 2.** Métodos utilizados para la encapsulación de probióticos.

<b>Método de encapsulación</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Material pared</b>	<b>Referencia</b>	
Emulsificación	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Almidón resistente	Ashwar <i>et al.</i> , 2018	
	<i>Bifidobacterium longum</i>	Caseinato de sodio Proteína de suero Leche descremada Proteína de soya Caseinato de sodio: Proteína de suero *Combinando con manitol, glicerol o maltodextrina	Dianawati <i>et al.</i> , 2013b	
	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Caseinato de sodio y caseinato de sodio+ Almidón resistente Caseinato de sodio + almidón resistente	Heidebach <i>et al.</i> , 2010	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Alginato de sodio	Ding y Shah, 2007	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Manitol Glicerol Almidón poroso Manitol + glicerol + almidón poroso	Xing <i>et al.</i> , 2015	
	<i>Lactobacillus casei</i>	Caseinato de sodio y goma gellan	Nag <i>et al.</i> , 2011	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Alginato de calcio	Mokarram <i>et al.</i> , 2009	

Método de encapsulación	Bacteria	Material pared	Referencia
Extrusión	<i>Bifidobacterium longum</i>	Alginato de sodio nativo	Amine <i>et al.</i> , 2014
		Alginato de sodio palmitolado	
		Alginato de sodio nativo: Alginato palmitolado	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato de sodio y almidón resistente	Mirzaei <i>et al.</i> , 2012
Absorción y liofilización	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Almidón gelatinizado	Benavent-Gil <i>et al.</i> , 2018
		Goma guar	
	Goma Xantana		
	*Se utilizó almidón de arroz poroso y nativo como material de soporte.		
	<i>Lactobacillus casei</i>	Maltodextrina	Rodríguez-Barona <i>et al.</i> , 2016
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Inulina		
		Fructooligosacáridos	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Almidón gelatinizado	Li <i>et al.</i> , 2016
*Se utilizó almidón poroso de maíz como material de soporte.			
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Leche descremada reconstituida	Zhang <i>et al.</i> , 2018
		Goma arabiga	
		Maltodextrina	
		Leche descremada	

Método de encapsulación	Bacteria	Material pared	Referencia
Secado por aspersión	<i>Lactobacillus casei</i> LK-1	Trehalosa	Liao <i>et al.</i> , 2017
		Maltodextrina	
		Leche descremada	
	<i>Bifidobacterium spp. lactis</i>	Maltodextrina + inulina	Paim <i>et al.</i> , 2016
		Maltodextrina + oligofructuosa	
		Maltodextrina + inulina+ oligofructuosa	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Maltodextrina	Rajam y Anandharamakrishnan, 2015	
	Fructooligosacáridos		
	Fructooligosacáridos + proteína de suero		
		Fructooligosacáridos + proteína de suero desnaturalizado	

### 2.2.1.1 Liofilización

El uso de la liofilización como método de encapsulación es relativamente actual, el método está basado en la sublimación, la cual ocurre en tres fases: un congelamiento y dos fases de secado, la primaria y la secundaria (Martín *et al.*, 2015).

La congelación debe realizarse a temperaturas muy bajas para asegurar el estado sólido de la muestra (Nireesha *et al.*, 2013), por lo que es necesario el uso de crioprotectores para reducir los daños en las células, ya que estos son capaces de acumularse dentro de las células y reducir la diferencia osmótica entre el exterior y el interior (Martín *et al.*, 2015).

La solución debe precongelarse por lo que esta etapa afecta directamente en las cápsulas obtenidas ya que el tipo de cristal formado en esta etapa depende de la velocidad de congelación. Una congelación rápida conlleva a la formación de cristales más pequeños que permiten conservar la estructura, aunque el tiempo de secado se alarga; caso contrario con una congelación lenta en la que los cristales formados son grandes y se generan poros en la estructura del material al momento del secado (Nireesha *et al.*, 2013)

Posteriormente, el hielo es retirado en el secado primario mediante sublimación. En esta etapa las condiciones de presión y temperatura son importantes para que se efectúe la sublimación correctamente, al mantener presiones ( $10^4$  -  $10^5$  atmósferas) y temperaturas (-45 a -20 °C) por debajo del punto triple del agua (4.579 mm de Hg y 0.0099 °C) o del solvente utilizado (Nireesha *et al.*, 2013; Martín *et al.*, 2015).

Finalmente, con el secado secundario, el agua ligada (7 - 8 %) aún existente en el material es retirada por desorción. Esta etapa se realiza a una temperatura por arriba del ambiente y por debajo de una temperatura que no afecte las propiedades del producto, la presión se reduce y el tiempo que tarda esta etapa es aproximadamente la mitad de la etapa de sublimación (Nireesha *et al.*, 2013).

La liofilización es utilizado como método de secado de materiales biológicos o sensibles, como antibióticos, bacterias, vacunas, suero, células y proteínas

(Nireesha *et al.*, 2013), es por ello que la encapsulación de probióticos por liofilización ha mostrado una mejor supervivencia de los microorganismos después de agregarlos a los productos objetivos (Champagne y Fustier, 2007). Sin embargo, la desventaja de este método es el tiempo prolongado de procesamiento y el consumo elevado de energía (Sandoval-Peraza *et al.*, 2016).

#### **2.2.1.2 Secado por aspersión**

El proceso de encapsulación por secado por aspersión involucra la disolución de un núcleo (material a encapsular) en una dispersión de un material matriz o pared; esta dispersión es atomizada a través de una boquilla con la que se producen pequeñas gotas (10 - 150  $\mu\text{m}$ ), las cuales, al estar en contacto con el aire caliente de secado (150  $^{\circ}\text{C}$  - 250  $^{\circ}\text{C}$ ), perderán inmediatamente el agua contenida debido a la transferencia de energía, en un tiempo corto (5 - 15 s) (Meng *et al.*, 2008; Augustin y Hemar, 2009).

La principal ventaja del secado por aspersión sobre la liofilización radica en ser un método mucho más barato, al consumir de 6 a 10 veces menos energía en comparación con la liofilización (Martín *et al.*, 2015). Otras ventajas del secado por aspersión es que es un proceso rápido, continuo y reproducible, además se pueden modificar las condiciones de operación dependiendo de las necesidades, por lo que resulta ser adecuado para encapsular una variedad de compuestos con distintos materiales (Ho *et al.*, 2017).

Las condiciones de operación y las características de la dispersión a alimentar, como la viscosidad, concentración, etc., son factores que tienen efectos sobre la eficiencia del proceso y principalmente sobre las características del producto final (Ho *et al.*, 2017).

El secado por aspersión se ha utilizado para la encapsulación de distintos ingredientes alimenticios como vitaminas, minerales, sabores, enzimas y probióticos. Se ha demostrado que se pueden encapsular ingredientes sensibles a la temperatura, debido a que el tiempo de exposición a altas temperaturas es muy corto y la evaporación rápida permite que el material núcleo no alcance temperaturas extremas (Augustin y Hemar, 2009).

Con respecto a la aplicación de esta metodología en bacterias, se ha demostrado que durante el proceso de secado las bacterias son sometidas a un estrés térmico, el cual puede causar daños sobre la membrana celular, provocando poros celulares que permiten la salida de sustancias intracelulares indispensables para la supervivencia de las bacterias (Meng *et al.*, 2008). Sin embargo, la supervivencia bacteriana en este método, depende de diferentes factores, dentro de los principales se encuentran: a) la especie del probiótico utilizado, la cual puede tener una termoresistencia alta; b) la temperatura de salida, temperaturas mayores a 90 °C pueden llegar a ser letales para bacterias probióticas; y c) el material de pared a utilizar, el cual le otorga protección a la célula (Meng *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2015).

### **2.2.2 Materiales de encapsulación**

El tipo de material tiene un papel principal en la microencapsulación ya que la protección que obtengan los probióticos contra factores adversos depende en gran medida de éste. Además, es preferible que las microcápsulas obtenidas sean insolubles en agua para asegurar su integridad en el ambiente y en el tracto gastrointestinal (Nazarro *et al.*, 2012). Los materiales utilizados para la encapsulación de probióticos son polímeros naturales o sintéticos, los cuales están en contacto directo con las células bacterianas y posteriormente estarán en contacto con el sistema digestivo protegiendo a los probióticos de éste (Gbassi y Vandamme, 2012).

Los materiales utilizados comúnmente son proteínas como polipeptonas, proteínas de soya, proteína de trigo, derivados de leche y gelatinas; lípidos como liposomas, parafinas, ácido esteárico y esteárico; y carbohidratos como diferentes fuentes de almidón nativos y modificados, goma arábiga, goma guar, goma acacia, maltodextrina, fosfooligosacáridos, inulina, alginato, carboximetilcelulosa, quitosano y acetato de celulosa (Gouin, 2004; Gbassi y Vandamme, 2012; Tripathi y Giri, 2014; Rodríguez *et al.*, 2016).

Dentro de las características para la selección de los materiales utilizados en la encapsulación se encuentran: habilidad de dispersarse con el material a encapsular, capacidad para mantener dentro de su estructura el material encapsulado, ser inerte

durante el proceso de encapsulación, características fisicoquímicas como una baja viscosidad a altas concentraciones, seguridad toxicológica y capacidad de liberar el material encapsulado en condiciones específicas, además, de ser de bajo costo (Gbassi y Vandamme, 2012; Sandoval-Peraza *et al.*, 2016).

La liberación de los probióticos de cápsulas en las que se utiliza algún polisacárido como material pared, depende de la hidrólisis de los enlaces glucosídicos, esta degradación es promovida por las bacterias de la microbiota principalmente las pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Bifidobacterium*. Los polisacáridos utilizados en la encapsulación se modifican con la finalidad de mejorar la eficiencia de encapsulación o controlar la liberación (de Vos *et al.*, 2010).

Los polisacáridos no digeribles como los prebióticos pueden ser utilizados como material de pared, debido a la resistencia que presentan a las enzimas digestivas, benefician al hospedero al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de las bacterias en el colon; además de aumentar los porcentajes de supervivencia al utilizar prebióticos como inulina y fructooligosacáridos (Rodríguez-Barona *et al.*, 2016).

Se ha realizado microencapsulación de probióticos exitosamente puesto que se han logrado mantener en buen estado a pesar de los factores implicados en el proceso y el almacenamiento, han resistido valores bajos de pH, sales biliares, choques de temperatura, ataque de bacteriófagos, presencia de oxígeno molecular, en el caso de microorganismos anaerobios y agentes químicos antimicrobianos (Tripathi y Giri, 2014).

#### **2.2.2.1 Uso de almidón como material pared y sus modificaciones**

El almidón ha sido empleado como material pared en la encapsulación principalmente porque es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, es un polímero versátil, útil, considerado GRAS (Generally Recognized as Safe, por sus siglas en inglés), no es alérgeno y es económico (de Vos *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016).

El almidón es el principal polisacárido de reserva energética en plantas, esta molécula se sintetiza en distintos órganos vegetales, encontrándose en mayor cantidad en tubérculos, semillas, bulbos, frutos y raíces (Martin y Smith, 1995). Se organiza en partículas llamadas gránulos, las cuales pueden variar en tamaño (1  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ), forma (ovales, esféricas, poliédricas, redondas e irregulares), composición y en el porcentaje de sus componentes, de acuerdo a su origen botánico (Jane *et al.*, 1994; Martin y Smith, 1995; Tester *et al.*, 2004).

El mayor porcentaje, aproximadamente del 98 - 99 %, del peso seco de estos gránulos está dado por la amilosa y la amilopectina. El resto lo pueden integrar algunos lípidos (~1 %) como triglicéridos y glucolípidos que se pueden adherir a la superficie de la amilosa; proteínas (~0.25 %) de almacenamiento o enzimas de biosíntesis o de degradación, y minerales (<0.4 %) como el calcio, potasio, magnesio y sodio; además en algunas fuentes botánicas el fósforo es un componente importante del almidón (~0.048 %) (Tester *et al.*, 2004; Vandeputte y Delcour, 2004).

La amilosa es un polímero conformado por unidades de D-Glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) lo que le da una estructura lineal y con pocas ramificaciones al tener enlaces  $\alpha$ -(1,6), es el componente menor del almidón comprendiendo entre el 15 y el 35 % de su composición (Vamadevan y Bertoft, 2015).

Por otro lado, la amilopectina es una molécula ramificada, debido a dichas ramificaciones que se pueden encontrar en la molécula, las cadenas de este polímero se han clasificado en cadenas tipo A, B y C. Las cadenas tipo A son aquellas que no sostienen a otras cadenas por medio de enlaces  $\alpha$ -(1,6), las cadenas tipo B son aquellas que llevan otras cadenas por medio de las ramificaciones producidas por los enlaces  $\alpha$ -(1,6) y la cadena C es la única que contiene el azúcar reductor y de ésta derivan las ramificaciones (Tester *et al.*, 2004; Vamadevan y Bertoft, 2015).

Debido a su composición química y a la organización, una fracción del almidón es resistente a la degradación por  $\alpha$ -amilasa pancreática, pudiendo ser únicamente degradada por enzimas de bacterias colónicas por lo que su interés como material de pared aumenta para la obtención de cápsulas dirigidas para ser liberadas a nivel del colon. Las modificaciones por métodos físicos, químicos o enzimáticos han permitido incrementar la fracción de almidón resistente a la digestión enzimática y obtener almidones con propiedades fisicoquímicas, morfológicas y reológicas deseables (de Vos *et al.*, 2010; Lewicka *et al.*, 2015).

Las modificaciones químicas, como la oxidación, eterificación y esterificación son realizadas con la finalidad de mejorar la solubilidad, reducir la viscosidad, aumentar la hidrofobicidad, mejorar su termoplasticidad, etc. (Lewicka *et al.*, 2015). Las modificaciones físicas, consisten en realizar alguna reorganización estructural de los gránulos, y con ello cambiar sus propiedades fisicoquímicas, estas son realizadas generalmente con tratamientos hidrotérmicos o micronización (Kaur *et al.*, 2012). Las modificaciones genéticas se realizan desde la planta, dirigiendo cambios en las enzimas de la ruta biosintética del almidón mediante técnicas tradicionales o de biotecnología (Kaur *et al.*, 2012); y por último las enzimáticas, en las que los componentes del almidón se ven afectados estructuralmente por acción de enzimas amilolíticas.

El almidón poroso es uno de los productos de las modificaciones que ha tenido un interés en los últimos años. Los poros obtenidos pueden tener diámetros de 1  $\mu\text{m}$  y llegar a presentar la mitad del volumen total del gránulo; estos poros se producen de la superficie hasta el centro del gránulo. La principal propiedad de los almidones porosos es su gran capacidad de adsorción en comparación con el nativo (Zhang *et al.*, 2012).

Los almidones porosos se han utilizado como materiales de encapsulación, dentro de los cuales se pueden alojar aceites, compuestos bioactivos o probióticos que pueden llegar a interactuar con los componentes del almidón y de esta forma quedar alojados dentro de la estructura granular, protegiendo de las condiciones ambientales y gastrointestinales, logrando una mejor estabilidad haciendo uso de

algún método, principalmente físico, de encapsulación (Li *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 2018; Qi y Tester, 2019)

La obtención de almidón poroso puede ser mediante modificaciones químicas, físicas o enzimáticas, siendo las últimas las más utilizadas (Lei *et al.*, 2018). La fuente botánica de almidón más común para la obtención de almidón poroso es el maíz debido a que el gránulo presenta canales de forma nativa que se amplían con el tratamiento enzimático (Fannon *et al.*, 2003).

### **2.2.3 Modificación enzimática**

La modificación enzimática consiste en hidrolizar el almidón mediante la acción de enzimas, comúnmente amilasas y amiloglucosidasas para la obtención de dextrinas y glucosa (Robyt, 2009). Estas modificaciones provocan diferentes distribuciones del peso molecular de las moléculas de almidón y diferentes longitudes de cadena, con esto se ven afectadas propiedades, como la viscosidad y la textura (Hong *et al.*, 2016). En los últimos años, se han propuesto más enzimas para la modificación del almidón, como amilomaltasas para la formación de geles termorreversibles o ciclomaltodextrinasa para la obtención de almidones bajos en amilosa (Kaur *et al.*, 2012).

#### **2.2.3.1 Almidón poroso**

El almidón poroso se ha utilizado como un agente de recubrimiento, el cual es obtenido mediante la hidrólisis enzimática con glucoamilasa del almidón ceroso de maíz nativo, con lo que se genera un gránulo con alta porosidad sin afectar su estructura granular (Jin *et al.*, 2017).

El almidón poroso no es obtenido con cualquier fuente de almidón, comúnmente se utiliza almidón de maíz debido a que en su estado nativo contiene pequeños poros en la superficie del gránulo, los cuales es posible ampliar mediante hidrólisis enzimática (Jin *et al.*, 2017).

La alta capacidad de absorción es la principal característica de los almidones porosos. Las enzimas utilizadas tienen un efecto sobre la capacidad de adsorción

además del grado de hidrólisis, aunque las enzimas utilizadas sean amilolíticas, tienen mecanismos de acción diferentes (Zhang *et al.*, 2012).

Con el uso de enzimas hidrolíticas como  $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo y amiloglucosidasa, se obtienen gránulos de almidón con poros, cuyo tamaño puede aumentar dependiendo del tiempo de hidrólisis hasta llegar a fraccionar el gránulo. Las partes semicristalinas y amorfas del almidón son hidrolizadas simultáneamente, con esto las propiedades térmicas y estructurales pueden llegar a ser muy similares a las del nativo, sin embargo, los factores implicados en el proceso determinan las características de los almidones obtenidos. Por otro lado, los contenidos de almidón resistente pueden disminuir, el de lenta digestión permanecer sin cambios, y aumentar el almidón de rápida digestión (Miao *et al.*, 2011). Algunas de las condiciones ya utilizadas para la obtención de almidón poroso mediante modificación enzimática se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3.** Tipo de enzima y tiempos de hidrólisis utilizados para la obtención de almidón poroso.

<b>Enzima utilizada</b>	<b>Tiempo de hidrólisis</b>	<b>Referencia</b>
$\alpha$ -amilasa de <i>Aspergillus kawachi</i> y glucoamilasa de <i>Aspergillus niger</i>	24 h	Uthumporn <i>et al.</i> , 2010
$\alpha$ -amilasa pancreática porcina tipo VI-B y amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i>	0.33, 0.66, 1.33 y 2 h	Miao <i>et al.</i> , 2011
$\alpha$ -amilasa y glucoamilasa	12 h	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i> .	0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h,	Chen y Zhang, 2012
$\alpha$ -amilasa fúngica y amiloglucosidasa	24 h	Dura <i>et al.</i> , 2014
Amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i> y $\alpha$ -amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	4 h	Wang <i>et al.</i> , 2016
Amiloglucosidasa, $\alpha$ -amilasa fúngica, ciclodextrina-glicosiltransferasa y enzima ramificante. **A diferentes concentraciones	2 h	Benavent-Gil y Rosell, 2017
Glucoamilasa de <i>Aspergillus niger</i> , $\beta$ -amilasa de cebada y $\alpha$ -amilasa de <i>Bacillus lichemiformis</i>	2, 4 y 8 h	Jung <i>et al.</i> , 2017
$\alpha$ -amilasa y glucoamilasa	8,10, 12 y 14 h	Lei <i>et al.</i> , 2018

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los probióticos tienen múltiples beneficios a la salud del consumidor, sin embargo, la mayoría de estos son susceptibles a factores ambientales y a las condiciones gastrointestinales, en las que su viabilidad se ve altamente reducida. Es por ello que se busca protegerlos por medio de la encapsulación, además de controlar la liberación de dichos microorganismos a nivel colon, para lo cual, existen diversidad de materiales y técnicas de encapsulación, los cuales influyen en la calidad del producto final.

Una de las desventajas de los materiales generalmente utilizados en la encapsulación es su costo, la mayoría de estos son caros debido a su baja disponibilidad en la naturaleza. El almidón debido a que es el principal polisacárido de reserva energética en plantas, presenta ciertas ventajas en relación con otros materiales al ser económico y altamente disponible; además, de que su estructura y propiedades funcionales que dependen de la fuente botánica pueden ser modificadas para mejorar sus características fisicoquímicas y estructurales. Uno de los productos de las modificaciones es el almidón poroso, cuya estructura promete otorgar una mejor protección a bacterias.

Por otro lado, la mayoría de los métodos de encapsulación generan productos con un alto contenido de humedad, los cuales suelen ser inestables microbiológica y fisicoquímicamente. Los métodos de encapsulación con los que se obtienen polvos con una baja humedad, son la liofilización y el secado por aspersion. A pesar de que los polvos suelen ser altamente estables microbiológica y fisicoquímicamente, las condiciones de operación de estos métodos conllevan etapas críticas que pueden influir en la integridad física de las bacterias, llevando a la muerte celular.

Por lo que se pretende evaluar el uso de liofilización y secado por aspersion como técnicas en la encapsulación de probióticos utilizando como material de pared almidón poroso obtenido mediante una modificación enzimática sobre la resistencia en condiciones gastrointestinales y su estabilidad fisicoquímica.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. General**

Evaluar la liofilización y el secado por aspersion, como métodos de encapsulación de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* utilizando como material de pared almidón poroso de maíz (*Zea mays*).

### **4.2. Específicos**

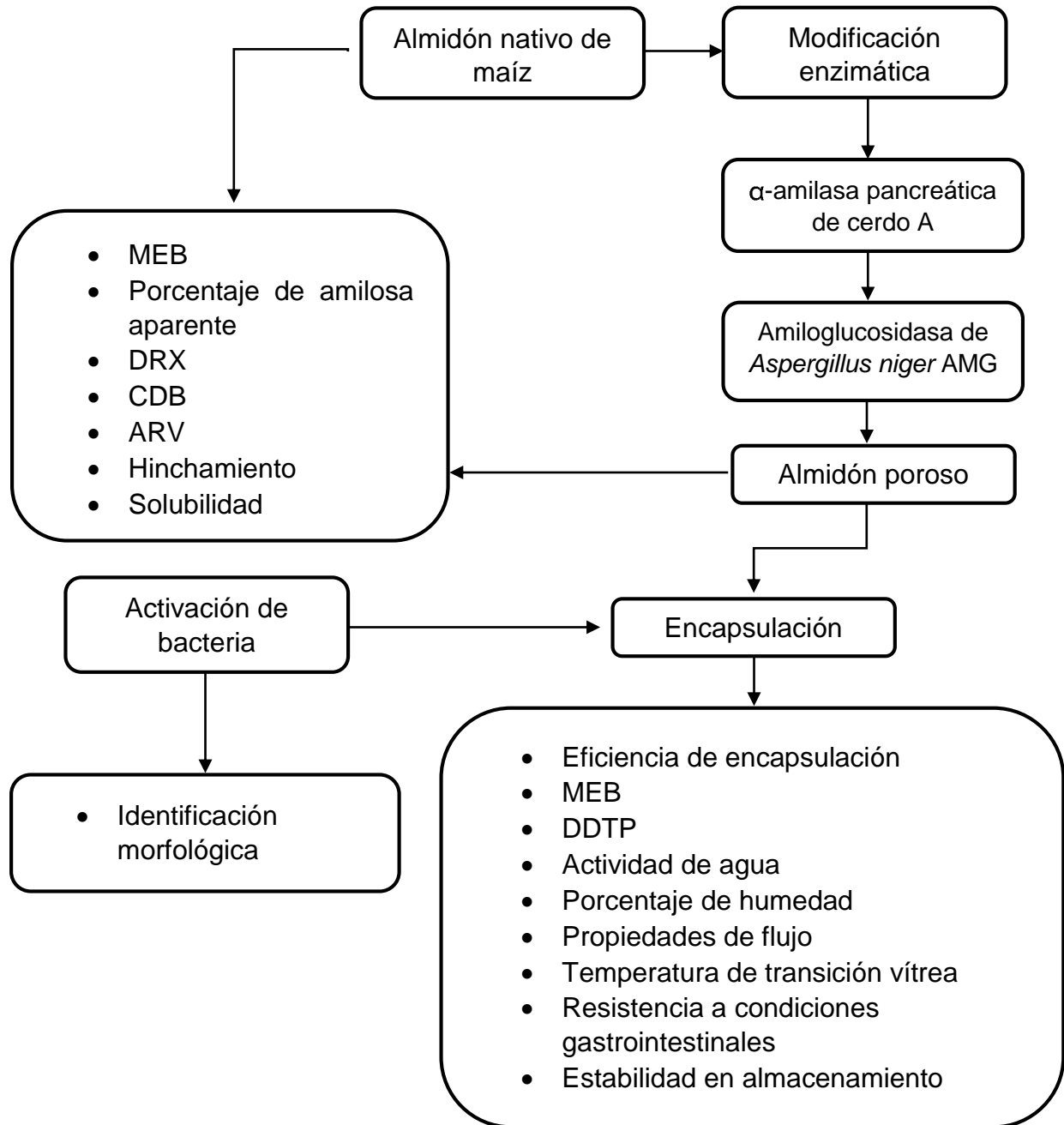
- Evaluar diferentes condiciones de hidrólisis enzimática para la obtención de un almidón poroso.
- Evaluar el uso de almidón poroso sobre la eficiencia de encapsulación en secado por aspersion.
- Evaluar el efecto de la encapsulación por liofilización y secado por aspersion sobre las características morfológicas, fisicoquímicas y estabilidad de los encapsulados con almidón poroso.

## **5. HIPÓTESIS**

El método de encapsulación influirá sobre la viabilidad y estabilidad de los probióticos encapsulados.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos planteados se siguió la siguiente estrategia experimental, en la que se inició con almidón de maíz comercial.



**Esquema 1.** Estrategia experimental.

### 6.1. Materiales

Se utilizó un cultivo liofilizado de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC-81 obtenido de Danisco (Kunshan, China). Ambas enzimas,  $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo (Sigma-Aldrich, A6255) y amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Supelco, A9913), fueron adquiridas de Merck-KGaA (Darmstadt, Alemania). Las enzimas se utilizaron para la modificación de almidón de maíz (Reactivos Química Meyer; Ciudad de México, México).

El citrato de sodio y el cloruro de sodio fueron adquiridos de Reactivos Química Meyer (Ciudad de México, México). El caldo y el agar Man Rogosa y Sharpe (MRS) utilizados para el cultivo de las bacterias se obtuvieron de DIBICO (Edo. Méx, México). El buffer de fosfato salino (Sigma-Aldrich, P5493) y el kit de tinción de Gram (HYCEL, 541, 301291) se adquirieron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y Reactivos Química Meyer (Jalisco, México), respectivamente. La pancreatina pancreática de cerdo (Sigma-Aldrich, P1750) y la pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich, P7000), fueron adquiridas de Merck-KGaA (Darmstadt, Alemania). El agua utilizada en todos los experimentos de secado fue agua ultrapura Milli-Q (Millipore, Billerica, USA), utilizando agua destilada en el resto de los experimentos.

### 6.2. Modificación enzimática del almidón de maíz

Se realizó una hidrólisis enzimática en dos etapas. La concentración de enzima utilizada se determinó de acuerdo con lo obtenido y realizado por Dura *et al.* (2014), Li *et al.* (2016) y Benavent Gil y Rosell (2017).

Para la primera etapa se preparó una solución (25 % p/v) de almidón de maíz y buffer de fosfato de sodio (20 mM, pH 6) y  $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo (15 U/g de almidón) manteniéndose en agitación durante 2, 4, 6 y 8 h a 38 °C en baño maría; transcurrido los tiempos correspondientes, se añadieron 50 mL de etanol para detener la actividad enzimática y posteriormente se transfirió la solución a tubos de centrifuga de 50 mL para posteriormente centrifugarlos (Heraus Megafuge, 16R; Walthman, USA) durante 15 min a 1176 x g, se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol 90 % y uno con agua destilada, se transfirió el pellet a

charolas de aluminio para secar durante 16 h a 50 °C en un horno de convección (BINDER, FD23, Alemania) y posteriormente se molió y se almacenó en recipientes completamente sellados manteniéndose a temperatura ambiente (25 °C) para su análisis y uso posterior.

De acuerdo a las morfologías obtenidas de la primera etapa, se llevó a cabo una segunda hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (19.95 U/g de almidón) en una dispersión (25 % p/v) del almidón de maíz previamente hidrolizado, por 2 y 8 h con  $\alpha$ -amilasa, y buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 4.2) manteniéndose en agitación en baño maría a 50 °C, durante 8, 12 y 16 h, transcurrido el tiempo se detuvo la hidrólisis, se realizaron lavados y se secó como se especifica anteriormente.

Debido a las morfologías obtenidas se optó por realizar una modificación evaluando el efecto sobre las propiedades funcionales del almidón de maíz con una hidrólisis previa con  $\alpha$ -amilasa durante 2, 4 y 6 h para posteriormente una hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h. Las modificaciones se realizaron por duplicado.

### **6.3. Caracterización morfológica, fisicoquímica y molecular del almidón nativo y modificado**

#### **6.3.1 Visualización por Microscopía Electrónica de Barrido**

Con la finalidad de determinar la morfología del almidón nativo y de corroborar la formación de poros en los gránulos del almidón modificado enzimáticamente, se utilizó MEB, siguiendo la metodología descrita por Benavent-Gil y Rosell (2017). Las muestras se espolvorearon sobre un soporte de aluminio con cinta conductora de cobre de doble adhesión, posteriormente con la ayuda de un ionizador de metales (JEOL, Japón) se cubrieron con una capa de oro. Las muestras se observaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM-5800LV, Japón) a un voltaje de 15 kV y una amplificación de 1000X, 2000X y 3500X. Las imágenes obtenidas se analizaron con la ayuda del software Image J1 (Versión 1.52a USA) realizando las medidas de diámetro de los poros generados en los almidones modificados y la frecuencia de estos para posteriormente analizarlos estadísticamente.

### 6.3.2 Contenido de amilosa aparente

Dependiendo de la fuente botánica y de factores geográficos, los almidones pueden estar compuestos con diferentes porcentajes de amilosa, la cual puede variar después de un proceso de modificación dependiendo del método utilizado.

La determinación se realizó de acuerdo al método descrito por Hoover y Ratnayake (2002). Se pesaron 20 mg de almidón en base seca y se disolvieron en 8 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (90 %) en tubos de ensayo con tapa rosca, se agitaron vigorosamente con ayuda de un vortex durante 20 min, posteriormente se colocaron en baño maría a 85 °C con agitación con vortex intermitente durante 15 min. La solución se transfirió a un matraz aforado de 25 mL y con agua destilada se ajustó el volumen. Se transfirió 1 mL de la dilución a un matraz aforado de 50 mL, se agregaron 40 mL de agua destilada y 5 mL de solución I<sub>2</sub>/KI (0.0025 M I<sub>2</sub> y 0.0065 M KI) para finalmente aforar con agua destilada. Se dejó reposar durante 15 min antes de leer la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-VIS, USA).

Para la curva estándar se prepararon soluciones de amilosa y amilopectina (1 mg/mL) tratadas del mismo modo que la muestra. Se transfirió un 1 mL de estas soluciones en diferentes relaciones de amilosa-amilopectina (0 - 100 %) en matraces de 50 mL y se continuó del mismo modo que las muestras. El contenido de amilosa aparente de las muestras se obtuvo mediante interpolación.

### 6.3.3 Difracción de Rayos X

Para determinar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre la estructura del almidón nativo de maíz, se realizó DRX, teniendo en cuenta que el almidón es un material semicristalino que puede presentar uno de los tres patrones de difracción dependiendo su naturaleza botánica (Biliaderis, 1991).

Las muestras se analizaron con un difractómetro de rayos X (Bruker Axs, D8 Advance, USA), la región de barrido fue desde  $2\theta = 5^\circ$  a  $2\theta = 60^\circ$  con un tamaño de paso de  $0.008^\circ$  con un tiempo de conteo de 5 s; el equipo se operó a 40 kV y 30

mA (Aparicio-Saguilan *et al.*, 2006). El porcentaje de cristalinidad relativa se determinó de acuerdo a la fórmula (ec.1) empleada por Hulleman *et al.* (1999).

$$\text{Cristalinidad (\%)} = \frac{\text{área cristalina dispersada}}{\text{área total dispersada}} \times 100$$

**Ec. 1**

#### **6.3.4 Calorimetría diferencial de barrido**

Las propiedades térmicas dependen de la estructura molecular del almidón, por lo que un cambio en las propiedades térmicas después de la modificación enzimática corrobora un cambio en estructura de alguno de sus componentes (Bertoft *et al.*, 2016).

Las propiedades térmicas se obtuvieron utilizando un calorímetro diferencial de barrido (TA Instruments, Discovery DSC250, USA) calibrado con indio. Se pesaron muestras de 2 mg en una charola de aluminio, se agregaron 7  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se sellaron herméticamente. Se dejó hidratar completamente durante 30 min. La muestra se sometió a un programa de calentamiento desde 30 °C hasta 120 °C con un aumento de 10 °C/ min. Se utilizó una charola vacía como referencia y se realizó por duplicado. La temperatura y entalpía de gelatinización se obtuvieron con la ayuda del software TA Universal Analysis (Paredes-López *et al.*, 1994).

#### **6.3.5 Análisis Rápido de Viscosidad**

El perfil de viscosidad del almidón nativo y de los modificados se determinó con un analizador rápido de viscosidad (Perten, RVA 4800, Suecia). En el contenedor de aluminio para muestra se pesaron 2.93 g de almidón y 25.07 g de agua destilada. Se llevó a un ciclo de calentamiento-enfriamiento, empezando con un aumento de 50 °C hasta 90 °C y posteriormente un enfriamiento hasta 50 °C con un aumento de temperatura de 8 °C/min y una velocidad de 160 rpm (Carlos-Amaya *et al.*, 2011).

### 6.3.6 Poder de hinchamiento y solubilidad

Para determinar el poder de hinchamiento y el porcentaje de solubilidad se siguió la metodología descrita por Hedayati y Niakousari (2018). Se preparó una dispersión al 1 % p/v, pesando 0.1 g de almidón en tubos de centrifuga de 50 mL y se añadieron 10 mL de agua destilada. Los tubos se mantuvieron en baño maría durante 30 min a 30, 50, 70 y 90 °C con agitación constante con la ayuda de un agitador magnético; transcurrido el tiempo se retiró de la temperatura y se enfrió a temperatura ambiente a baño de hielo. Los tubos se centrifugaron durante 30 min a 1176 x g, el sobrenadante fue recolectado en charolas de aluminio previamente puestas a peso constante, se secaron a 120 °C durante 4 h y transcurrido el tiempo se pesó. El sedimento del tubo se pesó para posteriormente realizar los cálculos correspondientes (ec. 2 y 3) (Hedayati y Niakousari, 2018; Zeng *et al.*, 2018).

$$\% \text{ de solubilidad} = \frac{\text{Peso del sobrenadante seco}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

**Ec. 2**

$$\text{Poder de hinchamiento} = \frac{\text{Peso del sedimento}}{\text{Peso de la muestra} - \text{Peso del sobrenadante seco}}$$

**Ec. 3**

### 6.4. Activación de la cepa bacteriana

Se utilizó una cepa liofilizada de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. Se tomaron 2 asadas de la bacteria liofilizada y se transfirieron a caldo MRS, posteriormente se sembró en agar MRS, incubando durante 24 h a 37 °C para la caracterización macroscópica y microscópica de las colonias.

Para la crioconservación de la cepa, se tomaron dos colonias de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* obtenidas del crecimiento en agar y se inocularon en 10 mL de caldo MRS estéril dejando incubar a 37 °C durante 24 h. Lo obtenido de este

cultivo se crioconservó en crio viales estériles en los que se añadieron 500 µL de glicerol y 500 µL del cultivo bacteriano para su uso en pruebas posteriores y producción de biomasa para la encapsulación.

#### **6.4.1 Tinción de Gram**

Para una caracterización microscópica y general de la cepa, se realizó una tinción de Gram de acuerdo a lo señalado por el kit de tinción. Se realizó un frotis de la bacteria a partir de las colonias en medio sólido, se añadió violeta de genciana y se dejó reposar durante 1 min, transcurrido el tiempo se enjuagó con agua destilada y se cubrió la muestra con lugol dejando 1 min y se enjuagó con agua destilada. Se realizó un lavado con una solución etanol/acetona para retirar el colorante, se enjuagó con agua y finalmente se le colocó safranina durante 1 min y se enjuagó nuevamente con agua destilada, se dejó secar a temperatura ambiente y se observó al microscopio.

#### **6.4.2 Prueba de catalasa**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se caracterizan por generar peróxido de hidrógeno, por lo que se consideran catalasa negativa (Ortiz-Balderas, 2006). La prueba se realizó en un portaobjetos en el cual se colocó una colonia bacteriana y se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las bacterias capaces de sintetizar catalasa hidrolizan el peróxido en forma de agua y de oxígeno, el cual se observa en forma de burbujas, por lo tanto, la prueba se considera positiva en presencia de éstas, por el contrario, se determina como catalasa negativa (Bou *et al.*, 2011).

#### **6.5. Resistencia térmica de *L. paracasei* subsp. *paracasei***

Para determinar la susceptibilidad de las bacterias a altas temperaturas, se realizó la metodología descrita por Nunes *et al.* (2018) con ligeras modificaciones como se describe a continuación.

Se cultivó *L. paracasei* subsp. *paracasei* en caldo MRS hasta su etapa crecimiento exponencial, se realizó un lavado de las células con buffer PBS por medio de centrifugación a 2305 x g / 10 min y se resuspendieron en buffer PBS realizando el

ajuste en la concentración bacteriana con el patrón de McFarland (0.5). Se transfirió 1 mL de cultivo bacteriano ajustado a viales estériles, posteriormente se sometieron durante 15 min a distintas temperaturas (36, 50, 60 y 70 °C) en baño maría, la temperatura se monitoreo teniendo un vial con buffer PBS. Transcurrido el tiempo de exposición al calor, los viales se enfriaron a temperatura ambiente con un baño de hielo, durante 3 min. Finalmente se realizó el conteo de UFC/mL en agar MRS, haciendo previamente las diluciones pertinentes con solución de NaCl (0.9 % p/v) para contabilizar de 15 a 300 UFC en placa, y se calculó la pérdida de viabilidad (ec. 4).

$$\text{Pérdida de viabilidad (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{Viabilidad inicial (Log UFC/mL)}}{\text{Viabilidad final (Log UFC/mL)}} \times 100 \right)$$

#### Ec. 4

Donde la viabilidad inicial son las células viables sin someterse a altas temperaturas (38 °C) y la viabilidad final, las células viables una vez al realizar el tratamiento.

### 6.6. Obtención de biomasa para la encapsulación

Se tomaron 100 µL de los cultivos crioconservados y se inoculó en 10 mL de caldo MRS, se dejaron incubar durante 24 h a 37 °C con agitación lenta de 65 rpm, transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 100 µL de este cultivo y se inocularon en 10 mL de caldo MRS dejando incubar a 37 °C durante 14 h para asegurar su máxima viabilidad (Alfaro-Galarza, 2019).

La biomasa se recuperó por medio de centrifugación a 2305 g / 10 min y se lavaron con solución de NaCl (0.9 % p/v) estéril, finalmente se resuspendieron en 1 mL y se mantuvieron en refrigeración (4 - 8 °C) hasta su uso.

### 6.7. Obtención de microcápsulas

#### 6.7.1 Preparación de la mezcla de alimentación

Como materiales de soporte se utilizaron almidón nativo y almidón poroso obtenido de la modificación realizada. Además, se probó el uso de maltodextrina DE10 y almidón gelatinizado como materiales de recubrimiento, quedando los siguientes tratamientos:

- AN ----- Almidón nativo de maíz.
- AP ----- Almidón poroso.
- MD-AP -- Maltodextrina + almidón poroso.
- AG-AP--- Almidón gelatinizado + almidón poroso.

El cultivo probiótico obtenido conforme a lo descrito en la sección 6.4.4 se añadió directamente a la mezcla de almidón poroso (20 % p/v de sólidos totales de acuerdo a los tratamientos propuestos). La mezcla se mantuvo en agitación en una placa de calentamiento (Thermo Scientific, Cimarec SP88857100; Ohio, USA) durante 30 min a 600 rpm a 30 °C. Para los tratamientos en los que se utilizaron materiales de recubrimiento, una vez que la mezcla con almidón poroso se homogenizó, se añadieron 0.25 g del material de recubrimiento (base seca) por cada g de almidón poroso utilizado. En el caso del almidón gelatinizado, este se preparó previamente calentando a 95 °C una suspensión de almidón al 3 % (p/v) durante 15 min manteniendo en agitación hasta la formación del gel, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente para poder ser adicionado a la suspensión de almidón poroso con el cultivo probiótico; mientras que la maltodextrina se añadió directamente a la suspensión, manteniendo un 20 % (p/v) de sólidos totales en todas las mezclas de alimentación. Una vez adicionado el material de recubrimiento, la mezcla se homogenizó completamente (600 rpm, 30 °C, 15 min) para posteriormente realizar el secado por aspersion o la liofilización. Las mezclas de alimentación se realizaron el mismo día del proceso de encapsulación.

### **6.7.2 Encapsulación mediante secado por aspersion**

Para el secado por aspersion se utilizó un secador por aspersion a escala laboratorio (Büchi B-290; Flawil, Switzerland). Se utilizaron una boquilla con diámetro estándar de 0.7 mm y un tapón de rosca con un diámetro de 1.5 mm. El secador Büchi B-290 trabajó con un deshumidificador (Büchi B-296; Flawil, Switzerland). El gas de secado utilizado fue aire (Humedad relativa 30 %). En todos los secados realizados el flujo de aire fue de 538 L/h (de acuerdo a las

especificaciones del fabricante, 35 mm sobre el rotámetro) y con una presión de atomización de  $6 \times 10^5$  Pa. La tasa de aspiración se mantuvo a 100 % en su capacidad de operación ( $35 \text{ m}^3/\text{h}$  de acuerdo a las especificaciones del fabricante y considerando un filtro de aire limpio).

Previamente al proceso de secado, cada elemento del secador por aspersion se limpió completamente con una solución de etanol (96 % v/v) y una vez armado el equipo se alimentó con agua ultrapura caliente para asegurar que todos los conductos estuviesen completamente limpios y así evitar contaminación de la suspensión de alimentación. Antes de alimentar el equipo con la suspensión para la encapsulación se estabilizaron las condiciones de operación del equipo.

La temperatura de entrada ( $T_{\text{entrada}}$ ) se mantuvo a  $140 \text{ }^\circ\text{C}$  mientras que la temperatura de salida ( $T_{\text{salida}}$ ) se mantuvo a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  controlando el flujo de alimentación. Posteriormente la mezcla se alimentó con la ayuda de una bomba peristáltica. Finalmente, los polvos obtenidos se recolectaron en bolsas de poliuretano selladas perfectamente y almacenadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  para su uso posterior. El rendimiento fue calculado con de acuerdo con la ecuación 5. Este procedimiento se realizó por duplicado para todos los tratamientos establecidos.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Producto obtenido (g)}}{\text{Sólidos alimentados (g)}}$$

**Ec. 5**

### **6.7.1 Obtención de cápsulas mediante liofilización**

Un método de encapsulación utilizado fue liofilización, para el cual se siguió la metodología descrita por Benavent-Gil *et al.* (2018) con una ligera modificación.

Se utilizó una liofilizadora (LABCONCO, Freezone 2.5). Antes de utilizarla se limpió completamente con una solución de etanol (70 % v/v), una vez completamente limpia se llevó a la estabilidad necesaria para posteriormente colocar las mezclas de alimentación previamente congeladas a  $-72 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 16 h.

Las mezclas se liofilizaron durante 30 h. Transcurrido el tiempo de operación, los polvos obtenidos se recolectaron en bolsas estériles y herméticas (Whirl-Pak, Deltalab, 200349) para su almacenamiento. Se mantuvieron a 4 °C para su almacenamiento.

### **6.8. Eficiencia de encapsulación**

Para determinar la eficiencia de encapsulación se contabilizaron los Log UFC antes y después de los procesos de encapsulación.

Para determinar los Log UFC antes de los procesos, se apartaron 300 µL de la solución descrita en el apartado 6.6 para realizar sembrado en placa. En tres viales estériles se colocaron 100 µL de la suspensión y se añadieron 900 µL de buffer PBS, se mezcló completamente con ayuda de vortex para posteriormente realizar diluciones decimales seriadas con buffer PBS, las diluciones se sembraron por duplicado y se dejaron incubar a 37 °C durante 48 h para finalmente realizar el conteo de las UFC, este procedimiento se realizó por duplicado.

Para determinar los Log UFC después de los procesos de encapsulación se siguió la metodología reportada por Benavent-Gil *et al.* (2018). Se pesaron 100 mg de las microcápsulas en viales estériles añadiendo 1 mg de pancreatina y 900 µL de buffer PBS. Se mezclaron completamente durante 2 min en vortex y posteriormente se llevaron a incubar durante 15 min a 37 °C manteniendo en agitación a 210 rpm, posteriormente se realizaron diluciones seriadas siguiendo la metodología anteriormente mencionada. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se enumeraron y registraron aquellas placas en las que se observaron de 15 a 300 colonias (Ding y Shah, 2007).

Para homogenizar las unidades de medida se tomaron en cuenta la cantidad de sólidos tanto en la solución de alimentación, como en las microcápsulas finales. Para obtener el porcentaje de la eficiencia de encapsulación (ec. 6) (Stefanello *et al.*, 2019).

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Células viables en microcápsulas}}{\text{Células viables antes de encapsulación}} \times 100$$

Ec. 6

## 6.9. Caracterización morfológica de microcápsulas

### 6.9.1 Microscopía Electrónica de Barrido

Para determinar la morfología de las microcápsulas obtenidas, las muestras se observaron siguiendo la metodología descrita en la sección 6.3.1.

### 6.9.2 Distribución de tamaño de partícula

Con la finalidad de conocer el tamaño de las microcápsulas obtenidas y verificar que se encuentren catalogadas como microcápsulas, se realizó distribución de tamaño de partícula en dispersión húmeda. Se utilizó un analizador de tamaño de partícula con una tecnología de difracción láser (Mastersizer 3000, Malvern) y un dispersador para líquidos (Hydro EV, Malvern), utilizando agua como solvente de medición. Las lecturas se realizaron en un intervalo de nivel de obscuración de 2-20 % utilizando sonicación al 30 % para separar aquellas partículas que por el método de encapsulación se hayan agrupado.

## 6.10. Caracterización fisicoquímica de microcápsulas

### 6.10.1 Humedad

El contenido de humedad, es decir, la cantidad de agua presente en la muestra, se determinó de acuerdo al método 925.25 de la AOAC. Se prepararon charolas de aluminio a peso constante para posteriormente pesar 0.5 g de muestra en estas. Las muestras colocaron en una estufa a 90 °C durante 3 h, una vez transcurrido el tiempo se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron, para posteriormente calcular el contenido de humedad (ec. 7).

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

Ec. 7

### 6.10.2 Actividad de agua

La actividad de agua ( $a_w$ ) es una característica determinante en la estabilidad de las microcápsulas, para determinarla se utilizó un medidor de  $a_w$  (Aqualab, 3TE, Decagon Devices). Se colocó la muestra en la charola con la cantidad suficiente para cubrir la superficie de la charola. El equipo fue previamente calibrado para posteriormente realizar la medición de la muestra y finalmente se registró el valor de  $a_w$  a 25 °C. (Fritzen-Freire *et al.*, 2012).

### 6.10.3 Propiedades de flujo

Para evaluar las propiedades de flujo se determinaron la densidad a granel, la densidad compactada, la relación de Hausner y en índice de Carr. La densidad se determinó mediante un método de volumen aparente utilizando una probeta graduada, como lo describen Tze *et al.* (2012), con la que fuese posible registrar el volumen utilizado por las microcápsulas, posteriormente se registró el peso. La densidad a granel se calculó de acuerdo con la ecuación 8.

$$\text{Densidad a granel } (\rho_B) = \frac{\text{Peso de la muestra}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

**Ec.8**

Para determinar la densidad compactada se realizó una compactación mecánica dejando caer la probeta a una superficie amortiguadora pero firme hasta encontrar un volumen constante el cual se registró como volumen final, para posteriormente utilizar la ecuación 9.

$$\text{Densidad compactada } (\rho_\tau) = \frac{\text{Peso de la muestra}}{\text{Volumen final}}$$

**Ec. 9**

La relación de Hausner y el índice de Carr están relacionados con la fluidez y con la compresibilidad de los materiales, respectivamente. Estos se calcularon mediante las ecuaciones 10 y 11.

$$\text{Relación de Hausner (HR)} = \frac{\rho_{\tau}}{\rho_B}$$

Ec. 10

$$\text{Índice de Carr (CI)} = 100 \times \frac{\rho_{\tau} - \rho_B}{\rho_{\tau}}$$

Ec. 11

Finalmente, las propiedades de flujo se describieron de acuerdo a los valores establecidos por FEUM (2016) (tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de propiedades de flujo de acuerdo al índice de Carr y al índice de Hausner.

Índice de Carr	Propiedades de flujo	Índice de Hausner
5 a 11	Excelentes	1.00 a 1.11
12 a 17	Buenas	1.12 a 1.18
18 a 22	Aceptables	1.19 a 1.34
26 a 31	Pobres	1.35 a 1.45
35 a 38	Muy pobres	1.46 a 1.59
>38	Extremadamente malas	> 1.60

Obtenido de [farmacopea.org](http://farmacopea.org) (FEUM, 2016).

#### 6.10.4 Temperatura de transición vítrea

La temperatura de transición vítrea (Tg) se determinó utilizando un calorímetro diferencial de barrido (TA Instruments, Discovery DSC250, USA), de acuerdo a la metodología descrita por Simperler *et al.* (2006) con ligeras modificaciones. Se pesaron 2 mg de cada uno de los tratamientos en una charola de aluminio y se selló. Las muestras se sometieron a un programa de calentamiento hasta llegar a 150 °C con un incremento de temperatura de 10 °C/min y luego se enfriaron a la misma

velocidad hasta -10 °C. Posterior a este programa se llevaron a un segundo calentamiento hasta 150 °C con un incremento de 10 °C/min.

Se utilizó una charola de aluminio vacía como referencia. Los experimentos se realizaron bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min). La temperatura de transición vítrea (Tg), se obtuvo por medio del análisis realizado con la ayuda del software TRIOS TA Instruments. Los experimentos se realizaron por duplicado.

### **6.11. Resistencia a condiciones gástricas**

Los jugos gástricos simulados (JGS) se prepararon con una solución de NaCl (0.5 % p/v) ajustada a un pH de 2.0 con HCl (0.1 M), se esterilizó y posteriormente se resuspendió pepsina con una concentración de 3 g/L. Una vez obtenida la solución se resuspendió 1 g de microcápsulas o 1 mL de bacterias libres, ajustadas al 0.5 de McFarland, en 9 mL de JGS, se mezclaron completamente con la ayuda de un vortex y se incubaron a 37 °C ± 1 °C durante 120 min con una agitación de 100 rpm. La viabilidad se monitoreó al tiempo 0, 30, 60 y 120 min, se tomaron alícuotas de 1 mL a las que se les ajustó el pH a 7.0 con NaOH (0.1 M), se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembraron en placa en agar MRS. La pérdida de viabilidad se determinó comparando la cantidad de UFC inicial con las UFC después de 30, 60, 120 min (Brinques y Ayub, 2011). Determinando el porcentaje de pérdida de viabilidad de cada tiempo de monitoreado (tm) con la ecuación 12.

$$\text{Pérdida de viabilidad (\%)} = \frac{\text{Log UFC}_{\text{tiempo 0}} - \text{Log UFC}_{\text{tm}}}{\text{Log UFC}_{\text{tiempo 0}}} \times 100$$

**Ec. 12**

### **6.12. Resistencia a condiciones intestinales**

La simulación de jugos intestinales (JIS) se realizó a partir de una solución estéril de NaCl (0.5 % p/v) con 4.5 % de sales biliares ajustada a un pH de 8.0 con NaOH (0.1 M), se añadió pancreatina para obtener una concentración de 3 g/L. Una vez obtenida la solución, se resuspendió 1 g de microcápsulas o 1 mL de bacterias

libres, ajustadas al 0.5 de McFarland, en 9 mL de JIS, se mezclaron completamente con la ayuda de un vortex y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 8 h con agitación constante de 100 rpm. La viabilidad se monitoreó al tiempo 0, 2, 4 y 8 h, se tomaron alícuotas de 1 mL, se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembraron en placa en agar MRS. La pérdida de viabilidad se determinó comparando la cantidad de UFC inicial con las UFC después de los tiempos establecidos utilizando la ecuación 12 (Brinques y Ayub, 2011).

### 6.13. Pérdida de viabilidad durante el almacenamiento

Una vez realizado el proceso de encapsulación, las microcápsulas obtenidas fueron recolectadas en bolsas de poliuretano y se sellaron perfectamente. Se almacenaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 meses. La viabilidad de *L. paracasei subsp. paracasei* se determinó cada mes siguiendo la metodología descrita en la sección 6.8. La determinación de viabilidad se realizó por cuadruplicado.

### 6.14. Análisis estadístico

Para los experimentos de modificación del almidón se siguió un diseño factorial simple, posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y para determinar la diferencia entre tratamientos se compararon las medias por el ensayo de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los datos de crecimiento bacteriano fueron normalizados con el uso de  $\text{Log}_{10}$ . Los resultados se analizaron con ayuda del software Minitab (Versión 2018).

Para el análisis de datos del ensayo de estabilidad durante el almacenamiento a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la viabilidad ( $y_i$ ) se ajustó al siguiente modelo donde se incluyeron los términos lineales y los términos cuadráticos del tiempo:

$$y_i = \beta_{i0}Z_{i1} + \beta_{i0}Z_{i2} + \beta_{i0}Z_{i3} + \beta_{i0}Z_{i4} + \beta_{i0}Z_{i5} + \beta_{i0}Z_{i6} + \beta_{i1}X_{i1}Z_{i1} + \beta_{i2}X_{i1}^2Z_{i1} \\ + \beta_{i1}X_{i1}Z_{i2} + \beta_{i2}X_{i1}^2Z_{i2} + \beta_{i1}X_{i1}Z_{i3} + \beta_{i2}X_{i1}^2Z_{i3} + \beta_{i1}X_{i1}Z_{i4} \\ + \beta_{i2}X_{i1}^2Z_{i4} + \beta_{i1}X_{i1}Z_{i5} + \beta_{i2}X_{i1}^2Z_{i5} + \beta_{i1}X_{i1}Z_{i6} + \beta_{i2}X_{i1}^2Z_{i6}$$

**Ec. 13**

Donde  $y_i$  es la viabilidad (Log UFC/g) como variable de respuesta;  $\beta_{ij}$  son los coeficientes de regresión;  $X_i$  es la variable del tiempo, siendo  $X_i^2$  el término cuadrático del tiempo;  $Z_1 \dots Z_6$  son las variables Booleanas que definen los tratamientos evaluados: AN-SA ( $Z_1$ ), AP-SA ( $Z_2$ ), MD-AP-SA ( $Z_3$ ), AG-AP-SA ( $Z_4$ ), MD-AP-LF ( $Z_5$ ) y AG-AP-LF ( $Z_6$ ) (Ver términos de referencia de los códigos en sección 6.5.1.). Los  $\beta_{ij}$  se calcularon por regresión lineal y los términos significantes ( $p < 0.05$ ) en el modelo se determinaron por análisis de varianza multivariado (MANOVA), se utilizó el software estadístico Minitab (versión 2018) para este análisis.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Caracterización del almidón de maíz nativo y modificado

#### 7.1.1 Morfología de los gránulos de almidón mediante Microscopía Electrónica de Barrido

De acuerdo con lo observado mediante MEB los gránulos de almidón nativo (figura 1b) presentaron una morfología poligonal, observándose pequeños huecos en la superficie del gránulo, los cuales corresponden a los poros o canales característicos del almidón nativo de maíz (Huber y BeMiller, 2000), mismos que se pueden observar en almidones nativos de otras fuentes botánicas como sorgo y mijo (Fannon *et al.*, 2003).

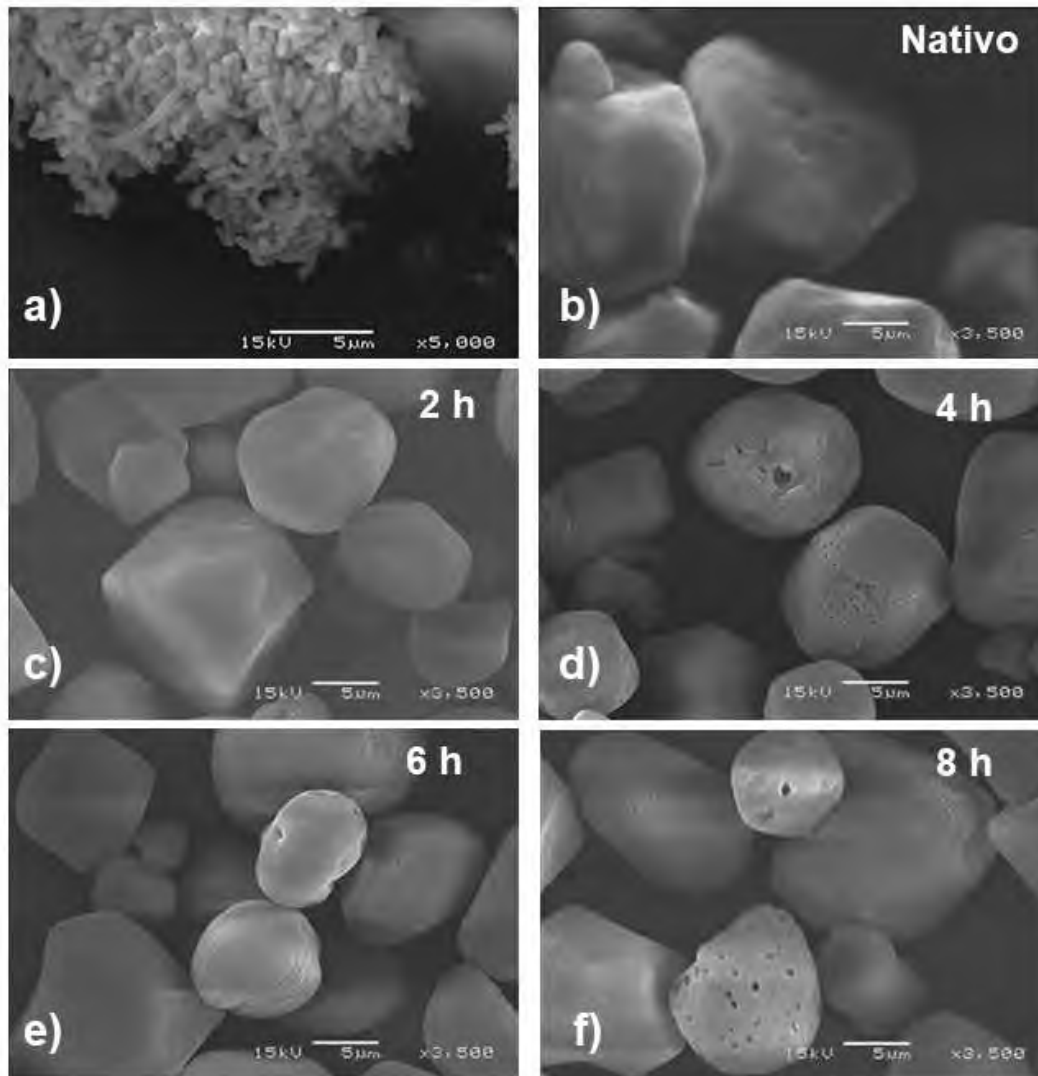
Con la hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa durante dos horas no se logró ampliar el diámetro de los poros en la mayoría de los gránulos (figura 1c), la superficie de estos se volvió más rugosa en comparación con la del gránulo de almidón nativo, lo que nos indica que la hidrólisis se ha realizado en la superficie del gránulo. Conforme los tiempos de hidrólisis aumentaron, la enzima hidrolizó una mayor cantidad de gránulos, a partir de las ocho horas se observó una ampliación de los canales en algunos gránulos (figura 1f) sin observarse profundidad en las porosidades. No obstante, los tamaños de poro obtenidos ( $0.34 \mu\text{m}$ ) (tabla 5) no fueron adecuados para la encapsulación de bacterias, debido a que de acuerdo a la literatura un bacilo comúnmente mide de  $5 - 8 \mu\text{m}$  de ancho por  $1.5 \mu\text{m}$  de largo, medidas que pueden ser distintas dependiendo de la especie utilizada (López y Torres, 2006). En el caso de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* se realizó la medición a partir de las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (figura 1a) encontrando un valor promedio de  $0.49 \mu\text{m}$  de ancho por  $1.36 \mu\text{m}$  de largo.

Las imágenes de los almidones hidrolizados con  $\alpha$ -amilasa durante 2, 4 y 6 muestran canales de tamaños muy similares, siendo la hidrólisis con 8 h en donde se observan los cambios más notorios sobre la superficie de los gránulos. Por lo que, para la segunda etapa se eligieron las muestras de 2 y 8 h. En esta segunda etapa se llevó a cabo la hidrólisis con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* durante

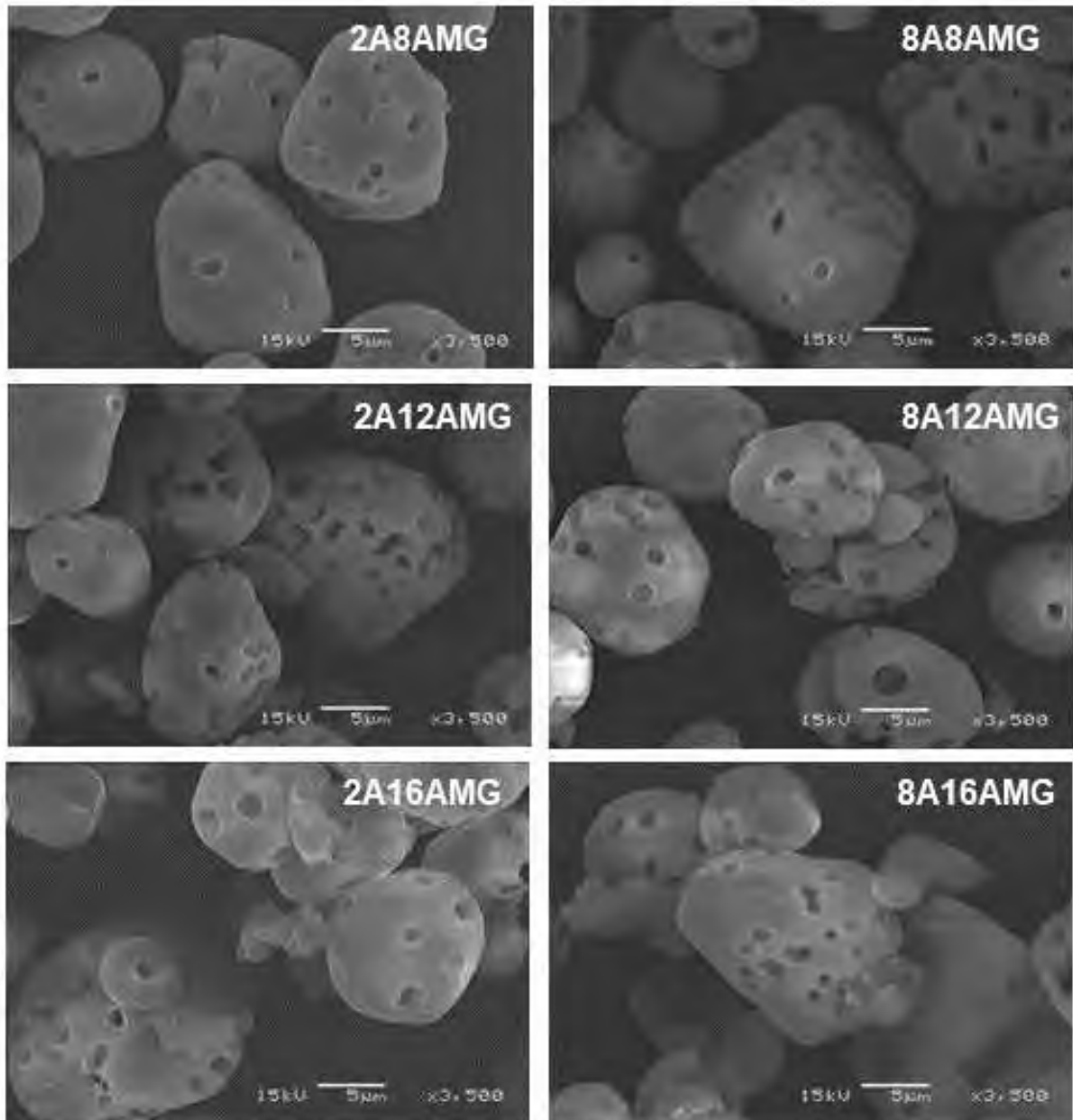
8, 12 y 16 h, con la cual se obtuvieron almidones porosos con un diámetro de poro de 1.117 - 1.562  $\mu\text{m}$  (tabla 6) y con una profundidad mayor (figura 2).

Los tiempos utilizados en la segunda etapa de hidrólisis enzimática tuvieron un efecto sobre el diámetro de poro generado, observando que el diámetro aumento conforme los tiempos fueron mayores (tabla 6). Por otro lado, la frecuencia de poros por cada gránulo fue afectada por los tiempos de hidrólisis enzimática con  $\alpha$ -amilasa (tabla 6), sin embargo, con la segunda etapa estas tendieron a ser significativamente iguales; aunque indirectamente se le podría atribuir el efecto dependiendo de los tiempos de hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa ( $p < 0.05$ ) aumentando la frecuencia de los poros con un tiempo de hidrólisis mayor.

Debido a que a las 16 h con amiloglucosidasa se observaron daños en la estructura granular del almidón se decidió trabajar con un tiempo de 12 h y determinar si los tiempos intermedios de hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa (2, 4 y 6 h) tenían un efecto sobre la morfología y las propiedades funcionales del almidón. En la figura 3 se observan los almidones porosos obtenidos. Los poros obtenidos tuvieron un diámetro promedio de 1.17  $\mu\text{m}$ , y una frecuencia de 17.8 poros/ gránulo sin existir diferencias entre los tiempos de hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa como se resume en la tabla 7.



**Figura 1.** (a) *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, (b) almidón de maíz nativo e hidrolizado con  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina durante (b) 2, (c) 4, (d) 6 y (e) 8 h.



**Figura 2.** Almidón poroso obtenido a partir de dos etapas de hidrólisis a diferentes tiempos. Primera etapa con  $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo (A) durante 2 y 8 h. Segunda etapa con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (AM) durante 8, 12 y 16 h.

**Tabla 5.** Características estructurales del almidón modificado con  $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo durante 2, 4, 6 y 8 horas.

Tiempo (horas)	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Frecuencia
2	$0.085 \pm 0.008^c$	$4.0 \pm 1.1^a$
4	$0.144 \pm 0.011^{bc}$	$6.0 \pm 2.1^a$
6	$0.202 \pm 0.038^b$	$8.0 \pm 2.1^a$
8	$0.250 \pm 0.027^a$	$7.0 \pm 1.8^a$

Promedio  $\pm$  error estándar n=10 (diámetro de poro) n=16 (frecuencia de poro). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 6.** Características estructurales del almidón modificado en dos etapas con diferentes tiempos en cada una.

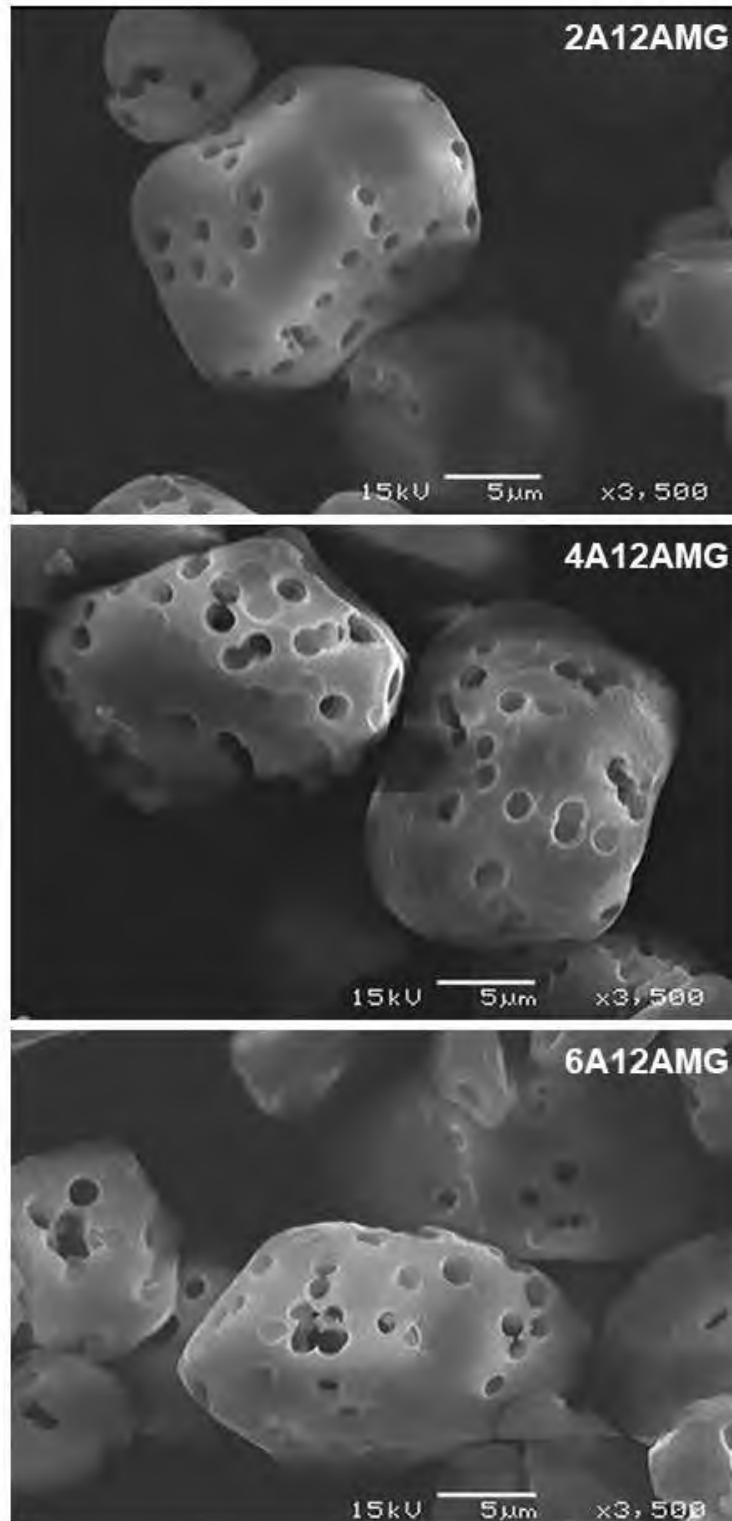
Tratamiento	Diámetro de poros ( $\mu\text{m}$ )	Frecuencia de poros
2A8AMG	$1.137 \pm 0.045^c$	$13.1 \pm 1.4^b$
2A12AMG	$1.202 \pm 0.053^{bc}$	$14.6 \pm 1.3^b$
2A16AMG	$1.562 \pm 0.052^a$	$14.6 \pm 1.1^b$
8A8AMG	$1.117 \pm 0.048^c$	$16.4 \pm 1.1^{ab}$
8A12AMG	$1.252 \pm 0.069^{bc}$	$21.0 \pm 1.5^a$
8A16AMG	$1.397 \pm 0.062^{ab}$	$17.7 \pm 1.5^{ab}$

A:  $\alpha$ -amilasa, AM: Amilogucosidasa. Hidrólisis con tiempos de 2, 8, 12 o 16 horas  
Promedio  $\pm$  error estándar n=10 (diámetro de poro) n=16 (frecuencia de poro). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 7.** Características morfológicas del almidón modificado con diferentes tiempos de hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa.

Tratamiento	Diámetro de poros ( $\mu\text{m}$ )	Frecuencia de poros
2A12AMG	$1.142 \pm 0.043^a$	$18.9 \pm 1.7^a$
4A12AMG	$1.169 \pm 0.051^a$	$17.8 \pm 1.6^a$
6A12AMG	$1.199 \pm 0.055^a$	$16.6 \pm 1.7^a$

A:  $\alpha$ -amilasa, AM: Amilogucosidasa. Hidrólisis con tiempos de 2, 4, 6 o 12 horas  
Promedio  $\pm$  error estándar n=10 (diámetro de poro) n=12 (frecuencia de poro). No existieron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** Almidones de maíz porosos obtenidos por una etapa de hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo (A) durante 2, 4 o 6 h con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (AMG) durante 12 h.

De acuerdo con la literatura se sabe que la cantidad de enzima utilizada y el tiempo de hidrólisis son factores importantes en el tamaño de poro obtenido, así como el tipo de enzima utilizada (Dura *et al.*, 2014; Chen y Zhang, 2012; Benavent-Gil y Rosell, 2017).

El uso de complejos enzimáticos ha sido evaluado con la finalidad de obtener mejores resultados en la generación de poros, los resultados obtenidos muestran una mejora en el diámetro del poro generado, sin embargo, la frecuencia obtenida no es alta (Zhang *et al.*, 2012; Uthumporn *et al.*, 2010). El uso de diferentes tipos de enzima de manera simultánea no parece ser lo más favorable debido a que cada enzima tiene valores de temperatura y pH óptimos para su acción, por lo que si el pH es diferente la eficiencia de la enzima se verá afectada (Jung *et al.*, 2017; Dura *et al.*, 2014) generando tiempos de hidrólisis enzimáticas más prolongadas.

Esto se puede ejemplificar con lo obtenido por Leyva-López *et al.* (2019) al utilizar  $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo en combinación con amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, en donde los tiempos de hidrólisis fueron prolongados (16- 20 h), para la generación de poros, observaron que, a mayor tiempo de hidrólisis el diámetro de poro y la frecuencia de estos aumentaba, correspondiendo con los resultados obtenidos en la presente investigación. En el mismo sentido Sánchez-Rivera (2018) extendió los tiempos de hidrólisis enzimática a 14 h con condiciones que pudieron ser óptimas para la acción enzimática, sin embargo, a pesar de que no se especifica un tamaño promedio de poro generado, el diámetro de estos parece ser menor a lo obtenido en el presente trabajo.

Se observó que algunos poros tienen una mayor profundidad mientras que otros parecen partir de la superficie del gránulo, esto puede deberse a los mecanismos de acción de las enzimas, por un lado, la  $\alpha$ -amilasa pancreática de cerdo se ha comprobado que hidroliza principalmente zonas amorfas y zonas con doble hélice de una longitud de cadena de 10 nm (Robyt, 2009). Por otro lado, la enzima amiloglucosidasa comienza a actuar sobre la superficie del gránulo que es más susceptible y posteriormente los canales se hacen profundos, llegando al interior del gránulo por endo corrosión (Chen y Zhang, 2012) esta enzima hidroliza en

extremos no reductores en ambos tipos de enlaces presentes en el almidón, hidrolizando 600 veces más rápido los enlaces  $\alpha$ -(1,4) que  $\alpha$ -(1-6); es por ello que los resultados dependen del tipo de enzima utilizada.

Por consiguiente, la hidrólisis enzimática puede afectar en mayor proporción a la fracción de amilosa o de amilopectina, modificando la relación de estos componentes, lo que conlleva a que no solamente se afecte el tamaño y la frecuencia de poros obtenidos, sino que también se modifiquen las propiedades funcionales del almidón, como por ejemplo la capacidad de absorción (Zhang *et al.*, 2012).

En vista de que en las micrografías las diferencias en los tratamientos son visualmente más notorias, se sugiere que la metodología empleada puede no ser la más indicada para determinar y aseverar la relación que existe entre el tiempo de hidrólisis y el tipo de enzima utilizada, con el diámetro de poro generado y la frecuencia de estos. Existen metodologías más precisas como la determinación del área superficial específica por BET (Brunauer, Emmett y Teller) con las que se pueden analizar los efectos sobre el tamaño de poro generado con el tratamiento de hidrólisis enzimática empleado.

### **7.1.1 Contenido de amilosa**

La relación de amilosa/ amilopectina de un almidón determina en su mayoría las propiedades funcionales de este, por lo que fue importante conocer la variación de esta relación como consecuencia de la modificación enzimática.

El almidón nativo de maíz utilizado contenía un 30.16 % de amilosa y 69.84 % de amilopectina, porcentajes que catalogan a este almidón como un almidón normal. Los contenidos de amilosa reportados en almidón de maíz dependen de la variedad de maíz utilizado y van desde un 22 % hasta un 29.5 % de amilosa (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2006), valores muy cercanos al contenido de amilosa determinado en el almidón utilizado.

La hidrólisis enzimática mostró tener un efecto sobre el contenido de amilosa, el cual disminuye a las 2 h de hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa para posteriormente aumentar conforme aumenta el tiempo de hidrólisis enzimática (tabla 8), hasta las 6 h en donde el contenido de amilosa es mayor que la del nativo.

**Tabla 8.** Contenido de amilosa y amilopectina en almidón nativo y modificado de maíz sometido a diferentes tiempos de hidrólisis.

Tratamiento	% Amilosa	% Amilopectina
Nativo	30.16 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	69.84 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
2A12AMG	29.22 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>	70.78 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
4A12AMG	29.85 $\pm$ 0.28 <sup>bc</sup>	70.15 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>
6A12AMG	31.14 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	68.86 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>

A:  $\alpha$ -amilasa, AM: Amiloglucosidasa. Hidrólisis con tiempos de 2, 4, 6 o 12 horas. Promedio  $\pm$  error estándar n=6. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

De acuerdo con lo reportado por Benavent-Gil y Rosell (2017), al utilizar  $\alpha$ -amilasa durante 2 h de hidrólisis, el contenido de amilosa disminuyó, mientras que al utilizar amiloglucosidasa el contenido de amilosa aumenta sin ser significativo respecto al almidón nativo (25.76 % de amilosa). Por el contrario, Dura *et al.* (2014) no encontró diferencias en el contenido de amilosa después de hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa o con amiloglucosidasa, después de 24 horas de hidrólisis.

Por otro lado, Uthumporn *et al.* (2010) obtuvieron almidones porosos de maíz hidrolizados con una mezcla comercial de  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus kawachi* y glucoamilasa de *Aspergillus niger* durante 24 h, con un contenido de amilosa de 17.2 % a partir de un almidón nativo con 23.1 %.

Cabe mencionar que un aumento del contenido de amilosa no está dado por la generación de nuevas moléculas, sino por la acción enzimática que hidroliza cadenas largas de amilosa o cadenas lineales de amilopectina que se traducen en un aumento en la cuantificación de amilosa.

El almidón está catalogado como un polisacárido con una estructura semicristalina, dentro del cual, el contenido de amilosa representa la zona amorfa del almidón y la amilopectina la zona semicristalina, por lo que los cambios en alguna de estas moléculas o de la proporción de estas, modificará la estructura del almidón aumentando o disminuyendo su cristalinidad.

### 7.1.2 Difracción de Rayos X

En el análisis de DRX se observó que tanto los tratamientos, como el almidón nativo presentaron el mismo patrón de difracción tipo A (figura 4), característico de los cereales (Tester *et al.*, 2004). En todos los difractogramas existe interferencia constructiva en los ángulos  $2\theta = 13^\circ$ ,  $17^\circ$  y  $23^\circ$  (Zhang *et al.*, 2012) característicos del patrón de difracción tipo A, presentando ligeras diferencias en las intensidades de los picos generados.

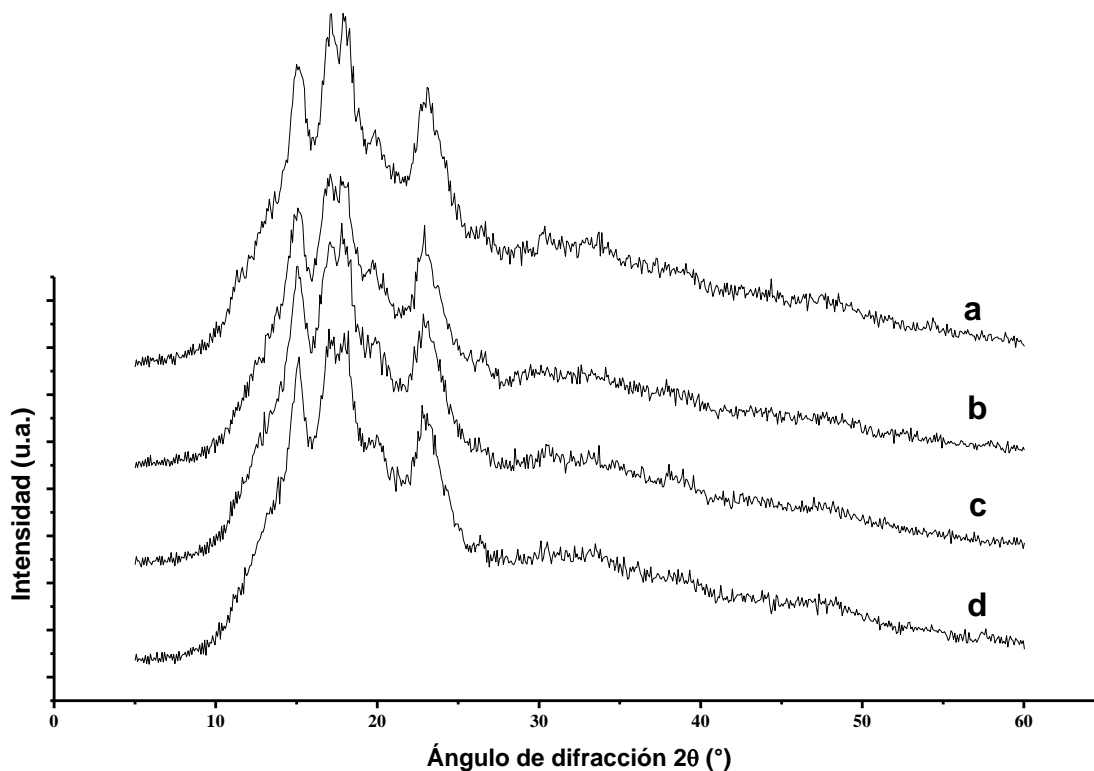
Como se muestra en la tabla 9 los porcentajes de cristalinidad relativa obtenidos no fueron estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, los valores de cristalinidad variaron, estas pequeñas variaciones son atribuidas a los tiempos de hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina. Como se puede observar en la tabla 9, el porcentaje de cristalinidad aumentó a las 2 h de hidrólisis en comparación al nativo y posteriormente al aumentar el tiempo, la cristalinidad se redujo. Por lo que es probable que la  $\alpha$ -amilasa tenga un mayor efecto sobre la zona cristalina ya que a mayor tiempo de hidrólisis, la cristalinidad se reduce, esto coincide con los porcentajes del contenido de amilosa aparente, la cual aumenta como producto de la hidrólisis de la amilopectina.

Las diferencias en el patrón de difracción o en la cristalinidad (la cual también puede determinarse con calorimetría diferencial de barrido), depende del tamaño de los cristales, la cantidad de regiones cristalinas y la orientación de las cadenas de doble hélice (Miao *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos con diferentes autores como Miao *et al.* (2011), quienes al utilizar ambas enzimas simultáneamente obtuvieron el mismo patrón de difracción sin encontrar diferencias significativas, sin embargo,

los porcentajes de cristalinidad mostraron una ligera reducción en la cristalinidad conforme aumentada el tiempo de hidrólisis. Del mismo modo, autores como Zhang *et al.* (2012) no encuentran cambios significativos en los patrones de difracción, no obstante, reportan ligeros incrementos en la cristalinidad, lo que indica que la mezcla de enzimas que utilizaron, afectaron principalmente zonas amorfas del almidón, cabe resaltar que las condiciones de pH y temperatura utilizadas en este estudio fueron iguales a las utilizadas en el presente trabajo.

En una modificación enzimática no es común encontrar diferencias en el porcentaje de cristalinidad debido a que los mecanismos de acción tienden a atacar ambos componentes del almidón, por lo que la proporción entre zona amorfa y zona cristalina, tienden a mantenerse o tener poca variación. Los cambios en la composición del almidón se pueden corroborar mediante calorimetría diferencial de barrido y un análisis de formación de pasta.



**Figura 4.** Difractogramas obtenidos mediante DRX. (a) Almidón nativo de maíz y almidones modificados durante (b) 2, (c) 4 y (d) 6 h con  $\alpha$ -amilasa, con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h.

**Tabla 9.** Porcentaje de cristalinidad en almidón nativo y almidones modificados sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis.

Tratamiento	% de Cristalinidad
Nativo	$20.70 \pm 0.58^a$
2A12AMG	$23.35 \pm 1.10^a$
4A12AMG	$20.88 \pm 0.87^a$
6A12AMG	$19.74 \pm 0.40^a$

A:  $\alpha$ -amilasa, AM: Amiloglucosidasa. Hidrólisis con tiempos de 2, 4, 6 o 12 horas. Promedio  $\pm$  error estándar n=2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

### 7.1.3 Perfil de formación de pasta

El perfil de formación de pasta determina dos valores de viscosidad importantes, los cuales están relacionados con la proporción de amilosa y amilopectina presentes en la muestra: la viscosidad máxima, la cual está determinada por la cantidad de amilopectina; y una viscosidad final, determinada por la cantidad de amilosa. Concretamente, en un perfil de formación de pasta se observa el cambio de viscosidad en una pasta formada a partir de un calentamiento a 90 °C en la que la amilopectina llega a su mayor capacidad de hinchamiento, seguido de un proceso de cocción y finalmente una retrogradación provocada por la reorganización de las cadenas de amilosa. Los perfiles de formación de pasta del almidón nativo y los modificados se muestran en la figura 5.

Como se resume en la tabla 10, los almidones modificados con 2 y 4 h de hidrólisis previa con  $\alpha$ -amilasa alcanzaron valores más altos en la viscosidad máxima, lo cual coincide con el contenido de amilopectina y con los valores de cristalinidad relativa, los cuales indican que, con estos tratamientos, las estructuras obtenidas son más cristalinas, del mismo modo, presentan una viscosidad final mayor, lo que indica una mayor retrogradación de estos almidones. Estos resultados sugieren que las cadenas A de la amilopectina fueron hidrolizadas y no se destruyeron las regiones cristalinas, por lo tanto, estas cadenas removidas pudieron ser cuantificadas como amilosa.

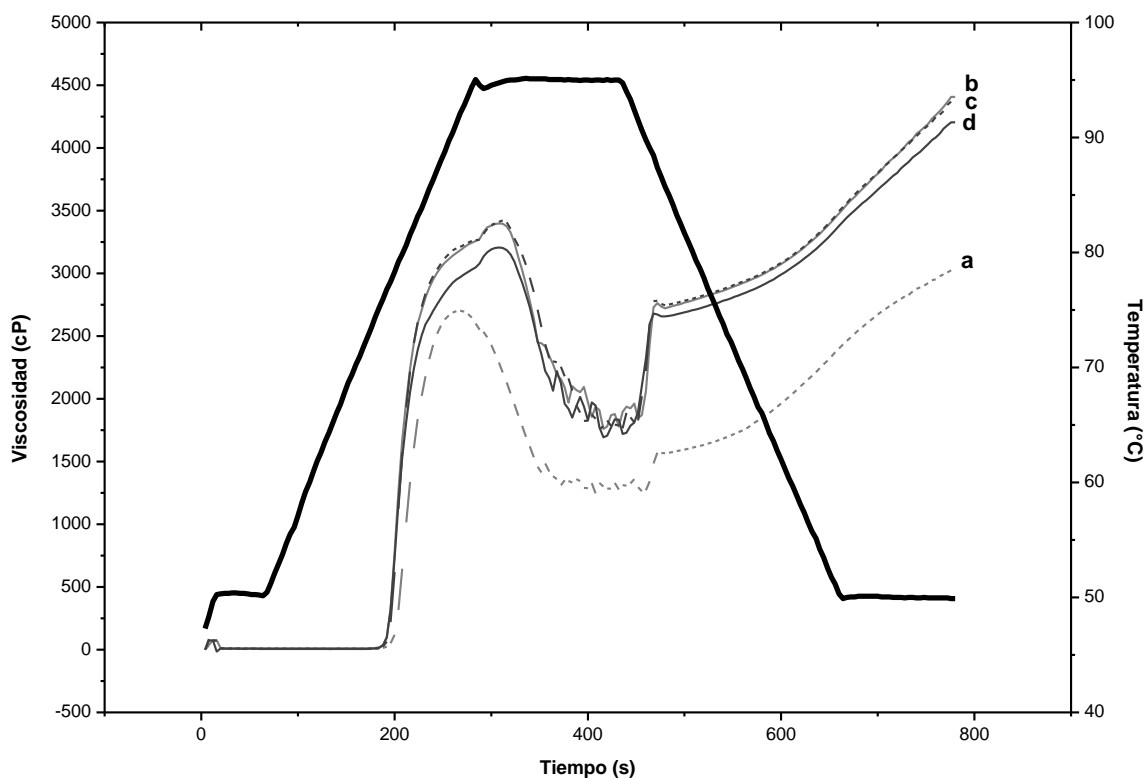
El tratamiento a las 6 h de hidrólisis a pesar de presentar un contenido de amilopectina menor comparado con el nativo, tuvo una viscosidad máxima mayor, además de presentar una mejor reorganización (retrogradación), reflejada en la viscosidad final.

La estabilidad de las pastas formadas por los almidones se puede medir, a partir del *breakdown*, el cual se obtiene restando el valor de la viscosidad de rompimiento del de la viscosidad máxima. Los almidones modificados tienen un valor más alto en el *breakdown* en comparación con la del nativo, esto debido a las estructuras porosas generadas, ya que, a pesar de ser capaces de retener un mayor contenido de agua, las pastas son menos estables.

En todos los almidones poroso durante la fase de enfriamiento se presentó un incremento en la viscosidad debido a la reorganización de las cadenas solubilizadas durante la fase de calentamiento y fase de sostenimiento, produciendo una red que retiene una mayor cantidad de moléculas de agua (Mali *et al.*, 2003) y dan las características de una pasta. Por otro lado el *setback* indica la capacidad de los almidones para retrogradar, comúnmente esta propiedad se asocia con el contenido de amilosa, sin embargo, los resultados obtenidos no se relacionan, por lo que se podría sugerir que durante la hidrólisis se forman moléculas de amilopectina con un menor grado de polimerización (GP), con una mejor propiedad para retener agua en estas condiciones y de retrogradar o reorganizarse a una velocidad similar a una molécula de amilosa (Thitripraphunkul *et al.*, 2003; Vamadevan y Bertoft, 2015).

El tipo de enzima utilizada es determinante en las variaciones de viscosidad en cada etapa del perfil de formación de pasta, de acuerdo con lo reportado por Dura *et al.* (2014) la hidrólisis con glucoamilasa reduce tanto la viscosidad máxima como la final, en cambio con  $\alpha$ -amilasa la viscosidad final aumenta, lo cual concuerda con lo obtenido en este trabajo, ya que se presentaron variaciones evidentes en la viscosidad final conforme aumentaba la hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa. Se ha reportado que la combinación de enzimas en una hidrólisis de una etapa tiene un efecto contrario ya que, de acuerdo con lo reportado por Uthumporn *et al.* (2010) se genera un aumento en la viscosidad final mientras que, la viscosidad máxima se reduce, efecto contrario a lo encontrado con la hidrólisis realizada en dos etapas.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Uthumporn *et al.* (2010), la hidrólisis enzimática da como resultado estructuras más frágiles, los cuales pueden colapsar más rápido en presencia de abundante agua y temperatura, lo que se traduce en una menor capacidad de absorción de agua. Sin embargo, en lo realizado en el presente trabajo, la viscosidad máxima obtenida fue mayor, con lo que se puede inferir que las estructuras obtenidas serán más resistentes y tardarán más tiempo en colapsar o necesitarán una mayor cantidad de energía para hacerlo.



**Figura 5.** Perfiles de formación de pasta de (a) almidón nativo y almidones modificados durante (b) 2, (c) 4 y (d) 6 h con  $\alpha$ -amilasa, con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h.

**Tabla 10.** Propiedades de formación de pasta del almidón nativo y almidones modificados sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis.

Tratamiento	Viscosidad máxima (cP)	Viscosidad de rompimiento (cP)	Viscosidad final (cP)
Nativo	2703.0 $\pm$ 07.0 <sup>c</sup>	1222.0 $\pm$ 05.0 <sup>b</sup>	3025.5 $\pm$ 03.5 <sup>c</sup>
2A12AMG	3398.0 $\pm$ 33.0 <sup>a</sup>	1686.5 $\pm$ 06.5 <sup>a</sup>	4406.5 $\pm$ 46.5 <sup>a</sup>
4A12AMG	3422.0 $\pm$ 03.0 <sup>a</sup>	1694.5 $\pm$ 30.5 <sup>a</sup>	4368.5 $\pm$ 01.5 <sup>a</sup>
6A12AMG	3217.0 $\pm$ 14.0 <sup>b</sup>	1632.5 $\pm$ 02.5 <sup>a</sup>	4204.5 $\pm$ 25.5 <sup>b</sup>

A:  $\alpha$ -amilasa, AM: Amiloglucosidasa. Hidrólisis con tiempos de 2, 4, 6 o 12 horas. Promedio  $\pm$  error estándar n=2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 7.1.4 Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas pertenecientes al almidón nativo y a los modificados se presentan en la tabla 11. Las transiciones endotérmicas pertenecientes al proceso de gelatinización se pueden observar en los termogramas (figura 6).

La temperatura de inicio de gelatinización incrementó ligeramente con la modificación enzimática, presentando diferencias significativas ( $p= 0.030$ ) únicamente entre el almidón nativo y el almidón hidrolizado 4 h con  $\alpha$ -amilasa. Mismo patrón al observado en el perfil de formación de pasta. El valor de temperatura de gelatinización ( $T_p$ ) de los almidones modificados fue más alta en comparación al almidón nativo, sin encontrar diferencias entre los tiempos de hidrólisis utilizados.

La gelatinización representa la pérdida de la estructura granular del almidón, perdiendo su cristalinidad y su birrefringencia. La gelatinización está controlada en parte por la estructura molecular de la amilopectina (perfección y orden de los cristales; longitud de las cadenas A, grado de ramificación, peso molecular y polidispersidad) y la estructura del gránulo (relación región amorfa: región cristalina). En este caso el incremento obtenido en la  $T_p$  no es proporcional con porcentaje de cristalinidad relativa determinado. Sin embargo, el cambio en la  $T_p$  sugiere cambios en la distribución de cadenas cortas de la amilopectina, como se observó en el perfil de formación de pasta (Noda *et al.*, 1998; Korstee *et al.*, 1998). La determinación de la temperatura pico de gelatinización se relaciona con la determinación de la perfección de la cristalinidad; comúnmente almidones con un alto orden molecular y cristales estables presentan  $T_p$  más altas (Vamadevan y Bertoft, 2015). La  $T_p$  del almidón nativo se encuentra cercana, pero por debajo de las ya reportadas por otros autores para el almidón de maíz, cuyas temperaturas oscilan entre 74.62 – 75.66 °C dependiendo de la variedad de maíz utilizado (Aparicio-Saguilán *et al.*, 2006; Palma-Rodríguez *et al.*, 2012; Rangel-Cortez, 2018).

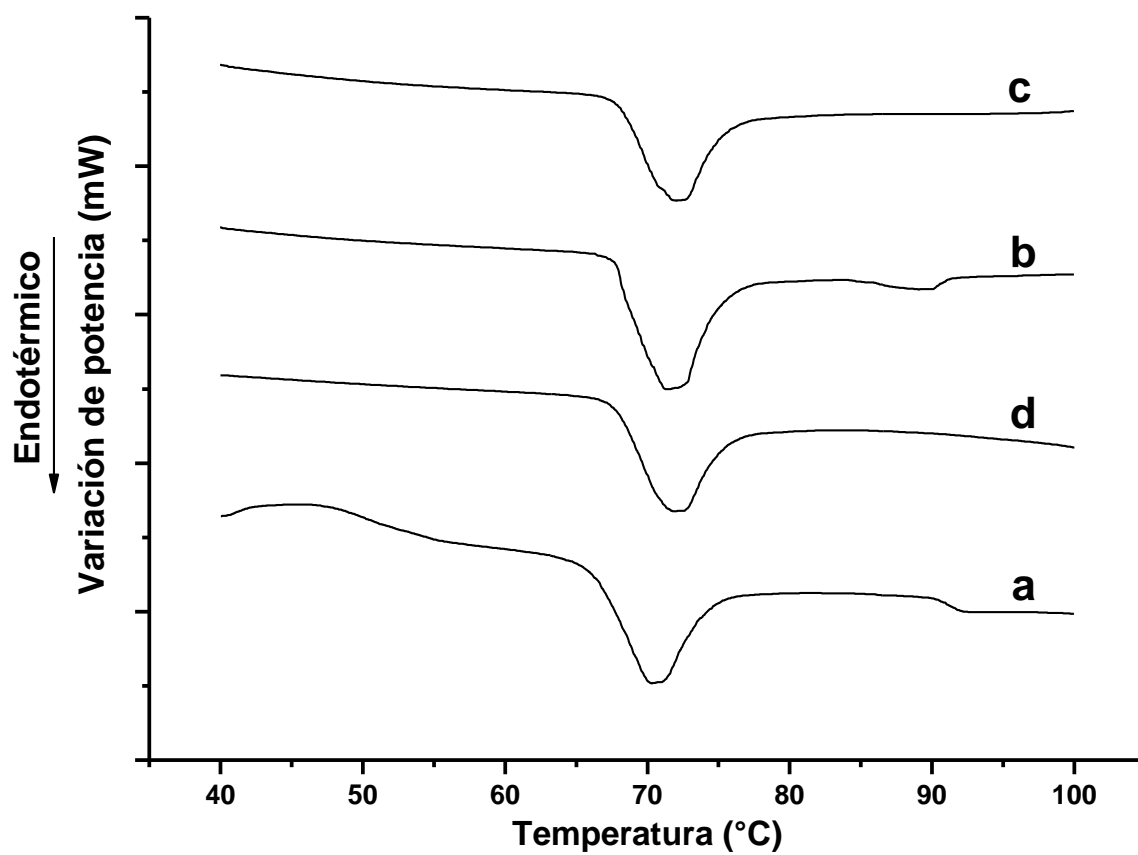
El intervalo de gelatinización (IG) indica la heterogeneidad de la estructura cristalina dentro del gránulo de almidón, en este parámetro se presentaron diferencias entre los almidones, aunque no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Se pudo

observar que en el almidón hidrolizado a las 2 h por  $\alpha$ -amilasa, el IG fue mayor en comparación al nativo, lo que no está influenciado por una  $T_0$  diferente, sino por un aumento en  $T_f$  de gelatinización. Lo que indica que se generaron estructuras cristalinas que se gelatinizan a mayor temperatura. Mientras que, al aumentar los tiempos de hidrólisis, el IG disminuye, indicando una mayor homogeneidad de la zona cristalina. Se ha descrito que la estructura de la amilopectina es importante en las propiedades térmicas, comúnmente estructuras con cadenas cortas se funden a temperaturas más bajas, mientras que las cadenas largas, se desorganizan a altas temperaturas (Vamadevan y Bertoft, 2015).

La entalpía de gelatinización ( $\Delta H$ ) tuvo un aumento a las 2 h de hidrólisis enzimáticas para posteriormente tomar valores iguales al del almidón nativo. La  $\Delta H$  proporciona una medida general de la cristalinidad (calidad y cantidad de los cristales) y es un indicador de la pérdida de orden molecular en el gránulo. En un material cristalino, la  $\Delta H$  será mayor (Genkina *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013), lo que corrobora que el tratamiento 2A12AMG es el material más cristalino como se determinó en el porcentaje de cristalinidad (tabla 9, sección 7.1.2).

De acuerdo con lo reportado por Jung *et al.* (2017), existe un aumento en la temperatura de gelatinización después de una hidrólisis enzimática, cuyos resultados varían de acuerdo con el tipo de enzima utilizada. Una endoenzima, como la  $\alpha$ -amilasa, puede hidrolizar tanto zonas amorfas como regiones de la zona cristalina por tal motivo,  $\Delta H$  disminuye. Por otro lado, las exoenzimas, como la glucoamilasa, hidrolizan zonas amorfas con lo que se aumenta la proporción de la zona cristalina, aumentando la  $\Delta H$  (Jung *et al.*, 2017).

Por lo tanto, la determinación de las propiedades térmicas, es otra manera de medir el cambio en la cristalinidad del material, debido a que será necesario una mayor cantidad de energía para gelatinizar el almidón cuando las zonas cristalinas son más abundantes (Uthumporn *et al.*, 2013). Esto se puede ver en los resultados de almidón modificado 2A12AMG ya que, aunque este presenta un incremento del 2.65 % de cristalinidad, el valor de la entalpía de gelatinización aumenta ligeramente.



**Figura 6.** Termogramas obtenidos por CDB de (a) almidón nativo y almidones modificados durante (b) 2, (c) 4 y (d) 6 h con  $\alpha$ -amilasa con una segunda hidrólisis con amilogucosidasa durante 12 h.

**Tabla 11.** Propiedades térmicas del almidón nativo y almidones modificados sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis.

Tratamiento	T <sub>0</sub> (°C)	T <sub>p</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	ΔH (J/g)	T <sub>f</sub> -T <sub>0</sub>
Nativo	66.90 ± 0.13 <sup>b</sup>	70.26 ± 0.08 <sup>b</sup>	75.46 ± 0.10 <sup>a</sup>	9.87 ± 0.59 <sup>ab</sup>	8.57 ± 0.02 <sup>a</sup>
2A12AMG	67.93 ± 0.13 <sup>ab</sup>	71.26 ± 0.05 <sup>a</sup>	77.55 ± 0.88 <sup>a</sup>	11.41 ± 0.18 <sup>a</sup>	9.63 ± 0.75 <sup>a</sup>
4A12AMG	68.32 ± 0.20 <sup>a</sup>	71.55 ± 0.29 <sup>a</sup>	76.60 ± 0.34 <sup>a</sup>	8.28 ± 0.19 <sup>b</sup>	8.28 ± 0.14 <sup>a</sup>
6A12AMG	67.83 ± 0.30 <sup>ab</sup>	71.66 ± 0.01 <sup>a</sup>	76.95 ± 0.12 <sup>a</sup>	8.77 ± 0.00 <sup>b</sup>	9.13 ± 0.18 <sup>a</sup>

A: α-amilasa, AM: Amiloglucosidasa. Hidrólisis con tiempos de 2, 4, 6 o 12 horas  
Promedio ± error estándar n=2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ )

### 7.1.5 Solubilidad e hinchamiento

El poder de hinchamiento es la capacidad del almidón de retener agua bajo distintas condiciones de temperatura y en un medio con exceso de agua (Lawal *et al.*, 2011), esta capacidad es mucho más alta que la solubilidad, ya que, debido a su estructura molecular, el almidón es prácticamente insoluble en agua. Sin embargo, por efecto de la temperatura esta capacidad aumenta debido a la disociación de la amilosa en medio acuoso. El poder de hinchamiento y el índice de solubilidad pueden ser distintos dependiendo del contenido de amilosa y del grado de polimerización de las cadenas de la molécula de amilopectina, además del grado de cristalinidad (Uthumporn *et al.*, 2010).

Debido a que las cadenas de amilosa son las primeras en formar interacciones con el agua y disolverse, un almidón con un mayor contenido de amilosa será más soluble, por otro lado, la capacidad de hinchamiento está determinada por la longitud de las cadenas de amilopectina (Hedayati y Niakosauri, 2018).

El índice de solubilidad del almidón aumentó debido a la modificación enzimática como se puede observar en la figura 7, sin embargo, entre los tiempos de hidrólisis no existió diferencias significativas. A partir de una temperatura que se puede considerar ambiente (30 °C), los almidones modificados presentaron un mayor índice de solubilidad en comparación al almidón nativo, a pesar de no existir diferencias estadísticas entre los almidones modificados, se observó la tendencia que, al aumentar los tiempos de hidrólisis, el índice de solubilidad se veía reducido nuevamente. Por otro lado, el poder de hinchamiento no se vio afectado a bajas temperaturas, como la solubilidad, sin embargo, a altas temperaturas, los almidones modificados tuvieron ligeramente un aumento en el poder de hinchamiento (figura 8), lo cual nos indica el efecto de la hidrólisis enzimática, ya que cadenas más cortas de amilopectina promueven el hinchamiento del gránulo (Vamadevan y Bertoft, 2015).

Los perfiles de solubilidad e hinchamiento obtenidos corresponden a los reportados por Rangel-Cortez (2018), con una solubilidad de 14 % y un poder de hinchamiento de 16.81 g H<sub>2</sub>O/ g muestra a los 90 °C, valores ligeramente menores a los obtenidos en

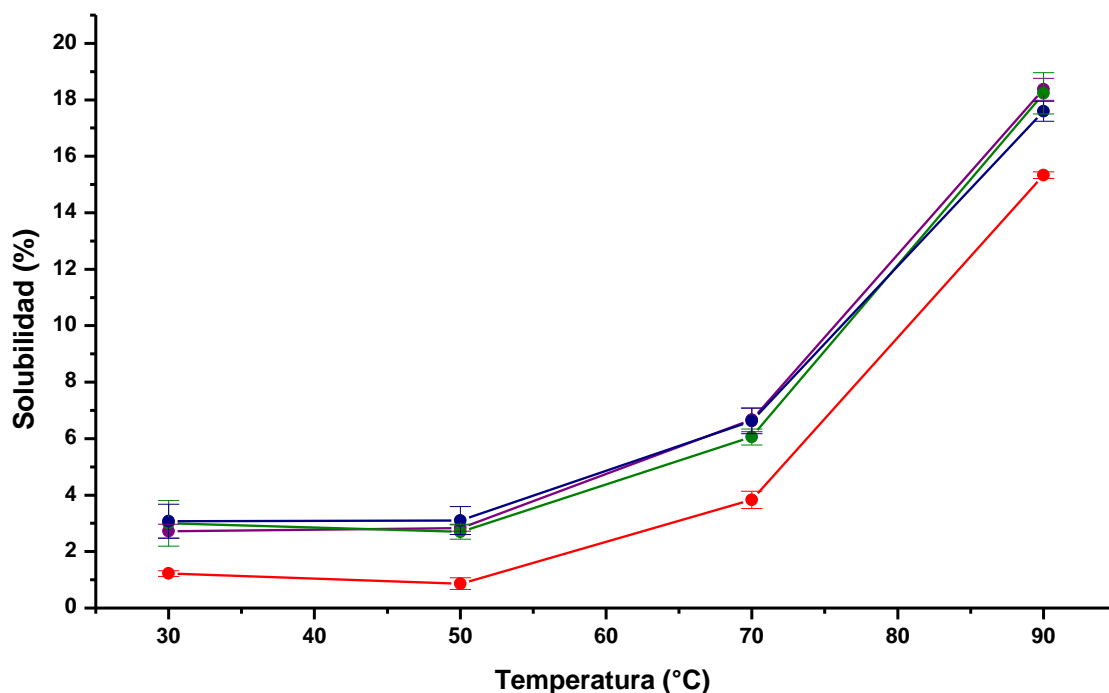
el presente trabajo, en el que el almidón nativo tuvo un poder de hinchamiento de hinchamiento de 18.5 g/g y un porcentaje de solubilidad de 15.3 %. Las ligeras diferencias probablemente son debido a la relación amilosa/amilopectina presentes en las muestras; Rangel-Cortez (2018) reporta un menor contenido de amilosa (26.64 %) comparado con el del almidón utilizado en el presente trabajo (30.16 %) lo que se traduce a un porcentaje menor de solubilidad.

Los almidones modificados presentaron un aumento en el porcentaje de solubilidad, del mismo modo en que lo reportan Uthumporn *et al.* (2010) con un porcentaje de solubilidad de 10.6 % en nativo y un 15.7 % en el poroso (hidrolizado). Mientras que el poder de hinchamiento se reduce de un 13.9 a 11.1 g/g en hidrolizados, estas diferencias son debido a las características de los poros que obtuvieron dando gránulos más cristalinos y con una menor cantidad de amilosa.

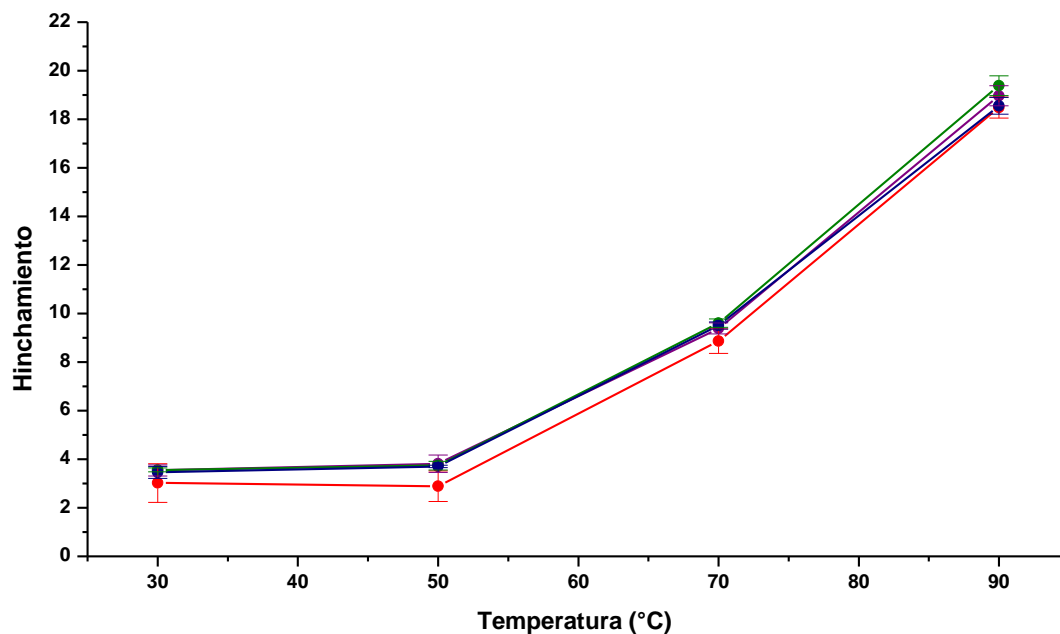
Dura *et al.* (2014) determinaron que el índice de hinchamiento y el porcentaje de solubilidad están afectado por el tipo de enzima utilizada para la hidrólisis de almidón. Para el porcentaje de solubilidad, ambas enzimas aumentan esta característica, sin embargo, la hidrólisis con AMG la aumenta considerablemente (18.95 %), mientras que con AM el aumento es menor (3.03 %). Para el índice de hinchamiento, el efecto es diferente, el uso de AMG no tiene un efecto sobre esta propiedad mientras que la AM aumenta de 1.27 a 2.68 g/g. A partir de esto podemos decir que los resultados obtenidos se debieron al uso de ambas enzimas, aunque fuera en dos etapas.

La fuerza de las estructuras de doble hélice de las cadenas de la amilopectina, afectan el poder de hinchamiento, cuando los enlaces entre estas cadenas son demasiado fuertes, complicado que el agua pueda interactuar con estas por lo que el hinchamiento se reduce (Hedayati y Niakosauri, 2018).

El contenido de amilosa, al constituir el componente amorfo, es la zona en donde el agua puede penetrar al gránulo, por lo que se dice que el aumento de contenido de amilosa aumenta el poder de hinchamiento y la solubilidad (Lawal *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Porcentaje de solubilidad de (—) almidón nativo de maíz y almidones modificados durante (—) 2, (—) 4 y (—) 6 h con  $\alpha$ -amilasa, con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h.

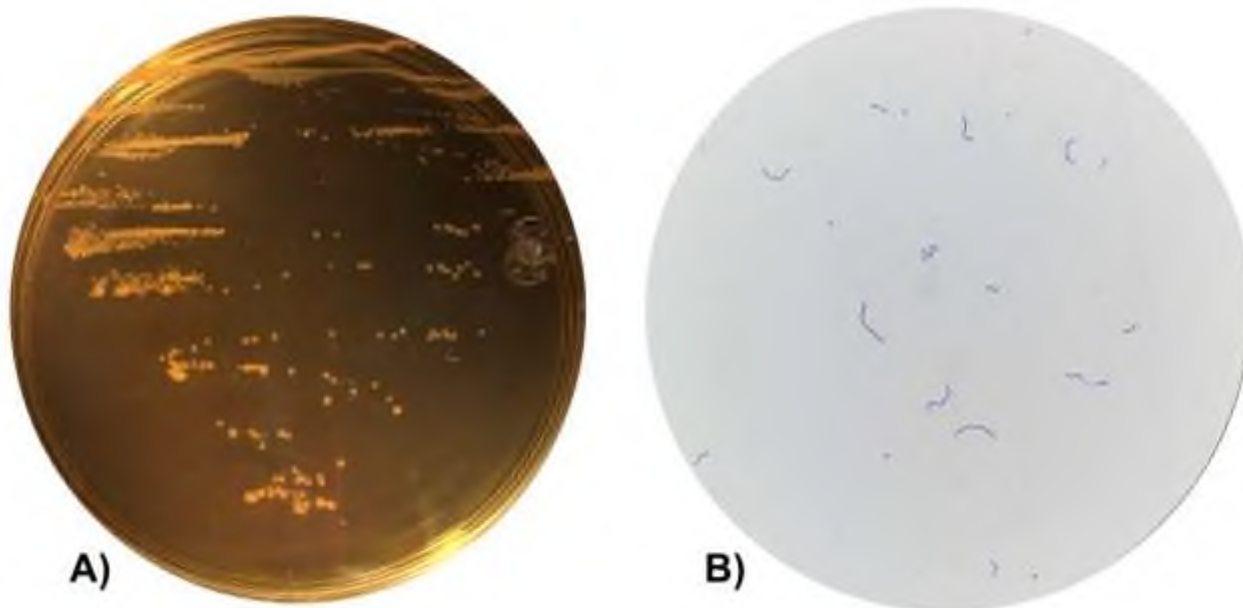


**Figura 8.** Índice de hinchamiento de (—) almidón nativo y almidones modificados durante (—) 2, (—) 4 y (—) 6 h con  $\alpha$ -amilasa, con una segunda hidrólisis con amiloglucosidasa durante 12 h.

## 7.2. Activación de cepa bacteriana

Se realizó la caracterización fenotípica de la cepa comercial de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* para corroborar su autenticidad. La bacteria en medio líquido presentó un crecimiento en forma de sedimento, debido a que es una bacteria anaerobia facultativa, es decir, puede desarrollarse en presencia o en ausencia de oxígeno, por lo que en presencia de oxígeno tienden a crecer en el fondo del medio.

En medio sólido, las colonias bacterianas presentaron una coloración crema opacas, de forma circular, con un borde liso y con una elevación convexa y lisa (figura 9, A). Microscópicamente se observaron bacterias Gram positivas, con morfología de bacilos cortos con extremos redondeados y organizados como estreptobacilos y sin presencia de esporas (figura 9, B), coincidiendo con la descripción de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (Stiles y Holzapfel, 1997).



**Figura 9.** *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. (A) Observación macroscópica y (B) observación microscópica.

Las bacterias del género *Lactobacillus* son utilizados como cultivos iniciadores en la producción de quesos, cárnicos fermentados, producción de vinos o cerveza y pan, situación que las coloca como excelentes modelos para el estudio de viabilidad con respecto a temperatura, pH y condiciones gastrointestinales (Stiles y Holzapfel, 1997).

### **7.3. Resistencia térmica de *L. paracasei* subsp. *paracasei***

Con la finalidad de conocer las temperaturas posibles a utilizar en el proceso de secado por aspersión, la bacteria se sometió a tres diferentes temperaturas: 50, 60 y 70 °C durante 15 min, encontrando una relación entre la viabilidad y la temperatura (figura 10), mientras la temperatura aumenta la viabilidad disminuye ( $R^2 = 0.973$ ) (tabla 12).

Estos resultados son similares a lo reportado por Paéz *et al.* (2012) quienes obtuvieron una pérdida de viabilidad de 2.42 – 3.26 Log UFC/mL para especies de *L. paracasei* al someterlas a una temperatura de 60 °C durante 5 min. Reportando que existen diferencias en la termosensibilidad entre diferentes cepas de *L. paracasei*.

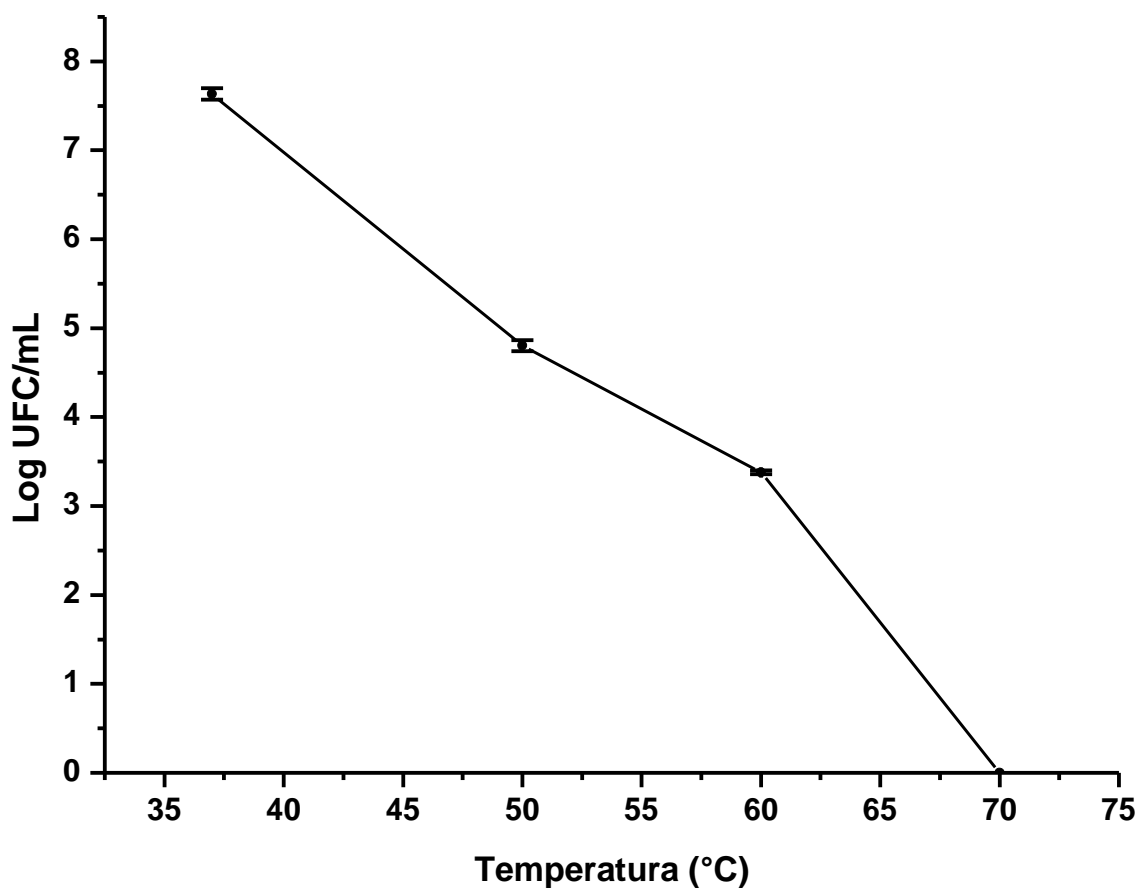
Como se observó, la temperatura es un factor importante en la pérdida de viabilidad, tal como se describe en la literatura, a partir de 55 °C existe una muerte celular, sin embargo, esta puede ser más alta si la temperatura aumenta y el tiempo de exposición se prolonga (Gardiner *et al.*, 2000). Sin embargo, cada cepa tiene una resistencia al calor muy distinta y comúnmente se diferencian entre géneros y especies, por lo que es un factor importante a considerar (Gardiner *et al.*, 2000; Paéz *et al.*, 2012). En las bacterias, las temperaturas por arriba de 90 °C pueden ser letales al 100 % (Martín *et al.*, 2015).

Debido a que el uso de los materiales de encapsulación tiene la finalidad de ser materiales protectores, se optó por probar el efecto del almidón poroso al utilizar la temperatura de 70 °C como temperatura de salida.

**Tabla 12.** Pérdida de viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* por exposición a altas temperaturas durante 15 min.

Temperatura (°C)	Pérdida de viabilidad (%)
50	37.09 ± 0.82 <sup>a</sup>
60	55.74 ± 0.30 <sup>b</sup>
70	100.00 ± 0.00 <sup>c</sup>

Promedio ± error estándar. n=4 Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ )

**Figura 10.** Viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* sometida a diferentes temperaturas durante 15 min.

## 7.4. Microcápsulas

Debido a que no se observaron diferencias estadísticas entre los diámetros de poro generados en los diferentes tratamientos de hidrólisis enzimática, pero si se encontraron diferencias en las propiedades funcionales de los almidones porosos obtenidos, se utilizó el almidón poroso 2A12AMG para los tratamientos de encapsulación de *L. paracasei* subsp. *paracasei*, cuya cristalinidad fue semejante al nativo y se obtuvo con el menor tiempo de hidrólisis enzimática.

### 7.4.1 Eficiencia de encapsulación

Para determinar la eficiencia del proceso, se tomó en cuenta el número de UFC viables en el producto final. La eficiencia siempre puede ser mejorada con la modificación de las variables del proceso. En la presente investigación las eficiencias fueron bajas (tabla 13), sin embargo, debido a que la alimentación para el proceso contó con una concentración de bacterias por encima de la dosis probiótica, los productos finales cumplen con la concentración mínima bacteriana (6 Log UFC/g) de un probiótico.

La viabilidad fue afectada por el método de encapsulación empleado (tabla 13); la liofilización aumenta la eficiencia obtenida mientras que el secado por aspersion la reduce. Esto concuerda con lo mencionado en la literatura en donde se menciona que por liofilización se logran eficiencias 70- 91 % (Benavent-Gil *et al.*, 2018) y para el secado por aspersion se han llega eficiencias del 60- 89 % (Huang *et al.*, 2017; Arepally y Goswami, 2019) influyendo en ambos métodos, el material de pared y la cepa utilizada, principalmente. En este caso las temperaturas utilizadas en secado por aspersion fueron determinantes para las bajas eficiencias obtenidas, a diferencia de la liofilizacion, en la que la inactivación celular sucede por deshidratación; en el secado por aspersion sucede por deshidratación y por inactivación térmica, por lo que la membrana citoplasmática de la bacteria es la más susceptible a daños debido a la perdida de agua de la superficie (Huang *et al.*, 2017; Fu y Chen, 2011).

Ambos procesos de encapsulación tienen etapas críticas en las que la viabilidad se ve amenazada; en liofilización, la congelación puede dañar la membrana o ADN de

la célula bacteriana (Stefanello *et al.*, 2019); en el secado por aspersión, la temperatura de salida es determinante debido a que el producto se expone más tiempo a esta temperatura (Meng *et al.*, 2008) de acuerdo con las eficiencias obtenidas, se sugiere que en ambos métodos se produjo un daño en la membrana celular.

El secado por aspersión tiene como ventaja ser un método más económico en la industria comparado con la liofilización, debido a que implica tiempos cortos de operación y un menor consumo de energía (Huang *et al.*, 2017). La temperatura de salida es importante sobre la supervivencia bacteriana (Nale *et al.*, 2018), se ha logrado aumentar las eficiencias cuando se utilizan temperaturas de salida por debajo de los 70 °C (Gul y Atalar, 2019; Arepally y Goswami., 2019), esto puede variar dependiendo de la termosensibilidad de las cepas utilizadas como reporta Gardiner *et al.* (2000); las especies de *Lactobacillus* tienen diferente resistencia al calor, además una variación de 3 °C puede hacer una diferencia entre mantener una viabilidad del 100 % o reducirla por debajo del 50 %. Debido a que *L. paracasei* subsp. *paracasei* presento un 100 % de muerte al exponerse a 70 °C/ 15 min (tabla 12), se puede decir que la temperatura fue un factor determinante en la eficiencia, mientras que los materiales de pared utilizados tuvieron un efecto termoprotector al mantener viables un porcentaje de células (35.67 – 41.60 %).

Con la finalidad de obtener altas eficiencias de encapsulación, diversos autores han modificado la temperatura y la mezcla de distintos materiales que brinden una adecuada termoprotección. Arepally y Goswami (2019) modificaron temperaturas de entrada entre 130 y 150 °C con una temperatura de salida de 55 °C; la concentración de goma arábica (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 % p/v) y manteniendo un 20 % p/v de maltodextrina, como materiales de pared, obteniendo eficiencias de 65- 89.15 %, este resultado se relaciona con el aumento en la concentración de goma arábica y la reducción de temperatura, brindando la goma arábica una mayor protección durante el proceso de secado. Del mismo modo, eficiencias cercanas (82.93 ± 2.52 %) son reportadas por Gul, (2017) utilizando temperaturas de salida de 64- 68 °C. Por otro lado, Alfaro-Galarza (2019) encapsuló *L. paracasei* subsp. *paracasei* con

almidón nativo de arroz y malanga, obteniendo eficiencias del 12 y 22 %, utilizando temperaturas de aire de secado de 70°C de entrada y 39 °C de salida, lo que sugiere que un material poroso puede brindar mayor protección a la bacteria en comparación con el uso almidones nativos, lo cual tiene que ver con las características fisicoquímicas de las microcápsulas obtenidas.

Durante el secado por aspersión la pérdida de viabilidad es debido a daños en las células bacterianas por desnaturalización del ADN y ARN, deshidratación de la membrana citoplasmática, ruptura y/o colapso de la membrana celular debido al retiro de agua, generando un daño físico de lípidos de la membrana y afectando del mismo modo a proteínas estructurales (Dianawati y Shah, 2011; Peighambardoust *et al.*, 2011; Arepally y Goswami, 2019).

La crioprotección necesaria durante el proceso de liofilización brindada por el almidón ya ha sido reportada por autores como De Araújo-Etchepare *et al.* (2016) y ha sido utilizado como material de pared en la encapsulación de probióticos obteniendo eficiencias hasta del 91 %, presentando mejores eficiencias con almidones de gránulo pequeño como el arroz (Benavent-Gil *et al.*, 2018).

En los últimos años se ha comparado el uso de almidón nativo con el almidón poroso de una misma fuente (maíz) obteniendo diversos resultados. Por su parte, Benavent-Gil *et al.* (2018) reportaron que no existe diferencia alguna entre encapsular con almidón nativo o con almidón poroso, mientras que Li *et al.* (2016) reportan mejores eficiencias al utilizar almidones porosos observando que estos tienen una mayor área de contacto para el anclaje del microorganismo al gránulo de almidón. Sin embargo; estas diferencias pueden ser debido a la cepa utilizada, como lo describen Salem *et al.* (2013) la capacidad de adhesión al gránulo está determinado por las proteínas que realizan enlaces con los sacáridos, por lo que, la capacidad de adhesión es diferente entre cada cepa bacteriana, encontrándose más estudiado el género *Bifidobacterium*. Además, el tamaño de la bacteria también puede ser un factor determinante en la supervivencia, mientras menor sea, resistirá mejor el estrés (Meng *et al.*, 2008).

Ahora bien, el uso de otros materiales en conjunto con el uso de almidón puede mejorar las eficiencias, esto dependerá del material utilizado, caso semejante a lo obtenido en el presente trabajo, Benavent-Gil *et al.* (2018) reportaron una mejora en las eficiencias de encapsulación con el uso de goma xantana y almidón gelatinizado como materiales de recubrimiento. Los materiales de recubrimiento propuestos en el presente trabajo (maltodextrina y almidón gelatinizado), mejoran la eficiencia de encapsulación (60.71 – 61.69 %) en comparación con lo obtenido con almidón poroso. Sin embargo, el comportamiento fue diferente dependiendo del método de encapsulación empleado, en la liofilización no existió diferencia en las eficiencias de encapsulación entre la maltodextrina y el almidón gelatinizado esto es debido al comportamiento de los materiales en las diferentes condiciones de operación de ambos métodos.

**Tabla 13.** Eficiencia de encapsulación de *L. paracasei* subsp. *paracasei* con almidón nativo y poroso utilizando como técnicas de encapsulación secado por aspersión o liofilización.

Tratamiento	Log UFC/g (Inicial)	Log UFC/g (Final)	Eficiencia (%)
AN-SA	17.76 ± 0.07	7.34 ± 0.29	41.34 ± 1.83 <sup>bc</sup>
AP-SA	17.71 ± 0.08	6.32 ± 0.13	35.67 ± 0.79 <sup>c</sup>
MD-AP-SA	18.03 ± 0.44	7.52 ± 0.42	41.60 ± 1.59 <sup>b</sup>
AG-AP-SA	17.13 ± 0.25	6.27 ± 0.32	36.53 ± 1.64 <sup>bc</sup>
MD-AP-LF	14.53 ± 0.33	8.95 ± 0.01	60.71 ± 1.76 <sup>a</sup>
AG-AP-LF	13.91 ± 0.25	8.43 ± 0.03	61.69 ± 1.57 <sup>a</sup>

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado; SA: Secado por aspersión; LF: Liofilización.  
Promedio ± error estándar n=2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

### 7.4.2 Rendimientos

Los rendimientos del proceso, se vieron afectados del mismo modo que la eficiencia, por el método de secado y por los materiales de pared utilizados, como se observa en la tabla 14. Los rendimientos más altos se obtuvieron con la liofilización como método de encapsulación debido a sus características de operación, las pérdidas obtenidas se deben al manejo de las mezclas de alimentación durante el proceso, mientras que los diferentes materiales para la encapsulación tuvieron un efecto sobre los rendimientos como se puede apreciar en los tratamientos de secado por aspersión. El uso de almidón poroso disminuyó el rendimiento en comparación con el almidón nativo, sin embargo, al añadir el material de recubrimiento estos porcentajes variaron, mejorando el rendimiento con el uso de maltodextrina como material de recubrimiento, mientras que con el gelatinizado los rendimientos quedan igual que utilizar únicamente almidón poroso.

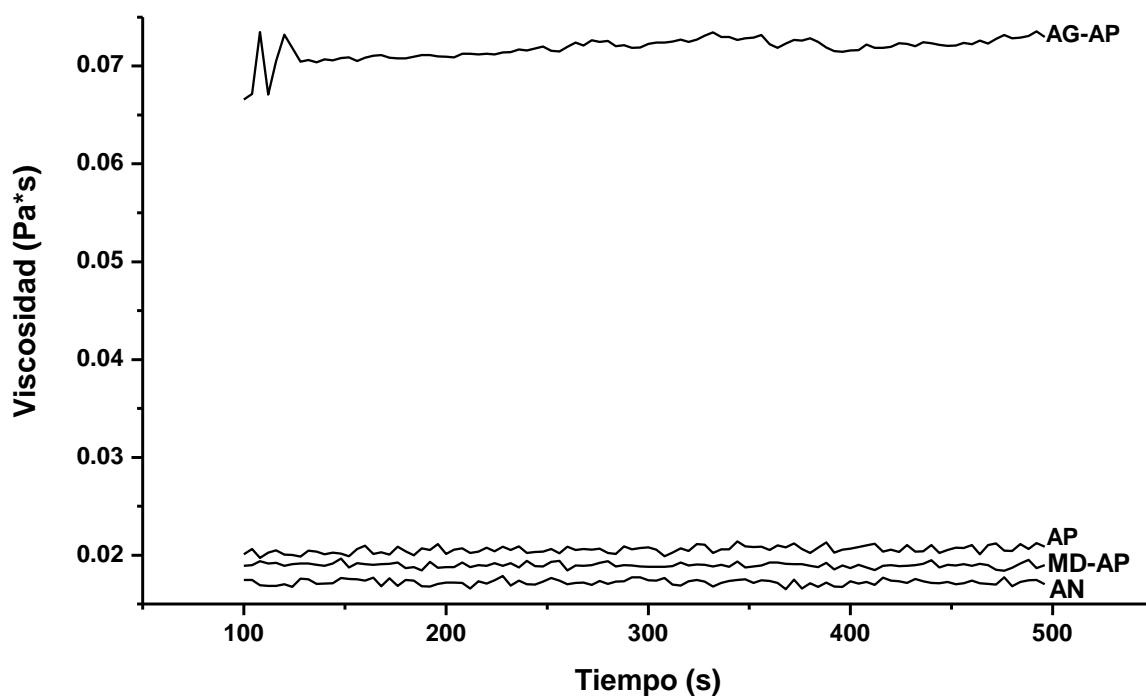
Dentro de los factores que tienen efecto sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión se encuentran los relacionados a las características de la mezcla de alimentación, como la viscosidad, concentración, componentes, temperatura, tensión superficial, etc. (Ho *et al.*, 2017). La viscosidad de las mezclas de alimentación fue distinta dependiendo del material utilizado (figura 11), la viscosidad más alta fue la de la mezcla de alimentación AG-AP, debido a que, al estar gelatinizado los polímeros tienen un mayor número de puntos de unión con el agua, aumentando así su viscosidad. Del mismo modo, la diferencia entre las mezclas restantes se debe a la disponibilidad de grupos hidroxilo para interactuar con el agua, de modo que con la hidrólisis enzimática se generó una mayor cantidad de puntos de interacción con el agua, como se reflejó en el perfil de formación de pasta y en las demás propiedades funcionales del almidón. La mezcla del tratamiento AG-AP tuvo un valor mucho más elevado de viscosidad, en comparación con las demás mezclas de alimentación, es por ello que el rendimiento disminuyó, sin embargo, es estadísticamente igual al almidón poroso AP-SA esto es debido a que, al ser una estructura porosa, el proceso de secado fue mucho más eficaz que con la mezcla AN-SA y MD-AP.

En este sentido los tratamientos AN-SA y MD-AP-SA tuvieron rendimientos estadísticamente iguales a los obtenidos por liofilización debido a que su estructura generó un mayor número de enlaces con el agua, lo cual se vio reflejado en sus propiedades fisicoquímicas.

**Tabla 14.** Rendimientos de encapsulación con almidón nativo o poroso utilizando secado por aspersion y liofilización como métodos de encapsulación.

Tratamiento	Flujo de alimentación (g/min)	Rendimiento (%)
AN-SA	9.7	70.2 ± 0.4 <sup>a</sup>
AP-SA	11.3	45.6 ± 2.2 <sup>b</sup>
MD-AP-SA	10.1	67.9 ± 3.5 <sup>a</sup>
AG-AP-SA	8.8	45.8 ± 2.0 <sup>b</sup>
MD-AP-LF	-	83.5 ± 6.0 <sup>a</sup>
MD-AP-LF	-	80.9 ± 3.6 <sup>a</sup>

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado; SA: Secado por aspersion; LF: Liofilización.  
Promedio ± desviación estándar n=2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11.** Viscosidad de mezclas de alimentación utilizadas en secado por aspersion. (AG-AP) almidón gelatinizado con almidón poroso, (AP) almidón poroso, (MD-AP) maltodextrina con almidón poroso y (AN) almidón nativo.

## 7.5. Caracterización morfológica de microcápsulas

### 7.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido

Como parte de la caracterización morfológica de las partículas obtenidas se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), en donde se observó que después de los procesos de encapsulación la estructura granular del almidón se mantuvo y funciona como una matriz para la encapsulación de *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

En las micrografías se observa que el método de encapsulación fue un factor importante en la formación de aglomerados (figura 12), los cuales variaron de tamaño de acuerdo con el método de encapsulación empleado, corroborando la información mediante distribución de tamaño de partícula. La liofilización favoreció la formación de aglomerados de un tamaño mayor en comparación con los obtenidos en secado por aspersion. Los tratamientos realizados mediante secado por aspersion presentan aglomeraciones de un tamaño menor, esto por efecto de la atomización en el proceso (Amine *et al.*,2014), mientras que en liofilización la poca movilidad de las moléculas generó agrupaciones más grandes. Este mismo comportamiento fue reportado por Amine *et al.* (2014) al encapsular con alginato por medió de extrusión o atomización para posteriormente una liofilización de lo obtenido, observando que el uso de atomización genera partículas más pequeñas.

Por otro lado, los materiales utilizados como recubrimiento (maltodextrina y almidón gelatinizado), tuvieron un comportamiento diferente en función del método de encapsulación empleado, obteniendo diferentes morfologías en los aglomerados generados y sobre la superficie de los gránulos de almidón. En ambos métodos los materiales de recubrimiento parecen unir a los gránulos, generando los agregados descritos. Sin embargo, la mayoría de los poros no fueron cubiertos por los materiales de recubrimiento utilizados, lo cual pudo ser debido a la concentración del material.

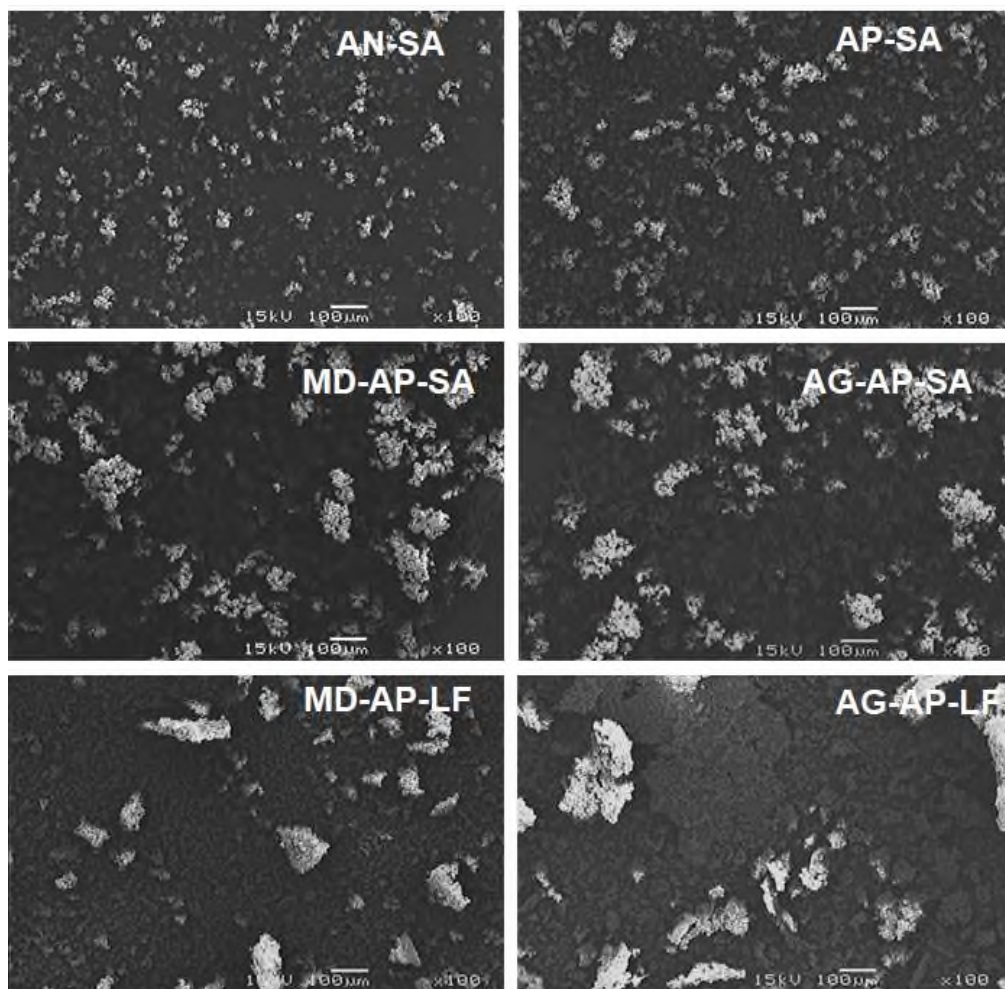
Como se observa en la figura 13 en el secado por aspersion la maltodextrina generó pequeñas esferas que se adhieren a la superficie de los gránulos, mientras que el almidón gelatinizado forma estructuras amorfas que se unen en algunos gránulos de almidón poroso. En el caso de la liofilización el comportamiento de los materiales

de recubrimiento fue diferente ya que estos no formaron estructuras definidas; la maltodextrina es casi imperceptible, mientras que el almidón gelatinizado genera algunas placas que unen a diferentes gránulos.

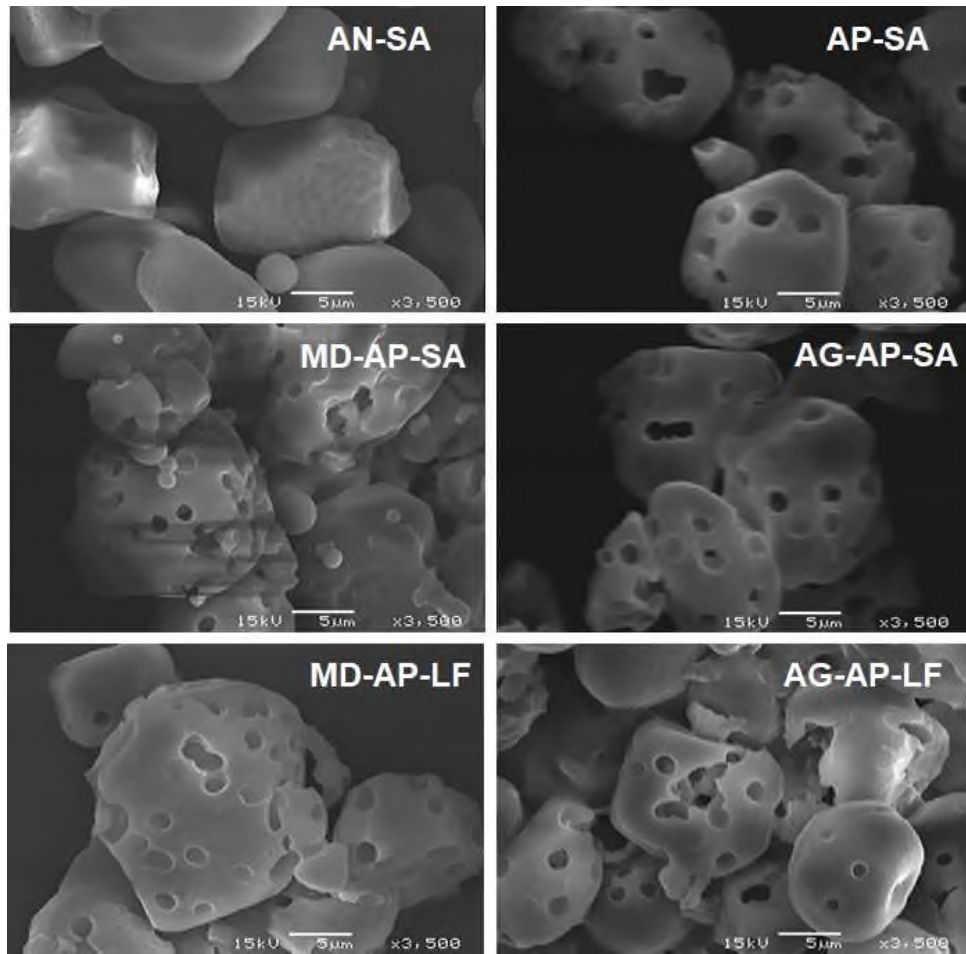
Las morfologías encontradas coinciden con las obtenidas por Xing *et al.* (2014), quienes al utilizar un método de emulsificación y utilizar alginato de sodio para la encapsulación de probióticos con la finalidad de recubrir los gránulos de almidón; y posteriormente obtener un producto seco mediante de liofilización, no lograron el recubrimiento de los poros del gránulo. Del mismo modo, la combinación de otros materiales como manitol, no logran el sellado de estos, obteniendo estructuras con una mayor aglomeración (Xing *et al.*, 2015).

Es importante mencionar que factores como las características de la bacteria y la concentración de bacterias utilizada son importantes para la encapsulación, debido a que la disponibilidad de volumen dentro del gránulo o de la superficie del gránulo puede afectar la eficiencia de encapsulación. De acuerdo con Xing *et al.* (2014) la relación de bacterias y almidón es importante para aprovechar la capacidad del material para albergar a los microorganismos, esto se debe considerar al realizar MEB ya que mientras exista una mayor concentración bacteriana existen mayores posibilidades de observarlas.

En las micrografías obtenidas no se observó la presencia de probióticos sobre la superficie de los almidones, de acuerdo a su tamaño (sección 7.1.1) se sugiere que estas se encuentran alojadas en el interior de los poros del almidón, ya que su presencia en el producto final se corroboró por conteo en placa. Este comportamiento es diferente al descrito por Benavent-Gil *et al.* (2018) en donde las bacterias de *Lactobacillus plantarum* se encuentran expuestas en la superficie del gránulo, algunas con anclaje en los poros del almidón, aunque esta capacidad de adhesión al gránulo de almidón es diferente dependiendo de la cepa bacteriana utilizada (Salem *et al.*, 2013).



**Figura 12.** Microcápsulas generadas mediante (SA) secado por aspersion y (LF) liofilización utilizando como material de pared (AN) almidón nativo, (AP) almidón poroso, (MD) maltodextrina y (AG) almidón gelatinizado. Micrografías obtenidas con una amplificación de 100X



**Figura 13.** Partículas generadas mediante (SA) secado por aspersión y (LF) liofilización utilizando como material de pared (AN) almidón nativo, (AP) almidón poroso, (MD) maltodextrina y (AG) almidón gelatinizado. Micrografías obtenidas con una amplificación de 3500X.

### 7.5.2 Distribución de tamaño de partícula

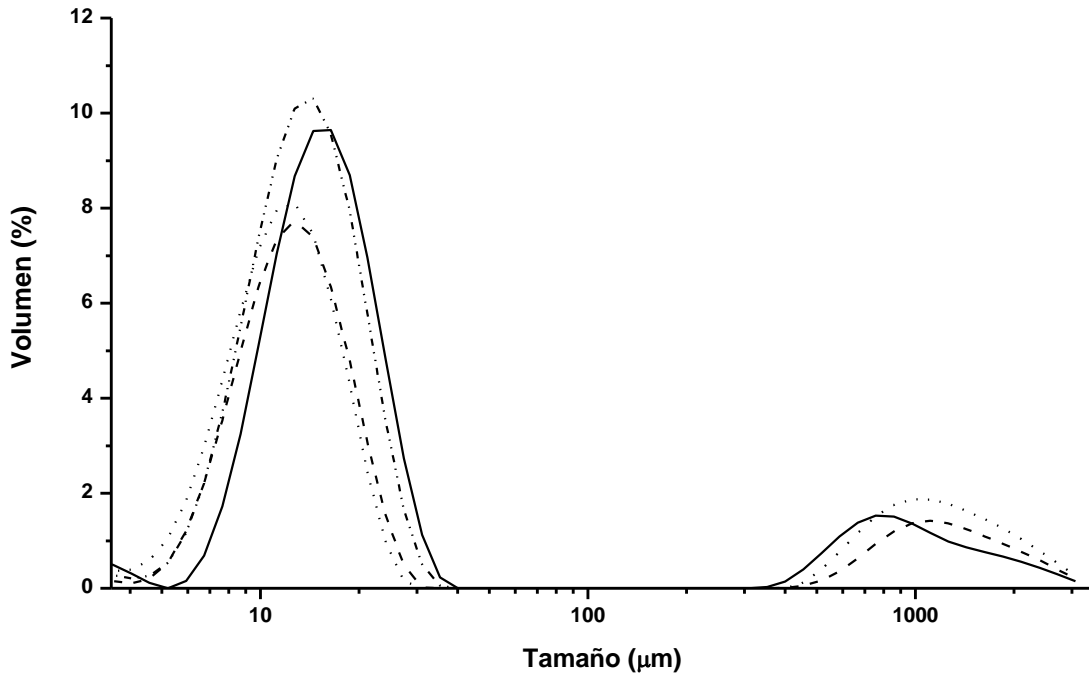
Continuando con la caracterización morfológica se determinó el tamaño de las partículas. Tal como se observó en MEB, las partículas obtenidas mediante secado por aspersión presentaron tamaños menores, además el tratamiento AG-AP-SA tuvo una distribución unimodal, lo que da como resultado partículas más homogéneas, mientras que MD-AP-SA presenta una distribución bimodal, siendo la población más pequeña las partículas de mayor tamaño (figura 14). El tratamiento AG-AP-LF fue el único con una distribución multimodal, lo que indica que el almidón gelatinizado forma aglomerados con los gránulos de almidón de diferente tamaño en comparación con los demás tratamientos.

Cabe mencionar que como se observó en MEB, todos los tratamientos tienen como población predominante aquella que tiene un tamaño de partícula entre 14 y 17  $\mu\text{m}$ , mismos que corresponden al promedio del tamaño del gránulo de almidón de maíz (Rangel-Cortez, 2018), debido a que no existió una modificación estructural del gránulo después de los procesos. Además, la masa molecular de los materiales utilizados para encapsular tiene una influencia en el tamaño de partícula obtenido, es por ello que los tamaños obtenidos son muy similares, ya que, al trabajar con materiales de la misma naturaleza, su masa molecular es similar (Fritzen-Freire *et al.*, 2012). Tal como lo describe Alfaro-Galarza (2019) el tamaño de las partículas generadas está en función del tamaño de gránulo de almidón utilizado, obteniendo partículas más pequeñas al utilizar almidón de malanga que con almidón de arroz en la encapsulación de *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

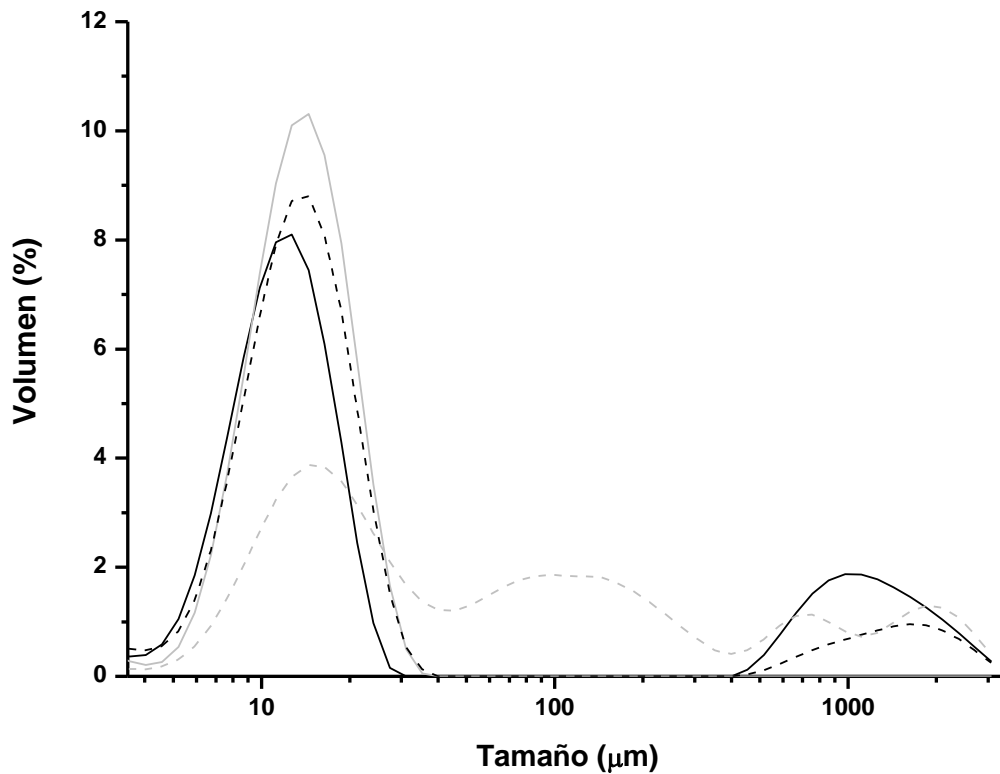
En los tratamientos AN-SA, AP-SA y MD-AP-SA se presentan poblaciones de mayor tamaño en menor proporción. El tratamiento MD-AP-SA presenta una población con mayor abundancia en comparación con las demás, con un tamaño mayor de 1000  $\mu\text{m}$ , el tratamiento AP-SA presenta una población de mismo tamaño, pero en menor, mientras que los tamaños generados en el tratamiento AN-SA alcanzan tamaños de 700  $\mu\text{m}$ .

Las diferencias entre los tamaños generados, por efecto del método de encapsulación utilizado (figura 15), son debido a que el comportamiento en la reorganización molecular es distinto en presencia de temperaturas altas que en temperaturas bajas. Además, la atomización es fundamental para el tamaño de partícula generado, por lo que el método de encapsulación es determinante en el tamaño de partícula. Por ejemplo, cuando se utiliza almidón resistente en el método de emulsificación se producen encapsulados de tamaño promedio de partícula de 45 – 49  $\mu\text{m}$  (Ashwar *et al.*, 2018).

Los tamaños más pequeños de partícula podrían afectar la capacidad de rehidratación, puesto que partículas de mayor tamaño tienen una menor área de exposición con el agua, mientras que una partícula más pequeña tiene una mayor área de contacto con el solvente, permitiendo así una rehidratación más rápida (Fritzen-Freire *et al.*, 2012). Sin embargo, mientras más simétricas sean estas pueden inhibir la penetración de agua debido a la acumulación de partículas (Davies *et al.*, 2005); también el tamaño es una característica que repercute en otras propiedades fisicoquímicas como la densidad.



**Figura 14.** Distribución de tamaño de partícula de microcápsulas obtenidas por secado por aspersion. (—) AN (---) AP (.....) MD-AP (-----) AG-AP.



**Figura 15.** Distribución de tamaño de partícula de microcápsulas con materiales de recubrimiento obtenidas por diferente método de encapsulación. (—) MD-AP-SA (---) MD-AP-LF (-----) AG-AP-SA (.....) AG-AP-LF.

## 7.6. Caracterización fisicoquímica

### 7.6.1 Contenido de humedad y actividad de agua

El contenido de humedad y la actividad de agua son factores críticos para la vida del producto o de la bacteria, se sabe que altos contenidos de agua provocan una pérdida gradual de viabilidad conforme el tiempo de almacenamiento (Meng *et al.*, 2008). Los porcentajes de humedad altos, así como valores de actividad de agua elevados, le otorgan una menor estabilidad al producto final, debido a que durante su almacenamiento se podrán llevar a cabo reacciones bioquímicas que modifiquen sus características (Heidebach *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo obtenido, el método de encapsulación empleado tuvo un efecto sobre la  $a_w$ , mientras que el material de pared tuvo influyó sobre el porcentaje de humedad (tabla 15), esto influenciado principalmente por las características moleculares de los materiales.

El contenido de agua residual recomendado para conservar la viabilidad por más tiempo es de 4 % o menos (Heidebach *et al.*, 2010), lo que nos dice que los tratamientos evaluados serán capaces de mantener su viabilidad, siendo menos probable los tratamientos AN-SA y AG-AP-SA, además de tener el riesgo de ser más fácilmente colonizadas por otro microorganismo del ambiente.

En secado por aspersión, los porcentajes de humedad principalmente se ven afectados por el tipo de material y por las temperaturas de operación utilizadas, lo que asegura un secado eficiente (Liao *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016; Rajam y Anandharamakrishnan, 2015); a mayores temperaturas se obtienen productos con un menor contenido de agua, como lo obtienen Paéz *et al.* (2012) logrando una humedad de 3.69 % con una temperatura de salida de 85 °C en la generación de sus microcápsulas.

Ahora bien, el concepto de actividad de agua está relacionada con el agua libre (agua no enlazada a moléculas del alimento) en el producto, la cual es aprovechada para fines metabólicos por microorganismos (Vesterlund *et al.*, 2012). En alimentos secos este atributo tiene un valor por lo menos de 0.2, sin embargo, para que un

producto sea considerado microbiológica y bioquímicamente estable, valores menores o iguales a 0.6 con suficientes. (Arepally y Goswami, 2019). Para productos probióticos una  $a_w \leq 0.25$  es lo recomendado debido a que, a este valor de  $a_w$  se asegura su viabilidad e integridad ya que, con una menor actividad de agua, la célula puede presentar una mayor cantidad de daños estructurales, por ejemplo, una  $a_w$  menor a 0.1 puede llevar a una oxidación de lípidos, y por lo tanto reducir su viabilidad (Heidebach *et al.*, 2010; Vesterlund *et al.*, 2012).

El método de encapsulación influye en la  $a_w$ , de acuerdo a lo obtenido en el presente trabajo y por otros autores; Ashwar *et al.* (2018) reportó que el uso de una emulsión con una posterior liofilización generó partículas con una  $a_w$  de 0.34-0.42 con lo que aseguran su estabilidad, mientras que Huang *et al.* (2017) reportó que mediante secado por aspersión al encapsular *Lactobacillus casei*, obtuvieron microcápsulas con un porcentaje promedio de humedad de 5.2 % y una  $a_w$  de 0.27, corroborando que las temperaturas de secado son un factor importante en el contenido de agua presente en la muestra. El bajo contenido de agua alarga la vida útil del producto, sin embargo, es importante que el almacenamiento sea adecuado, manteniendo valores de  $a_w$  bajos para mejorar una estabilidad enzimática (Vesterlund *et al.*, 2012).

**Tabla 15.** Porcentaje de humedad y actividad de agua de microcápsulas obtenidas por secado por aspersión y liofilización con almidón nativo y poroso.

Tratamiento	$a_w$	% Humedad
AN-SA	$0.258 \pm 0.018^a$	$5.15 \pm 0.13^{ab}$
MP-SA	$0.307 \pm 0.004^a$	$3.18 \pm 0.30^c$
MD-AP-SA	$0.303 \pm 0.025^a$	$4.42 \pm 0.18^{bc}$
AG-AP-SA	$0.331 \pm 0.010^a$	$6.13 \pm 0.42^a$
MD-AP-LF	$0.034 \pm 0.002^b$	$0.73 \pm 0.05^d$
AG-AP-LF	$0.081 \pm 0.030^b$	$0.23 \pm 0.11^d$

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado; SA: Secado por aspersión; LF: Liofilización.  
Promedio  $\pm$  error estándar n=2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ )

### 7.6.2 Propiedades de flujo

La densidad de un polvo es considerada para determinar las características de almacenamiento y empaquetado de un producto o se toma en cuenta para la formulación de nuevos productos (Knowlton *et al.*, 1994). Además, a partir de la densidad a granel y compactada se puede determinar la interacción entre partículas con el índice de Hausner y el de Carr, los cuales reflejan la capacidad de asentamiento de un polvo, traduciéndose en su capacidad para fluir (FEUM, 2016).

En la tabla 16 se observa que el tipo de material utilizado en la encapsulación tuvo un efecto sobre la densidad del producto obtenido, mejorando las propiedades de flujo después del secado por aspersion en comparación con los valores de cada material (tabla 17). Dentro de las principales características que tienen influencia sobre la densidad de las micropartículas se pueden encontrar principalmente el tamaño de partícula, mientras menor sea el tamaño de las partículas pueden existir mayor interacción entre ellas y una dificultad para fluir; la morfología de estas, en la que partículas con superficie lisa tendrán mejores propiedades de flujo; y el porcentaje de humedad, en el que partículas más secas tendrán menor interacción entre ellas (Tze *et al.*, 2012; Karaaslan y Dalgic, 2014).

Los polvos con mejores propiedades de flujo fueron los obtenidos por liofilización (tabla 16), clasificándose con propiedades buenas, de acuerdo con el índice de Carr (sección 6.10.3, tabla 4), esto debido a las características anteriormente descritas, ya que fueron partículas con un tamaño mayor, superficies con estructuras más uniformes y valores de humedad y  $a_w$  muy bajos. Mientras que las partículas obtenidas mediante secado por aspersion presentaron un comportamiento diferente dependiendo de los materiales utilizados.

El tratamiento MD-AP-SA fue el único que presento una propiedad de flujo pobre, este comportamiento influenciado principalmente por la morfología obtenida (figura 13), la formación de pequeñas esferas de maltodextrina genera una mayor fuerza de cohesión entre los gránulos con superficies poco uniformes en las agrupaciones formadas, sin embargo, su contenido alto de humedad tuvo un efecto lubricante (Tze *et al.*, 2012).

Las partículas con una menor densidad y por lo tanto con mejores propiedades de flujo fueron las del tratamiento AP-SA, estas presentaron un menor contenido de humedad (3.18 %) en comparación con los demás tratamientos, además de encontrarse partículas con un tamaño de 110  $\mu\text{m}$ , siendo el contenido de humedad el factor más importante en los valores de densidad obtenidos, mientras que la densidad baja obtenida en el tratamiento AG-AP-SA se debe a la presencia de almidón gelatinizado, lo que da como resultado superficies más lisas en el gránulo de almidón poroso.

Cabe mencionar que la baja fluidez también está relacionada con las fuerzas de Van der Waals y con las fuerzas electroestáticas, mismas que se ven afectadas por el contenido de humedad (Tze *et al.*, 2012).

**Tabla 16.** Densidad de las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión y liofilización con almidón nativo y poroso.

	Densidad a granel (g/cm <sup>3</sup> )	Densidad compactada (g/cm <sup>3</sup> )	Índice de Hausner	Índice de Carr	Propiedad de flujo
AN-SA	0.52 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.09	25.00 ± 5.00	Aceptable
AP-SA	0.21 ± 0.02 <sup>cd</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.25 ± 0.00	20.00 ± 0.00	Aceptable
MD-AP-SA	0.33 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.45 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.06	27.00 ± 3.00	Pobre
AG-AP-SA	0.17 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.28 ± 0.03	21.67 ± 1.67	Aceptable
MD-AP-LF	0.43 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.00	17.14 ± 0.00	Aceptable-Buena
AG-AP-LF	0.31 ± 0.04 <sup>bcd</sup>	0.37 ± 0.05 <sup>bc</sup>	1.20 ± 0.01	16.43 ± 0.71	Aceptable-Buena

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado; SA: Secado por aspersión; LF: Liofilización.  
Promedio ± desviación estándar n=2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 17.** Densidad de los materiales utilizados para la encapsulación de *L. paracasei* subsp. *paracasei* con almidón nativo y poroso utilizando secado por aspersión o liofilización como métodos de encapsulación.

	Densidad a granel (g/cm <sup>3</sup> )	Densidad compactada (g/cm <sup>3</sup> )	Índice de Hausner	Índice de Carr	Propiedad de flujo
AN	0.51 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.03	22.00 ± 2.00	Aceptables
AP	0.36 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.50 ± 0.00 <sup>c</sup>	1.39 ± 0.00	28.00 ± 0.00	Pobres
MD	0.44 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.00	38.00 ± 0.00	Extremadamente malas
AG	0.20 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.57 ± 0.01	36.27 ± 0.27	Muy pobres

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado.  
Promedio ± desviación estándar n=2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

### 7.6.3 Temperatura de transición vítrea

Del mismo modo en que la densidad es un factor importante para las características de almacenamiento y transporte de un producto, la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) también debe ser tomada en cuenta. Si la temperatura de almacenamiento se encuentra por arriba de la  $T_g$  del alimento, probablemente existan cambios en el alimento como la pérdida de funcionalidad, cristalización, colapso estructural, oxidación de lípidos, pérdida de compuestos volátiles, pegajosidad etc. (Bhandari y Roos, 2017).

Los procesos en la industria alimenticia como el secado por aspersion y la liofilización pueden afectar la estructura de los materiales, modificando la  $T_g$ . Sin embargo, de acuerdo con el análisis realizado (tabla 18) las partículas obtenidas no presentan diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) en su  $T_g$  a pesar de los diferentes métodos de secado utilizados, esto debido a que el componente mayoritario en todos los tratamientos es el mismo: almidón de maíz.

Mismo comportamiento se reportó por Sánchez-Rivera (2018) al encapsular ácido gálico con almidón de maíz nativo y almidones modificados enzimática y químicamente, presentaron los mismos valores de  $T_g$  ( $\sim 61.1$  °C) cercanos a los obtenidos, sin embargo, las condiciones de secado utilizadas fueron distintas por lo que las diferencias pueden ser debido al agua presente en las microcápsulas obtenidas debido a que los valores de  $a_w$  reportados fueron mayores, lo que influye en la  $T_g$ .

A pesar de que la  $T_g$  comúnmente se ve influenciada por la presencia de agua, de modo que, a mayor contenido de agua la  $T_g$  se ve disminuida (Forseell *et al.*, 1998), el contenido de agua de las partículas obtenidas no fue determinante en la  $T_g$ , observando que las  $T_g$  menores fueron las de las partículas obtenidas mediante liofilización, las cuales tienen un menor contenido de agua. Del mismo modo lo describe Shi *et al.* (2016) en la encapsulación de compuestos activos, en el que observan una diferencia numérica entre secar las nanopartículas generadas mediante emulsión y posteriormente secadas por liofilización y secado por aspersion, las partículas secadas por liofilización presentaron una menor  $T_g$ .

Comparado con lo obtenido por Behboudi-Jobbehdar *et al.* (2013) las partículas obtenidas en el presente trabajo tienden a ser más estables y es posible almacenarlas a temperaturas más altas que las obtenidas por ellos, en las cuales se utilizó como material de pared un complejo carbohidrato-proteína y con las condiciones óptimas en secado por aspersión para este sistema y cuya Tg fue de 59 °C.

La mejora de los valores obtenidos en comparación con lo reportado por Shi *et al.* (2016) y Behboudi-Jobbehdar *et al.*, (2013) es el uso de otros materiales en la obtención de las cápsulas mientras que, en el presente trabajo, el material principal es el almidón de maíz cuya Tg determinada fue de 66.67 °C (tabla 19), la cual es baja en comparación con lo reportado en la literatura, en la que se reportan valores desde 64 °C hasta ~78.5 °C dependiendo del contenido de humedad y de la relación amilosa/amilopectina del almidón (Louaer *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010).

La consecuencia de que las temperaturas de almacenamiento sean cercanas a la Tg conllevan a que exista una movilidad molecular del agua presente y por lo tanto exista una actividad metabólica de las células bacterianas (Behboudi-Jobbehdar *et al.* (2013), lo que afecta la estabilidad de la viabilidad bacteriana en el almacenamiento. Por lo que, si la Tg es alta es menos probable que con las condiciones ambientales exista una numerosa muerte celular.

**Tabla 18.** Temperaturas de transición vítrea de las partículas obtenidas por liofilización y secado por aspersión.

<b>Tratamiento</b>	<b>Tg</b>
AN-SA	67.78 ± 0.06 <sup>a</sup>
AP-SA	68.17 ± 1.02 <sup>a</sup>
MD-AP-SA	68.23 ± 0.39 <sup>a</sup>
AG-AP-SA	67.03 ± 0.10 <sup>a</sup>
MD-AP-LF	67.49 ± 0.14 <sup>a</sup>
AG-AP-LF	67.98 ± 0.11 <sup>a</sup>

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado; SA: Secado por aspersión; LF: Liofilización. Promedio ± error estándar n=2. No existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 19.** Temperatura de transición vítrea de diferentes materiales utilizados para la encapsulación.

<b>Material</b>	<b>Tg</b>
AN	66.67 ± 0.50 <sup>a</sup>
AP	67.19 ± 0.86 <sup>a</sup>
MD	68.12 ± 0.17 <sup>a</sup>
AG	67.63 ± 0.23 <sup>a</sup>

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado. Promedio ± error estándar n=2. No existen diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

### 7.7. Resistencia a condiciones gástricas

El proceso de digestión se compone de distintas etapas en el sistema gastrointestinal, a través de las cuales, los alimentos consumidos se convierten moléculas más pequeñas que se traducen en nutrimentos y energía. El proceso comienza en la boca y termina en el intestino delgado en el que sucede la absorción de nutrientes. Este proceso se da gracias a los movimientos peristálticos que suceden a través de todo el sistema digestivo, además por la secreción de sustancias y enzimas para la degradación de los alimentos. Algunas condiciones son extremas para que los alimentos puedan ser degradados.

La primera condición extrema sucede en el estómago en donde la presencia de jugos gástricos, producen un pH de 2.0 y la presencia de pepsina ayuda a hidrolizar los compuestos de los alimentos, es por ello que las partículas obtenidas se sometieron a estas condiciones, determinando su viabilidad, transcurridas 2 h.

Como se observa en la figura 16, *L. paracasei subsp. paracasei* sin algún tratamiento presenta una pérdida del 100 % de la viabilidad a los 60 min de exposición a condiciones gástricas, mientras que el tiempo mínimo de permanencia de los alimentos y líquidos en el estómago es de 2 h. Ahora bien, las partículas obtenidas con la bacteria encapsulada resisten el tiempo de exposición, con una variación en la viabilidad final y con un comportamiento diferente a lo largo del tiempo.

El método de encapsulación fue importante en el comportamiento de la viabilidad en condiciones gástricas. Las partículas obtenidas por liofilización presentan la menor pérdida de viabilidad final (5.61 y 11.35 %), además de mantener una pérdida de viabilidad constante desde los 30 min de exposición sin encontrar diferencias estadísticas entre los materiales utilizados, mientras que los obtenidos mediante secado por aspersión tuvieron una pérdida gradual de viabilidad conforme se aumentaba el tiempo de exposición (tabla 20). Además, existe una diferencia en la supervivencia al finalizar el tiempo determinado, lo cual se encuentra relacionado con las características anteriormente descritas.

El uso de almidón poroso a pesar de disminuir las eficiencias de encapsulación, tiene una menor pérdida de viabilidad en condiciones gástricas en comparación con el almidón nativo, en el que las bacterias quedan más expuestas al ambiente, provocando una mayor muerte celular, lo que coincide con lo obtenido por Xing *et al.* (2014), quienes observan cierto grado de protección a la bacteria al utilizar almidón poroso el cual puede ser mejorado dependiendo la proporción de almidón utilizada.

Por lo contrario, Li *et al.* (2016) no encuentran diferencia entre almidón nativo y almidón poroso teniendo pérdidas de viabilidad cercanos al 20 % en condiciones gástricas, sin embargo, esta aseveración se debe a la cepa probiótica que utilizaron (*Lactobacillus plantarum*), tiene una mayor resistencia a ácidos en comparación con *L. paracasei* ya que presentó una reducción del 50 % de su viabilidad en condiciones ácidas. Además, es importante mencionar que las pruebas las realizaron sin utilizar enzimas implicadas en el proceso de digestión; por otro lado, los poros que logran generar en el almidón presentaron un tamaño menor en comparación con los generados en la presente investigación, lo que pudo provocar una menor protección, la mayor parte de las bacterias pudieron quedar expuestas en la superficie de acuerdo a lo reportado por Benavent-Gil *et al.* (2018), aunque reportan la presencia de bacterias dentro del gránulo de almidón.

El tratamiento con mayor susceptibilidad a ácidos fue AG-AP-SA, teniendo en cuenta que el tamaño de las partículas obtenidas fue menor, lo que incrementa el área de contacto con la solución ácida. En comparación con el tratamiento MD-AP-SA en el que el tamaño de las partículas generadas fue mayor, lo que favoreció en la protección de los microorganismos a las condiciones gástricas.

En los tratamientos realizados con materiales de recubrimiento, la viabilidad de las bacterias cuantificadas fue menor, esto pudo ser debido a que, durante el proceso de encapsulación un porcentaje de bacterias hayan sido atrapadas en las estructuras que se formaron, o que se localicen en la superficie como parte del recubrimiento del gránulo, siendo una matriz mucho más sensible a condiciones gástricas. O bien, la protección haya sido mejor, y las bacterias vivas no se

cuantificaron debido a que se mantuvieron protegidas y debido a la metodología empleada no se lograron contabilizar, lo cual se podría corroborar mediante microscopía confocal.

Xing *et al.* (2014) encapsularon *L. acidophilus* en diferentes concentraciones de almidón poroso, describen una protección a las condiciones ácidas utilizando un 10 % de almidón poroso, ya que al utilizar una menor concentración la protección disminuye debido a que hay menor cantidad de poros disponibles para el alojamiento de bacterias, mismo comportamiento obtenido en lo realizado, en el que la cantidad de bacterias utilizadas fue similar para lograr esta protección a ácidos.

Los tratamientos liofilizados, además de ser más resistentes a condiciones gástricas, también son más estables entre los tiempos de exposición en el medio, mientras que los tratamientos obtenidos mediante secado por aspersion tienen una pérdida de viabilidad gradual (tabla 20), puesto que los aglomerados obtenidos en liofilización alcanzaron tamaños mayores en comparación con secado por aspersion (sección 7.5.2).

Alfaro-Galarza (2019) menciona que la protección de los microorganismos se mejora al utilizar almidones de gránulo pequeño, al obtener una pérdida del 15.23 % en condiciones ácidas, a pesar de esto, la supervivencia en estas condiciones con el almidón poroso, y con materiales de recubrimiento, presentaron mejor supervivencia.

Cabe resaltar que se comparó la supervivencia con un producto comercial obteniendo tratamientos con una mejor conservación de viabilidad a condiciones gástricas, es necesario mencionar que el producto comercial es obtenido por liofilización y contiene inulina, maltodextrina y es un conjunto de distintas especies bacterianas cuya resistencia a ácidos en forma libre podrían ser distintas a la resistencia de *L. paracasei*.

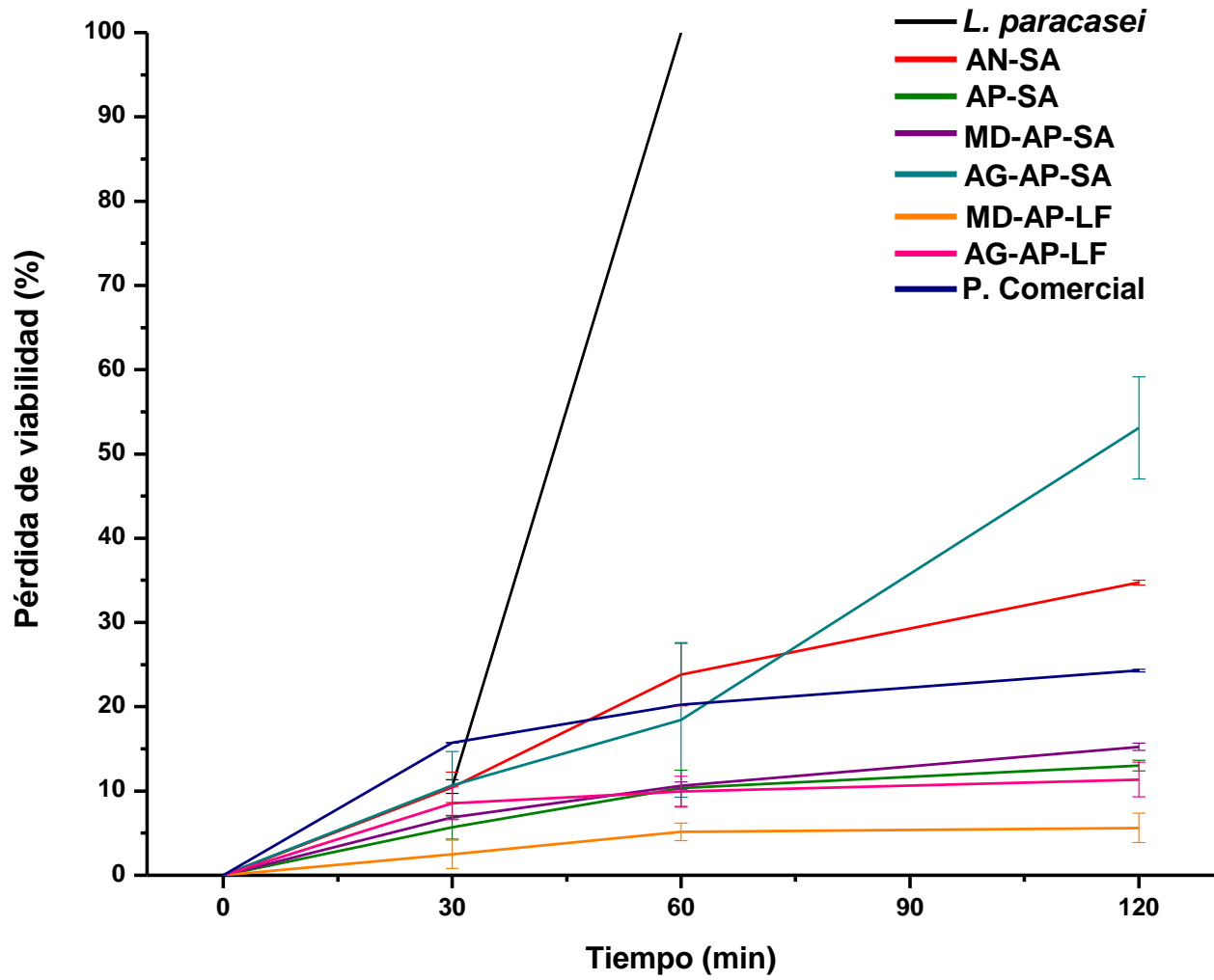


Figura 16. Pérdida de viabilidad en condiciones gástricas.

\*\*P.Comercial: Producto comercial

**Tabla 20.** Porcentaje de pérdida de viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* en condiciones gástricas con distintos tiempos de exposición.

Tratamiento	Tiempo (min)		
	30	60	120
<i>L. paracasei</i>	10.54 ± 0.82 <sup>ABa</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>Cb</sup>	-
AN-SA	10.44 ± 1.81 <sup>ABa</sup>	23.83 ± 3.71 <sup>Bab</sup>	34.74 ± 0.30 <sup>Cb</sup>
AP-SA	5.69 ± 1.38 <sup>Aa</sup>	10.33 ± 2.14 <sup>ABa</sup>	13.00 ± 0.64 <sup>Aa</sup>
MD-AP-SA	6.87 ± 0.23 <sup>Aa</sup>	10.64 ± 0.41 <sup>ABb</sup>	15.23 ± 0.43 <sup>ABc</sup>
AG-AP-SA	8.76 ± 2.14 <sup>ABa</sup>	15.70 ± 6.44 <sup>ABa</sup>	51.75 ± 4.70 <sup>Db</sup>
MD-AP-LF	2.49 ± 1.68 <sup>Aa</sup>	5.14 ± 1.03 <sup>Aa</sup>	5.61 ± 1.74 <sup>Aa</sup>
AG-AP-LF	8.54 ± 1.95 <sup>ABa</sup>	9.92 ± 1.84 <sup>ABa</sup>	11.35 ± 2.06 <sup>Aa</sup>
P. Comercial	15.73 ± 0.01 <sup>Ba</sup>	20.23 ± 0.03 <sup>ABb</sup>	24.30 ± 0.15 <sup>Cc</sup>

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado; SA: Secado por aspersión; LF: Liofilización; P. Comercial: Producto comercial. Promedio ± error estándar n=4. Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas. Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

### **7.8. Resistencia a condiciones intestinales**

Otro de los ambientes gastrointestinales que es crítico para la viabilidad de los probióticos es la exposición a sales biliares. Como se observa en la figura 17, la especie de *L. paracasei* es resistente a la presencia de sales biliares en conjunto con pancreatina, la viabilidad se mantiene durante las ocho horas de exposición a esta condición, llegando a una pérdida de viabilidad del 2.97 % (tabla 21).

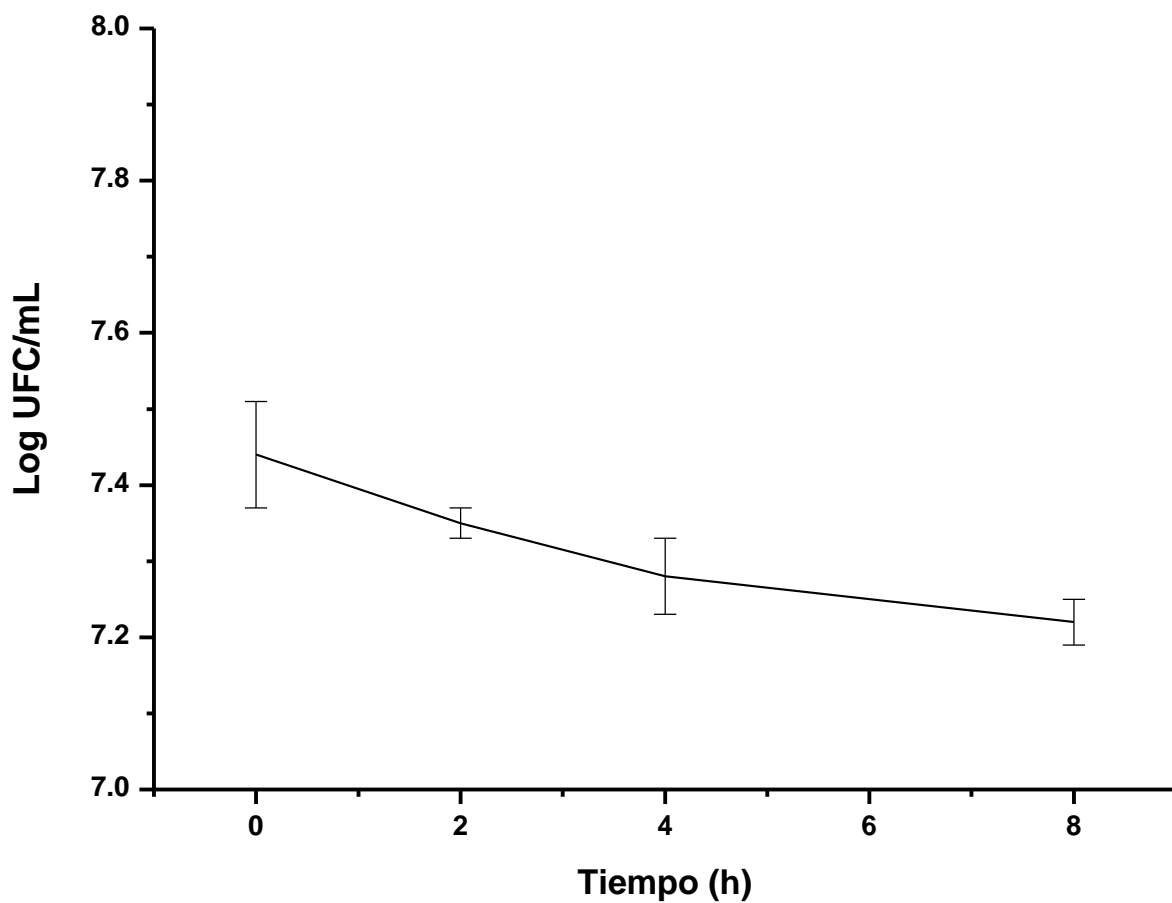
De acuerdo con la caracterización realizada por Ljungh *et al.* (2002) de la cepa de *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19, esta es capaz de sobrevivir a una exposición de sales biliares del 20 % durante 2 h, del mismo modo, en un estudio realizado por Fernández de Palencia *et al.* (2008) demuestran que, en condiciones ácidas, *L. paracasei* tiene una pérdida alta de viabilidad, mientras que en exposición a sales biliares y medios alcalinos tienen una alta supervivencia.

Debido a estos resultados con la cepa bacteria sin encapsular, se decidió no realizar la simulación con las partículas obtenidas de los tratamientos realizados, ya que se puede decir que no representa una condición en la que se pueda ver afectada la viabilidad bacteriana.

**Tabla 21.** Pérdida de viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* en presencia de jugos intestinales *in vitro*.

Tiempo (h)	Pérdida de viabilidad (%)
2	1.25 ± 1.06 <sup>a</sup>
4	2.14 ± 1.22 <sup>a</sup>
8	2.97 ± 1.09 <sup>a</sup>

Promedio ± error estándar (n=3). No existen diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

**Figura 17.** Viabilidad de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* en jugos intestinales.

### 7.9. Pérdida de viabilidad durante el almacenamiento

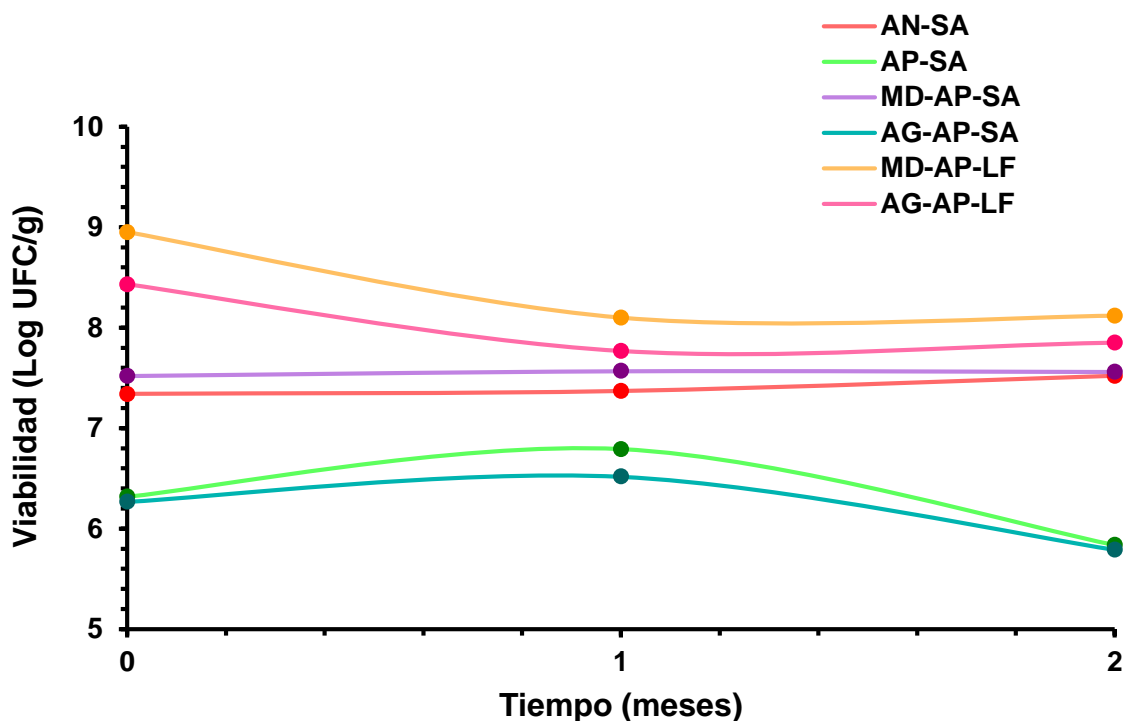
Además de una estabilidad fisicoquímica de las partículas obtenidas y de su estabilidad en condiciones gastrointestinales, es importante que la viabilidad del producto obtenido se mantenga a lo largo del tiempo, manteniendo la dosis probiótica. Por ello se determinó la viabilidad al tiempo 0, 1 y 2 meses a partir de la obtención de éstas.

El efecto del tiempo sobre la viabilidad de las partículas obtenidas con los diferentes tratamientos se discutió a partir de las gráficas en dos dimensiones obtenidas (figura 18) y el análisis estadístico realizado. En la tabla 22 se reportan los coeficientes de regresión ( $\beta_{ij}$ ) del modelo propuesto (ec. 13).

**Tabla 22.** Coeficientes de regresión para la viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* durante el almacenamiento a 4 °C.

Tratamiento	Tiempo	Valor de CR	Valor de p
AN-SA	$\beta_{i0}$	7.371	0.133
	$\beta_{i1}$	0.089	0.495
	$\beta_{i2}$	0.061	0.787
AP-SA	$\beta_{i0}$	6.791	0.000
	$\beta_{i1}$	-0.240	0.069
	$\beta_{i2}$	-0.714	0.002
MD-AP-SA	$\beta_{i0}$	7.566	0.442
	$\beta_{i1}$	0.020	0.881
	$\beta_{i2}$	-0.027	0.904
AG-AP-SA	$\beta_{i0}$	6.516	0.000
	$\beta_{i1}$	-0.239	0.071
	$\beta_{i2}$	-0.489	0.034
MD-AP-LF	$\beta_{i0}$	8.101	0.202
	$\beta_{i1}$	-0.416	0.002
	$\beta_{i2}$	0.435	0.058
AG-AP-LF	$\beta_{i0}$	7.767	0.000
	$\beta_{i1}$	-0.291	0.029
	$\beta_{i2}$	0.374	0.102

AN: Almidón nativo; AP: Almidón poroso; MD: Maltodextrina; AG: Almidón gelatinizado; SA: Secado por aspersión; LF: Liofilización; CR: Coeficiente de regresión del modelo propuesto (ec. X).  $\beta_{ij}$ : es el CR que relaciona el factor tiempo con la viabilidad. Los términos se consideraron estadísticamente significativos con valores de  $p < 0.05$ .



**Figura 18.** Viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* durante el almacenamiento a 4 °C. Líneas continuas generadas a partir del modelo de regresión empleado, mientras que los marcadores indican la media de los resultados experimentales.

Como se observa en la figura 18, la viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* a través del tiempo se mantuvo estable con los tratamientos AN-SA y MD-AP-SA y de acuerdo con el análisis estadístico no existen diferencias en los términos analizados, manteniéndose prácticamente la misma viabilidad desde la obtención de las partículas hasta después de dos meses de almacenamiento.

Mientras que los tratamientos AP-SA y AG-AP-SA presentan un comportamiento distinto a través del tiempo, presentando un incremento en la viabilidad en el primer mes y posteriormente una disminución, sin embargo, existe suficiente evidencia estadística para asegurar que la viabilidad se mantiene a través del tiempo de almacenamiento, al menos bajo las condiciones evaluadas.

Es importante mencionar que para los tratamientos obtenidos a partir de liofilización (MD-AP-LF y AG-AP-LF), el tiempo de almacenamiento es determinante sobre la viabilidad, obteniendo CR negativos de acuerdo con el modelo propuesto (tabla 22), indicando una relación inversa entre la viabilidad y el tiempo, lo cual corresponde a una pérdida de viabilidad siendo más evidente en MD-AP-LF (figura 18). Sin embargo, en el término cuadrático del tiempo, existe una relación positiva (tabla 22), lo cual sugiere un aumento en la viabilidad o una estabilidad microbiológica después de un tiempo de adaptación.

La conservación de la viabilidad durante el almacenamiento depende de diferentes factores como pueden ser el método de encapsulación y el material encapsulante empleado, la cantidad de células dañadas durante el proceso, las condiciones de almacenamiento como la temperatura, humedad relativa, oxígeno, exposición a la luz y de características del producto final como la humedad y la Tg (Gul *et al.*, 2017)

De acuerdo con los resultados, se observó una mejor estabilidad durante el almacenamiento de las partículas obtenidas mediante secado por aspersion, esto pudo ser debido a que las condiciones de operación utilizadas fueron muy cercanas a la Tg de los materiales utilizados en los que el mayor componente eran almidón nativo y almidón poroso de maíz. Debido a que el gránulo de almidón es un polímero vítreo, protege mejor a los probióticos por lo que la estabilidad durante el almacenamiento se ve favorecida (Heidebach *et al.*, 2010).

La Tg de los productos finales es una característica importante para determinar la temperatura de almacenamiento, debido a que el almacenamiento en temperaturas mayores a la Tg de los productos finales, lo llevan a un estado gomoso en donde son más susceptibles a reacciones químicas que afectan la viabilidad. Perdana *et al.* (2014) mencionan que la temperatura de almacenamiento más recomendable para sus productos obtenidos fue por debajo de 40 °C, siendo mucho más estables conforme la temperatura disminuía, esto fue determinado por la Tg de los productos finales, ya que aquellos con una Tg mayor a 40 °C mantenían su viabilidad mientras que en los productos con una Tg por debajo de los 40 °C, la disminuían. Con lo que podemos sugerir que las partículas obtenidas en el presente trabajo, pueden ser

almacenadas a temperatura ambiente, debido a que las Tg obtenidas se encuentran en 67.7 °C en promedio.

Además de que la temperatura de secado influye en la eficiencia de encapsulación, también su efecto se puede reflejar en la viabilidad a través del tiempo de almacenamiento, ya que mayor temperatura los daños estructurales a la célula son más severos quedando la bacteria susceptible a las condiciones ambientales que la puedan dañar (Desmond *et al.*, 2002). Sin embargo, nuestros resultados comparados con los obtenidos por Alfaro-Galarza (2019) en el que se emplea secado por aspersión utilizando como materiales encapsulantes, almidón nativo de malanga y de arroz, fueron mejores al mantener la viabilidad durante el primer mes de almacenamiento a 4 °C, mientras que Alfaro-Galarza reporta una pérdida de 0.45 y 0.55 Log UFC/g respectivamente, esto pudo estar influenciado con las temperaturas de secado utilizadas, ya que las utilizadas por Alfaro-Galarza (2019) fueron menores, lo que pudo generar polvos con un mayor contenido de agua, dando menor estabilidad fisicoquímica y microbiológica.

La temperatura de almacenamiento es uno de los factores determinantes en la conservación de la viabilidad, las temperaturas cercanas a 0 °C propician una mejor estabilidad en la viabilidad debido a que reducen la presencia de reacciones químicas perjudiciales como la oxidación de ácidos grasos (Heidebach *et al.*, 2010). Desmond *et al.* (2002) al estudiar 4, 15 y 30 °C como temperaturas de almacenamiento, consideran 4 °C mejor para la estabilidad, mejorando de acuerdo al material empleado. Misma conclusión de Alfaro-Galarza (2019) al comparar 4 y 25 °C como temperaturas de almacenamiento y de Tao *et al.* (2019) al comparar con 20 °C.

La protección que brindó el almidón durante el proceso de secado por aspersión y durante el almacenamiento puede ser debido a que, al ser un carbohidrato de alto peso molecular, le brinda protección a la bacteria mediante la fijación de las bacterias en las cavidades porosas de la matriz, lo que dificulta la movilidad de la bicapa lipídica de la membrana celular de las bacterias (Perdana *et al.*, 2014). Perdana *et al.*, (2014) sugieren que los carbohidratos interactúan con los

fosfolípidos de la membrana celular, y en consecuencia brindan una mejor estabilidad durante el proceso de secado y el almacenamiento del producto obtenido.

Del mismo modo Xing *et al.* (2015) al encapsular *L. acidophilus* con gelificación iónica- liofilización y probando el uso de diferentes materiales como manitol, glicerol, almidón poroso y una mezcla de estos, mejora la estabilidad el uso con almidón poroso y la mezcla de materiales, lo que confirma la efectiva protección de la bacteria con el uso de almidón. La protección se ve reflejada en su viabilidad a través del tiempo, partiendo de una concentración inicial de bacterias de aproximadamente 9.3 Log UFC/g y a las 8 semanas de almacenamiento (4 °C) se encontraron concentraciones de 4.12, 6.3, 7.0 y 7.12 Log UFC/g para manitol, glicerol, almidón poroso y mezcla de estos materiales, respectivamente (Xing *et al.*, 2015).

Tao *et al.* (2019) encapsularon *L. paracasei* con leche descremada, utilizando como materiales coencapsulantes diferentes carbohidratos y encontraron que el alginato de sodio y la carboximetilcelulosa mejoran la estabilidad; sin embargo, los resultados del ensayo de estabilidad son muy similares a lo obtenido en el presente trabajo bajo condiciones de refrigeración: la pérdida de viabilidad a los dos meses es mínima.

A pesar de que en la literatura la liofilización se describe como una técnica adecuada para la conservación de materiales biológicos, en el presente trabajo se encontró que después de dos meses de almacenamiento existe una mayor pérdida de viabilidad en comparación con el secado por aspersion. Caso contrario con lo obtenido por Moayyedi *et al.*, (2018) en el que la liofilización garantiza mayor supervivencia bacteriana en comparación con secado por aspersion y electropulverización; sin embargo, estos resultados pueden ser influenciados por otras características como el contenido de agua en la muestra, el cual, al ser mucho menor puede provocar daños en la célula, como la oxidación de lípidos afectando la estructura celular.

Se ha comprobado que a una  $a_w$  menor en el almacenamiento (0.07- 0.1), la viabilidad es más estable (Dianawati *et al.*, 2013a), sin embargo, valores  $a_w$  muy bajas después del secado lleva a bajas supervivencia, debido a un daño progresivo debido a la deshidratación, aumentando el daño celular por la eliminación de agua estructural de la célula (Heidebach *et al.*, 2010) lo que pudo ser la razón por la cual los tratamientos liofilizados tuvieron una mayor pérdida de viabilidad.

Por otro lado, un valor elevado de humedad relativa (HR) propicia la oxidación de lípidos lo que conduce a una reducción en la viabilidad, se debe tener en consideración que la muestra siempre buscará un equilibrio con el ambiente, por lo que, si el contenido de agua del producto es bajo, pero la HR de las condiciones de almacenamiento es alta, habrá un incremento en el contenido de agua de la muestra. Heidebach *et al.* (2010) consideran que HR entre el 7- 11 % son adecuadas para mantener la viabilidad bacteriana.

## 8. CONCLUSIÓN

La liofilización y el secado por aspersion, utilizados como métodos de encapsulación de *L. paracasei* subsp. *paracasei*, permitieron mejorar la estabilidad de las bacterias usando como material encapsulante almidón poroso de maíz.

El almidón poroso de maíz obtenido mediante hidrólisis enzimática mantuvo la mayoría de las propiedades funcionales de un almidón nativo y presentó diámetros de poros adecuados para la encapsulación de bacterias, de acuerdo con los resultados obtenidos las bacterias alojadas en los poros generados tienen una mayor protección al mantener una viabilidad más estable en condiciones gástricas. No obstante, las eficiencias en comparación con el almidón nativo se ven reducidas al emplear secado por aspersion, mismas que pueden ser mejoradas con el uso de otros materiales como se observó con la maltodextrina. Además, otros materiales pueden mejorar la estabilidad y características fisicoquímicas y morfológicas del producto final, dependiendo la naturaleza y concentración de estos.

Los métodos de encapsulación fueron determinantes en parámetros como la eficiencia, resistencia a condiciones gástricas y la estabilidad durante el almacenamiento. La eficiencia de encapsulación mejoró con la liofilización, además las partículas obtenidas fueron más resistentes a condiciones gástricas junto con los tratamientos AP-SA y MD-SA; por otro lado, las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersion presentaron una mejor estabilidad durante el almacenamiento, manteniendo la viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* durante los dos meses de almacenamiento a 4 °C, lo cual se relacionó con las características fisicoquímicas de los productos obtenidos.

## 9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- Realizar cinéticas de hidrólisis y un seguimiento morfológico y estructural a los productos obtenidos.
- Evaluar las mejores condiciones de hidrólisis enzimática en fuentes no convencionales de almidón.
- Realizar el estudio de la obtención de almidones porosos mediante modificaciones genéticas.
- Comparar los beneficios de *L. paracasei* subsp. *paracasei* con otros probióticos.
- Estudiar el efecto de la temperatura de salida en secado por aspersion, sobre la viabilidad de *L. paracasei* subsp. *paracasei* utilizando almidón como material de encapsulación.
- Evaluar el uso de diferentes materiales de recubrimiento en porcentajes mayores a los utilizados.
- Estudiar el uso de almidón gelatinizado de otras fuentes botánicas para ser utilizado como material de recubrimiento, aprovechando las diferentes propiedades funcionales.

## 10. REFERENCIAS

- Ahn, Y. T., Lim, K. L., Ryu, J. C., Kang, D. K., Ham, J. S., Jang, Y. H., & Kim, H. U. (2002). Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(12), 1790-1797.
- Alfaro-Galarza, O. (2019). *Microencapsulación de Lactobacillus paracasei subsp. paracasei mediante secado por aspersión* (Tesis de maestría). Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo.
- Amine, K. M., Champagne, C. P., Salmieri, S., Britten, M., St-Gelais, D., Fustier, P., & Lacroix, M. (2014). Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *bifidobacterium longum* during freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 111-117.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International.
- Aparicio-Saguilán, A., Méndez-Montealvo, G., Solorza-Feria, J., & Bello-Pérez, L. A. (2006). Thermal and viscoelastic properties of starch gels from maize varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7), 1078-1086.
- Arepally, D., & Goswami, T. K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT*, 99, 583-593.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Gani, A., Shah, A., & Masoodi, F. A. (2018). Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chemistry*, 239, 287-294.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902-912.
- Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., & Fisk, I. (2013). Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*, 31(11), 1274-1283.
- Benavent-Gil, Y., Rodrigo, D., & Rosell, C. M. (2018). Thermal stabilization of probiotics by adsorption onto porous starches. *Carbohydrate Polymers*, 197, 558-564.
- Benavent-Gil, Y., & Rosell, C. M. (2017). Comparison of porous starches obtained from different enzyme types and levels. *Carbohydrate Polymers*, 157, 533-540.

- Bendali, F., Madi, N., & Sadoun, D. (2011). Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(11), e787-e794.
- Bertoft, E., Annor, G. A., Shen, X., Rumpagaporn, P., Seetharaman, K., & Hamaker, B. R. (2016). Small differences in amylopectin fine structure may explain large functional differences of starch. *Carbohydrate Polymers*, 140, 113-121.
- Bhandari, B. & Roos, Y. H. (2017). Introduction to Non-Equilibrium States and Glass Transitions- The Fundamentals Applied to Foods Systems. En Bhandari, B, & Ross, Y. H. (Ed.), *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods Processing Effects and Product-Specific Implications* (pp. XXXIII-XLIX). United Kingdom: Elsevier.
- Biliaderis, C. G. (1991). The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69(1), 60-78.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. [Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
- Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 123-128.
- Brisbin, J. T., Parvizi, P., & Sharif, S. (2012). Differential cytokine expression in T-cell subsets of chicken caecal tonsils co-cultured with three species of *Lactobacillus*. *Beneficial Microbes*, 3(3), 205-210. doi:10.3920/BM2012.0014
- Carlos-Amaya, F., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Yee-Madeira, H., & Bello-Pérez, L. A. (2011). Physicochemical and digestibility properties of double-modified banana (*Musa paradisiaca* L.) starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1376-1382.
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Chen, G., & Zhang, B. (2012). Hydrolysis of granular corn starch with controlled pore size. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 316-320.
- Chiang, S., & Pan, T. (2012). Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 903-916.

- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56-67.
- Davies, C. E., Tallon, S. J., & Brown, N. (2005). Continuous monitoring of bulk density and particle size in flowable powders and grains. *Chemical Engineering Research and Design*, 83(7 A), 782-787.
- de Araújo Etchepare, M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, E. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S., . . . de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 511-517.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Desmond, C., Ross, R. P., O'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(6), 1003-1011.
- Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2013a). Stability of microencapsulated *lactobacillus acidophilus* and *lactococcus lactis* ssp. *cremoris* during storage at room temperature at low aw. *Food Research International*, 50(1), 259-265.
- Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2013b). Survival of *bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food Research International*, 51(2), 503-509.
- Dianawati, D., & Shah, N. P. (2011). Enzyme stability of microencapsulated *bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 after freeze drying and during storage in low water activity at room temperature. *Journal of Food Science*, 76(6), M463-M471.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9), M446-M450.
- Dominguez-Bello, M. G., & Blaser, M. J. (2008). Do you have a probiotic in your future? *Microbes and Infection*, 10(9), 1072-1076.
- Dura, A., Błaszczak, W., & Rosell, C. M. (2014). Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 837-845.
- Fannon, J. E., Gray, J.A., Gunawan, N. & Huber, K.C. (2003). "The channels of starch granules." *Food Science and Biotechnology* 12: 700-704.

- FAO (2006). Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma. ISBN 92-5-105513-0.
- Fernández De Palencia, P., López, P., Corbí, A. L., Peláez, C., & Requena, T. (2008). Probiotic strains: Survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology*, 227(5), 1475-1484.
- FEUM (2016). MGA.1031. Densidad Aparente y Densidad Compactada de Polvos F. d. I. E. U. Mexicanos.
- Forssell, P. M., Mikkilä, J. M., Moates, G. K., & Parker, R. (1998). Phase and glass transition behaviour of concentrated barley starch-glycerol-water mixtures, a model for thermoplastic starch. *Carbohydrate Polymers*, 34(4), 275-282.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45(1), 306-312.
- Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5), 1127-1149.
- Gardiner, G. E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., . . . 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), 2605-2612.
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149-163. doi:10.3390/pharmaceutics4010149
- Genkina, N. K., Wikman, J., Bertoft, E., & Yuryev, V. P. (2007). Effects of structural imperfection on gelatinization characteristics of amylopectin starches with A- and B-type crystallinity. *Biomacromolecules*, 8(7), 2329-2335.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15(7-8), 330-347.
- Gul, O. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus casei shirota* by spray drying using different combinations of wall materials and application for probiotic dairy dessert. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5).

- Gul, O., & Atalar, I. (2019). Different stress tolerance of spray and freeze dried *Lactobacillus casei shirota* microcapsules with different encapsulating agents. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 807-816.
- Hedayati, S., & Niakousari, M. (2018). Microstructure, pasting and textural properties of wheat starch-corn starch citrate composites. *Food Hydrocolloids*, 81, 1-5.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2010). Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*, 98(3), 309-316.
- Ho, T.M., Truong, T. & Bhandari, B. (2017). Spray-Drying and Non-Equilibrium States/ Glass Transition. En. Bhandari, B. & Roos, Y.H. (Ed.) *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods Processing Effects and Product-Specific Implications* (pp.111-132) United Kingdom: Elsevier.
- Hong, Y., Liu, G., & Gu, Z. (2016). Recent advances of starch-based excipients used in extended-release tablets: A review. *Drug Delivery*, 23(1), 12-20.
- Hoover, R., & Ratnayake, W. S. (2002). Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. *Food Chemistry*, 78(4), 489-498.
- Huang, S., Vignolles, M. -, Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 1-17.
- Huber, K. C., & Bemiller, J. N. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 41(3), 269-276.
- Hulleman, S. H. D., Kalisvaart, M. G., Janssen, F. H. P., Feil, H., & Vliegthart, J. F. G. (1999). Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticized, compression-moulded potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 39(4), 351-360.
- Jane, J. -, Kasemsuwan, T., Leas, S., Zobel, H., & Robyt, J. F. (1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch - Stärke*, 46(4), 121-129.
- Jin, Y., Li, J. Z., & Malaki Nik, A. (2017). Starch-based microencapsulation. En Sjöo, M. & Nilsson, L. (Ed.) *Starch in food: Structure, function and applications: Second edition* (pp. 661-690). United Kingdom: Elsevier.
- Jung, Y., Lee, B., & Yoo, S. -. (2017). Physical structure and absorption properties of tailor-made porous starch granules produced by selected amylolytic enzymes. *PLoS ONE*, 12(7)

- Karaaslan, İ., & Dalgıç, A. C. (2014). Spray drying of liquorice (*glycyrrhiza glabra*) extract. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3014-3025.
- Kaur, B., Ariffin, F., Bhat, R., & Karim, A. A. (2012). Progress in starch modification in the last decade. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 398-404.
- Kim, W., Jang, Y. J., Seo, B., Han, D. H., Park, S., & Ko, G. (2019). Administration of *lactobacillus paracasei* strains improves immunomodulation and changes the composition of gut microbiota leading to improvement of colitis in mice. *Journal of Functional Foods*, 52, 565-575.
- Knowlton, T.M., Carson, J.W., Klinzing, G.E. & Yang, W-C. (1994). The Importance of Storage, Transfer and Collection. *Chemical Engineering Progress*, 44-54.
- Kortstee, A. J., Suurs, L. C. J. M., Vermeesch, A. M. G., Keetels, C. J. A. M., Jacobsen, E., & Visser, R. G. F. (1998). The influence of an increased degree of branching on the physico-chemical properties of starch from genetically modified potato. *Carbohydrate Polymers*, 37(2), 173-184.
- Lawal, O. S., Lapasin, R., Bellich, B., Olayiwola, T. O., Cesàro, A., Yoshimura, M., & Nishinari, K. (2011). Rheology and functional properties of starches isolated from five improved rice varieties from west africa. *Food Hydrocolloids*, 25(7), 1785-1792.
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1303-1315.
- Lei, M., Jiang, F., Cai, J., Hu, S., Zhou, R., Liu, G., . . . Xiong, X. -. (2018). Facile microencapsulation of olive oil in porous starch granules: Fabrication, characterization, and oxidative stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 755-761.
- Lewicka, K., Siemion, P., & Kurcok, P. (2015). Chemical modifications of starch: Microwave effect. *International Journal of Polymer Science*, 2015
- Leyva-López, R., Palma-Rodríguez, H. M., López-Torres, A., Capataz-Tafur, J., Bello-Pérez, L. A., & Vargas-Torres, A. (2019). Use of enzymatically modified starch in the microencapsulation of ascorbic acid: Microcapsule characterization, release behavior and in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, 96, 259-266.
- Li, H., Jiao, A., Wei, B., Wang, Y., Wu, C., Jin, Z., & Tian, Y. (2013). Porous starch extracted from chinese rice wine vinasse: Characterization and adsorption properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 156-159.
- Li, H., Thuy Ho, V. T., Turner, M. S., & Dhital, S. (2016). Encapsulation of *lactobacillus plantarum* in porous maize starch. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 542-549.

- Liao, L., Wei, X., Gong, X., Li, J., Huang, T., & Xiong, T. (2017). Microencapsulation of *lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 82-89.
- Linares, D. M., Ross, P., & Stanton, C. (2016). Beneficial microbes: The pharmacy in the gut. *Bioengineered*, 7(1), 11-20.
- Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 55-66.
- Liu, P., Yu, L., Wang, X., Li, D., Chen, L., & Li, X. (2010). Glass transition temperature of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 388-391.
- Liu, Y., Li, Y., Shi, T., Zhao, J., Wang, H., Liu, T., . . . Zhu, Z. (2016). The optimization of spray drying process of *lactobacillus reuteri*. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 615-618.
- Ljungh, Å., Lan, J., & Yanagisawa, N. (2002). Isolation, selection and characteristics of *lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14(SUPPL. 3), 4-6.
- López, L. y Torres, C. (2006). Trabajo Practico No. 6 Identificación. Microbiología General-Farmacia. Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste. Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>
- Louaer, W., Meniai, A., & Grolier, J. E. (2008). Thermal analysis of the influence of water content on glass transitions: Heat capacities of starches from different origins. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93(2), 605-610.
- Mali, S., Ferrero, C., Redigonda, V., Beleia, A. P., Grossmann, M. V. E., & Zaritzky, N. E. (2003). Influence of pH and hydrocolloids addition on yam (*dioscorea alata*) starch pastes stability. *LWT - Food Science and Technology*, 36(5), 475-481.
- Martin, C., & Smith, A. M. (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell*, 7(7), 971-985.
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15-25.
- Martínez-Peña, M., Castro-Escarpulli, G. & Aguilera-Arreola, G. (2012). "Microbiota vaginal normal: los lactobacilos." *MedLab* 4: 17-25.

- Mayorga-Reyes, L., Azaola-Espinosa, A & Gutiérrez-Nava, A. (2010). "Revisión bibliográfica. Probióticos y su potencial en la prevención del cáncer de colon." *ContactoS* 77: 10-15.
- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., & Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106(4 SPEC. ISS.), 1406-1416.
- Miao, M., Zhang, T., Mu, W., & Jiang, B. (2011). Structural characterizations of waxy maize starch residue following in vitro pancreatin and amyloglucosidase synergistic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 214-220.
- Mirzaei, H., Pourjafar, H., & Homayouni, A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry*, 132(4), 1966-1970.
- Moayyedi, M., Eskandari, M. H., Rad, A. H. E., Ziaee, E., Khodaparast, M. H. H., & Golmakani, M. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*, 40, 391-399.
- Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Najafi, M. B. H., & Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, 42(8), 1040-1045.
- Nag, A., Han, K. -, & Singh, H. (2011). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, 21(4), 247-253.
- Nale, Z., Tontul, I., Aşçi Arslan, A., Sahin Nadeem, H., & Kucukcetin, A. (2018). Microbial viability, physicochemical and sensory properties of kefir microcapsules prepared using maltodextrin/Arabic gum mixes. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 61-72.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 182-186.
- Nireesha, GR., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjan Babu, M. & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/ Freeze Drying- An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3 (4), 87-98.
- Noda, T., Takahata, Y., Sato, T., Suda, I., Morishita, T., Ishiguro, K., & Yamakawa, O. (1998). Relationships between chain length distribution of

amylopectin and gelatinization properties within the same botanical origin for sweet potato and buckwheat. *Carbohydrate Polymers*, 37(2), 153-158.

Nunes, G. L., Etchepare, M. D. A., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Jacob Lopes, E., Barin, J. S., . . . de Menezes, C. R. (2018). Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of lactobacillus acidophilus encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 128-133.

Ortiz-Balderas, M. (2006). *Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo* (Tesis de pregrado). Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, Hidalgo.

Paéz, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., & Reinheimer, J. (2012). Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 48(2), 748-754.

Paim, D. R. S. F., Costa, S. D. O., Walter, E. H. M., & Tonon, R. V. (2016). Microencapsulation of probiotic jussara (*euterpe edulis M.*) juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 21-25.

Palma-Rodriguez, H. M., Agama-Acevedo, E., Mendez-Montealvo, G., Gonzalez-Soto, R. A., Vernon-Carter, E. J., & Bello-Pérez, L. A. (2012). Effect of acid treatment on the physicochemical and structural characteristics of starches from different botanical sources. *Starch/Staerke*, 64(2), 115-125.

Paredes-López, O., Bello-Pérez, L. A., & López, M. G. (1994). Amylopectin: Structural, gelatinisation and retrogradation studies. *Food Chemistry*, 50(4), 411-417.

Patel, R., & Dupont, H. L. (2015). New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60, S108-S121.

Peighambardoust, S. H., Golshan Tafti, A., & Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 22(5), 215-224.

Perdana, J., Fox, M. B., Siwei, C., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2014). Interactions between formulation and spray drying conditions related to survival of *lactobacillus plantarum* WCFS1. *Food Research International*, 56, 9-17.

Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M.A., Tortoló-Cabañas, K., Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para

- microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47, 14-25.
- Qi, X. & Tester, R.F. (2019). Starch granules as active guest molecules or microorganism delivery systems. *Food Chemistry*, 271, 182-186.
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 773-780.
- Rangel-Cortez, A.J. (2018). *Caracterización morfológica, fisicoquímica y estructural del almidón de semillas del árbol de hule (Hevea brasiliensis)* (Tesis de maestría). Universidad del Papaloapan, San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.
- Rezazadeh, A., Shahabi, S., Bagheri, M., Nabizadeh, E., & Jazani, N. H. (2018). The protective effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* as the gut microbiota members against chronic urticaria. *International Immunopharmacology*, 59, 168-173.
- Robyt, J. F. (2009). Enzymes and their action on starch. *Starch* (pp. 237-292).
- Rodríguez, YA., Rojas, AF. & Rodríguez-Barona S. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud*. 15(2), 106-115.
- Rodríguez-Barona S., Giraldo, G.I. & Montes, L.M. (2016). Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos. *Información Tecnológica*, 27(6), 135-144.
- Salem, G., Hassan, Z., & Abubakr, M. (2013). Adhesion of probiotic bacteria to resistant rice starch. *American Journal of Applied Sciences*, 10(4), 313-321.
- Sánchez-Rivera, J. (2018). *Desarrollo de micropartículas a partir de almidón modificado de maíz usado como material de soporte para la encapsulación de compuestos bioactivos* (Tesis de pregrado). Universidad del Papaloapan, San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.
- Sandoval-Peraza, M., Cu-Cañetas, T., Peraza-Mercado, G. & Acereto-Escoffie, P.O.M. (2016). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.) *Alimentos Funcionales de Hoy* (pp. 181-218). Barcelona, España: OmniaScience.
- Shi, A., Li, D., Liu, H., Adhikari, B., & Wang, Q. (2016). Effect of drying and loading methods on the release behavior of ciprofloxacin from starch nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 55-61.

- Shokryazdan, P., Jahromi, M. F., Liang, J. B., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Idrus, Z., & Ho, Y. W. (2017). In vitro assessment of bioactivities of lactobacillus strains as potential probiotics for humans and chickens. *Journal of Food Science*, 82(11), 2734-2745.
- Simperler, A., Kornherr, A., Chopra, R., Bonnet, P. A., Jones, W., Motherwell, W. D. S., & Zifferer, G. (2006). Glass transition temperature of glucose, sucrose, and trehalose: An experimental and in silico study. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(39), 19678-19684.
- Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Fries, L. L. M., Bernardi, A. O., & Copetti, M. V. (2019). Survival and stability of *lactobacillus fermentum* and *wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90-94.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Tao, T., Ding, Z., Hou, D., Prakash, S., Zhao, Y., Fan, Z., . . . Han, J. (2019). Influence of polysaccharide as co-encapsulant on powder characteristics, survival and viability of microencapsulated *lactobacillus paracasei* lpc-37 by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 252, 10-17.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004a). Starch - composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- Thitipraphunkul, K., Uttapap, D., Piyachomkwan, K., & Takeda, Y. (2003). A comparative study of edible canna (*canna edulis*) starch from different cultivars. part I: Chemical composition and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 53(3), 317-324.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225-241.
- Tze, N. L., Han, C. P., Yusof, Y. A., Ling, C. N., Talib, R. A., Taip, F. S., & Aziz, M. G. (2012). Physicochemical and nutritional properties of spray-dried pitaya fruit powder as natural colorant. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 675-682.
- Uthumporn, U., Karim, A. A., & Fazilah, A. (2013). Defatting improves the hydrolysis of granular starch using a mixture of fungal amylolytic enzymes. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 441-449.
- Uthumporn, U., Zaidul, I. S. M., & Karim, A. A. (2010). Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 47-54.

- Vamadevan, V., & Bertoff, E. (2015). Structure-function relationships of starch components. *Starch/Staerke*, 67(1-2), 55-68.
- Vandeputte, G. E., & Delcour, J. A. (2004). From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: A focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 58(3), 245-266.
- Vesterlund, S., Salminen, K., & Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 319-321.
- Wang, H., Lv, J., Jiang, S., Niu, B., Pang, M., & Jiang, S. (2016). Preparation and characterization of porous corn starch and its adsorption toward grape seed proanthocyanidins. *Starch/Staerke*, 68(11-12), 1254-1263.
- Wang, M., Chen, Y., Wang, Y., Li, Y., Zhang, X., Zheng, H., . . . Liao, Q. (2018). Beneficial changes of gut microbiota and metabolism in weaned rats with *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* bi-07 supplementation. *Journal of Functional Foods*, 48, 252-265.
- Xing, Y., Xu, Q., Jiang, L., Cao, D., Lin, H., Che, Z., . . . Cai, Y. (2015). Effect of different coating materials on the biological characteristics and stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. *RSC Advances*, 5(29), 22825-22837.
- Xing, Y., Xu, Q., Ma, Y., Che, Z., Cai, Y., & Jiang, L. (2014). Effect of porous starch concentrations on the microbiological characteristics of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. *Food and Function*, 5(5).
- Zeng, H., Chen, P., Chen, C., Huang, C., Lin, S., Zheng, B., & Zhang, Y. (2018). Structural properties and prebiotic activities of fractionated lotus seed resistant starches. *Food Chemistry*, 251, 33-40.
- Zhang, B., Cui, D., Liu, M., Gong, H., Huang, Y., & Han, F. (2012). Corn porous starch: Preparation, characterization and adsorption property. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1), 250-256.
- Zhang, H., Wang, Y., Sun, J., Guo, Z., Guo, H., & Ren, F. (2013). Safety evaluation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC-01, a probiotic bacterium. *Journal of Microbiology*, 51(5), 633-638.
- Zhang, L., Chen, X. D., Boom, R. M., & Schutyser, M. A. I. (2018). Survival of encapsulated *Lactobacillus plantarum* during isothermal heating and bread baking. *LWT*, 93, 396-404.