

Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos

Sneyder Rodríguez-Barona^{(1)*}, Gloria I. Giraldo⁽²⁾ y Luz M. Montes⁽³⁾

(1) Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Departamento de Ingeniería Química, Campus la Nubia Km 4 Vía al Aeropuerto, AA 127 Manizales, Colombia (e-mail: snrodriguezba@unal.edu.co)

(2) Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Física y Química, Manizales, Colombia (e-mail: gigiraldogo@unal.edu.co)

(3) Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Manizales, Colombia (e-mail: lmmontesr@unal.edu.co)

*Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

Recibido May. 12, 2016; Aceptado Jun. 17, 2016; Versión final Ago. 9, 2016, Publicado Dic. 2016

Resumen

Se evaluó durante liofilización y almacenamiento, el efecto de los prebióticos inulina y fructo-oligosacárido-FOS (25% p/v) sobre las propiedades fisicoquímicas de los polvos y la viabilidad de las cepas *L. casei* ATCC-393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC-9469. La humedad, la actividad de agua y los recuentos de células viables no menores a 10^6 UFCg⁻¹ fueron los criterios de estabilidad. Se evaluaron las propiedades de rehidratación (higroscopicidad, humectabilidad, solubilidad) y estructurales (tamaño de poro, área superficial). En el almacenamiento ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) se determinaron diferencias significativas en la supervivencia; para *L. casei* fue de 70.49% a los 63 días y para *L. rhamnosus* fue 73.58% a los 98 días. Para ambos microorganismos la humedad y la actividad de agua se incrementaron por encima del 50%; el tamaño de poro se incrementó por la adición de los prebióticos y el área superficial (BET) reportó valores bajos. Se demostró que la inulina genera una mayor estabilidad al *L. rhamnosus* permitiendo su aplicación en alimentos funcionales con potencial simbiótico.

Palabras clave: inulina, FOS, probiótico-prebiótico, encapsulación, liofilización

Encapsulation of Probiotic by Freeze Drying in the Presence of Prebiotic

Abstract

During lyophilization and storage the effects of the prebiotics inulin and fructo-oligosaccharide-FOS (25% w/v) on the physicochemical properties of powders and the viability of the strains *L. casei* ATCC-393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC-9469 were evaluated. Humidity, water activity and the viable cell counts not less than 10^6 CFUg⁻¹ were the stability criteria. Properties of rehydration (hygroscopicity, wettability, solubility) and structural properties (pore size, surface area) were evaluated. Significant differences in survival during storage ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) were determined. For *L. casei* was 70.49% after 63 days and for *L. rhamnosus* was 73.58% after 98 days. For both microorganisms, the moisture and the water activity, increased above 50%; the pore size was increased by addition of prebiotics and the surface area (BET) reported low values. It is shown that inulin generates greater stability for *L. rhamnosus*, allowing its application in functional foods with symbiotic potential.

Keywords: inulin, FOS, probiotic-prebiotic, encapsulation, freeze drying

INTRODUCCIÓN

Desde los descubrimientos de Metchnikoff, se ha atribuido a los microorganismos probióticos, propiedades benéficas sobre humanos y animales, lo que ha inducido a su aplicación en diversos alimentos vehiculos, que le permiten al consumidor alcanzar estos beneficios. Adicionalmente, la combinación apropiada de prebióticos y probióticos produce mayor beneficio al consumidor y puede producir un efecto sinérgico (Tripathi y Giri 2014). Las técnicas de encapsulación son una alternativa cuando se intenta proteger a estos microorganismos del efecto de agentes medioambientales que pueden afectar su viabilidad, durante el procesamiento, almacenamiento, consumo y a su paso por el tracto gastrointestinal al permitirles mantener su viabilidad y funcionalidad en el tiempo (Semyonov et al., 2010; González et al., 2015) reduciendo el daño celular al retener las células dentro de materiales encapsulantes que generan su aislamiento (Ranadheera et al., 2010; Ray et al., 2016).

Existe una amplia variedad de técnicas de encapsulación de microorganismos. Muchas consideran mezclas líquidas que deberán ser secadas en el tratamiento de encapsulación, en este caso la probable aplicación de altas temperaturas están asociadas a una reducción significativa de la viabilidad de los microorganismos debida a la rápida deshidratación y al estrés térmico (Ray et al., 2016). La liofilización es una técnica adecuada para la encapsulación de microorganismos termosensibles, que mediante la congelación del producto y tras la aplicación de vacío, el agua es eliminada por sublimación, obteniendo de esta manera una pasta seca que favorece la preservación en el tiempo del producto (Semyonov et al., 2010; Fritzen-Freire, et al., 2012). La tecnología de liofilización permite la encapsulación de materiales biológicos al reducir la velocidad de las reacciones químicas y la degradación por calor (Strasser et al., 2009; Semyonov et al., 2010). Se han reportado muchos factores como responsables de la supervivencia microbiana durante y después del liofilizado, entre ellos, la especie bacteriana, el estado fisiológico, la densidad celular, efecto de protectores (Shamekhi et al., 2012), tasas de congelación y otros parámetros de proceso, así como la rehidratación (Kearney et al., 2009; Shamekhi et al., 2012). El efecto de estos parámetros puede causar daño celular, reducción de la viabilidad y actividad microbiana en varios grados, induciendo a cambios en el estado físico de la membrana lipídica y la estructura de las proteínas (Strasser et al., 2009)

Resultados de investigaciones muestran que además de la técnica de encapsulación, el efecto de protección depende en gran medida de las propiedades funcionales del material pared. Ingredientes no digeribles de los alimentos como los prebióticos a los que se les atribuyen cualidades protectoras sobre la flora gastrointestinal benéfica de humanos y animales podrían aplicarse como material de recubrimiento (Vasiljevic 2008; Quigley 2010). Estos por ser alimentos no digeribles, resistentes a las enzimas digestivas benefician al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y /o actividad de las bacterias en el colon (Fritzen-Freire, et al., 2013). Debido a la potencial sinérgico entre probióticos y prebióticos, la combinación establece una relación simbiótica, que beneficia al huésped debido a una mayor supervivencia e implantación de microorganismos vivos en el sistema gastrointestinal (Casiraghi et al., 2007).

Algunos autores, reportan el uso de prebióticos tales como almidón resistente, inulina y fructo-oligosacáridos (FOS) en las mezclas de materiales pared con beneficios evidentes en la viabilidad del encapsulado (Rajam y Anandharamakrishnan, 2015; Rodriguez et al., 2012; Fritzen et al, 2012). Adicionalmente, para incrementar la viabilidad de los probióticos durante la encapsulación por liofilización, el almacenamiento y subsecuentemente el paso a través del tracto gastrointestinal, se adicionan agentes crioprotectores (sacáridos y polioles) y otros solutos compatibles como el adonitol, la betaina, el glicerol y la leche en polvo (Shamekhi et al., 2012). La presente investigación contribuye al estudio y aplicación de la tecnología de liofilización en la encapsulación de las cepas probióticas con agentes prebióticos como material pared para su aplicación posterior en matrices alimenticias con características funcionales. Se plantea como objetivo evaluar durante la liofilización y el almacenamiento, el efecto de la adición de prebióticos (inulina y FOS) sobre las propiedades físicas de los polvos y la viabilidad de las cepas *L. casei* y *L. rhamnosus* encapsuladas.

METODOLOGÍA

Se describe el material y equipo experimental usado, se detalla cómo se realiza la obtención de biomasa microbiana y la encapsulación. Posteriormente, se explica el estudio de la supervivencia y la estabilidad durante el almacenamiento de los microorganismos y la caracterización del material probiótico encapsulado luego de la liofilización. Adicionalmente se explica el recuento de células viables, se describen las propiedades estructurales, el diseño experimental y el análisis estadístico.

Material y equipo experimental

Como material bioactivo se utilizaron dos cepas probióticas de *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469 adquiridas a través de una casa comercial. Como agentes encapsulantes se

utilizaron maltodextrina (DE 19-20), inulina (INU) comercial extraída de raíz de achicoria y fructo-oligosacárido (FOS) (Nutraflora® Corn Productos Andina, Medellín, Colombia).

Obtención de biomasa microbiana

Las cepas de *L. casei* ATCC 393 y *L. rhamnosus* ATCC 9469 se conservaron en crioviales (con glicerol al 1%) a una temperatura de -20 °C. Para su uso se activaron en caldo MRS en incubación a 37°C por 24 horas en condiciones aerobias. En cada caso, la biomasa al final de la fase exponencial, se recuperó por centrifugación (5000 rpm) a 4°C y el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, las células se transfirieron a 500 mL de caldo MRS bajo agitación lenta (50 rpm) en las mismas condiciones anteriores, hasta la obtención de una concentración de células al final de la fase exponencial alrededor de 10⁹ Unidades Formadoras de Colonia (UFC) g⁻¹. Finalmente, las células fueron recuperadas según se mencionó y lavadas con una solución estéril de NaCl al 0.85 % p/v y conservadas en refrigeración (6±2 °C) hasta su uso.

Encapsulación

Para cada microorganismo se prepararon tres suspensiones al 25 % p/v de sólidos totales de maltodextrina, maltodextrina-FOS y maltodextrina-INULINA, estas últimas en relación 1:1 p/p y homogeneizadas con ultraturax (Mechanical homogenizer (Micra D-9, Roth, Karlsruhe, Germany) durante 30 segundos. Todas las suspensiones se esterilizaron a 120 °C durante 15 minutos y posteriormente se inocularon con 10⁹ UFC g⁻¹ de cada microorganismo.

Las mezclas fueron liofilizadas en un equipo Marca VIRTIS modelo ADVANTAGE XL, USA., con ciclo completo de 48 horas, iniciando a una temperatura de congelación de -40 °C a 0.1 mbar durante 4 horas, seguido por un secado primario de 24 horas a 40°C y 4 horas de secado secundario a 20 °C y 0.05 mbar durante 10 horas más. El material liofilizado se empacó a vacío en bolsas de alta barrera (Bopp metalizado/Pa/Pe) y se almacenó a temperatura ambiente (20±2 °C).

Estudio de supervivencia y estabilidad

Para determinar el efecto de los agentes prebióticos (inulina y FOS) sobre la viabilidad de los microorganismos encapsulados, el número de células viables fue determinado antes y después de la liofilización y cada 7 días durante el almacenamiento a 20±2 °C (considerando 63 días para el *L. casei* y 98 días para *L. rhamnosus*). Se emplearon como criterios de estabilidad: la viabilidad durante el almacenamiento (≥10⁶ UFC g⁻¹) y las propiedades físicas humedad y actividad de agua. Estos parámetros fueron determinados periódicamente (cada siete días) por triplicado.

Caracterización del material probiótico encapsulado después de la liofilización

Viabilidad

Se realizó el recuento de células viables sobre 1 g de material encapsulado, rehidratada a temperatura ambiente en 9 mL de agua de peptona tamponada al 0.1 % p/v (pH 7.2±2) homogeneizado en vortex (Marca Boeco V1 Plus, Alemania) y reposado durante 30 minutos para favorecer la liberación del microorganismo.

Un volumen de 100 µL de dilución fue sembrado en superficie sobre medio MRS con azul de anilina (0.1 %) e incubado en condiciones aerobias a 37 °C por 48 horas. Los recuentos fueron realizados por duplicado y expresados como UFC g⁻¹ en base seca, para cada condición experimental (Champagne et al., 2011). El porcentaje de viabilidad para cada muestra se calculó según la ecuación (1) (Semyonov, 2010; Rodríguez-Barona et al., 2012).

$$\%Viabilidad = \left(\frac{N}{N_o} \right) * 100 \quad (1)$$

donde, N_o es el número de células viables por gramo de materia seca antes del secado y N es el número de células viables por gramo de material encapsulado.

Caracterización Físicoquímica

La humedad se determinó en 1 gramo de material encapsulado usando balanza de infrarojo MOC-120H (Shimadzu, Made in Japan) a 100 °C, la actividad de agua (A_w) se determinó en un higrómetro de punto de rocío (Thermoconstanter TH200, Novasina, Switzerland), la solubilidad de las muestras deshidratadas expresada en porcentaje se calculó según el método descrito por Cano-Chauca et al., (2005). La higroscopicidad expresada como gramos de humedad adsorbida por 100 g de sólidos secos, se determinó

de acuerdo al método propuesto por Cai y Corke (2000) y modificado por Fritzen-Freire et al., (2012). La humectabilidad fue determinada en un dispositivo de humectación estática de forma cuboide, propuesto y descrito por Freudig et al., (1999) y modificado por Ceballos et al., (2012), este tiempo de humectación se expresó en minutos, correspondiente al tiempo que tardó para la inmersión completa 1 g de polvo, depositado suavemente sobre 100 mL de agua a 20 °C. En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado.

Caracterización estructural: tamaño de poro y área superficial

Estas pruebas se realizaron en un analizador de porosidad y área superficial ASAP 2020 (Micromeritics Instrument Corporation, Gosford, New South Wales, Australian). Se trabajó con los estándares α -alúmina y caolinita, con áreas superficiales de $0.52 \pm 0.03 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ y $15.8 \pm 0.09 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, respectivamente. Se desgasificó a 100 °C con una rampa de calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ por 24 h hasta alcanzar una presión estable de 7 mmHg, y una velocidad de evacuación de 10 mmHg s^{-1} . Los datos de volumen adsorbido a condiciones estándar de temperatura y presión se transformaron matemáticamente de acuerdo con la ecuación de BET (Brunauer et al., 1938).

Diseño experimental y análisis estadístico

Para cada microorganismo se aplicó un diseño experimental de un factor con medidas repetidas donde las unidades experimentales se siguieron a través del tiempo. Los resultados corresponden al promedio de tres réplicas y se presentan como la media \pm desviación estándar. Para el análisis de los datos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey con un nivel de significancia a $p < 0.05$. Para procesar los resultados se utilizó el software R Development Core Team, Vienna, Austria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los agentes prebióticos en la liofilización y durante el almacenamiento.

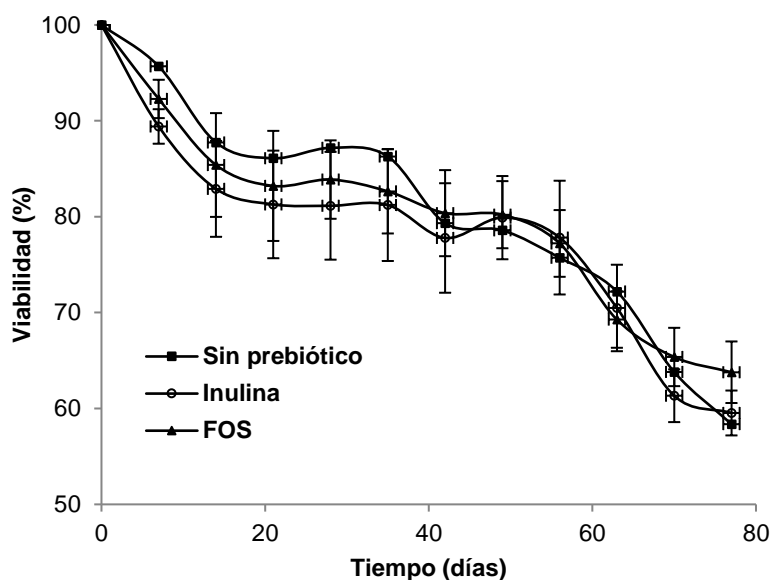
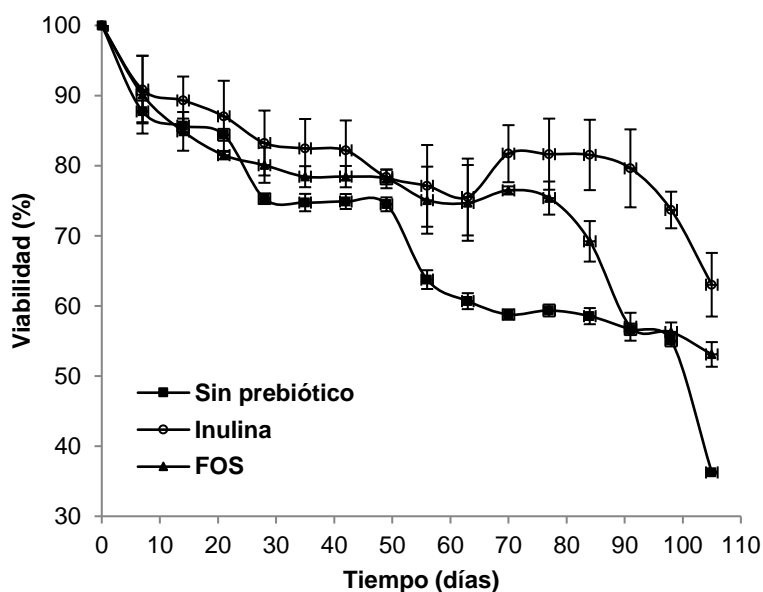
La Tabla 1 muestra los resultados de la viabilidad de los microorganismos probióticos después de la liofilización con y sin agentes prebióticos. El análisis de varianza, mostró un efecto significativo de los prebióticos sobre la viabilidad para los dos microorganismos, ($p < 0.05$); en el *L. casei* se observó un efecto con los dos prebióticos, presentándose una mayor viabilidad en presencia de inulina. Para el *L. rhamnosus* solo se observó diferencia en presencia de FOS. En las Figuras 1 y 2, se observa el comportamiento de la viabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente, estos corresponden al promedio de tres repeticiones con desviaciones en un rango entre 0.73 y 5.93 para *L. casei* y para *L. rhamnosus* las desviaciones se observan en un rango entre 0.57 y 5.83.

Tabla 1: Porcentaje de viabilidad tras la encapsulación. Letras diferentes en una misma fila, indican diferencias estadísticamente significativas según Test de Tukey HSD.

Microorganismo	Viabilidad (%)		
	Sin Prebiótico	Inulina	FOS
<i>Lactobacillus casei</i>	89.79 \pm 0.40 ^a	96.67 \pm 0.47 ^b	93.94 \pm 0.37 ^c
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	83.52 \pm 0.08 ^a	84.04 \pm 0.48 ^a	85.96 \pm 0.24 ^b

Para el *L. casei* se observa un porcentaje de viabilidad superior al 80% durante los primeros 30 días y hasta un 65% al cabo de 70 días de almacenamiento. Este efecto favorable sobre la viabilidad podría responder a la acumulación del agente prebiótico al interior de las células reduciendo de esta forma el diferencial osmótico, tal como reportan Rajam y Anandharamakrishnan (2015). Adicionalmente podría estar formando una fase amorfa superficial que aísla al microorganismo del ambiente externo haciéndolo menos susceptible a factores ambientales (Rajam y Anandharamakrishnan, 2015).

El *L. rhamnosus* durante el almacenamiento conserva la viabilidad por encima del 75% en todos los casos, con un descenso considerable para las muestras encapsuladas sin prebiótico. En este caso es evidente el efecto protector del prebiótico durante la liofilización. En el caso de las muestras con inulina y FOS la viabilidad es constante hasta los 75 días de almacenamiento. Con la inulina se tuvo el mayor tiempo de conservación del microorganismo encapsulado, llegando a valores de 10^6 UFC g^{-1} después de 98 días de almacenamiento, seguido del tratamiento con FOS 84 días. Para el producto sin adición de prebiótico este valor se alcanzó solo hasta los 49 días de almacenamiento.

Fig. 1: Viabilidad durante el almacenamiento de *L. casei* encapsuladoFig. 2: Viabilidad durante el almacenamiento de *L. rhamnosus* encapsulado

La inulina nativa extraída de la achicoria por su alto grado de polimerización (GP de 2 a 60) le facilita al microorganismo gran cantidad de glucosa como fuente de carbono, por lo que de cierta manera por la conformación de su estructura química le confirió mayor supervivencia al *L. rhamnosus*; mientras que los oligosacáridos como el FOS su grado de polimerización es menor (GP de 2-9) (Biedrzycka y Bielecka, 2004).

Un factor adicional que claramente podría estar influenciando la estabilidad de los probióticos en la experiencia es la producción de exopolisacáridos, sustancias que confieren funciones biológicas de protección. En este caso, podría estar ejerciendo acción termoprotectora durante el liofilizado. Estos exopolisacáridos por sus características gelificantes y termoprotectoras han sido usados como vehículos para la microencapsulación microbiana con resultados favorables a la estabilidad del microorganismo (Jimenez-Pranteda, et al., 2012).

Algunos autores reportan para encapsulados mediante secado por aspersión, el efecto favorable del uso de prebióticos como material pared al mantener la estabilidad durante el almacenamiento de los probióticos encapsulados con agentes prebióticos (Fritzen-Freire et al., 2012; Rodríguez-Barona et al., 2012). En ambos casos se sugiere un efecto termoprotector del agente prebiótico que podría favorecer la viabilidad del

microorganismo durante el tratamiento térmico. Es de mencionar, que en numerosos casos la temperatura de almacenamiento fue de refrigeración o bajo 0 °C. En el presente estudio el almacenamiento se siguió a temperatura ambiente, factor que claramente pudo influenciar la viabilidad. En contraste, Pinto et al (2015) no observan efecto favorable en la viabilidad de bifidobacterias durante la encapsulación, ni durante el almacenamiento a 4 °C y a -20 °C. Por su parte Corcoran et al (2004) en sus estudios sobre el efecto comparativo de la supervivencia de lactobacilos encapsulados mediante secado por aspersión en presencia de sustancias prebióticas, verificaron que la inclusión del prebiótico inulina no incremento la viabilidad durante el almacenamiento de los encapsulados.

Propiedades fisicoquímicas

Los valores de humedad y actividad de agua son consideradas parámetros críticos para la supervivencia de los microorganismos y en la estabilidad de las microcápsulas durante el almacenamiento, estos se determinaron al inicio y final del almacenamiento, y son reportados en la Tabla 2.

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de los microorganismos encapsulados. Letras diferentes en una misma fila, para cada microorganismo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) según Test de Tukey HSD.

Variable	<i>Lactobacillus casei</i>			<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		
	Sin Prebiótico	Inulina	FOS	Sin Prebiótico	Inulina	FOS
Humedad Inicial [%]	1.13 ± 0.15 ^a	0.70 ± 0.04 ^b	0.30 ± 0.02 ^c	1.03 ± 0.06 ^a	1.27 ± 0.06 ^b	1.47 ± 0.06 ^c
Humedad Final [%]	2.53 ± 0.06 ^a	2.67 ± 0.06 ^b	1.90 ± 0.01 ^c	2.47 ± 0.06 ^a	2.87 ± 0.06 ^b	2.26 ± 0.01 ^c
Aw Inicial	0.05 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^a
Aw Final	0.10 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^b	0.18 ± 0.01 ^a

Los bajos valores reportados para la humedad podrían estar confiriendo estabilidad en la supervivencia de los microorganismos encapsulados al presentar menos agua libre disponible para las reacciones bioquímicas y por lo tanto favoreciendo la vida útil del producto final (Tonon, 2009). Estas características mantenidas de forma invariable durante el almacenamiento estarían asegurando la estabilidad en el tiempo del producto y por tanto la viabilidad del microorganismo. Para ambos microorganismos la adición de los prebióticos tuvo un efecto significativo sobre la humedad inicial y final ($p < 0.05$), en la actividad de agua inicial no hubo efecto por la presencia de los prebióticos para ninguno de los dos microorganismos, y en la actividad de agua final se presentaron diferencias en el comportamiento de esta variable, fue significativo el efecto del FOS en el *L. casei* y de la inulina para el *L. rhamnosus*.

Algunos autores afirman que el efecto adverso o no, del proceso de liofilización está relacionado con aspectos como la especie bacteriana, adición de sustancias protectoras, concentración celular inicial, estado fisiológico de los microorganismos, tasa de congelación por la generación de estrés osmótico, temperatura y condiciones de rehidratación, entre otras (Zhao y Zhang 2005). Por otro lado, la etapa de crecimiento a la que fueron cosechadas las células (final de la fase exponencial, inicio de fase estacionaria) podría estar incidiendo en los resultados encontrados, pues se considera que las células en estado estacionario de crecimiento presentan mayor resistencia a la desecación y ante situaciones de estrés como son pH, temperatura, presión osmótica (Kim et al., 2008).

Para el caso de microorganismos liofilizados, algunos estudios han puesto en evidencia disminuciones extremadamente rápidas de la tasa de supervivencia poco después del proceso, debido a condiciones inadecuadas de almacenamiento que generan un alto contenido de humedad en el producto, así como la presencia de oxígeno en el empaque podría generar el fenómeno de oxidación a nivel de la membrana lipídica de los microorganismos y como consecuencia traería la reducción de la viabilidad tras la liofilización (Castro et al., 1997). Para el presente estudio el empaque a vacío en bolsas metalizadas de barrera al vapor muy probablemente podría haber favorecido la viabilidad y consecuentemente la estabilidad de los microorganismos (Rodríguez-Barona et al., 2015).

De manera resumida en la Tabla 3, se presentan las propiedades de rehidratación de los materiales encapsulados. Con respecto a la higroscopicidad los resultados no arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para *L. rhamnosus* y para el *L. casei*, se presentó diferencia con respecto al material sin prebiótico ($p < 0.05$). La humectabilidad se vio incrementada en las muestras con material prebiótico y los resultados para la solubilidad arrojaron valores con diferencias significativas ($p < 0.05$) para los encapsulados de *L. casei* en presencia de FOS.

Tabla 3: Propiedades de rehidratación de las cápsulas. Letras diferentes en una misma fila, para cada microorganismo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) según Test de Tukey HSD.

Variable	<i>Lactobacillus casei</i>			<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		
	Sin Prebiótico	Inulina	FOS	Sin Prebiótico	Inulina	FOS
Higroscopicidad [g humedad 100g de sólido seco ⁻¹]	13.12 ± 0.52 ^a	15.65 ± 0.57 ^b	15.55 ± 0.30 ^b	14.98 ± 0.26 ^a	15.41 ± 0.15 ^a	15.32 ± 0.29 ^a
Humectabilidad [min]	1.91 ± 0.08 ^a	5.32 ± 0.01 ^b	2.7 ± 0.04 ^c	2.09 ± 0.02 ^a	4.89 ± 0.01 ^b	4.66 ± 0.01 ^c
Solubilidad [%]	98.19 ± 0.90 ^a	98.99 ± 0.70 ^a	94.59 ± 0.41 ^b	95.99 ± 0.73 ^a	96.69 ± 0.35 ^a	96.75 ± 0.75 ^a

La tabla 3 muestra las propiedades de rehidratación evaluadas para las cápsulas. En todos los casos se observa el comportamiento propio de polvos deshidratados, con una alta higroscopicidad y una humectabilidad incrementada con la presencia de material prebiótico, lo que estaría condicionando el uso de un material de empaque con cualidades de alta barrera que permita conservar su estabilidad en el tiempo. Se observa una alta solubilidad en las muestras, con y sin prebiótico. Este comportamiento está estrechamente relacionada las características químicas y estructurales, relacionadas con el número de azúcares libres y el grado de polimerización (GP) (Madrigal y Sangronis 2007, Barclay et al., 2010; Fritzen-Freire et al., 2012), y afectado por la temperatura (Naskar, Dan et al. 2010). Estas propiedades estarían restringiendo la aplicación de los encapsulados obtenidos a un tipo de matriz alimenticia específica, muy estable, con baja actividad de agua y de posible hidratación al momento del consumo. En medios acuosos, la alta solubilidad de las cápsulas podría poner en riesgo la supervivencia del microorganismo.

Las propiedades de rehidratación de los polvos encapsulados pueden afectar la viabilidad de los microorganismos al ser un paso crítico en su recuperación luego de su liofilización, porque las células que se sometieron a una posible lesión subletal pueden no ser capaces de reparar dicho daño si se rehidratan en condiciones inapropiadas (Xu et al., 2016). En este estudio se obtuvo comparativamente un alto porcentaje de viabilidad tras el almacenamiento y rehidratación al emplearse una solución fosfato tamponada que facilita unas condiciones adecuadas de equilibrio, mientras las células se están nuevamente adaptando en términos de osmolaridad, pH, temperatura.

Propiedades estructurales y tamaño de partícula

La Tabla 4, muestra los resultados de la caracterización con respecto al tamaño de poro y área superficial de los polvos encapsulados de *L. casei* y *L. rhamnosus* producidos con los diferentes agentes encapsulantes. Los resultados de tamaño de poro mostrados en la tabla 4, muestran que este se incrementa por la adición de los prebióticos para ambos microorganismos ($p < 0.05$). El área superficial para el *L. casei*, presenta una disminución con respecto al material encapsulado sin prebiótico y para el *L. rhamnosus*, esta se incrementa en todos los casos, presentado una mayor diferencia por efecto del FOS.

Tabla 4: Propiedades microestructurales del material encapsulado. *Letras diferentes en una misma fila, para cada microorganismo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) según Test de Tukey HSD.

Variable	<i>Lactobacillus casei</i>			<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		
	Sin Prebiótico	Inulina	FOS	Sin Prebiótico	Inulina	FOS
Tamaño de Poro [Å]	59.99 ± 0.01 ^a	68.47 ± 0.02 ^b	64.30 ± 0.02 ^c	57.13 ± 0.01 ^a	64.79 ± 0.03 ^b	63.71 ± 0.02 ^c
Área superficial [m ² g ⁻¹]	0.43 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.05 ^b	0.46 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.03 ^a	0.53 ± 0.05 ^a	1.01 ± 0.07 ^b

Las cifras de área superficial (Tabla 4) en todos los tratamientos son bajas si se mira con la óptica de un soporte catalítico ya que son ideales los soportes de más de 100 m²g⁻¹. Para el caso de encapsulación cuando se reportan a mayor área por gramo, mayor posibilidad de contacto con agentes externos y, consecuentemente, mayor deterioro en almacenamiento (Barbosa-Canovas et al., 2005). Como no se manipuló la velocidad de enfriamiento estas muestras experimentalmente no se vieron afectadas en sus características fisicoquímicas como por ejemplo la humedad. El tamaño de poro fue mayor para las muestras encapsuladas con prebióticos con valores entre 63.71 y 68.47 Å, que comparando con el tamaño de los microorganismos es mucho mayor ya que el tamaño promedio de un microorganismo es < de 1 Å

(0,5-1,2 μm ancho x 1-10 μm largo). Algunos autores hacen referencia a que el tamaño y la distribución de los poros y el área superficial de la muestra dependen ampliamente de la velocidad de enfriamiento y estos a su vez afectan las características fisicoquímicas como la humedad y actividad de agua de los polvos encapsulados (Barbosa-Canovas et al., 2005, Ceballos et al., 2012).

CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de la aplicación de los agentes prebióticos inulina y FOS como material pared, sobre las propiedades físicas de los polvos y la viabilidad de las cepas de *L. casei* y *L. rhamnosus* encapsuladas. Se observó una alta higroscopicidad y humectabilidad en presencia de agentes prebióticos. Se demostró que fueron mayores los porcentajes de supervivencia de las bacterias probióticas encapsuladas con inulina y FOS. Las características encontradas en los materiales encapsulados restringen la aplicación de los polvos a un tipo de matriz alimenticia de baja actividad de agua y de posible hidratación al momento del consumo. En matrices hidratadas la solubilidad de las cápsulas podría poner en riesgo la supervivencia del microorganismo y la estabilidad del alimento.

REFERENCIAS

- Barbosa-Canovas, G. V., E. Ortega-Rivas y P. Juliano, Yan, H, Food powders, Physical properties, processing and functionality, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, (2005)
- Barclay, T., M. M. Ginic, P. Cooper y N. Petrovsky, Inulin—A versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses, *J Excip Food Chem*, 1, 27–50, (2010)
- Biedrzycka, E.; Bielecka, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Tech*, 15, p. 170–175, (2004)
- Brunauer, S., P. H. Emmett y E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J Am Chem Soc*, 60, 309-319, (1938)
- Cai, Y. Z. y H. Corke, Production y properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments, *J Food Sci*, 65, 1248–1252, (2000)
- Casiraghi, M. C.; Canzi, E.; Zanchi, R.; Donati, E.; Villa, L. Effects of a symbiotic milk product on human intestinal Ecosystem, *J Appl Microbiol*, 103, p. 499-506, (2007)
- Cano-chauca, M., P. C. Stringheta, A. M. Ramos y J. Cal-vidal, Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization, *Innov Food Sci Emerg Technol*, 6(4), 420-428, (2005)
- Castro, H. P., P. M. Texeira y R. Kirby, Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying, *Journal of Applied Microbiology*: 82, 87–94, (1997)
- Ceballos, A. M., Giraldo G. I. y Orrego C. E., Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp, *J Food Eng*, 111, 360–365, (2012)
- Champagne, C. P., R. P. Ross, M. Saarela, K. F. Hanen y D. Charalampopoulos, Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures in a food matrices, *Int J Food Microbiol*, 149, 185-193, (2011)
- Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., & Stanton, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances, *J Appl Microbiol*, 96(5), 1024–1039, (2004)
- Freudig, B., S. Hoge Kamp y H. Schubert, Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel, *Chem Eng Process*, 38, 525–532, (1999)
- Fritzen-Freire, C. B., E. S. Prudencio, R. D. M. C. Amboni y S. S. Pinto, Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics, *Food Res Int*, 45(1), 306-312. (2012)
- Fritzen-Freire, C. B., E. S. Prudencio, R. D.M.C. Amboni, S. S. Pinto, y I. B. Muñoz, Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments, *LWT-FOOD SCI TECHNOL*, 50, 39-44 (2013)
- González, R. E., J. Mendoza y L. B. Morón, Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados, *Inf Tecnol*, 26(5), 11-16, (2015)

- Jimenez, M. L., Poncelat, D. y otros cinco autores, Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers, *J Biosci Bioeng*, 113(2), 179-184, (2012)
- Kailsapathy, K., Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt, *Lebensm Wiss Technol*, 39, 1221–1227, (2006)
- Kearney, X. C., C. Stanton, J. Kelly, Fitzgerald, G.F. y R. P. Ross, Development of a spray dried probiotic yogurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, *Int Dairy J*, 19, 684-689, (2009)
- Kim S, J., C. S. Yong, S. y otros cinco autores, Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *Lebensm Wiss Technol*, 41, 493-500, (2008)
- Madrigal, L. y E. Sangronis, La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *ALAN*, 57(4), 387-396, (2007)
- Naskar, B., A. Dan, S. Ghosh y S. P. Moulik, Viscosity and solubility behavior of the polysaccharide inulin in water, water + dimethyl sulfoxide, and water + isopropanol media, *J. Chem. Eng. Data*, 55, 2424–2427, (2010)
- Pinto S.S., Fritzen-Freire C.B. y otros cinco autores, Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. *Food Res Int*, 67 400–408. (2015)
- Quigley, E. M., Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota, *Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork*: 6, 213–218, (2010)
- Rajam, R., Anandharamakrishnan, C., Spray freeze drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, *J Food Eng*, 166, 95-103 (2015)
- Ranadheera, R. D. C. S., S. K. Baines y M. C. Adams, Importance of food in probiotic efficacy, *Food Res Int*, 43(1), 1-7, (2010)
- Ray, S., U. Raychaudhuri y R. Chakraborty, An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology, *Food Biosci*, 13, 76-83, (2016)
- Rodríguez-Barona, S., Giraldo G. I. y Zuluaga J.P, Evaluación de la Incorporación de Fibra Prebiótica sobre la Viabilidad de *Lactobacillus casei* Impregnado en Matrices de Mora (*Rubus glaucus*), *Inf Tecnol*, 26(5), 25-34, (2015)
- Rodríguez, S., Montes R. L. M. y Ramires D. d. J., Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos, *Vitae*, 19, 186-188, (2012)
- Semyonov D., K. Z. Ramon O., Levin-Brener L., Gurevich N. y S. E., Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying, *Food Res Int*, 43, 193- 202, (2010)
- Shamekhi, F., M. Shuhaimi, A. B. Ariff y A. M. Yazid, Optimization of a cryoprotective medium for infant formula probiotic applications using response surface methodology, *Ann Microbiol*, 62, 911–921, (2012)
- Strasser, S., Neureiter M., M. Geppl , R. Braun y H. Danner, Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria, *J App Microbiol*, 107, 167-177, (2009)
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., Hubinger, M.D, Physicochemical and morphological characterization of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) produced with different carrier agents, *Int J food Sci Tech*, 44, 1950-1958, (2009)
- Tripathi, M. K. y S. K. Giri, Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *J Funct Foods*, 9, 225-241, (2014)
- Vasiljevic, T. y Shah, N. P., Probiotics—From Metchnikoff to bioactives, *Int Dairy J*, 18(7), 714-728, (2008).
- Xu, Meng., Gagné, F., Dumont, M.J., Jabaji, S., Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cell and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. *J Food Eng*, 168, 52-59, (2016)
- Zhao, G. y Zhang, Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J App Microbiol*, 99, 333-338, (2005)

