



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD MICHOACÁN



**“Elaboración de un alimento funcional a base de
Saccharomyces boulardii e inulina “**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE

PRESENTA:

QFB RAFAEL ZAMORA VEGA

DIRECTORES DE TESIS

DR. JOSÉ LUÍS MONTAÑEZ SOTO

DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

Jiquilpan, Michoacán, México. Noviembre de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich; siendo las 13:00 horas del día 22 del mes de Noviembre Del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR - MICH. para examinar la tesis titulada:

"Elaboración de un alimento funcional a base de Saccharomyces boulardii e inulina".

Presentada por el alumno:

ZAMORA

Apellido paterno

VEGA

Apellido materno

RAFAEL

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	3	8	7
---	---	---	---	---	---	---

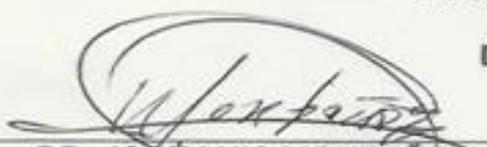
aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

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

LA COMISIÓN REVISORA

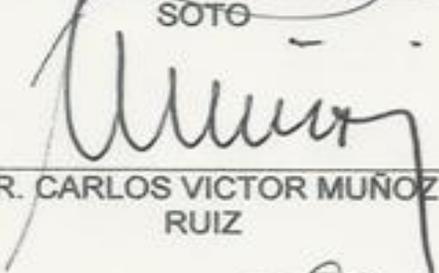
Directores de tesis



DR. JOSÉ LUIS MONTAÑEZ
SOTO



DR. HÉCTOR EDUARDO
MARTÍNEZ FLORES



DR. CARLOS VÍCTOR MUÑOZ
RUIZ



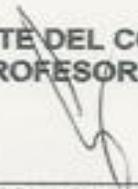
M.C. REBECA FLORES
MAGALLON



DR. JOSÉ VENEGAS
GONZALEZ



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE
PROFESORES



DR. GUILLERMO HERRERA ARREOLA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez Michoacán el día 22 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Rafael Zamora Vega alumno (a) del Programa de **Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable** con número de registro B091387, adscrito a **C.I.I.D.I.R. I.P.N. Unidad Michoacán**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de DC. José Luis Montañés Soto y cede los derechos del trabajo intitulado "Desarrollo de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boullardii* e *inulina*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección quimic08@hotmail.com, montasoto@yahoo.com.mx, hedu65@hotmail. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Rafael Zamora Vega

Nombre y firma



Esta Tesis fue realizada con el apoyo de la beca Institucional y beca PIFI otorgadas por el Instituto Politécnico Nacional.

“Desarrollo de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e inulina”



Un especial agradecimiento al Laboratorio de Alimentos y de Microbiología de la Facultad de Químicofarmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Dedicatoria

a

Yunión

a

Mis padres y hermanos

Es precisamente a ustedes a quienes dedico la presente tesis, pues ustedes son la razón de mí existir.

Agradecimientos

A Dios

Agradezco infinitamente por darnos salud, y con ello la oportunidad de compartir esta importante etapa de mi vida con todos mis seres queridos.

A Yunuén

A ti querida esposa por tu apoyo y comprensión, durante el trayecto de este trabajo, por estar siempre a mi lado en todo momento y por la alegría que hoy en día disfrutamos. TE AMO

A mis Padres.

Mario y Rosa María, por el apoyo mostrado y por estar ahí siempre que los he necesitado. Gracias.

A mis hermanos.

Jesús, Dulce, Lili, Mario y Maribel. Por estar siempre ahí y apoyarme en toda ocasión.

A mis Amigos.

En quienes me apoye y también en ocasiones descuide, sé que siguen ahí con su fiel amistad,

A mis directores de tesis.

Con especial gratitud al Dr. José Luis Montañez Soto y al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores quienes han sido un ejemplo y mi guía a seguir y me han tendido una mano amiga durante el desarrollo de esta tesis.

A mis Profesores. Les agradezco de todo corazón sus enseñanzas, sus observaciones, pero sobre todo sus críticas sin las cuales sería más difícil lograr el éxito.

A mis revisores de tesis.

A Mc. Rebeca Flores Magallón, DC. José Venegas González, DC. Carlos Muñoz por sus sabios consejos y apoyo brindado cuando lo necesite en la realización de esta tesis.



INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	IV
INDICE DE TABLAS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1 INTRODUCCIÓN	- 1 -
2 ANTECEDENTES	- 5 -
2.1 Alimentos funcionales	- 6 -
2.2 Ingredientes prebióticos.....	- 7 -
2.2.1 Fructanos.....	- 7 -
2.2.2 Inulinas	- 8 -
2.2.3 Fructooligosacáridos	- 9 -
2.2.4 Beneficios que aporta el consumo de alimentos prebióticos	- 9 -
2.2.5 Fuentes potenciales.....	- 10 -
2.3 Probióticos	- 11 -
2.3.1 Origen de los probióticos	- 12 -
2.3.2 Definición de probiótico.....	- 13 -
2.3.3 Características que debe reunir un microorganismo probiótico	- 14 -
2.3.4 Beneficios de los probióticos en la salud del huésped.....	- 14 -
2.3.5 Consumo de probióticos	- 15 -
2.3.6 Dosis recomendada de probióticos.....	- 15 -
2.3.7 Principales microorganismos probióticos	- 16 -
2.3.8 Formas de empleo.....	- 16 -
2.3.9 <i>Saccharomyces boulardii</i>	- 17 -
2.4 Simbióticos.....	- 18 -
2.4.1 Definición de simbiótico.....	- 20 -
2.5 Microencapsulación.....	- 21 -



2.5.1	Técnicas y materiales de encapsulación.....	- 22 -
2.5.2	Material encapsulante (hidrocoloides)	- 23 -
2.5.2.1	Mucílago de Nopal	- 23 -
2.5.2.2	Alginato	- 25 -
2.7	Objetivo general	- 27 -
2.7.1	Objetivos particulares	- 27 -
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 28 -
3.1	Materias prima.....	- 29 -
3.4	Métodos.....	- 29 -
3.4.1	Extracción del mucílago de nopal	- 29 -
3.4.2	Preparación y análisis de los geles	- 30 -
3.4.2.1	Formulaciones de mezclas de hidrocoloides	- 30 -
3.4.2.2	Propiedades texturales de los geles formados	- 31 -
3.4.3	Proceso de encapsulación de la levadura <i>Saccharomyces boulardii</i>	- 33 -
3.4.4	Viabilidad del microorganismo.....	- 34 -
3.4.5	Microscopía Electrónica de Barrido.....	- 34 -
3.4.6	Elaboración del alimento funcional.....	- 35 -
3.4.7	Viabilidad del microorganismo probiótico en el alimento funcional	- 36 -
3.4.8	Análisis microbiológico del alimento funcional.....	- 36 -
3.4.9	Análisis Bromatológico del alimento funcional.....	- 36 -
3.4.10	Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> in vitro	- 37 -
3.4.11	Evaluación Sensorial	- 37 -
3.4.12	Análisis estadístico	- 37 -
4.1	Análisis del perfil de textura	- 39 -
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 38 -
4.2	Formación de las microcápsulas.....	- 41 -
4.3	Viabilidad del microorganismo probiótico encapsulado.....	- 42 -
4.4	Microscopia electrónica de barrido	- 44 -
4.5	Alimento funcional	- 45 -
4.6	Análisis microbiológico del alimento funcional	- 49 -
4.7	Viabilidad del microorganismo en el alimento funcional.....	- 50 -

4.8 Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	- 52 -
4.8.1 Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> libre y encapsulada bajo condiciones <i>in vitro</i>	- 52 -
4.8.2 Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> libre y encapsulada en el alimento bajo condiciones “ <i>in vitro</i> ”	- 54 -
4.9 Evaluación sensorial	- 57 -
5 CONCLUSIONES	- 58 -
6 BIBLIOGRAFÍA	- 58 -
7 ANEXOS.....	- 58 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nº	Título de figura	Página
1	Estructura química de los fructanos tipo inulina y tipo levana	8
2	Principales fuentes potenciales de fructanos	11
3	Acción de los probióticos sobre los microorganismos patógenos	19
4	Estructura de las microcápsulas	22
5	Estructura de los alginatos	26
6	Diagrama de flujo del proceso de extracción del mucílago de nopal	30
7	Analizador de textura LRFA	31
8	Curva típica del análisis del perfil de textura	32
9	Procedimiento de emulsificación	33
10	Diagrama de flujo del proceso de elaboración de queso fresco	35
11	Análisis de perfil de textura de las diferentes mezclas de hidrocoloides	39
12	Microfotografía electrónica de barrido de la cápsula formada con alginato de sodio, inulina y mucílago de nopal	44
13	Queso fresco	45
14	Evaluación sensorial de los diferentes quesos	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°	Título de la tabla	Página
1	Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces boulardii</i>	18
2	Metodología empleada en el análisis microbiológico del queso	36
3	Parámetros instrumentales de textura de los geles	39
4	Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> libre y encapsulada	42
5	Análisis bromatológico de las diferentes formulaciones de quesos	46
6	Variación del pH de los diferentes quesos elaborados con respecto al tiempo	48
7	Resultados obtenidos del análisis microbiológico del alimento	49
8	Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> en los diferentes quesos elaborados	50
9	Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> libre y encapsulada a pH de 2	52
10	Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> libre y encapsulada a pH de 6.5	53
11	Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> presente en el queso en estado libre y encapsulada bajo condiciones ácidas (pH 2.0)	54
12	Viabilidad de <i>Saccharomyces boulardii</i> presente en el queso en estado libre y encapsulada bajo condiciones de pH cercanas a la neutralidad (pH 6.5)	56

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la viabilidad de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* sin encapsular y encapsulada en queso fresco, con el objetivo de proteger al probiótico de la degradación con el fin de garantizar un mayor número de levaduras viables en el alimento funcional de acuerdo a lo estipulado por la FAO. El probiótico fue encapsulado con una mezcla de hidrocoloides de alginato de sodio, mucílago de nopal e inulina empleando la técnica de emulsión, donde fueron estudiadas las relaciones entre las propiedades texturales del gel formado por los materiales encapsulantes. Aquí el alginato de sodio formó un gel de mayor dureza. Sin embargo, la incorporación de otros hidrocoloides como mucílago de nopal e inulina, disminuyó la fuerza del gel formando una matriz de gel más cohesiva y más resiliente. Con estos resultados se elaboraron microcapsulas conteniendo a *S. boulardii*, utilizando a este mismo microorganismo de manera libre como control. Después de estudios de viabilidad el simbiótico encapsulado fue agregado al queso fresco, donde se observó que la viabilidad fue mayor que cuando se utilizó al microorganismo sin encapsular durante 30 días de almacenamiento a 4°C. Posteriormente, el alimento funcional fue expuesto a condiciones de acidez a pH de 2.0 y 6.5 durante un periodo de incubación de 3 hrs, observándose que la viabilidad del microorganismo libre en el alimento sólo mantuvo una supervivencia del 0.081% a pH de 2.0 con respecto a la viabilidad inicial. Por su parte, cuando el microorganismo se adicionó al queso en forma encapsulada, logro una supervivencia del 1.7% con respecto a su viabilidad inicial, conservando una viabilidad de 107, por lo que resulta adecuado para considerarse como un microorganismo probiótico bajo las condiciones de aplicación. A pH de 6.5 la mayoría de las células de levadura encapsulada quedaron atrapadas dentro de las microesferas, se obtuvo una viabilidad despues de los 180 min de 57.54% y 40.74%, respectivamente. Tanto en estado libre como encapsulado, la viabilidad de *S. boulardii* fue mayor a pH 6.5 que a pH 2.0. Se logró obtener un alimento simbiótico con efectos probióticos y prebióticos a base de *S. boulardii* e inulina, con la concentración del microorganismo probiótico recomendada para que pueda ejercer sus efectos benéficos sobre la salud del huésped.

A B S T R A C T

The viability of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in free and encapsulated forms in cheese was evaluated, with the aim of protecting the probiotic degradation to ensure a greater number of viable yeasts in the food functional as stipulated by the FAO. The probiotic was encapsulated in a mixture of hydrocolloids based on sodium alginate, cactus mucilage and inulin by the emulsion technique, where they studied the relationship between the textural properties of gel formed by the encapsulating material, where sodium alginate gel formed harder, however, the addition of other hydrocolloids such as cactus mucilage and inulin decreased the strength of the gel forming a more cohesive gel matrix and more resilient. With these results we developed microcapsules containing *S. boulardii*, using the same organism in a free as a control. After feasibility studies on symbiotic package was added to cheese where it was observed that viability was greater than the organism used freely for 30 days of storage at 4°C. Subsequently the functional food was exposed to acidic conditions which were tested at pH 2.0 and 6.5 during an incubation period of 3 hours, respectively, observing that the viability of the microorganism in the food-free survival rate was only maintained of 0.081% at a pH 2.0 with respect to the initial viability. Meanwhile, when the organism was added to cheese in encapsulated form, was observed a survival rate of 1.70% over its initial viability, maintaining a viability of 107, a concentration that is adequate to be considered a probiotic microorganism under the conditions of application. A pH of 6.5 the viability of the microorganism was greater when added to cheese in a free state when encapsulated is added, which is due to the encapsulated cells were not completely released from the microcapsules in the evaluation stage, after a period 3 hours under these conditions, the viability obtained was 57.54% and 40.74% respectively. In both in forms, free and encapsulated, the viability of *Saccharomyces boulardii* was higher at pH 6.5 than at pH 2.0. It was possible to obtain a symbiotic food with probiotic and prebiotic effects based in *Saccharomyces boulardii* and inulin, with the concentration of probiotic microorganism recommended to exercise for its beneficial effects on host health.



1 INTRODUCCIÓN

La relación entre dieta y salud fue reconocida por la Medicina Tradicional China hacia el año 1,000 antes de Cristo. Hace casi 2500 años que también Hipócrates menciona: “Deja que la alimentación sea tu medicina y que la medicina sea tu alimentación”, con lo cual reconoció la importancia de la alimentación en la salud humana y concluyó que el mantenimiento de la salud se efectúa a través de la dieta y la higiene.

Existen cada vez más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que ciertos alimentos tienen efectos físicos y psicológicos benéficos, gracias al aporte de los nutrientes esenciales. La ciencia de la nutrición ha evolucionado a partir de conceptos clásicos, tales como evitar las deficiencias de nutrientes, hacia los conceptos de nutrición "positiva" u "óptima". Las investigaciones han pasado a centrarse más en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, que ofrecen la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y psíquicas, así como de reducir el riesgo a contraer enfermedades (Boylston *et al*, 2004)

Por otro lado, la necesidad de contar con alimentos que sean más beneficiosos para la salud, se ve apoyada por los cambios socioeconómicos y demográficos que se están dando en la población. El aumento de la esperanza de vida, el cual trae como consecuencia el incremento de la población de la tercera edad, y el deseo de gozar de una mejor calidad de vida, así como el aumento de los costes sanitarios, han potenciado que los gobiernos, los investigadores, los profesionales de la salud y la industria alimenticia busquen la manera de controlar estos cambios de forma más eficaz. Se ha descubierto que muchos productos alimenticios tradicionales, como las frutas, las verduras, la soya, los granos enteros y la leche, contienen componentes que pueden resultar saludables. Además de éstos, cada día se están desarrollando nuevos alimentos que añaden o amplían estos componentes beneficiosos, por las ventajas que suponen para la salud y sus convenientes efectos psicológicos.

Estos alimentos reciben el nombre de “*Alimentos funcionales*” y se les define como aquellos alimentos que además de nutrirnos, nos aportan beneficios a la salud y reducen el riesgo de enfermarnos, a través de las sustancias biológicamente activas que contienen, las cuales son conocidas con el nombre de ingredientes funcionales ó

nutracéuticos y desempeñan una acción específica en las funciones fisiológicas del organismo. Existe una gran variedad de alimentos funcionales a disposición del consumidor, pero en estos momentos la prioridad es identificar qué alimentos funcionales pueden mejorar la salud y el bienestar y reducir el riesgo o retrasar la aparición de importantes enfermedades, como las cardiovasculares, el cáncer y la osteoporosis. Como ejemplos de alimentos funcionales destacan aquellos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra dietética, así como aquellos alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, entre las que destacan los fitoquímicos, los *antioxidantes* y los probióticos, cultivos vivos de microorganismos beneficiosos (Hansen *et al*, 2002).

Los microorganismos probióticos generalmente han sido suplementados a los productos lácteos fermentados, pero también a otros tipos de alimentos, con objeto de desarrollar los “Alimentos funcionales o Nutracéuticos” que demandan los consumidores en los mercados mundiales. La simple alimentación cotidiana es difícilmente favorecer el establecimiento, crecimiento y desarrollo de una buena flora bacteriana de protección, actualmente se está recurriendo al desarrollo de alimentos simbióticos; es decir, alimentos suplementados tanto con microorganismos probióticos como con sustancias prebióticas que sirven de sustratos fermentativos de los probióticos; aumentando de esta forma las posibilidades de supervivencia del probiótico en el tracto gastrointestinal y con ello, aportando los beneficios a la salud del huésped. Los fructooligosacáridos y la inulina se encuentran entre los ingredientes prebióticos más utilizados en el desarrollo de alimentos funcionales. (Kailasapathy *et al*, 1997)

Dado que los microorganismos probióticos no pueden sobrevivir en número suficiente y conservar su actividad en las preparaciones comerciales o en el tracto digestivo del huésped, actualmente se está recurriendo a la selección de cepas resistentes al ácido y a las sales biliares, así como a la microencapsulación del probiótico con objeto de incrementar su supervivencia, viabilidad, establecimiento, crecimiento y desarrollo y de esta forma, proporcionar los efectos benéficos a la salud del huésped (Shah, 2000; Krasaekoopt *et al.*, 2003).

La microencapsulación es un proceso en el cual las partículas son retenidas dentro de una matriz encapsulante o membrana, para su posterior liberación. Las técnicas de microencapsulación más utilizadas son: secado por aspersion, extrusión, emulsión, coacervación, inclusión molecular, liofilización, centrifugación, co-cristalización entre otras. Entre los polímeros más utilizados para la microencapsulación de microorganismos se tienen los siguientes: alginatos, gelana, quitosano, celulosas, κ -carragenina, grenetina, pectina, goma arábica, goma guar, agar, almidón, dextranos, jarabes, ceras, parafinas, aceites, grasas, gluten, caseína, albúmina y silicatos. La elección de la técnica de encapsulación dependerá del material utilizado como agente encapsulante, así como del material a encapsular (Mandal *et al*, 2005).

Hoy en día, la gente reconoce en mayor medida, que llevar un estilo de vida sano, incluida la dieta, puede reducir el riesgo de padecer enfermedades y dolencias, y contribuir de forma positiva al mejoramiento de la salud y el bienestar de la población en general. La amplia difusión que se está dando a la importancia de incluir en nuestra dieta los alimentos funcionales “*per-se*”, así como a los alimentos funcionales desarrollados, está contribuyendo a impulsar el desarrollo del mercado de estos alimentos en todo el mundo.

El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto encapsulante de la mezcla alginato de sodio con inulina y mucílago de nopal, sobre el crecimiento y supervivencia de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* adicionada en un alimento durante el almacenamiento en frío.



2 ANTECEDENTES

2.1 Alimentos funcionales

Los alimentos son todos aquellos productos que al ser ingeridos, llegan a la sangre, nutren, reparan el desgaste, dan energía y calor al organismo, sin perjudicarlo ni provocarle pérdida de su actividad funcional. Otra definición más completa dice que los alimentos son todos aquellos materiales de origen biológico necesarios para el buen funcionamiento de los organismos vivos, los cuales están compuestos de cantidades variables de agua, proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales y otros compuestos, incluyendo los que imparten sabor y color (Badui, 1988).

Los alimentos funcionales se definen como aquellos alimentos que además de su contenido nutrimental, aportan beneficios a la salud, al contener sustancias que desempeñan una acción específica en las funciones fisiológicas del organismo; dichas sustancias reciben el nombre de “ingredientes funcionales ó nutraceuticos”. El término de alimento funcional se introdujo por primera vez en Japón en los años 80's cuando las autoridades sanitarias Japonesas supusieron que una buena nutrición, mejoraría de manera importante la salud y con ello disminuirían los costos de prevención y atención global de la población. En este sentido, se introdujo un nuevo concepto de alimentos: “Alimentos para uso específico de salud” (*Foods for Specified Health Use o FOSHU*), los cuales se desarrollaron para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. La demanda de este tipo de alimentos ha crecido en países asiáticos desde finales del siglo XX y en fechas recientes, su uso se ha extendido rápidamente a países de Europa, África y América (Buts et al, 2006).

Actualmente la investigación y desarrollo de alimentos funcionales se basa en el estudio de los principales ingredientes funcionales o nutraceuticos de los alimentos, con la finalidad de demostrar su actividad biológica y potencial efecto benéfico para la salud. Entre los principales ingredientes nutraceuticos de los alimentos se tienen: probióticos, prebióticos, fibra dietética, vitaminas, minerales, flavonoides, terpenos, carotenoides, fitoestrógenos, betaglucanos, ácidos grasos Ω -3 y Ω -6 (Ramírez, 2009).

2.2 Ingredientes prebióticos

Los *prebióticos* "promotores de vida" son ingredientes alimenticios no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento de ciertas bacterias de la flora intestinal, principalmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, las cuales tienen efectos benéficos en la salud del huésped. (Gibson y Roberfroid, 1995). Los requisitos que deben tener los ingredientes nutracéuticos para ser considerado como prebióticos son: no ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto digestivo; estimular selectivamente el desarrollo y metabolismo de la flora bacteriana benéfica del colon y, eventualmente inducir efectos sistémicos favorables a la función intestinal (Fuller *et al*, 2007).

Entre los principales ingredientes prebióticos de los alimentos se encuentran algunos carbohidratos no digeribles como fructanos, oligosacáridos, genticooligosacáridos, galactooligosacáridos, isomaltooligosacáridos y xilooligosacáridos, polisacáridos y lactulosa; algunos péptidos y proteínas no digeribles y, ciertos lípidos y ácidos grasos insaturados. Los únicos que satisfacen estrictamente el concepto de ingredientes prebióticos son los fructanos (Wismar *et al*, 2010).

2.2.1 Fructanos

Los fructanos son polímeros de fructosa que constituyen los principales carbohidratos de reserva en algunas familias del reino vegetal, o bien, comparten esta función con el almidón y son producidas por microorganismos; se almacenan en raíces, tubérculos, rizomas, inflorescencias y frutos inmaduros; son sintetizados a partir de sacarosa y sólo contienen un residuo de glucosa en el extremo reductor de la molécula; presentan diferente grado de polimerización, peso molecular, estructura, y por ende, diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales. De acuerdo a su estructura molecular, los fructanos se clasifican en "inulinas", cuando entre las moléculas de fructosa predominan enlaces glucosídicos $\beta(2,1)$, o "levanas", cuando predominan enlaces glucosídicos $\beta(2,6)$; sin embargo, se pueden presentar una variedad de estructuras complejas a través de ramificaciones en las posiciones complementarias $\beta(2,6)$ de la inulina y en las posiciones $\beta(2,1)$ de las levanas; dichas estructuras reciben el nombre de "fructanos

ramificados” (Figura 1). Derivados de la hidrólisis de los fructanos anteriores se tienen los fructooligosacáridos (FOS), fructános de bajo peso molecular cuyo grado de polimerización es menor a 10 unidades de fructosa (Spiegel et al., 1994; Vijn y Smeekens, 1999; López et al., 2003).

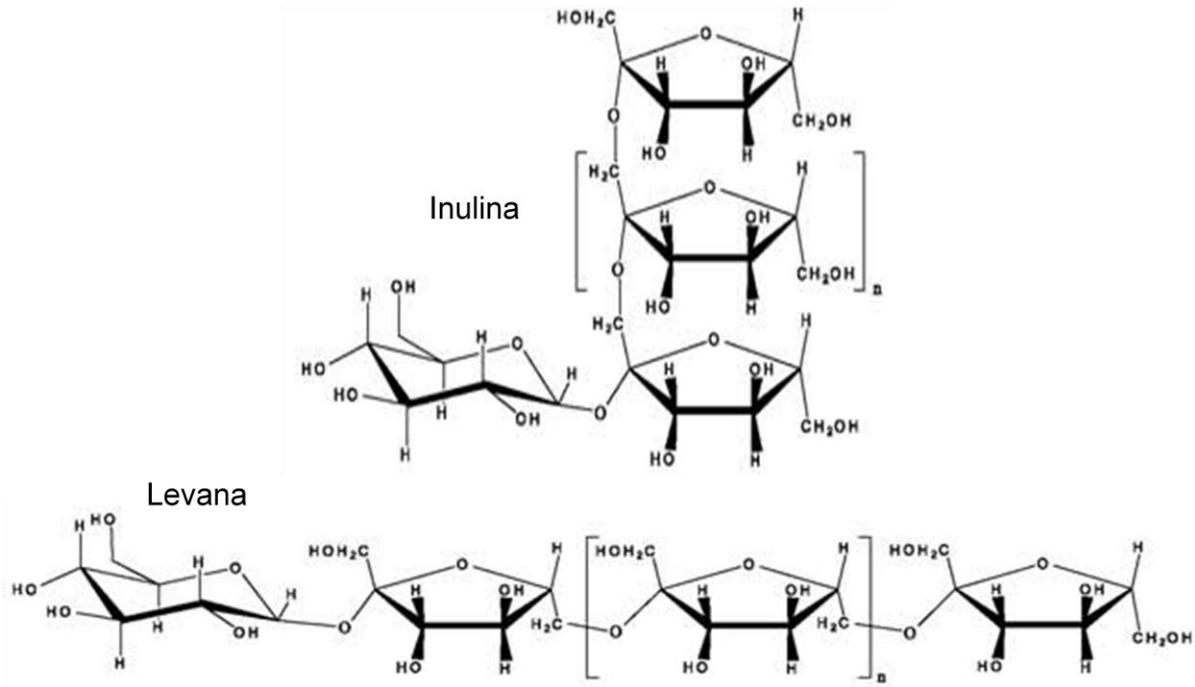


Figura 1: Estructura química de los fructanos tipo inulina y tipo levana

Madrigal y Sangronis, 2007

2.2.2 Inulinas

Las inulinas fueron descritas por primera vez en 1804 por una científica alemana quien las encontró en una infusión de la planta *Inula helenium*, a dicha sustancia en 1818. Thompson la llamó inulina. Son producidas por plantas monocotiledoneas de las familias *Liliaceae*, *Agavaceae*, *Amaryllidaceae* e *Iridaceae*, y plantas dicotiledoneas de las familias *Compositae*, *Boraginaceae*, *Malpighiaceae*, *Primulaceae*, *Stylidiaceae* y *Violaceae*. Alcanzan grados de polimerización hasta de 200 unidades, aunque generalmente su tamaño oscila entre 30 y 60 unidades de fructosa (Macfarland et al., 2008).

2.2.3 Fructooligosacáridos

Los fructooligosacáridos son polímeros de fructosa derivados de la hidrólisis de los tres grupos anteriores, sus grados de polimerización no rebasan las 10 unidades de fructosa y presentan un relativamente bajo poder endulzante y muy bajo aporte calórico, lo cual los convierte en edulcorantes altamente atractivos para utilizarse en la elaboración de alimentos bajos en calorías, así como en aquellos alimentos dirigidos a personas con problemas de diabetes (Porter, 1962; Pontis, 1985).

2.2.4 Beneficios que aporta el consumo de alimentos prebióticos

La dosis diaria recomendada para la ingesta de inulina y fructooligosacáridos en los adultos va más allá de 10 g/día y de elección, de 20 a 30 g/día (Manzanares et al., 2006); mientras que en la población infantil se recomienda su consumo entre 1 a 3 g/día (Madrigal y Sangronis, 2007). Los prebióticos son capaces de provocar dolor y distensión abdominal así como flatulencias y diarrea, cuando son ingeridos en cantidades mayores a las recomendadas. Estos síntomas son secundarios al efecto osmótico y a la fermentación en la luz intestinal del colon y/o intestino delgado. Sin embargo, estos síntomas raramente son observados con una dosis diaria menor a 20 g, existiendo amplia variabilidad interindividual dosis - respuesta. (Manzanares et al., 2006) De ahí, que algunos autores propongan como dosis efectivas en adultos cantidades menores a las mencionadas más arriba: 5 a 15 g de prebióticos al día (Macfarland et al., 2008).

Entre los beneficios que aporta el consumo de prebióticos como la inulina y sus derivados se encuentran los siguientes (Roberfroid, 2007).

- a) Dado que los fructanos no son degradados por las enzimas digestivas de nuestro organismo, estos polímeros desempeñan la función de *fibra dietética* y contribuyen a la salud del consumidor al reducir la absorción de metales tóxicos, disminuyen el estreñimiento por acelerar el tránsito del bolo fecal en el intestino, no alteran el índice glicémico ni las reservas de glucógeno, reducen la concentración de lipoproteínas de baja densidad, lo que ocasiona la disminución de la concentración

del colesterol y triglicéridos en sangre; disminuyen la presión arterial en personas hipertensas e incrementan la absorción de iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , PO_4^{3-} , etc..

- b) Los fructanos viajan a través del sistema digestivo sin sufrir prácticamente alteración alguna hasta llegar al intestino grueso, donde actúan como ingredientes *prebióticos* estimulando el crecimiento de bifidobacterias, cuyos productos de fermentación lo constituyen aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta que causan la disminución del pH y con ello, la inhibición del crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos y putrefactivos como *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Listeria*, *Shigella* y *Salmonella* (Gibson et al., 1995).

Otro aspecto a destacar de estos ingredientes son sus propiedades funcionales de la inulina destaca su capacidad gelificante y de retención de humedad, sirve para dar cuerpo y mejorar la textura, lo que la convierte en un ingrediente potencial para reemplazar la grasa, incrementar la palatabilidad y reducir las calorías en los alimentos; no aporta color, olor ni sabor en los productos en que se utiliza, lo cual le confiere ventajas sobre ingredientes similares (Spiegel, 1994). Por su parte, los fructooligosacáridos con grados de polimerización entre 3-6 unidades son de sabor dulce, de ahí el interés en su utilización como edulcorantes naturales de bajo aporte calórico (Smeekens, 1998).

Por otro lado, los efectos benéficos de los fructanos originales o añadidos a los alimentos se pueden ver alterados durante el procesado de los mismos, a consecuencia de su exposición a altas temperaturas, cambios de pH y actividad de agua, ocasionando importantes cambios en estos carbohidratos a través de las reacciones de Maillard, las de caramelización y las de hidrólisis. Dichos cambios pueden provocar la pérdida total o parcial de las propiedades nutraceuticas y funcionales de los fructanos presentes en los alimentos (Matusek et al. 2009).

2.2.5 Fuentes potenciales

Entre las principales fuentes potenciales de fructanos destacan los tubérculos de la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), cuyo contenido de fructanos alcanza el

80% en base seca; las raíces de la planta de achicoria (*Chicory intybus*), los tubérculos de la dalia (*Dahlia variabilis*) y las cabezas o piñas de la planta de agave (*Agave*



Tequilana Wever, variedad Azul) (Gibson *et al.*, 1995). (Figura 2).

Figura 2: Principales fuentes potenciales de fructanos

2.3 Probióticos

En la flora intestinal humana existen más de 400 especies de microorganismos que conviven en armonía sintetizando vitaminas, sustancias beneficiosas, contribuyendo a la absorción de nutrientes, favoreciendo el metabolismo colónico de la fibra, mejorando la digestibilidad, neutralizando sustancias potencialmente patogénicas. El intestino ofrece substratos y las condiciones para su desarrollo, permitiendo así que la flora promueva una mejor función intestinal (Manning *et al*, 2004).

En la vida intrauterina el tracto intestinal es estéril, y es después del nacimiento cuando la flora intestinal se desarrolla. Durante los primeros días de vida las bifidobacterias colonizan el intestino protegiendo al niño de infecciones. Las principales funciones de la

flora intestinal son limitar el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos en el intestino e interactuar con substratos no absorbidos de la dieta. Sin embargo, la flora intestinal es vulnerable a determinadas condiciones. En los adultos varía notablemente ya que dependen de varios factores como la alimentación, los genes, el medio que habita, tratamientos con antibióticos, estrés, medicamentos, infecciones, edad, clima, intervenciones quirúrgicas en estómago o intestino, enfermedades, hepáticas, renales y, cáncer (Manning *et al*, 2004).

Tener una flora estable y bien equilibrada es una garantía de buena salud ya que evita la colonización y sobre desarrollo de microorganismos patógenos mediante varios mecanismos como la competencia y la síntesis de bacteriocinas. El desequilibrio de la flora puede prevenirse con la administración de cultivos microbianos vivos, los cuales reciben el nombre de *probióticos* (Steidler *et al*, 2000).

2.3.1 Origen de los probióticos

En 1908, Élie Metchnikoff, se dio cuenta de que en Bulgaria existía un gran número de personas centenarias, a pesar de ser uno de los países europeos más pobres. La razón para esa extraordinaria longevidad no podía ser tampoco debido a la calidad de sus servicios médicos. Metchnikoff atribuyó la longevidad de los caucásicos al consumo de grandes cantidades de leche fermentada, que contiene bacterias lácticas fermentativas.

Metchnikoff logró aislar la bacteria responsable de la producción del yogurt y la utilizó para sus investigaciones, hecho que marca el inicio oficial de la Probiótica. Metchnikoff se volvió un firme defensor de la hipótesis de que, la dieta puede proteger el cuerpo de la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida. Fue la primera persona en desarrollar un preparado terapéutico utilizando *Lactobacillus* encapsulados para ingerir, dicho preparado fue denominado *Lactobacillin* (Shah *et al*, 2000).

2.3.2 Definición de probiótico

En 1965, Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término de *probiótico*, para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. La palabra *probiótico* deriva de dos vocablos, del latín “*pro*” que significa por o en favor de, y del griego “*bios*” que quiere decir vida, por lo que probiótico significa a favor de la vida. Esta definición fue modificada y se redefinió el término de Probióticos como microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal (Manning *et al*, 2004).

En 1989, R. Fuller definió a los probióticos como: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino". Más recientemente en 1998, el ILSI (International Life Science Institute, de la Unión Europea) en Bruselas, definió a los probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales. Afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo. Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar o reducen el riesgo de enfermedad (Hickey *et al*, 2005).

Según la FAO (2001), los probióticos son “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas”, mientras que los alimentos probióticos los define como “aquellos alimentos susceptibles de producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, proporcionan un mejor estado de salud y bienestar o reducen el riesgo de enfermedad, pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma” (FAO 2002).

Definiciones más recientes de probióticos los indican como “suplemento alimenticio integrado por microorganismos vivos que al ser ingerido en cantidades suficientes, proporcionan un efecto benéfico sobre la salud del huésped, mejorando su balance microbiano intestinal” (Olagnero *et al.*, 2007).

2.3.3 Características que debe reunir un microorganismo probiótico

La particularidad de los microorganismos probióticos, es la capacidad de sobrevivir el tránsito por el tracto gastrointestinal y de colonizar tanto el intestino delgado como el intestino grueso, favoreciendo el equilibrio del ambiente ecológico bacteriano. Para que un microorganismo pueda clasificarse como probiótico debe reunir las siguientes características:

- ▶ Ser habitante normal del intestino humano.
- ▶ No ser patógeno ni toxigénico
- ▶ Resistir al pH ácido del estómago y al efecto de las sales biliares en el duodeno.
- ▶ Ser capaz de adherirse a la mucosa intestinal.
- ▶ Adaptarse a la microbiota intestinal.
- ▶ Seguridad para uso alimentario o clínico.
- ▶ Sus efectos sobre la salud deben estar clínicamente validados y documentados.
- ▶ Presentar buenas propiedades tecnológicas.

2.3.4 Beneficios de los probióticos en la salud del huésped

Entre los beneficios que aporta la ingestión de microorganismos o alimentos probióticos a la salud del huésped se incluyen los siguientes (Figura 3) (Parvez et al., 2006):

- Evitan la colonización de patógenos y el desequilibrio de la flora intestinal.
- Reducen la incidencia y duración de diarreas.
- Estimulan el sistema inmunológico y evitan la translocación bacteriana.
- Contribuyen al mantenimiento de la integridad de las mucosas.
- Producen importantes micronutrientes como vitaminas B2, B6 y biotina.
- Favorecen la asimilación de oligoelementos y la actividad antitumoral.
- Favorecen la digestión de la lactosa en personas intolerantes a la misma.
- Reducen los niveles de colesterol.
- Presentan actividad anticarcinogénica.
- Prevención de cáncer de colon.
- Inhiben la proliferación de células tumorales.
- Previenen la recurrencia del cáncer.

2.3.5 Consumo de probióticos

La utilización de Probióticos se recomienda a cualquier persona que requiera favorecer el equilibrio de la flora intestinal. En personas con tratamiento con antibióticos, en ancianos, en el embarazo, en disturbios intestinales y, para mejorar la intolerancia a la lactosa. Se utiliza también para disminuir los efectos de la diarrea y constipación, en enfermedades inflamatorias del intestino ya que al modular la flora intestinal aumenta la producción de inmunoglobulina A y estos pacientes tienen disminuidos los lactobacilos (Hickley *et al*, 2005).

2.3.6 Dosis recomendada de probióticos

La dosis recomendada de probióticos ha sido motivo de controversia, existiendo amplia variabilidad de dosis en los diferentes ensayos clínicos realizados. No obstante, el número de bacterias viables que alcanzan o colonizan el intestino depende de otros factores además de la dosis, particularmente de la fórmula probiótica (cuya acidez y fecha de elaboración inciden en la viabilidad de los microorganismos), la administración de alimentos o leche (que pueden proteger al probiótico del ácido gástrico), y el pH estomacal del individuo, su motilidad intestinal y la composición previa de su flora (Acevedo *et al.*, 2003). De ahí que aún no sea posible establecer una dosis general para los probióticos; la cual tiene que estar basada en estudios que muestren un beneficio para la salud en humanos. Frecuentemente se menciona que los alimentos funcionales elaborados con probióticos deben contener por lo menos 10 millones de células viables por cada 100 mL, la cual se considera como la dosis ideal para lograr los efectos deseados y aumentar las defensas naturales, sin embargo, como ya se ha mencionado, la dosis dependerá del microorganismo utilizado, de la forma de consumo y del efecto que se desee obtener

La concentración de probióticos en la mayoría de los productos lácteos comerciales se encuentra generalmente en el rango de 10⁸-10⁹ UFC/ml, la cual está por arriba de las recomendaciones (10⁵-10⁷ bifidobacterias/ml en la fecha de consumo) de Kurmann y Rasic (1991), y también por encima del nivel mínimo sugerido por la Federación

Internacional de Lácteos, que señala por lo menos 107 UFC / g en el producto hasta la fecha mínima de caducidad) (Rokka y Rantamäki, 2010). Para que un alimento sea considerado como probiótico, deberá contener una concentración del probiótico entre 106 a 107 UFC/g de producto (FAO/OMS 2002).

2.3.7 Principales microorganismos probióticos

Entre los principales microorganismos clasificados como probióticos se encuentran los siguientes. Del género *Lactobacillus sp*: *L. acidophilus*, *L. casei* var. *Shirota*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. salivarius*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. lactis cremoris*, *L. gasseri*. Bacterias del género *Bifidobacteriu*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. lactis*. Entre otras bacterias lácticas se tienen: *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecalis* y, dentro de los microorganismos no lácticos se encuentran: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus salivaris*, *Streptococcus faecium* y *Streptococcus diacetylactis* (Gómez, 2011).

2.3.8 Formas de empleo

Los probióticos pueden incorporarse a un amplio abánico de productos, tanto en alimentos como en medicamentos y suplementos dietéticos (Mennickent y Green, 2009). Los alimentos probióticos o alimentos funcionales probióticos, por ende, son aquellos que contienen microorganismos probióticos en número suficiente para modificar la flora intestinal y así ejercer efectos beneficiosos para la salud. Son productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped (Mennickent y Green, 2009).

Los agentes probióticos más comerciales están compuestos por células viables de bacterias ácido-lácticas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, las cuales son componentes importantes de la microflora gastrointestinal humana. El

género *Bifidobacterium* contiene microorganismos gram-positivos, anaerobios estrictos, crecen a pH de 4,5-8,5 y generalmente se encuentran en el intestino grueso humano. El género *Lactobacillus* comprende un grupo heterogéneo de microorganismos gram-positivos, microaerobios o anaerobios que varían ampliamente en las características metabólicas y de crecimiento. Las especies más frecuentemente utilizadas como probióticos, son distintas cepas de las especies *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Lactobacillus casei* (Gibson *et al*, 1995).

Dentro de todos ellos, el microorganismo más utilizado en la elaboración de alimentos probióticos es el *Lactobacillus acidophilus*, que además de sus beneficios al tracto intestinal, produce vitaminas del complejo B (B₆, B₁₂, ácido fólico, riboflavina, niacina, biotina y ácido pantoténico), mejora la absorción del calcio, produce enzimas como la lactasa, que ayuda a la digestión de la lactosa de la leche y a mejorar los síntomas del Síndrome de Intestino Irritable, produce antibióticos naturales que ayudan en el control de bacterias patógenas intestinales, ayuda en la digestión de los alimentos y al control de la candidiasis intestinal. El *L. acidophilus* se puede consumir en forma de productos lácteos como el yogur, queso cottage y también se encuentra a la venta en las tiendas de productos naturales en forma de líquido o cápsulas, los cuales proveen una mayor concentración de la bacteria que la leche, el yogurt u otros productos lácteos similares (Ramón, 2006). Además del *L. acidophilus* el yogur contiene otras dos clases de microorganismos benéficos que son: el *L. bulgaricus* y el *S. thermophilus*, los cuales ayudan en la digestión de los carbohidratos de la leche, propiedad deseada para aquellas personas que sufren de intolerancia a la lactosa (Gómez, 2011).

2.3.9 *Saccharomyces boulardii*

No solo existen bacterias probióticas, también hay levaduras, como *Saccharomyces boulardii*, la cual será nuestro modelo a estudiar. Esta es una levadura natural no modificada genéticamente, aislada de la corteza del árbol de “litchi” en Indochina (Buts, 2005). *Saccharomyces boulardii* es segura, no tóxica, no patógena, es una levadura termofílica (Abosereh, 2007), es resistente a la acidez gástrica y a la proteinólisis y

puede almacenarse en grandes cantidades en el tracto gastrointestinal, manteniendo niveles constantes en forma viable (Macfarland y Bernasconi, 1996).

En varios estudios se ha investigado el empleo de esta levadura como un agente potencial bioterapéutico para el tratamiento de microbios asociados con diarrea y colitis (Abosereh, 2007), más sin embargo no se ha encontrado bibliografía que hable de esta levadura adicionada en alimentos, por esta razón resultó un atractivo objeto de investigación. Las células viables de esta levadura han sido recientemente utilizadas para mejorar la resistencia del ecosistema intestinal para infecciones bacteriales (Abosereh, 2007).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces boulardii*

<i>Saccharomyces boulardii</i>	
Clasificación Científica	
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Sacharomycotina
Clase	Sachcaromycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Sachcaromycetaceae
Género	Saccharomyces
Especie	<i>S. boulardii</i>
Nombre binomial	
<i>Saccharomyces boulardii</i>	
Henry Boulard	

2.4 Simbióticos

En el intestino del hombre coexiste aproximadamente un kilogramo de bacterias cuya función es indispensable para la salud: es lo que se llama flora bacteriana intestinal. Está concentrada en la última parte del intestino y está compuesta por bacterias

benéficas (eubióticas) y bacterias patógenas. La flora bacteriana se mantiene sana cuando hay más cantidad de bacterias benéficas que de bacterias patógenas. Entre los dos grupos se establece una verdadera guerra de colonización y de supervivencia, si prevalecen las bacterias eubióticas, el organismo se beneficia de ello y se establece un equilibrio que determina salud y bienestar (Figura 3) (Pérez y López, 2009).

En particular, las bacterias eubióticas se reproducen aprovechando todo lo que llega al intestino, y, por lo tanto, sustraen el alimento a los gérmenes patógenos que no se pueden reproducir en masa. Ocurre lo mismo que en la naturaleza: la especie que logra nutrirse, crece, mientras que la otra está destinada a detener su desarrollo. Las bacterias eubióticas en teoría metabolizan de todo, pero normalmente su alimento ideal son los hidratos de carbono. Sin embargo, lamentablemente la glucosa, la fructosa y la galactosa de los hidratos de carbono presentes en los alimentos que normalmente ingerimos, son asimilados por el cuerpo antes de llegar a la última parte del intestino, en donde se encuentra la flora bacteriana eubiótica.

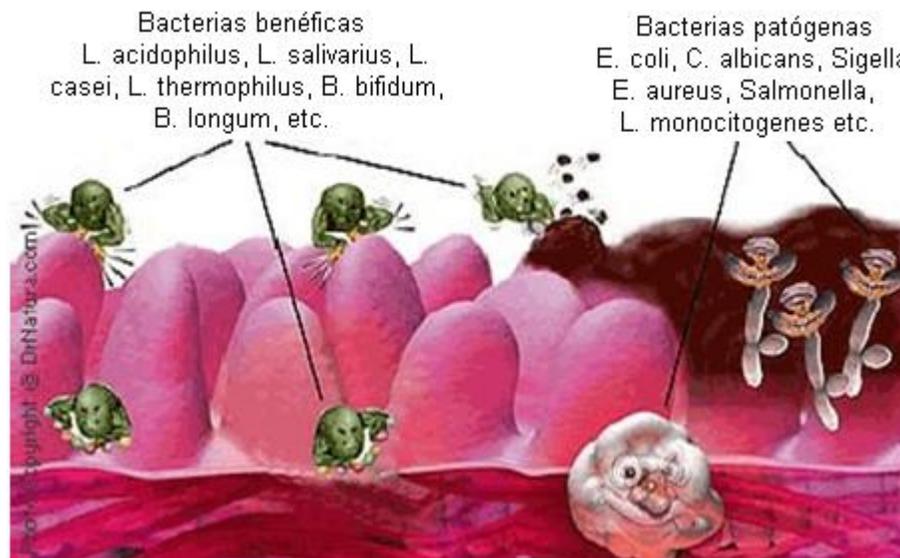


Figura 3: Acción de los probióticos sobre los microorganismos patógenos

Esta es la razón por la que las bacterias eubióticas tienen que fermentar las fibras presentes en la dieta (pectina, inulina, etc.) para producir sacáridos. Cuando los microorganismos patógenos prevalecen en mayor medida que los benéficos como

sucede después de una larga terapia con antibióticos o por la ingestión de alimentos contaminados o por estrés, pueden aparecer molestias: dolor de vientre, inflamación, diarrea. Con la simple alimentación cotidiana es difícil favorecer el crecimiento y el desarrollo de una buena flora bacteriana de protección. Es por eso que se recomienda tomar simbióticos (fermentos lácticos probióticos asociados con sustancias prebióticas), vitaminas y oligoelementos específicos.

2.4.1 Definición de simbiótico

Los simbióticos constituyen un grupo de alimentos diferente a los probióticos y se definen como “una mezcla de prebióticos y de probióticos, destinada a aumentar la supervivencia de las bacterias que promueven la salud, con el fin de modificar la flora intestinal y su metabolismo”. El término debe reservarse exclusivamente para los productos que poseen verificación científica de la simbiosis, es decir en los cuales los prebióticos favorecen selectivamente a los probióticos adicionados con este simbiótico en particular (Olagnero et al., 2007). La evidencia actual, aún escasa e incipiente, parece demostrar que el uso de un simbiótico es capaz de optimizar los resultados con relación a los probióticos en términos de modulación inmune y control bioecológico intestinal (Bengmark, 2004).

Los microorganismos probióticos generalmente han sido suplementados a los productos lácteos fermentados, pero hoy en día también a otros tipos de alimentos, con objeto de desarrollar los “alimentos funcionales o nutraceuticos” que demandan los consumidores en los distintos mercados mundiales (Stanton et al., 2001). Para que un alimento probiótico pueda proporcionar propiedades funcionales, el nivel mínimo de bacterias viables debe ser de aproximadamente 10^6 UFC/mL en la fecha de caducidad del producto, y como dosis terapéutica se sugiere de 10^8 a 10^9 células viables por día (Kurmann y Rasic, 1991).

A menudo, sin embargo, el número de bacterias probióticas viables capaces de colonizar el intestino y proporcionar sus efectos benéficos es demasiado baja, dado que muchos factores, entre ellos la acidez, el contenido de oxígeno, la concentración de

ácido láctico y ácido acético, la acción del jugo gástrico y las sales biliares, afectan a la supervivencia de los probióticos en los alimentos y en el tracto gastrointestinal del huésped. Debido a ello, se han desarrollado varios métodos para mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos, incluyendo la selección de cepas resistentes al ácido y a las sales biliares, el uso de contenedores impermeables al oxígeno, la adaptación al estrés y la incorporación de micronutrientes prebióticos tales como inulina y fructooligosacaridos, y la microencapsulación (Shah, 2000; Krasaekoopt et al., 2003; Rokka y Rantamäki, 2010).

2.5 Microencapsulación

La encapsulación es considerada como una forma especial de empaque, en la que un material puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente y de influencias deletéreas. En la industria la encapsulación se emplea como herramienta para estabilizar el material cubierto, para controlar las reacciones oxidativas, para la liberación controlada del material encapsulado, para el enmascaramiento de sabores, colores y olores, para extender la vida de anaquel del producto encapsulado y para prevenir la pérdida nutricional de los componentes del material encapsulado (Anal y Singh, 2007).

Por su parte, la microencapsulación es un proceso en el cual las células son retenidas dentro de una matriz encapsulante o membrana, que pueden liberar su contenido a velocidades controladas y bajo condiciones específicas. Una microcápsula consiste de una membrana semipermeable, esférica, delgada y fuerte, que rodea un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que varía de unas pocas micras hasta 1 mm (Anal y Singh 2007). La microencapsulación provee un medio para envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su posterior liberación bajo condiciones y velocidades controladas (Pedroza-Islas, 2002). La microcápsula protege el contenido activo de las condiciones del medio (acidez, oxígeno y condiciones gástricas) y mejora la viabilidad de las bacterias; además, la microencapsulación facilita la manipulación de las células y permite una dosificación controlada (Rokka y Rantamäki, 2010).

Las microcápsulas presentan una amplia variedad de estructuras (Figura 4), algunas son de geometría esférica con una fase interna continua rodeada por una pared también continua conocida como estructura de partícula simple, mientras que otras pueden tener una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared formando estructuras agregadas (McMaster et al., 2005).

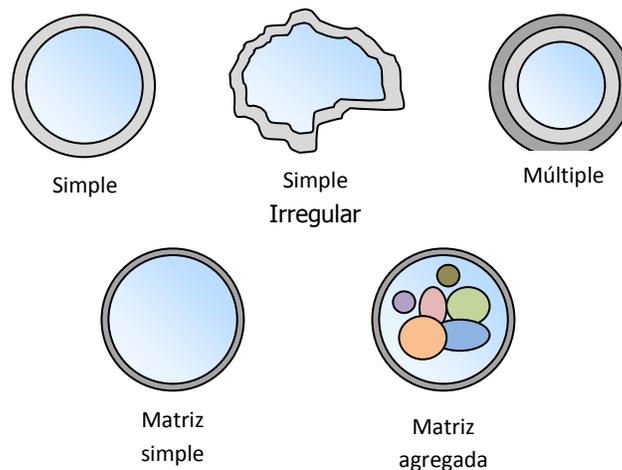


Figura 4: Estructura de las microcápsulas.

La inmovilización de probióticos utilizando la técnica de microencapsulación, ya sea para mejorar la viabilidad del probiótico en productos comerciales, tanto y durante el procesamiento, almacenamiento y durante la digestión en el tracto gastrointestinal, ha sido a la fecha ampliamente estudiada, generando nuevas tecnologías y métodos exitosos (O’Riordan et al., 2001; Goderska 2003; McMaster et al., 2005; Shima et al., 2007; Kim et al., 2008; Ding, Shah 2007 y 2009).

2.5.1 Técnicas y materiales de encapsulación

Dado que los microorganismos pueden verse afectados durante el proceso de microencapsulación, se debe elegir la técnica menos agresiva posible y el material de

recubrimiento adecuado (Kailasaphaty, 2002; Nassif et al., 2003; Doleyres y Lacroix, 2005). Entre las técnicas de microencapsulación más conocidas se encuentran el secado por aspersión, la extrusión, la coacervación, emulsión, inclusión molecular, liofilización, centrifugación, co-cristalización y otras. La estabilidad de las microcápsulas puede ser mejorada mediante el uso de diversos materiales de recubrimiento, por ejemplo, quitosano (McMaster et al., 2005; Shima et al., 2006; Muthukumarasamy et al., 2006). La elección de la técnica de encapsulación dependerá del material utilizado como encapsulante, así como del material a encapsular.

Tratando de encontrar el material encapsulante más conveniente, diez cepas de bacterias probióticas (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. bifidum*, *B. longum*, *L. salivarius*, dos de *L. rhamnosus* y dos de *B. lactis*), fueron encapsuladas en alginato, goma guar, goma xantana, goma de algarrobo y carragenina. El alginato, la goma xantana y la carragenina, fueron los materiales que incrementaron la supervivencia de las cepas *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. bifidum*, *B. lactis* al ser sometidas a condiciones ácidas y biliares (Ding y Shan, 2009).

Entre los polímeros más utilizados para la microencapsulación de microorganismos se tienen los siguientes: alginatos, gelatina, quitosano, celulosas, κ -carragenina, gnetina, pectina, goma arábiga, goma guar, agar, almidón, dextranos, jarabes, ceras, parafinas, aceites, grasas, gluten, caseína, albúmina y silicatos (Yañez et al., 2002; Anal y Singh, 2007; Lahtinen et al., 2007; Ding y Shah, 2009; Pimentel, 2009).

2.5.2 Material encapsulante (hidrocoloides)

2.5.2.1 Mucílago de Nopal

Los nopales son plantas arbustivas, rastreras o erectas, que pueden alcanzar de 3 a 5m de altura. El sistema radical es muy extenso, densamente ramificado, rico en raíces finas absorbentes y superficiales en zonas áridas de escasa pluviometría. La longitud de las raíces está en relación con las condiciones hídricas y con el manejo cultural, especialmente el riego y la fertilización (Sáenz 2007). Su tronco es leñoso y mide entre

20 y 50 cm de diámetro. Sus ramas están formadas por cladodios de 30 a 60 cm de largo x 20 a 40 cm de ancho y de 2 a 3 cm de espesor.

El cladodio fresco recibe el nombre de nopalito y el adulto de penca. En las pencas, de color verde opaco, se realiza la fotosíntesis, pues éstas remplazan a las hojas con esa función. Se encuentran protegidas por una cutícula gruesa que, en ocasiones, está cubierta de cera o pelos que disminuyen la pérdida de agua, ya que poseen abundante parénquima. En este tejido se almacenan considerables cantidades de agua lo que permite a las plantas soportar largos periodos de sequía. Cabe destacar el papel de los mucílagos (hidrocoloides presentes en este tejido) que tienen la capacidad de retener el agua (Nobel *et al.*, 1990).

Del genero *Opuntia* hay sólo 10 ó 12 especies hasta ahora utilizadas por el hombre, entre las que se encuentran, como especies cultivadas, *Opuntia ficus-indica*, *O.amyclaea*, *O. xoconostle*, *O. megacantha* y *O. streptacanthay* como especies silvestres: *Opuntiahyptiacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta*. La más ampliamente cultivada en distintas partes del mundo es *Opuntia ficus-indica*. El nombre científico le fue asignado por Tourneforten en 1700, por su semejanza con una planta espinosa que crecía en el poblado de Opus en Grecia (Ariamendi *et al*, 2004).

Las características de estas especies son variables, diferenciándose en la forma de los cladodios, en la presencia o ausencia de espinas, en el tamaño y color de los frutos, entre otras (Cardenas, 2007). El cultivo y aprovechamiento del nopal se remonta a las antiguas civilizaciones mesoamericanas y su importancia en la vida social, económica y religiosa determinó las rutas migratorias de las tribus nómadas de Aridoamérica, los asentamientos humanos en el centro de México y formó parte del escudo de Tenochtitlán, símbolo que se conserva hasta nuestros días. El nopal utilizado en México tiene evidencias fechadas hace 7,000 años en semillas, cáscaras de tuna y fibras de pencas de nopal fosilizadas, encontradas en excavaciones realizadas en Tehuacán, Puebla (Rodríguez, 2010).

Otro componente al que se ya se ha hecho mención por su importancia fisiológica es el mucílago. Este compuesto se presenta tanto en los cladodios como en la piel y pulpa de la fruta, aunque en muy diversas proporciones. Estudios efectuados por Sáenz y Sepúlveda (2006) indican que el rendimiento en todos los casos es bajo: 0.5 por ciento en la cáscara y 1.2 por ciento en los cladodios.

El mucílago es un carbohidrato complejo. Entre los monómeros contenidos en su cadena se encuentran: L-arabinosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-Xilosa y ácido galacturónico. La proporción de estos monómeros en la molécula varía de acuerdo a diversos factores como: variedad, edad, condiciones ambientales y estructura empleada para la extracción (fruto, cáscara, cladodio), entre otros.

El mucílago está presente como su sal de calcio en las células de mucílago del parénquima de la penca. Este mucílago constituye un hidrocoloide que podría integrar la oferta de una gran gama de agentes espesantes de amplio uso en la industria de alimentos y farmacéutica, además de que tiene una gran capacidad de absorción de agua. Su poder espesante está siendo actualmente estudiado (Cárdenas *et al.*, 2007), con resultados interesantes, por lo que si se mejoran los rendimientos de extracción podría competir con gomas de gran uso como la goma guar u otros agentes espesantes. Una amplia revisión acerca de estos compuestos fue publicada por Sepúlveda *et al.* (2007).

2.5.2.2 Alginato

Las paredes celulares de las algas pardas contienen algina, polisacárido compuesto de ácidos D-manurónico y L-gulurónico en diversas proporciones (Figura 5). Cuando prácticamente se remplazan los cationes naturales por un único catión, las alginas se llaman “alginatos” (de sodio, potasio, amonio, etcétera). Cuando se separan los cationes se produce el ácido algínico, que es insoluble. Por intercambio de cationes y conversión de los grupos carboxilo en ésteres y amidas, se modifica la reología de los alginatos y de esta forma, sirven así para diferentes usos. Algunas veces, se emplean en las formulaciones agentes retenedores de iones. Asimismo es posible regular la

consistencia de los geles claros de los alginatos. Los iones calcio gelifican a los alginatos, pero la instauración de complejos de calcio con los restos de ácido D-L-gulurónico es diferente a la de las pectinas poco metoxiladas (Ariza et al., 2010).

La acetilación parcial de los grupos hidroxilo inhibe la gelificación por los iones calcio. Se ha investigado y discutido el papel del calcio en la formación de los puentes salinos y quelatos con grupos hidroxilo próximo en moléculas adyacentes (Hodge y Osman, 1985). Los alginatos tienden a formar geles con un gran número de cationes divalentes. El mecanismo de gelación de los alginatos es conocido como el modelo de la caja de huevo, en el cual el calcio interactúa con los grupos carboxilo formando este tipo de agrupación (Nussinovitch, 1997).

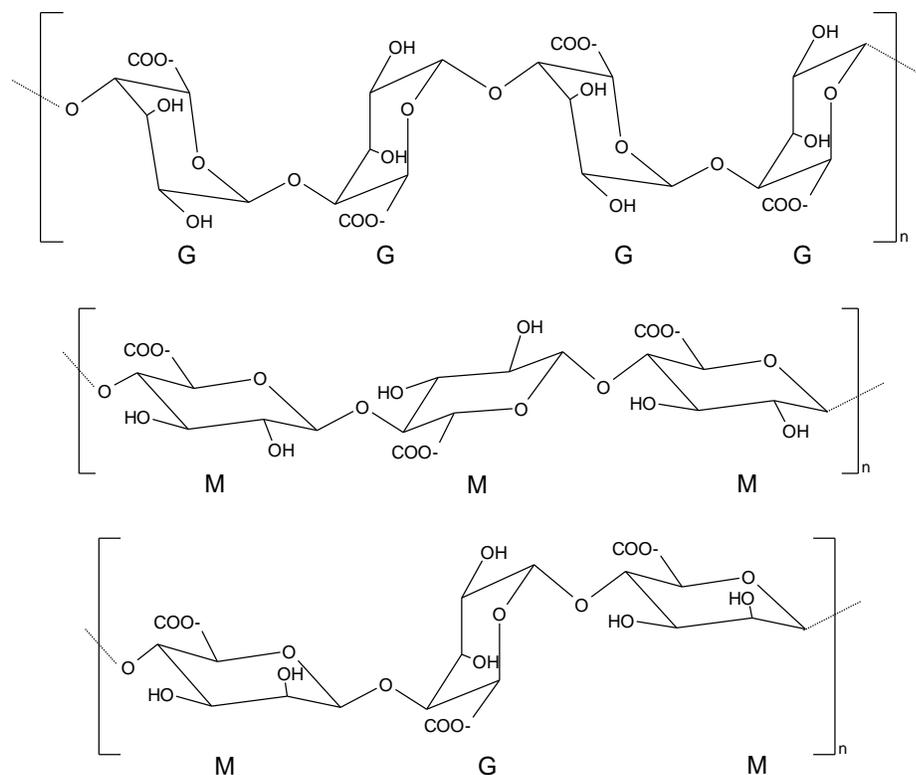


Figura 5. Estructura de los alginatos (M = Ácido malurónico y G = Ácido gulurónico).

Adaptado de Homayouni et al., (2007).

2.6 Justificación

Los inadecuados hábitos de alimentación y estilos de vida de la población contribuyen a enfermedades del síndrome metabólico. Cada día los consumidores están más conscientes de la importancia que tiene la alimentación en la nutrición y en la reducción del riesgo de contraer enfermedades. Debido a ello, es necesario el desarrollo de alimentos funcionales que además de contribuir a la nutrición, desempeñen una acción específica benéfica en las funciones fisiológicas del organismo. .

Debido a la constante preocupación de la sociedad por mejorar su alimentación se considera de suma importancia la incorporación en un alimento para consumo humano, de un agente probiótico (*Saccharomyces boulardii*) y prebiótico (*Inulina*) que prevenga y ayude al tratamiento de ciertas enfermedades, así como ayudar a mantener viable y activa la flora intestinal.

2.7 Objetivo general

Elaborar un alimento simbiótico a base de *Saccharomyces boulardii* e inulina

2.7.1 Objetivos particulares

1. Formular una mezcla de *Saccharomyces boulardii* e inulina y encapsularla mediante el empleo del mucílago de nopal y alginato de sodio.
2. Evaluar la viabilidad del microorganismo encapsulado
3. Elaborar un alimento funcional con el microorganismo encapsulado
4. Realizar la caracterización fisicoquímica, y microbiológica del alimento desarrollado.
5. Evaluar la viabilidad del microorganismo bajo condiciones “*in vitro*”



3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materias prima

La cepa de la levadura probiotica utilizada fue *Saccharomyces boulardii* (CDBB-L-1483 ATCC-MYC-797), la cual fue obtenida de la colección del CINVESTAV (México). La cepa fue mantenida en medio PDA: agar papa dextrosa (BIXON) a 30°C, y posteriormente se mantuvo en refrigeración a 4°C. Nopales de la variedad *Opuntia ficus indica* fueron adquiridos en el mercado local de la cd. de Morelia, Mich.

3.2 Materiales

Fueron usados; Alginato de sodio, Protanal SF 120 (FMC Biopolymers); Inulina (Megafarma); Sorbitol triolate (Span 85) (Sigma de México); Aceite comestible de canola (Industrial Patrona, S. A., México);

3.3 Equipo de laboratorio

Balanza analítica Adam AQT-600, Sartorius; Centrifuga Damon; Balanza granataria Ohaus; Olla de esterilización (All american, USA); Horno Felisa; Baño maría con control de temperatura (Felisa); Stomakter 400 Blender; Horno de microondas Samsung; Parrilla de agitación magnética IKA; Horno con vacío modelo 282A Fisher Scientific; Bomba de vacío Felisa; Analizador de textura (LFRA Texture Analyzer); Deshidratador semiautomático de punto crítico (Samdri 795, Tousimis, USA)

3.4 Métodos

3.4.1 Extracción del mucílago de nopal

La extracción del mucílago del nopal se basó en la técnica aplicada por Rodríguez (2010), tal como lo relata Arizmendi en el (2004) y el cual consiste como se muestra en la Figura 6.

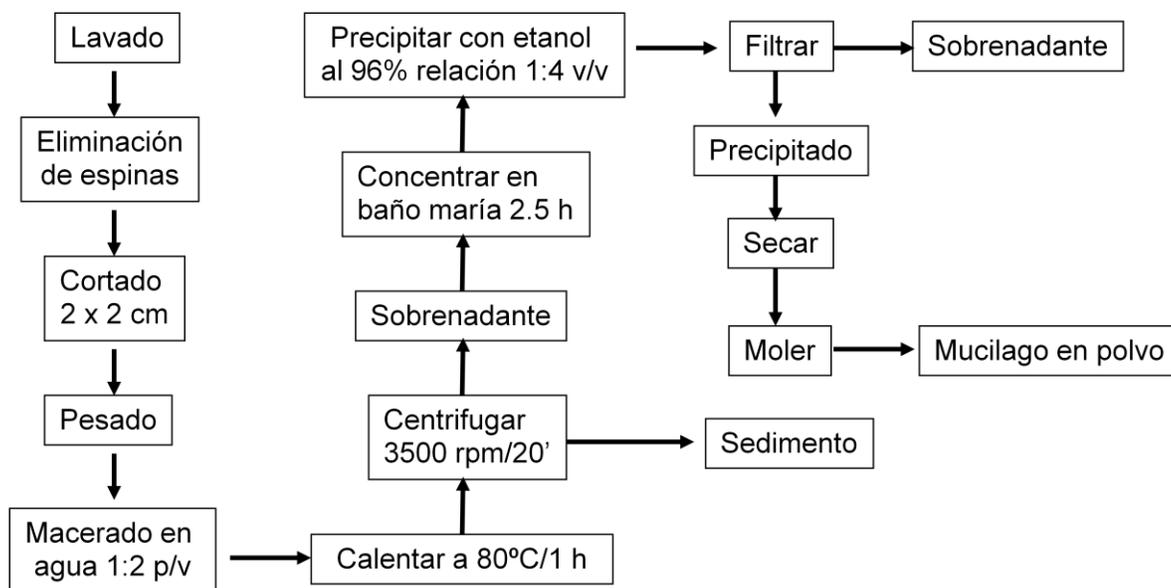


Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de extracción del mucílago de nopal.

3.4.2 Preparación y análisis de los geles

3.4.2.1 Formulaciones de mezclas de hidrocoloides

Se emplearon cuatro formulaciones de mezclas de hidrocoloides que fueron:

- Protanal SF 120 alginato de sodio (1.0%, w/v) (FMC Biopolymers).
- Protanal SF 120 alginato de sodio (1.0%, w/v) mezclado con mucílago de nopal (*Opuntia ficus-indica*), (0.1%, w/v).
- Protanal SF 120 alginato de sodio (1.0%, w/v) mezclado con inulina (0.1%, w/v).
- Protanal SF 120 alginato de sodio (1.0%, w/v) mezclado con mucílago de nopal (*Opuntia ficus-indica*), (0.5%, w/v) y con inulina (0.5%, w/v).

Las diferentes formulaciones fueron ubicadas como ALG (a), ALMUC (b), ALINU (c), ALMUCIN (d) respectivamente.

3.4.2.2 Propiedades texturales de los geles formados

Las propiedades texturales de los geles formados fueron evaluadas mediante un análisis de perfil de textura, cuya técnica de determinación se basó en lo propuesto por Ariza et al (2010) y consistió en lo siguiente.

Los geles de las diferentes mezclas de hidrocoloides se formaron dentro de una funda sintética de celulosa de 20 mm de diámetro. A las suspensiones de los hidrocoloides se les fueron agregando CaCO_3 (0.04 M) disuelto por agitación magnética para la posterior adición de ácido acético (0.35 M), que originó la formación final del gel. Los geles moldeados fueron removidos de la funda y rebanados en cilindros de 20 mm de altura. El análisis de perfil de textura fue realizado mediante un analizador de textura Brookfield (LFRA Texture Analyzer) (Figura 7). Las muestras fueron comprimidas 10 mm de la altura original (50%) en un doble ciclo de compresión a una velocidad constante de 1.0 mm/s y un periodo entre compresiones de 3.0 s. El vástago utilizado fue de aluminio con 5 cm de diámetro.



Figura 7. Analizador de textura LFRA.

De las curvas fuerza-deformación obtenidas para cada formulación y según las áreas, distancia y fuerza; los parámetros instrumentales de textura fueron determinados y definidos como: **dureza**, que es la fuerza máxima alcanzada durante el primer periodo de compresión; **cohesividad**, que es la relación entre el área positiva durante la segunda compresión entre la primera, excluyendo las áreas de descompresión de cada ciclo; **resorteo**, que es la altura que la muestra recupera entre el final de la primera compresión y el inicio de la segunda; y **resiliencia**, como la energía acumulada que permite a la muestra recuperar su forma original después de la deformación (Figura 8) (Texture Technologies, 2003).

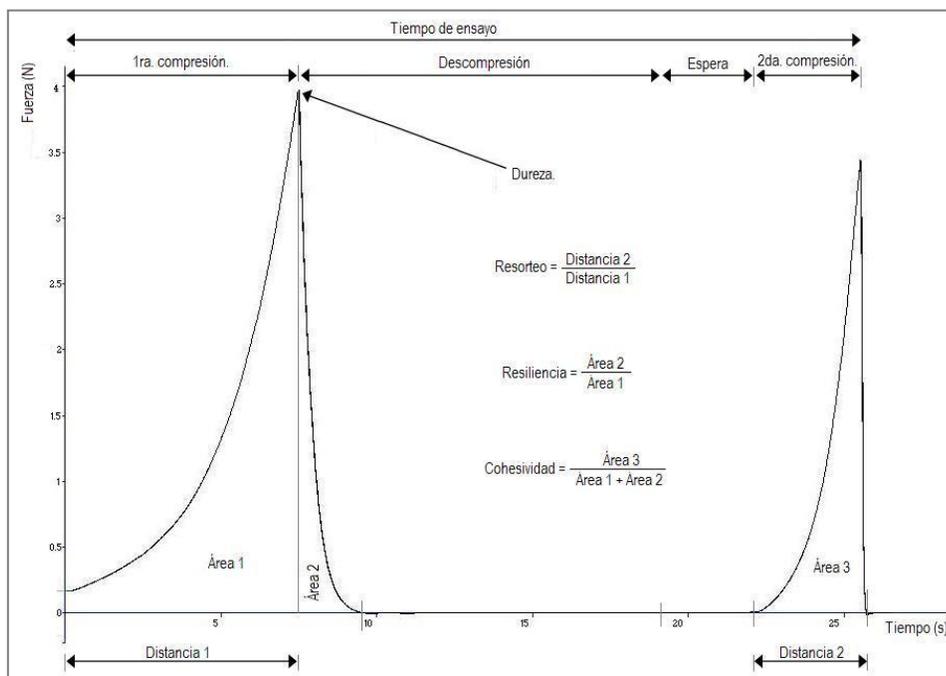


Figura 8. Curva típica del análisis del perfil de textura.

Las propiedades mecánicas de los geles que se obtienen instrumentalmente, fueron definidas basándose en la semejanza con el procesado de los alimentos en la boca como: **dureza**, la fuerza necesaria para provocar una deformación al material que se esté probando; **cohesividad**, la fuerza interna molecular que mantiene la forma del producto; **resorteo**, la proporción a la cual un material deformado regresa después de eliminada esta fuerza de deformación (Szczesniak, 1962).

3.4.3 Proceso de encapsulación de la levadura *Saccharomyces boulardii*

La encapsulación del microorganismo se realizó mediante una adaptación de la técnica de emulsión propuesta por Rosas-Flores (2008) y Ariza et al, (2010). Inicialmente la levadura probiótica se proliferó en caldo nutritivo (BIXON) a 30°C durante 48 h y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min para obtener un botón celular compacto. La técnica está basada en la formación de una emulsión agua en aceite (W/O), que consistió en preparar 100 mL de una dispersión (fase acuosa) de la formulación de hidrocoloides, adicionando el botón celular obtenido por centrifugación, y que contiene una concentración celular equivalente a 1×10^{10} UFC/mL. Posteriormente a la mezcla se agregó CaCO_3 (0.04 M).

De manera separada se mezclaron 200 mL de aceite de canola (Aceite capullo, México) con 2.5 gr de Span 85 (fase oleosa). En agitación constante la fase acuosa fue adicionada a la fase oleosa (Figura 9), permitiendo la formación de la emulsión W/O. Posteriormente se agregaron 40 mL del mismo aceite, mezclado con ácido acético glacial (0.35 M) para iniciar el proceso de gelificación. Este sistema se mantuvo en agitación durante 20 min para la completa formación de las cápsulas y posteriormente se dejó reposar por 30 min. Finalmente, se decantó y filtró, las cápsulas fueron lavadas con agua destilada estéril y dos veces con una solución buffer de fosfatos (pH = 7.2) para eliminar los residuos de aceite. Las cápsulas fueron seleccionadas y almacenadas a 4°C para su posterior análisis.

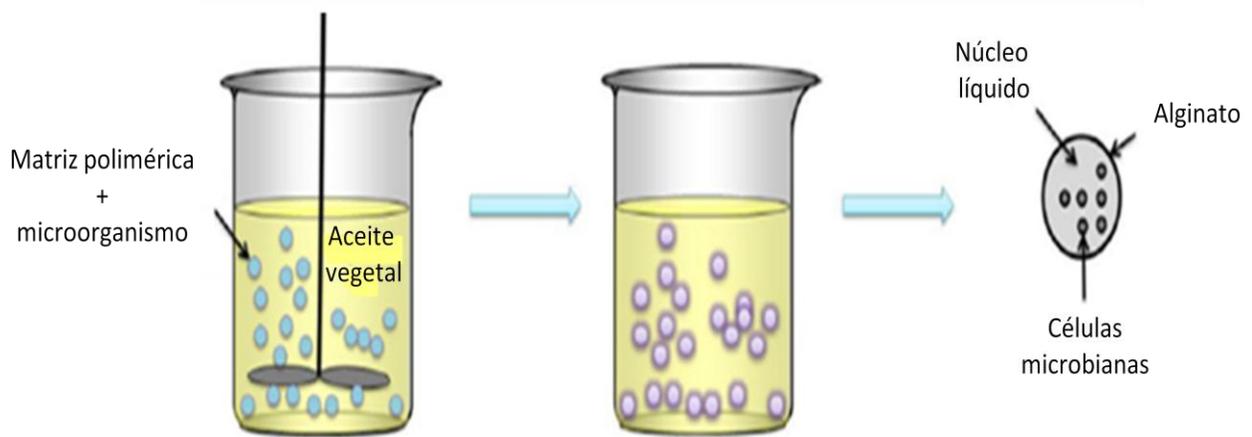


Figura 9. Procedimiento de emulsificación (Rosas-Flores 2008)

3.4.4 Viabilidad del microorganismo.

La viabilidad del microorganismo fue determinada tanto libre como encapsulado en la formulación de los hidrocoloides. Para ello se empleó el método de cuenta en placa, el cual consistió en la realización de una serie de diluciones de 10^{-1} en diluyente (agua peptonada) hasta 10^{-10} . Al final se trabajó con las diluciones 10^{-5} a 10^{-7} . Se tomaron alícuotas de 100 μ L, de las diluciones correspondientes, y se vertieron sobre placas de agar papa dextrosa e incubadas 72 h a 30 °C. Para cuantificar los microorganismos encapsulados, 1ml fue colocado en un tubo de ensayo y con el pistilo de un agitador de vidrio estéril, fueron desintegradas las cápsulas y posteriormente suspendidas en diluyente (Yañez, 2006). Finalmente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias y se reportó como UFC/mL (Shima et al., 2006). Se hicieron cuatro repeticiones tanto para la levadura libre como encapsulada y se realizó comenzando por el día de la elaboración del queso (tiempo 0), realizando estudios de viabilidad del microorganismo cada ocho días por un mes (tiempo 4), realizándose comparaciones de cuenta total de microorganismo libre y encapsulado con respecto al tiempo.

3.4.5 Microscopía Electrónica de Barrido

La estructura y superficie de los materiales de encapsulación y *S. boulardii* encapsulada se observaron mediante microscopía electrónica de barrido, de acuerdo a la técnica reportada por Muthukumarasamy et al., (2006). Inicialmente se obtuvieron microcápsulas de la mezcla antes descritas sin incluir a los microorganismos. Posteriormente la levadura probiótica fue encapsulada en la formulación de mezcla de hidrocoloides. y las muestras fueron sumergidas en una solución búfer de fosfatos (0.1 M) con gluteraldehído al 5% (v/v), y en seguida en tetróxido de osmio para su fijación. La muestra fue deshidratada mediante gradientes de etanol, desde 30% hasta etanol absoluto. En seguida, las muestras fueron transferidas a contenedores microporosos, deshidratadas a punto crítico con CO₂ en un deshidratador semiautomático de punto crítico (Samdri 795, Tousimis, USA) y finalmente cubiertas con oro con un equipo (Denton vacuum desk III, PAIS). Las muestras fueron observadas y las imágenes capturadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) con Z=12mm y un voltaje de aceleración de 13 y 10 kV.

3.4.6 Elaboración del alimento funcional

Para la elaboración del queso fresco probiótico, se empleó como materia prima leche bronca recolectada de un establo particular de la ciudad de Sahuayo, Mich, la cual fue procesada como se indica en la Figura 10 (Sangronis y García, 2007).

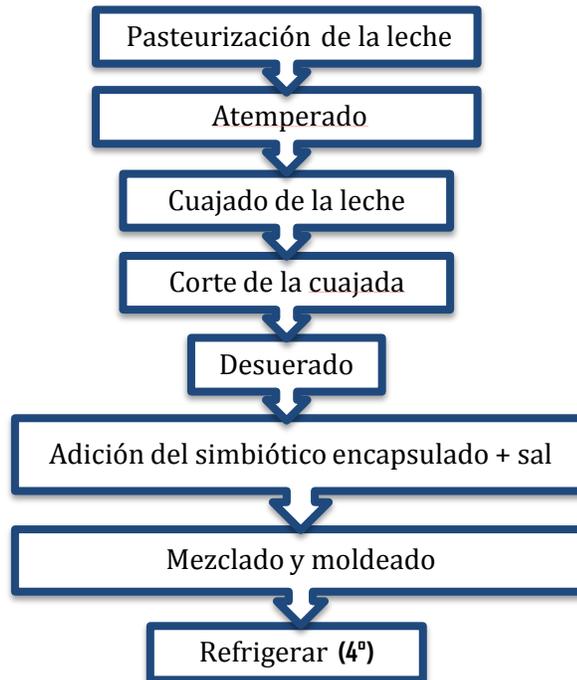


Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de queso fresco.

El simbiótico encapsulado fue adicionado después de la obtención de la cuajada y desuerado de la misma, en cinco diferentes tratamientos de un litro de leche cada uno. Al tratamiento 1 (T1) se le agregaron 10g de encapsulado, al tratamiento 2 (T2) se le agregaron 20g, al tratamiento 3 (T3) se le agregaron 30g, al tratamiento 4 (T4) se le agregaron 2g de microorganismo sin encapsular y finalmente al tratamiento 5 (T5) el cual fungió como control debido a que no se le adicionaron microorganismos probióticos en ninguna de sus presentaciones (libres o encapsulados). Se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento.

El queso se empaco en papel encerado y se mantuvo en bolsa de plástico a refrigeración de 4°C.

3.4.7 Viabilidad del microorganismo probiótico en el alimento funcional

Al igual que en la parte anterior se determinó la viabilidad por el método de vaciado en placa, colocando 10g de queso en 90 ml de diluyente. A los quesos con encapsulado se les aplicó el tratamiento previo antes mencionado de acuerdo a Yañez, (2006). Para la liberación y cuantificación del microorganismo igualmente se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento y se manejaron los tiempos antes mencionados.

3.4.8 Análisis microbiológico del alimento funcional

El contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), hongos y levaduras, organismos coliformes totales (OCT), Salmonella, Staphylococcus aureus y Escherichia coli, en el alimento funcional, se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (Tabla 2).

Tabla 2. Metodología empleada en el análisis microbiológico del queso

Norma Oficial Mexicana	Microorganismo
NOM-092-SSA1-1994	Bacterias Mesófilas Aerobias
NOM-111-SSA1-1994	Hongos y Levaduras
NOM-113-SSA1-1994	Coliformes Totales
NOM-114-SSA1-1994	Salmonella
NOM-115-SSA1-1994	Staphylococcus aureus
Método de MUG	Escherichia coli

3.4.9 Análisis Bromatológico del alimento funcional.

El análisis bromatológico del alimento funcional se realizó de acuerdo a la metodología propuesta en el AOAC (2004). El contenido de humedad se determinó por el método de destilación de Bidwell-Sterling; las cenizas se determinaron de acuerdo al método 935.42; el contenido de grasa se determinó de acuerdo al método 933.05 y el contenido de proteína fue determinado de acuerdo al método 920.123. Dichas evaluaciones se hicieron al inicio y después de 30 días de almacenamiento.

3.4.10 Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* in vitro.

La tolerancia a la acidez del organismos probiótico libre y encapsulado fue estudiada de acuerdo al método de Ding *et al.*, (2007). Se utilizó agua peptonada ajustada con HCl 6M al pH estomacal (pH 2.0) y de colon (pH 6.5). Inicialmente el microorganismo se proliferó en caldo nutritivo por 48h, lográndose una viabilidad de aproximadamente 10^{10} UFC/ml, la cual fue inoculada en el caldo peptonado modificado tomando muestras en intervalos de 0, 60, 120 y 180 min para la enumeración. La viabilidad de *S. boulardii* se determinó por el método de vaciado en placa, las placas fueron incubadas a 30°C por 72 h. Para el organismo probiótico encapsulado, las levaduras previamente liberadas de las cápsulas por secuestro de iones calcio utilizando tampón de fosfato a pH 7.0. La tolerancia a la acidez se determinó comparando la concentración final de microorganismos después de 3h con el recuento inicial a las cero horas. Todas las pruebas se realizaron en 4 repeticiones para calcular el promedio y el error estándar.

3.4.11 Evaluación Sensorial

Se realizó un análisis sensorial, en donde se evaluaron los efectos en los atributos sensoriales del queso probiótico en comparación con un control (queso fresco sin encapsular), utilizando una escala hedónica de cinco puntos. Los atributos que se evaluaron fueron: color, olor, textura, sabor, aceptabilidad general. La evaluación sensorial fue determinada por “análisis del consumidor” o prueba hedónica. Los jueces fueron 60 alumnos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Se montó el panel con las 2 muestras en recipientes, primero se les dio a probar la muestra 1 (problema), después se le dio la muestra 2 (control). Después de darles a probar cada muestra, se les proporciono agua para que se enjuagaran vigorosamente la boca y se les otorgo una hoja donde se presentaban todos los parámetros a evaluar para cada muestra (Anexo).

3.4.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa SAS (V.9.0) mediante un Análisis de Varianza diseño de bloques al azar; y la diferencia significativa entre las medias de los tratamientos por Tukey ($P < 0.05$).



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis del perfil de textura

Los perfiles de textura obtenidos para cada uno de los geles preparados se muestran en la Figura 11, mientras que los parámetros de textura obtenidos para cada uno de los geles son mostrados en la Tabla 3.

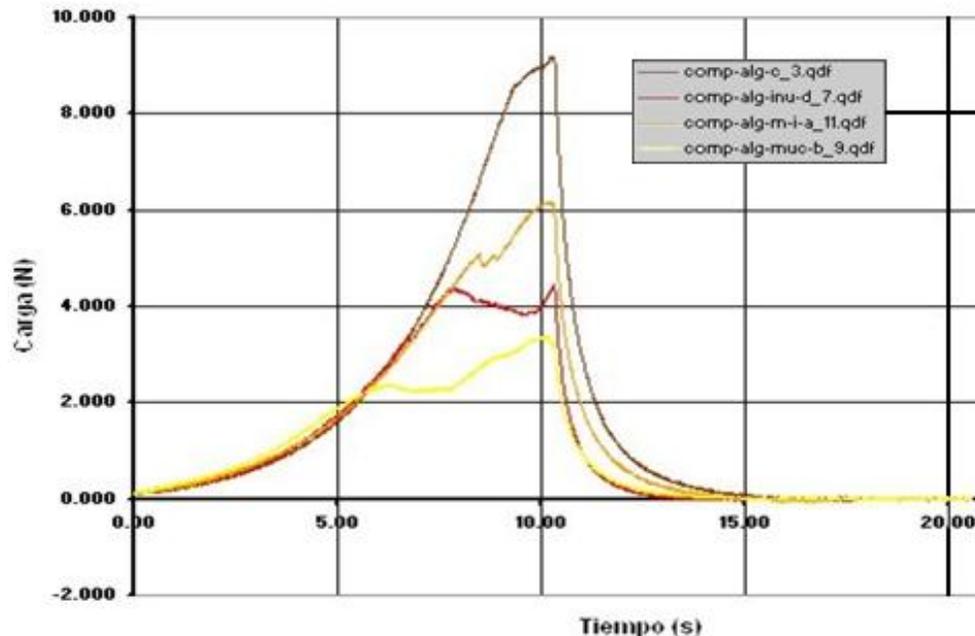


Figura 11. Análisis de perfil de textura de las diferentes mezclas de hidrocoloides

Tabla 3. Parámetros instrumentales de textura de los geles

PARÁMETRO	TIPO DE GEL			
	a: ALG	b: ALG/MUC	c: ALG/INU	d: ALG/MUC/INU
Dureza (N)	9.20	3.39	4.46	6.17
Resiliencia	0.418	0.140	0.889	0.185

Se puede observar que los geles que fueron preparados con mucílago de nopal (formulaciones b y d), muestran resiliencias bajas, lo que significa que el material no regresa a su forma original, después de que la fuerza que actúa sobre él ha sido eliminada, ya sea para doblarlo, estirarlo o comprimirlo; lo que significa que se trata de un material que no se hidrata en su totalidad y por lo tanto, se puede deducir que no

tiene interacción molecular con los otros materiales. Sin embargo, la energía acumulada en la muestra de inulina si interacciona debido a la cantidad de energía que puede absorber antes de que comience a deformarse en forma irreversible y por lo tanto, si afecta el resultado al ser mezclada con alginato, sin adición de mucílago.

En cuanto a la dureza, el alginato de sodio es por naturaleza un material muy duro que disminuye su dureza con la adición de otros hidrocoloides. En la Tabla 3 podemos observar que la dureza del gel de alginato de sodio disminuye a medida que se mezcla con uno o ambos hidrocoloides (mucílago de nopal e inulina), y mayormente con aquellos con los que no se establece asociación alguna, como es el caso del gel que se obtiene al mezclar alginato de sodio y mucílago de nopal, ya que dicha mezcla ocasiona la formación de un gel muy blando debido a que no existe una fuerte interacción molecular entre sus constituyentes. En la formulación ternaria en la cual se utiliza la mezcla de alginato/mucílago e inulina, es posible que la dureza medio alta se deba a la concentración de polvos ocasionado por la adición de la inulina en polvo, lo que provoca que haya una mayor concentración de sólidos y por lo tanto, una menor disponibilidad de agua en el medio.

Ariza et al., (2010), estudiaron la relación entre las propiedades texturales de los geles formados para la encapsulación de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Aerococcus viridans* y *Pediococcus pentosaceus*) a partir de mezclas de hidrocoloides de alginato (ALG), alginato/gelana (AGL) o alginato/□-carragenina/algarrobo (AKL). El análisis del perfil de textura de los geles no mostró diferencia en cohesividad y resorteo, pero ALG formó los geles más duros. Sin embargo, la incorporación de otros hidrocoloides con alginato disminuyó la fuerza del gel formando una matriz de gel más cohesiva, similar a los resultados del presente trabajo, donde también la adición de inulina y mucilago de nopal en polvo con alginato de sodio formó geles de mayor resiliencia.

4.2 Formación de las microcápsulas

El método de microencapsulación empleado en este trabajo consiste de un sistema de dos fases, una fase hidrofílica y otra hidrofóbica compuesta por un aceite vegetal inerte. La mezcla de estas dos fases por medio de agitación dio como resultado la formación de una emulsión formada por una gran cantidad de microgotas que pueden ser inducidas hacia la “solidificación”.

Para la preparación de microcápsulas se distinguen tres pasos: 1) Dispersión de una disolución acuosa de un reactante soluble en agua en una fase orgánica (aceite) para producir una emulsión agua en aceite (w/o); 2) Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua iniciada por un reactante soluble en aceite a la emulsión w/o, 3) Separación de las microcápsulas de la fase orgánica (Pedroza-Islas, 2002).

Las microcápsulas fueron obtenidas de la emulsión (w/o), utilizando la formulación ternaria formada con alginato de sodio, inulina y mucílago de nopal más la adición de un agente tensoactivo al 2% (Span 85), para la unión de ambas fases, así como carbonato de calcio 0.04M, condiciones que permitieron formar una emulsión semiestable así como la separación de las fases aplicando una fuerza de agitación durante todo el proceso. Una etapa importante posterior al proceso de formación de una membrana de atrapamiento es la facilidad con que se puedan recuperar las microcápsulas, una vez que la reacción de polimerización ha permitido su formación.

Diferentes autores como Yañez *et al.*, (2008), estudiaron el efecto del tiempo de reacción del agente entrecruzante (glutaraldehído) y la concentración sobre la eficiencia de recuperación de microcápsulas formadas a partir de goma arábica, donde muestran que las microcápsulas no fueron recuperadas, esto debido a que posterior a la reacción de polimerización el sistema formado fue bastante homogéneo y estable el cual no pudo ser separado ni por centrifugación severa ni suave, caso contrario a lo sucedido en nuestro trabajo, ya que la adición de tres polímeros diferentes conlleva a la

formación de un sistema que permitió la separación de las microcápsulas de la fase orgánica.

4.3 Viabilidad del microorganismo probiótico encapsulado

El efecto del proceso de microencapsulación en gel de alginato de sodio-inulina-mucílago de nopal, sobre la viabilidad del microorganismo probiótico *Saccharomyces boulardii*, tanto en estado libre como en forma encapsulada, fue determinada por el método estándar de vaciado en placa y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* libre y encapsulada (log UFC/mL)

Células	Tiempo (semanas)				
	1	2	3	4	5
Encapsuladas	9.61±0.02 ^B	9.29±0.15 ^A	9.03±0.08 ^A	8.09±0.05 ^A	7.31±0.13 ^A
Libres	10.30±0.10 ^A	9.05±0.83 ^A	8.24±0.49 ^B	7.55±0.22 ^B	6.52±0.07 ^B

Medias en la mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

A los resultados se les aplicó un análisis de varianza el cual mostró diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto a la viabilidad de *Saccharomyces boulardii* con respecto al tiempo, en estado libre y encapsulada con alginato de sodio-inulina-mucílago de nopal y almacenados a 4°C. La cepa sin encapsular presento una reducción significativa en su viabilidad al ser comparadas con la cepa encapsulada, el material encapsulante ayudo a mejorar la viabilidad de la levadura. La cepa libre inicialmente comenzó con un promedio de 10.30-log UFC/ml de células probióticas viables, pero después de la 2ª semana su viabilidad disminuyó en 94.38%, manteniendo un conteo celular de sólo 9.05-log UFC/ml, pero al término de la 5ª semana su viabilidad disminuyó en 99.98%, conservando un conteo celular de tan solo 6.52-log UFC/ml. En cambio, la viabilidad del microorganismo encapsulado después de la 2ª semana sólo disminuyó en un 52.14%, manteniendo un conteo celular de 9.29-log UFC/ml y al término de la 5ª semana la disminución de la viabilidad del microorganismo encapsulado fue del 99.5%, lográndose conservar un conteo celular de 7.31-log

UFC/mL; lo que equivale a 6.17 veces mayor viabilidad que el microorganismo sin encapsular; sin embargo, independientemente de si el microorganismo se encuentra o no encapsulado, ambos niveles de supervivencia se consideran adecuados para conferir los beneficios como agentes probióticos, ya que de acuerdo con la FAO/OMS (2001), para que un alimento sea considerado como probiótico, deberá contener una concentración del microorganismo entre 10^6 a 10^7 UFC/g de producto.

Varios autores han reportado que la encapsulación con alginato mejora la viabilidad de microorganismos encapsulados. Dembczynski y Jankowski, (2000) demostraron un incremento de 2.8×10^7 hasta 7.2×10^9 después de 30 h de fermentación de la cepa *L. acidophilus* encapsulado en una mezcla de alginato con almidón. De Giulio *et al.* (2005), trabajaron con tres cepas de bacterias ácido lácticas encapsuladas en alginato de calcio, mismas que fueron sometidas a pruebas de congelamiento y de liofilización, resultando no ser afectadas por ninguno de estos procesos. Mandal *et al.* (2005) probaron varias concentraciones de alginato para la microencapsulación de *L. casei*, y llegaron a la conclusión de que la supervivencia de estos microorganismos se incrementó de manera proporcional al incremento en la concentración de alginato. Kim *et al.* (2008) determinaron la viabilidad de *L. acidophilus* encapsulado en alginato después de haberse sometido a pruebas de acidez (condiciones gastrointestinales simuladas) y altas temperaturas, resultando ser más resistente a estas condiciones, aún después de llevarse a cabo un proceso de almacenamiento. Ariza *et al.* (2010), encapsularon cuatro cepas de bacterias ácido lácticas (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Aerococcus viridans* y *Pediococcus pentosaceus*) en mezclas de hidrocoloides de alginato (ALG), alginato/gelana (AGL) o alginato/k-carragenina/algarrobo (AKL) por la técnica de emulsión, La viabilidad de las bacterias encapsuladas fue mayor cuando se utilizaron mezclas de alginato con otros hidrocoloides aun después de 30 días de almacenamiento a 4 °C, similar a lo ocurrido en este trabajo al utilizar como agente encapsulante una mezcla de alginato de sodio, inulina y mucílago de nopal.

4.4 Microscopia electrónica de barrido

La Figura 12 muestra la microfotografía de las microcápsulas obtenidas con la formulación utilizada como material encapsulante (alginato-inulina-mucílago de nopal). Se puede apreciar que el tamaño promedio de las microcápsulas formadas fue de , aproximadamente 9.2 μm de diámetro.

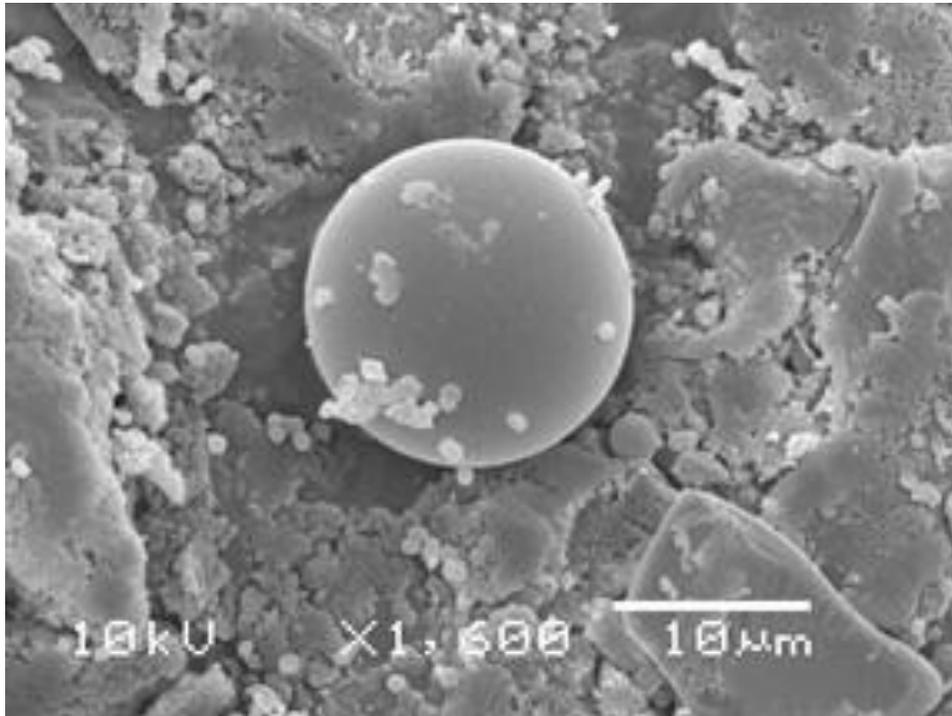


Figura 12. Microfotografía electrónica de barrido de la cápsula formada con alginato de sodio, inulina y mucílago de nopal.

Ariza et al., (2010), observaron microcápsulas elaboradas con alginato de sodio encontrando la formación de superficie rugosa, pero con un interior sólido, es decir, no poroso, lo que no permite la liberación constante de probióticos, caso contrario con la adición de uno o más hidrocoloides con alginato de sodio donde se reduce la dureza y rigidez del mismo, tal como lo obtenido en el presente trabajo. Song *et al.*, (2003) reportaron cápsulas de alginato de calcio diferentes a las que se obtuvieron en el presente trabajo, tanto en rugosidad como en superficie. Esta estructura rugosa y con cavidades es similar a la reportada por Rosenberg *et al* (1985) en un estudio realizado

con goma arábica κ -carragenina y goma de algarrobo. Esta formación rugosa puede deberse a la interacción entre las moléculas de los diferentes materiales utilizados en el proceso de encapsulación (Tako y Nakamura 1986).

4.5 Alimento funcional

Tanto a nivel de investigación como comercial, los productos que han sido utilizados principalmente como vehículo de agentes probióticos han sido los alimentos fermentados obtenidos a partir de productos lácteos como el yogurt y el queso. Los quesos presentan ventajas como soporte de microorganismos probióticos con respecto a las leches fermentadas, debido fundamentalmente a sus características fisicoquímicas y de composición como son: mayor valor de pH, menor acidez, mayor capacidad de almacenamiento, mayor contenido de materia grasa, una mayor disponibilidad de nutrientes y menor contenido de oxígeno, entre otras (Heller *et al.* 2003). Los quesos son alimentos con un período de vida útil prolongado, que puede variar de uno a varios meses, dependiendo del tipo de queso, fresco, blando, semiduro o duro (Heller *et al.* 2003). Teniendo en cuenta esta característica, el desarrollo de quesos probióticos debe garantizar el mantenimiento de la viabilidad probiótica durante todo el período de maduración o vida útil del alimento (Ross *et al.* 2002). Además, también resulta necesario considerar que la actividad bioquímica de los probióticos agregados al queso no debe influir negativamente en la composición, sabor, textura y otras características sensoriales propias del alimento típico (Boylston *et al.* 2004).

El tipo de queso seleccionado para utilizar como vehículo del probiótico fue el queso fresco (Figura 13), ya que es un alimento de alto consumo en nuestro país y va dirigido a toda la población.



Figura 13. Queso fresco

Las medias de los valores fueron comparadas mediante ANOVA, con el objetivo de verificar que el agregado encapsulado no impactaba significativamente en la composición del alimento, que por lo tanto ofrecía un medio ambiente similar para la expresión bioquímica de los probióticos. La presencia de diferencias significativas se estableció a un nivel de confianza del 95% ($\alpha < 0.05$).

En la Tabla 5 se presentan los resultados de los análisis bromatológicos realizados a los 4 diferentes quesos formulados y el queso control, obtenidos al inicio y al final de los 30 días de su almacenamiento en refrigeración a 4°C.

Tabla 5. Análisis bromatológico de las diferentes formulaciones de quesos

Parámetro	T R A T A M I E N T O				
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
Humedad	55.33±0.57 ^A	55.33±1.15 ^A	5.22±0.57 ^A	54.33±0.95 ^A	54.66±1.15 ^A
	44.12±0.32 ^A	45.23±1.32 ^A	45.88±0.21 ^A	44.09±1.12 ^A	45.53±0.19 ^A
Cenizas	4.11±0.11 ^A	4.31±0.37 ^A	4.12±0.23 ^A	3.98±0.20 ^A	4.04±0.24 ^A
	4.80±0.40 ^A	4.83±0.14 ^A	4.62±0.14 ^A	4.46±0.14 ^B	4.53±0.14 ^A
Grasa	19.90±0.36 ^A	19.66±0.35 ^A	19.40±0.65 ^A	19.86±0.47 ^A	20.56±0.70 ^A
	22.45±0.03 ^A	21.93±1.40 ^B	22.10±0.12 ^{AB}	22.78±1.56 ^A	23.23±1.34 ^B
Proteínas	18.03±0.20 ^A	7.76±0.53 ^A	17.51±0.36 ^A	17.94±0.37 ^A	18.45±0.21 ^A
	20.32±0.01 ^{AB}	19.89±0.22 ^{AB}	19.32±0.65 ^B	20.57±0.21 ^A	21.87±0.96 ^A

Medias en el mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El agregado simbiótico no impactó significativamente en la composición química del alimento, lo cual se corrobora por el hecho de que no se encontró diferencia estadística significativa en la composición inicial de los diferentes quesos obtenidos. La composición inicial promedio de los quesos elaborados fue: humedad 54.98%, cenizas 4.11%, grasa 19.88%, proteínas 17.94%; lo que hace un total de 96.91%; el restante 3.09% corresponde al contenido de carbohidratos como la lactosa, la cual no fue determinada pero se obtiene por diferencia.

Aun cuando los quesos fueron almacenados en refrigeración a 4°C y en bolsas de plástico para evitar la deshidratación, al cabo de los 30 días de almacenamiento los quesos exudaron suero, de tal manera que por efecto de la sinéresis hubo una pérdida de humedad y por ende, la concentración de los nutrientes del queso, de tal manera que al final de los 30 días de almacenado a 4°C, la composición promedio de los quesos fue la siguiente: humedad 44.97%, cenizas 4.65%, grasas 22.50%, proteínas 20.39%; lo que da un total de 92.51%; el restante 7.49% está conformado por carbohidratos como la lactosa, Existieron diferencias estadísticas significativas entre la composición inicial y la composición final de los diferentes quesos elaborados. Dichas diferencias en la composición inicial y final de los quesos se debieron a la pérdida de humedad que por efecto de la sinéresis se presentó durante la etapa de almacenamiento de los quesos y concentro nutrientes.

En otros trabajos sobre quesos probióticos, se encontraron variaciones en algunos de los parámetros de la composición global entre quesos testigo y probióticos. Éstas variaciones fueron atribuidas a la dificultad de controlar la composición de los quesos elaborados a escala laboratorio (25 y 10 L) (Gardiner *et al.*, 1998, Ong *et al.*, 2007). Gardiner *et al.* (1998), corroboraron que al fabricar los quesos a escala piloto (450 L) utilizando los mismos probióticos, las diferencias en su composición desaparecían. En nuestro trabajo, a pesar de que el volumen de leche de elaboración fue de 1L, no se obtuvieron diferencias en la composición de los quesos, debido a que se puso especial cuidado en las etapas críticas del proceso de elaboración.

Otro factor de gran importancia es el pH, que además de influir en las actividades enzimáticas, ha demostrado tener un gran efecto en la textura del queso, ya que impacta en el estado del calcio en el alimento, de esta manera, la obtención de quesos demasiado ácidos podría ser perjudicial para la calidad del producto, ya que ocasionaría características reológicas indeseables (Pastorino *et al.*, 2003). También se ha señalado al pH del alimento probiótico como un factor crítico para la sobrevivencia del microorganismo probiótico; sin embargo, la sensibilidad a la acidez es un fenómeno que varía entre especies e incluso entre cepas de una misma especie, y se reconoce a *S. boulardii* como relativamente resistente comparado con *Lactobacillus* o las *bifidobacterias* (Michaelidou *et al.*, 2003). En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos de la variación del pH de los diferentes quesos elaborados con respecto al tiempo de almacenamiento en refrigeración a 4°C.

Tabla 6. Variación del pH de los diferentes quesos elaborados con respecto al tiempo

pH	T R A T A M I E N T O				
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
Inicial	4.9 ± 0.03 ^A	5.2 ± 0.04 ^B	5.2 ± 0.07 ^B	4.8 ± 0.03 ^A	5.4 ± 0.15 ^B
Final	5.2 ± 0.05 ^A	5.6 ± 0.05 ^B	5.4 ± 0.03 ^{AB}	5.1 ± 0.05 ^A	5.6 ± 0.24 ^B

Medias en el mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Después de 30 días de almacenamiento de los quesos en refrigeración a 4°C observamos que en todos los quesos elaborados incluyendo al testigo, el pH final del queso fue ligeramente mayor que el pH inicial, lo cual es indicativo de que durante el periodo de almacenamiento no hubo fermentación de la lactosa, ya que el metabolismo de los microorganismos es mínimo a bajas temperaturas. Por otro lado, por efecto de la sinéresis que se presentó durante el almacenamiento, los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (ácido láctico) presentes inicialmente son drenados de los quesos, ocasionando de esta forma el ligero incremento del pH de los mismos.

El pH de los quesos, varió de 4.8 a 5.6, manteniéndose siempre mayor al pH que presentan las leches fermentadas, el cual se encuentra entre 3.7 a 4.3, siendo de este modo un medio menos perjudicial y más estable para la supervivencia de los microorganismos probióticos (Boylston *et al.*, 2004). Kasimoğlu *et al.*(2004), comprobaron que las bacterias probióticas no ejercían ninguna influencia en la composición del queso, incluyendo el pH, por el contrario, otros autores Ong *et al.*(2006), encontraron que el agregado de diferentes bacterias probióticas se reflejaba en una disminución del pH del producto, debido a su capacidad acidificante que se sumaba a la del fermento primario, similar a los resultados aquí obtenidos.

Por otro lado, la matriz cerrada del queso y su contenido de materia grasa relativamente alto también generan un ambiente protector hacia la viabilidad de los probióticos (Gardiner *et al.* 1998). Fenelon *et al.* (2000) y Michaelidou *et al.* (2003), observaron variaciones en el contenido de materia grasa, lo cual puede modificar la proteólisis de quesos y la sinéresis.

4.6 Análisis microbiológico del alimento funcional

Los quesos adicionados con el agente probiótico encapsulado, así como el adicionado de levadura sin encapsular mostraron menor concentración de todos los microorganismos patógenos evaluados que el queso control (Tabla 7), lo cual puede atribuirse a la posible actividad inhibitoria de la cepa probiótica sobre estos microorganismos.

Por otro lado, la concentración de BMA en todos los quesos excepto el control, estuvo por debajo de lo que marca la NOM, fuera de ello, todas las demás concentraciones de los diferentes microorganismos evaluados en todos los quesos incluyendo el control, estuvieron por debajo de lo que se estipula en la NOM correspondiente. Díaz y García (2000) mencionan que *S. aureus* es un microorganismo omnipresente ya que se encuentra en la mucosa, cavidad nasal, piel etc., razón por la que es muy frecuente que se encuentre en alimentos como los aquí elaborados y analizados.

Tabla 7. Resultados obtenidos del análisis microbiológico del alimento

Microorganismo (log UFC/g)	T R A T A M I E N T O					Limite
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	NOM
BMA	2.45E+04	2.91E+04	2.10E+04	3.15E+05	7.15E+04	5'000,000
<i>L. monocytogenes</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente
<i>C T</i>	<100	<100	<100	<100	<100	100
<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>S. aureus</i>	650	513	721	420	879	1000
<i>E. coli</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente

4.7 Viabilidad del microorganismo en el alimento funcional

Se realizó el monitoreo de la supervivencia de *S. boulardii* durante las 5 semanas que se almacenó el producto a una temperatura de refrigeración de 4°C (Tabla 8). En general, la viabilidad de la levadura probiótica disminuyó conforme aumentó el tiempo de almacenamiento en refrigeración a 4°C, presentándose una diferencia estadística significativa ($P < 0,05$) en la viabilidad del microorganismos entre los diferentes tratamientos. Al inicio del estudio los tratamientos T₂ y T₄ fueron los que registraron mayores recuentos de células viables, alcanzando concentraciones superiores a 10⁹ UFC/g; el tratamiento T₂ presento diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos (T₁, T₃ y T₅), mientras que el tratamiento T₄ solo presento diferencia significativa con los tratamientos T₁ y T₅ los cuales a su vez presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí.

En general, la viabilidad del microorganismo probiótico disminuyó en todos los tratamientos conforme al tiempo de almacenamiento en refrigeración a 4°C. Al cabo de la 5ª semana, la viabilidad del microorganismo probiótico con respecto a su viabilidad inicial en los tratamientos T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅ fue del 1.20, 2.14, 1.15, 0.13 y 0.2%, respectivamente.

Tabla 8. Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* en los diferentes quesos elaborados

Tratamiento	Log UFC/g a los diferentes tiempos				
	1	2	3	4	5
T ₁	8.57±0.09 ^C	7.65±0.40 ^C	7.59±0.18 ^{AB}	7.62±0.16 ^A	6.65±0.03 ^{BC}
T ₂	9.17±0.08 ^A	8.66±0.31 ^A	8.12±0.49 ^A	8.08±0.44 ^A	7.50±0.02 ^A
T ₃	8.99±0.06 ^B	8.50±0.26 ^{AB}	8.26±0.42 ^A	8.02±0.29 ^A	7.05±0.20 ^{AB}
T ₄	9.04±0.06 ^{AB}	8.05±0.09 ^{BC}	7.30±0.13 ^B	6.87±0.08 ^B	6.15±0.50 ^C
T ₅	5.72±0.05 ^D	5.14±0.04 ^D	4.84±0.21 ^C	3.13±0.09 ^C	3.04±0.03 ^D

Medias en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Podemos apreciar que T₂ fue el tratamiento en el que se conservó la mayor viabilidad del microorganismo; en otras palabras, T₂ fue el tratamiento con menor pérdida de viabilidad de *S. boulardii*. De la misma manera, T₄ fue el tratamiento donde se registró la mayor pérdida de viabilidad del microorganismo y corresponde al tratamiento donde el microorganismo fue adicionado en estado libre, ya que en este tratamiento sólo se conservó el 0.13% de la viabilidad inicial del microorganismo. Esto nos indica el efecto protector que ejerce la microcápsula sobre la viabilidad de los microorganismos adicionados en los quesos elaborados.

La tendencia en el recuento de células viables en el transcurso del almacenamiento fue decreciente en todos los tratamientos, destacando la importancia de lograr un alto recuento de microorganismos probióticos al inicio de la elaboración del alimento funcional, a fin de lograr mantener las concentraciones de microorganismos recomendadas para que puedan ejercer el efecto probiótico, una vez que el alimento ha sido ingerido.

Más allá de las ventajas que presentan los productos lácteos como vehículo de probióticos, en general su supervivencia en este tipo de alimentos ha mostrado ser muy variable. En efecto, a pesar de numerosos resultados favorables, se han observado también algunas limitaciones en el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias

probióticas, dado que las condiciones ambientales del alimento no son las ideales para el crecimiento y actividad microbiana, la mayor o menor supervivencia se debe, fundamentalmente, a la sensibilidad del microorganismo al estrés causado por las características propias del alimento, así como de las condiciones ambientales de almacenamiento y conservación del mismo (Boyston *et al.*, 2004). Masuda *et al.* (2005), incorporaron *Lb. acidophilus* La-5 a un queso fresco, y su viabilidad se mantuvo sobre 10^7 UFC/g durante tres semanas. Al parecer, este organismo se adaptó muy bien a las condiciones adversas del medio, y pudo incluso desarrollarse a pH menores de 5.0.

4.8 Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* bajo condiciones *in vitro*.

4.8.1 Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* libre y encapsulada bajo condiciones *in vitro*.

En la Tabla 9 se muestran los resultados del efecto de las condiciones ácidas (pH=2.0) sobre la viabilidad del organismo probiótico tanto en estado libre como encapsulado. Después de tres horas de permanencia a pH de 2, el microorganismo probiótico presentó una mayor pérdida de viabilidad cuando se encuentra en estado libre, que cuando se encuentra encapsulado, apreciándose de esta forma el efecto protector de la microcápsula sobre el microorganismo.

Tabla 9. Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* libre y encapsulada a pH de 2

C E P A	T I E M P O DE EXPOSICIÓN (min)			
	0	60	120	180
Libre (log UFC/mL)	10.03±0.09 ^A	8.50±0.40 ^A	7.51±0.18 ^A	6.79±0.16 ^B
Encapsulada (log UFC/mL)	9.34±0.06 ^B	8.20±0.26 ^A	7.72±0.42 ^A	7.18±0.29 ^A

Medias en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En estado libre, la pérdida de viabilidad con respecto al tiempo de exposición del microorganismo a pH de 2 fue de 97.05, 99.7 y 99.94% a tiempos de exposición de 60, 120 y 180 minutos, respectivamente. Por su parte, cuando el microorganismo se encuentra encapsulado, la pérdida de viabilidad a los mismos tiempos de exposición fue

de 92.76, 97.60 y 99.31%. El nivel de supervivencia de *Saccharomyces boulardii* encapsulado fue mayor que en estado libre

Es necesario que el microorganismo probiótico adicionado al alimento sea capaz de resistir las condiciones de baja acidez presentes en el estómago, para que el microorganismo pueda llegar al colon en las concentraciones adecuadas para establecerse y de esta forma, proporcionar los efectos probióticos al huésped.

La microencapsulación de probióticos con alginato de sodio ya ha sido utilizada para mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos en condiciones gástricas simuladas. Ding y Shah (2007), estudiaron la viabilidad de 8 cepas de bacterias probióticas encapsuladas con alginato de sodio, las cuales fueron expuestas a condiciones de acidez *in vitro*, resultando una mejor viabilidad de los microorganismos encapsulados en comparación con las bacterias probióticas libres. Los resultados de este estudio coinciden con otros estudios similares (Audet *et al*, 1988; Jankowski *et al*, 1997; Krasaekoopt *et al.*, 2003; Doleyres y Lacroix 2004), donde se ha encontrado que la microencapsulación con alginato en combinación con otros polímeros aumenta considerablemente la supervivencia de los microorganismos probióticos en condiciones de acidez.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad del organismo probiótico tanto en estado libre como encapsulado, bajo las condiciones de pH que prevalecen en el colon (pH 6.5).

Tabla 10. Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* libre y encapsulada a pH de 6.5

C E P A	T I E M P O DE EXPOSICIÓN (min)			
	0	60	120	180
Libre (log UFC/mL)	10.06±0.08 ^A	9.90±0.31 ^A	9.62±0.49 ^A	9.32±0.44 ^A
Encapsulada (log UFC/mL)	9.17±0.06 ^B	8.83±0.09 ^B	8.53±0.13 ^B	8.08±0.08 ^B

Medias en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Bajo las condiciones evaluadas, la pérdida de viabilidad con respecto al tiempo de exposición del microorganismo en estado libre a pH de 6.5 fue de 30.81, 63.69 y 81.80% a tiempos de exposición de 60, 120 y 180 min, respectivamente. Por su parte, cuando el microorganismo se encuentra encapsulado, la pérdida de viabilidad a iguales valores de pH y tiempos de exposición fue de 54.29, 77.09 y 91.87%. Podemos ver que durante todo el tiempo de exposición, la mayor pérdida de viabilidad se presentó en el microorganismo encapsulado, probablemente debido a que no se logró la liberación total de los microorganismos encapsulados bajo las condiciones de trabajo aplicadas. Al comparar los resultados de la tabla 9 con los presentados en la tabla 10, podemos deducir que *Saccharomyces boulardii* resiste mejor bajo condiciones de pH cercanas a la neutralidad (pH 6.5), que bajo condiciones de alta acidez (pH 2.0), las cuales corresponden a las condiciones de acidez y pH que imperan en el estómago y en el colon, respectivamente.

4.8.2 Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* libre y encapsulada en el alimento bajo condiciones “*in vitro*”

Se ha documentado que los microorganismos probióticos no sobreviven en grandes cantidades a la acidez de los productos lácteos (Kailasapathy y Taibka 1997), es por ello que se requiere de mayor investigación como la del presente estudio, a fin de encontrar la forma de incrementar la supervivencia y actividad del probiótico en el lugar de acción. Los probióticos deben soportar barreras naturales, por ello la estructura y función protectora de los alimentos como el utilizado en este trabajo, es de suma importancia para aumentar la capacidad de sobrevivir a la acidez severa y mejorar la estabilización. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos bajo condiciones de acidez estomacal (pH 2.0), de la viabilidad de *Saccharomyces boulardii* presente en el queso en estado libre y encapsulada.

Cuando el microorganismo probiótico se adicionó al queso en estado libre, su pérdida de viabilidad con respecto al tiempo de exposición a pH de 2 fue del 99.40, 99.70 y 99.92% a tiempos de exposición de 60, 120 y 180 minutos, respectivamente; es decir, el microorganismo sólo mantuvo una supervivencia del 0.081% con respecto a la

viabilidad inicial. Por su parte, cuando el microorganismo se adicionó al queso en forma encapsulada, su pérdida de viabilidad a los mismos tiempos de exposición fue de 71.16, 95.43 y 98.30%; es decir, el microorganismo encapsulado mantuvo una supervivencia del 1.70% con respecto a su viabilidad inicial. Al igual que en la evaluación de la viabilidad de *Saccharomyces boulardii* fuera del alimento, el nivel de supervivencia de *Saccharomyces boulardii* adicionado al queso en forma encapsulada, fue significativamente mayor que el adicionado en estado libre.

Tabla 11. Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* presente en el queso en estado libre y encapsulada bajo condiciones ácidas (pH 2.0)

C E P A	T I E M P O DE EXPOSICIÓN (min)			
	0	60	120	180
Libre (log UFC/mL)	9.36±0.03 ^A	7.14±0.13 ^B	6.83±0.49 ^B	6.27±0.74 ^B
Encapsulada (log UFC/mL)	9.41±0.06 ^A	8.87±0.09 ^A	8.07±0.13 ^A	7.64±0.08 ^A

Medias en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Chandramouli *et al.* (2004), reportaron un aumento significativo en cuanto a la viabilidad de *L. acidophilus* a pH 2.0 cuando este fue encapsulado con alginato. Lee, Cha *et al.* (2004), observaron mayor supervivencia de bifidobacterias inmovilizados en pH ácido simuladas en fluido gástrico. Mandal *et al.* (2005), reportó la tolerancia de *Lactobacillus casei* especial-298 encapsulado en concentraciones diferentes de alginato (2%, 3% o 4%), a pH de 1,5, así como la liberación de células encapsuladas en solución acuosa simulando el pH del colon. La supervivencia aumentó proporcionalmente con el aumento de las concentraciones de alginato sin afectar a la liberación de células atrapadas en la solución simulada del pH del colon. Sin embargo, nuestros resultados difieren en comparación con otros investigadores (Hansen *et al.*, 2002; Trindade *et al.*, 2000) quienes reportaron que la microencapsulación con alginato en alimentos no protege efectivamente los microorganismos a pH bajo.

Por otra parte, cuando el microorganismo probiótico se adiciona al queso en estado libre, su pérdida de viabilidad con respecto al tiempo de exposición (Tabla 12) a pH 6.5 fue de: 18.72, 43.77 y 27.54% a tiempos de exposición de 60, 120 y 180 minutos, respectivamente; es decir, después de 3 horas de exposición a pH de 6.5 el microorganismo mantuvo una supervivencia del 57.54% con respecto a la viabilidad inicial. La pérdida de viabilidad cuando el microorganismo se adicionó al queso en forma encapsulada, a los mismos tiempos de exposición fue de 38.34, 53.22 y 59.26%; es decir, después de tres horas de exposición a pH de 6.5 el microorganismo adicionado al queso en forma encapsulada mantuvo una supervivencia del 40.74% con respecto a su viabilidad inicial. Nuevamente observamos que el microorganismo es más resistente a condiciones de pH cercano a la neutralidad (pH 6.5), que bajo condiciones de alta acidez, como la acidez que prevalece en el estómago (pH 2.0). Para este caso en particular está claro que la variación del pH del queso no afectó negativamente la viabilidad del probiótico, permaneciendo esta última por encima del nivel recomendado para obtener un producto funcional a lo largo de la vida de anaquel del alimento.

Tabla 12. Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* presente en el queso en estado libre y encapsulada bajo condiciones de pH cercanas a la neutralidad (pH 6.5)

C E P A	T I E M P O DE EXPOSICIÓN (min)			
	0	60	120	180
Libre (log UFC/mL)	9.43±0.23 ^A	9.34±0.57 ^A	9.18±0.39 ^A	8.87±0.28 ^B
Encapsulada (log UFC/mL)	9.57±0.02 ^A	9.36±0.42 ^A	9.24±0.19 ^A	9.18±0.13 ^A

Medias en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La mayor viabilidad que conservan los microorganismos cuando se encuentran en el alimento, adicionados en estado libre y encapsulados; es atribuible al efecto protector que ejerce la matriz del alimento sobre dichos microorganismos. Es por ello que el queso podría ser un mejor vehículo para estos microorganismos que los alimentos tradicionalmente empleados, por tener una mayor capacidad amortiguadora, mayor exclusión del oxígeno y mayor contenido graso, lo que favorecería la resistencia y

supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y el tránsito intestinal. Teniendo en cuenta estas características, el queso ha sido propuesto como un alimento más eficaz que los tradicionales productos lácteos fermentados fluidos para proteger la viabilidad probiótica, no sólo durante la elaboración y almacenamiento del producto durante largos períodos, sino también durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal (Ross *et al.*, 2002).

4.9 Evaluación sensorial

La figura 14 muestra los resultados obtenidos de la evaluación sensorial del queso adicionado de microorganismo probiótico y el queso control. Los parámetros de esta evaluación comprenden olor, color, textura, sabor y aceptabilidad total en escala hedónica de 5 puntos. Se analizaron los resultados obtenidos por medio de análisis de varianza de una vía con comparación por Tukey por un rango de error del 5%.

No se presentaron diferencias estadísticas significativas en el grado de aceptación de los jueces en cuanto al color y el olor del queso adicionado con los microorganismos probióticos con respecto al queso control (queso sin adición de probióticos); es decir, la adición del probiótico encapsulado no modificó el color ni el olor del queso, propiedad que resulta deseable para que no afecten la percepción del consumidor. Cerón *et al.* (2008), agregaron al queso fresco el probiótico *Lactobacillus casei* encapsulado en tres diferentes agentes gelificantes como alginato de sodio, carragenina y gelatina y de igual forma que en el presente estudio no observaron diferencia estadísticas significativa con respecto al color y olor.

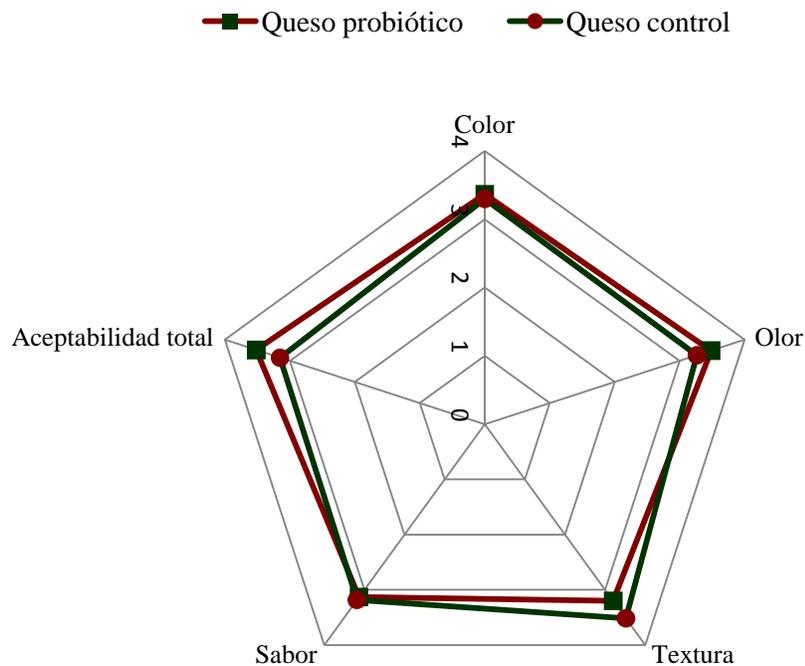


Figura 14. Evaluación sensorial de los diferentes quesos

En el atributo de calidad sensorial donde sí se apreció una diferencia estadística significativa fue en la textura del queso probiótico en relación con el queso control; debido a ello, algunos jueces expresaron su inconformidad con este parámetro en el alimento funcional, dado a que su textura se percibía un poco más blanda que la mostrada por el queso control.

Otra característica de calidad sensorial de gran importancia, donde no se presentaron diferencias estadísticas significativas de los resultados obtenidos, entre el queso adicionado con el simbiote y el queso control, fue en el sabor; con lo cual se corrobora que la adición de microorganismos probióticos al queso no impacta de manera negativa en los atributos de calidad sensorial evaluados, sino por el contrario, en muchos casos como el aquí presente, la adición del simbiote encapsulado puede mejorar dichos atributos de calidad sensorial, ya que de acuerdo a la evaluación de los 60 jueces no entrenados, 39 de ellos manifestaron su preferencia general por el queso que contiene



los microorganismos probióticos encapsulados, mientras que los 21 jueces restantes optaron por el queso control.



5 CONCLUSIONES

El proceso de microencapsulación incrementó la viabilidad del microorganismo probiótico utilizado, ya sea en forma aislada, o incorporado en un alimento como el queso fresco.

El pH del medio es un factor extrínseco que afecta la viabilidad del microorganismo, la cual fue mayormente impactada a valores de pH de 2.0 que a valores de pH de 6.5

El pH de los quesos se incrementó ligeramente durante su almacenamiento a 4°C, a consecuencia del fenómeno de sinéresis durante el cual se drena el ácido láctico inicialmente presente en el queso, así como al bajo o nulo metabolismo de los microorganismos a la temperatura de almacenamiento.

Bajo los niveles de utilización, la incorporación del microorganismo probiótico encapsulado con mucílago de nopal e inulina, no alteró la composición química, ni modificó negativamente las características sensoriales del queso, excepto su textura.

La incorporación del simbiote *Saccharomyces boulardii*- inulina y mucílago de nopal en la formulación del queso fresco, mejoró las propiedades organolépticas del queso fresco, lo cual se reflejó en la mayor aceptación de éste con respecto al queso fresco sin adición de simbiote.

Dada su composición química y su pH, el queso fresco resultó ser un buen vehículo del simbiote, debido a que ofrece una buena barrera protectora para los microorganismos probióticos incorporados en su formulación, ya sea en estado libre o encapsulado.

Se logró obtener un alimento simbiótico con efectos probióticos y prebióticos a base de *Saccharomyces boulardii* e inulina, con la concentración del microorganismo probiótico recomendada para que pueda ejercer sus efectos benéficos sobre la salud del huésped.

La calidad sanitaria del alimento simbiótico obtenido está dentro de los límites establecidos por la Normas Oficia Mexicana correspondiente



6 BIBLIOGRAFÍA

1. Abosereh N., A.2007. Genetic Construction of Potentially Probiotic *Saccharomyces boulardii* Yeast Strains Using Intraspecific Protoplast Fusion, Microbial Genetics Dept, National Research Centre, Cairo, Egypt, 3(3):209-210.
2. Acevedo G. Claudia R., O. Jaime, Espejo T., R. 2003. Comparative Activity of Different Comercial Products Containing *Saccharomyces boulardii*, Rev Chil Nutr Vol. 31, N° 1, pags. 33-38.
3. Anal A., K. y Singh H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science and Technology. 18: 240-251.
4. Ariza O., T., J. Totosaus S., A. Pérez CH., M., L. 2010. Relación entre la textura de geles de alginato de sodio con gelana o kappa-carragenina/algarrobo y viabilidad en la encapsulación de bacterias lácticas. TESE. Ecatepec México.
5. Arizmendi, C., D. 2004. Optimización de dos compuestos plastificantes (glicerol y polietilenglicol) en la elaboración de una película plástica comestible obtenida a partir del mucílago de nopal de la especie *opuntia tomentosa* salm-dyck. Universidad autónoma del estado de México. México, D.F.
6. Audet P. Paquin C. Lacroix C. 1988. Immobilized growing lactic acid bacteria with kcarrageenan-locust bean gum gel. Appl Microbiol Biotechnol 29:11–8.
7. Badui D., S. 1988. Diccionario de tecnología de los alimentos. Ed. Alhambra, México, DF pp. 42 y 100
8. Barbosa C., G., V. Ortega R., E. Juliano P. Yan H. 2005. Encapsulation Processes. Capítulo 8 en: Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality. Springer US editor, New York, pp. 199-219.
9. Boylston T., D. Vinderola C., G. Ghoddusi H., B. Reinheimer J., A. 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. International Dairy Journal, 14, 375-387.
10. Buts J.,P. 2005. Ejemplo de un medicamento probiótico *Saccharomyces boulardii*. Revista Gastrointestinal, 25:176-188.
11. Buts J., P. Dekeyser N. Stilmant C. Delem E. Smets F. Sokal E. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein

- phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatr Res*;60(1):24-9.
12. Cárdenas A. Goycoolea M., F. Rinaudo M. 2007. On the gelling behaviour of nopal (*Opuntia ficus-indica*) low methoxyl pectin. *Carbohydrate polymers* 73, 212-222. Mexico.
 13. Chandramouli V. Kailasapathy K. Peiris P. Jones M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiol Methods*, 56, 27–35.
 14. De Giulio B. Orlando P. Coppola R. De Rosa M. Sada A. De Prisco P., P. Nazzaro F. 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 739-746.
 15. Dembczynski R. Jankowski T. 2000. Growth of lactic acid bacteria in alginate/starch capsules. *Food biotechnology*. 291-294.
 16. Ding W., K. Shah P. 2007. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated bacteria. *Journal of Food Science*. 72(9): 446-450.
 17. Ding W., K. Shah N., P. 2008. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*. 15(2): 219-232.
 18. Ding W., K. Shah N., P. 2009. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*. 74(2): 100-107.
 19. Doleyres Y. Lacroix C. 2004. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*. 15: 973-988.
 20. FAO/OMS. 2001. Probióticos en los alimentos.
 21. Fenelon M., A. O'Connor P. Guinee T., P. 2000. The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*. 83, 2173-2183.
 22. Fuller Z. Louis P. Mihajlovski A. 2007. Influence of cabbage processing methods and prebiotic manipulation of colonic microflora on glucosinolate breakdown in man. *Br J Nutr*,98:364–372.

23. Gardiner G., E. Ross R., P. Collins J., K. Fitzgerald G., Stanton C. 1998. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and environmental microbiology*. 64 (6), 2192-2199.
24. Gardiner G., E. O'Sullivan E. Kelly J. Auty M., A., E. Fitzgerald G., F. Collins J., K. Ross R., P. 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.
25. Gibson G., R. Roberfroid M., B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*;125:1401–12.
26. Goderska K. Zybals M. Czarnecki Z. 2003. Characterization of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* LR7 strain. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*. 12/53, 21–24.
27. Gómez D., G., J. 2011. Los probióticos. Una alternativa en el tratamiento de enfermedades. Consultado en línea el 25 de mayo de 2011 en: <http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>.
28. Hansen L., T. Allan W., P., M. Jin Y., L. Paulson A., T. 2002. Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*. 19,35–45.
29. Heller K., J. Bockelmann W., Schrezenmeir J., de Vrese M. 2003. Handbook of fermented functional foods; Cap. 8: Cheese and its potential as a probiotic food (Ed.: Farnworth, E. R.). CRC Press, Estados Unidos, pp. 203-225.
30. Hickey M. 2005. Current legislation on probiotic products. In: *Probiotic dairy products*. Tamime AY, editor. Oxford: Blackwell Publishing. p. 73-97.
31. Hodge J., E. Osman E., M. 1985. Hidratos de carbono. Capítulo 3 en: *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Fennema O. R. editor. Reverté, España, pp. 47-160.
32. Homayouni A. Reza E., M. Azizi A. Saeid Y., M. Hadi R., S. 2007. Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. *Iranian Polymer Journal*. 16(9): 597-606.

33. Jankowski T, Zielinska M, Wysłowska A. 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnol Tech* 11:31–4.
34. Kailasapathy K, Rybka S. 1997. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*—Their therapeutic potential and survival in yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*. 52, 28–35.
35. Kailasapathy K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 3: 39-48.
36. Kasimoğlu A, Göncüoğlu M, Akgün S. 2004. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*. 14 (12), 1067-1073.
37. Kim S., J. Cho S., Y. Kim S., H. Song O., J. Shin I., S. Cha D., S. Park H., J. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT*. 41: 493-500.
38. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13:3-13
39. Lahtinen S., J. Ouwehand A., C. Salminen S., J. Forsell P, Myllärinen P. 2007. Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Letters in Applied Microbiol.* 44: 500-505.
40. López, G., M, Mancilla M., N. Mendoza D., G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber azul. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7835-7840.
41. Madrigal L., Sangronics E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en los alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 57 (4): 387-396
42. Mandal S, Puniya A., K. Singh K. 2005. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*. 16: 1190-1195.
43. Manning T., S. Gibson G., R. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18: 287–298.
44. Manzanares W, Alonso M, Biestro A. (2006). Probióticos, Prebióticos y Simbióticos en pacientes críticos. *Rev Bras Nutr Clin*. 21(2):155-62.

45. Masuda T. Yamanari R. Itoh T. 2005. The Trial for Production of Fresh Cheese incorporated probiotic *Lactobacillus acidophilus* Group Lactic Acid Bacteria. *Milchwissenschaft*. 60 (2): 167-171.
46. Mcfarland L., V. Bernasconi P. 1996. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbiol Ecology Health Dis.*, 6:57-171.
47. Mcfarland L., V. Bernasconi P. 2008. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbiol Ecology Health Dis.*, 6;57-171.
48. McMaster L., D. Kokott S., A. Slatter P. 2005. Micro-encapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 723-728.
49. Michaelidou A. Katsiari M., C. Voutsinas L., P. Kondyli E. Alichanidis E. 2003. Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese. *International Dairy Journal*, 13, 743-753.
50. Muthukumarasamy P. Allan W., P. Holley R., A. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*. 71(1): 20-24.
51. Nassif N. Roux C. Coradin T. Rager M., N. Bouvet O., M., M. Livage J. 2003. A sol-gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. *Journal of Materials Chemistry*. 13: 203-208.
52. Nobel S., P. Gibson C., A. 1990. *The cactus primer*. First Harvard University Press paperback edition. pp. 196- 199.
53. Norma Oficial Mexicana
54. Nussinovitch A. 1997. Capítulo 2. Alginates en: *Hydrocolloid Applications: Gum technology in the food and other industries*. Editorial Chapman & Hall. Gran Bretaña. Pp. 19-30.
55. Ong L. Henriksson A. Shah N., P. 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*, 16, 446-456.
56. Ong L. Henriksson A. Shah N., P. 2007. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of

- Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. International Dairy Journal, 17 (1), 67-78.
57. O’Riordan K. Andrews D. Buckle K. Conway P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. Journal of Applied Microbiology. 91: 1059-1066.
58. Pastorino A., J. Hansen C., L. McMahon D., J. 2003. Effect of pH on the chemical composition and structure-function relationships of cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 86 (9), 2751-2760.
59. Parvez S. Malik K., A. Ah K., S. Kim H., Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health J Appl Microbiol 100:1171–1185.
60. Pérez M., F. López V., D., M. 2009. Alimentos Simbióticos. ReCiTeIA. 9(2): 1-38
61. Pedroza-Islas R. 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. En: Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Ed. by Cruz L., Ricque D., Tapia M., Gaxiola M. y Simoes, N. Quintana Roo, México.
62. Pimentel G., D., J. 2009. Encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* en emulsiones dobles formuladas con suero dulce como emulsificante y su sobrevivencia bajo condiciones simuladas. Tesis doctoral, UAM-I, México.
63. Pontis, H., Campillo, E. (1985). Fructans. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. Dey P. and R. Dixon Editors. Academic Press. U. S. A.
64. Porter, H. K. (1962). Synthesis of polysaccharides of higher plants. Ann. Rev. Plant. Physiol., 13: 303-328.
65. Ramírez Ch., N., L. 2009. Identificación de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos para ser utilizadas como probióticos. Tesis Doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.
66. Ramón V., D. 2006. Probióticos: aspectos microbiológicos y tecnológicos. Alimentación, Nutrición y Salud, 13(2):48-52.
67. Roberfroid M. 1993. Dietary fibre, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. CRC Crit. Rev. Food Sci. Technol. 33: 103-148.

68. Roberfroid M., B. 2007. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition* 137:830-837 S.
69. Rodríguez G., S. Martínez F., H., E. 2010. Efecto de la incorporación de Mucílago de nopal sobre las propiedades sensoriales y texturales de una pasta a base de huitlacoche *Ustilago maydis*. UMSNH. Morelia.
70. Rosas F., W. 2008. Microencapsulación de *Lactobacillus sp.* por gelación iónica utilizando mezclas binarias de gelana y alginatos. Tesis de maestría, Biotecnología, Cinvestav Zacatenco, México.
71. Rosenberg M. Kopelman I., J. Talmon Y., Y. 1985. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. *Journal of Food Science*. 50: 139-144.
72. Ross R., P. Fitzgerald G. Collins K. Stanton C. 2002. Cheese delivering biocultures probiotic cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (2), 71-78.
73. Sáenz C. Berger H. Corrales G., J. Galletti L. García C., V. Higuera I. Mondragón C. Rodríguez A., F. Sepúlveda E. Vanero M., T. 2007. Utilización agroindustrial del nopal. Reimpresión. Boletín de servicios de la FAO. Roma, Italia. P 1-2,7-8.
74. Sepúlveda E. Saenz C. Aliaga, E. Aceituno, C. 2006. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. Dto. de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agrómicas, Universidad de Chile. Santiago Chile.
75. Sepúlveda E. Sáenz C. Aliaga E. Aceituno C. 2007. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments* Volume 68:4. Dto. de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agrómicas, Universidad de Chile. Santiago Chile. 534 pp.
76. Shah N. 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Sciences*. 83:894-907.
77. Shima M. Morita Y. Yamashita M. Adachi S. 2006. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*. 20: 1164-1169.
78. Shima M. Matsuo T. Adachi S. 2007. Effects of inner-phase components of Water-in-Oil-in-Water emulsion on low-pH tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 103(3): 278-281.

79. Smeekens, S. 1998. A convert to fructans in sugar beet. *Nature Biotechnology*, 16:822-823.
80. Song S., H. Cho Y., H. Park J. 2003. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using Microporous Glass Membrane Emulsification System. *Food Engineering and Physical Properties*. 68(1): 195-200.
81. Spiegel J., E. Rose R. Karabell P. Frankos V., A. Schmitt D., F. 1994. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technology*. 85-89.
82. Stanton C. Gardiner G. Meehan H. Collins K. Fitzgerald G. Lynch P., B. Ross R., P. 2001. Market potential for probiotics. *American Journal of clinical and Nutrition*. 73: 476-483.
83. Steidler L. Hans W. Schotte L. Neiryck S. Obermeier F. Falk. 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-5.
84. Szczesniak A., S. 1962. Classification of Textural Characteristics. *Journal of Food Science*. 28: 385-389.
85. Tako M. Nakamura S. 1986. Synergistic interaction between Kappa-Carrageenan and Locust-bean Gum in aqueous media. *Agric. Biol. Chem.* 50(11): 2817-2822.
86. Texture technologies. 2003. Texture Profile Analysis. Disponible en: http://www.texturetechnologies.com/texture_profile_analysis.html. 10/01/10
87. Trindade C., S., F. Grosso C., R., F. 2000. The effect of the immobilization of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Milchwissenschaft*, 55, 496–499.
88. Wismar R. Brix S. Frokiaer H. Laerke H., N. 2010. Dietary fibers as immunoregulatory compounds in health and disease. *Ann N.Y. Acad. Sci*, 1190:70–85. This is the most updated review on dietary fibers and gut immunoregulation.
89. Yañez J. Salazar J. Chaires L. Jiménez J. Márquez M. Ramos E. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*. 21: 313-318.



7 ANEXOS

Anexo 1

Formato de encuesta para evaluación sensorial

Prueba las muestras de queso que se te presentan a continuación, e indica tu nivel de agrado para cada una de las características marcando con una **X** el punto de la escala que mejor describa al producto.

PARÁMETRO	Color	Olor	Textura	Sabor	Aceptabilidad total
Me gusta Mucho					
Me gusta moderadamente					
No me gusta					
Me disgusta moderadamente					
Me disgusta mucho					

¿Que muestra es de tu mayor agrado?

1 _____ 2 _____

Comentar ¿por qué?
