

Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado

Efrain Cayra^{(1,2)*}, Jor H. Dávila⁽¹⁾, Jenny M. Villalta⁽¹⁾, Yovani Rosales⁽²⁾

(1) Departamento de I&D, Empresa Camarones S.A.C., Carretera Salamanca km 04, Tumbes, Perú.
(e-mail: ecayra@marinasol.com.pe, ecayra@msn.com)

(2) Centro de Investigaciones y Desarrollo de Postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, Empresa Marinazul S.A., Panamericana Norte Km. 1202, Canoas de Punta Sal, Tumbes

* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

Recibido Abr. 25, 2017; Aceptado Jun. 30, 2017; Versión final Ago. 31, 2017, Publicado Dic. 2017

Resumen

Se microencapsularon dos cepas probióticas (*Bacillus sp. 2.* y *Saccharomyces sp. 4.*), mediante la técnica de pulverización en lecho fluidizado (FBD), utilizando tres formulaciones, F1: leche descremada (33%), F2: leche descremada (23%) + maltodextrina (10%) y F3: maltodextrina (33%), evaluando en cada una, el porcentaje de viabilidad después de FBD y la tasa de supervivencia durante el almacenamiento (90 días), mediante recuento de UFC en placa. El porcentaje de viabilidad indicó que F1 obtuvo los mejores resultados para *Bacillus sp. 2.* (97.49%) y *Saccharomyces sp. 4.* (97.85%), seguido de F2 en ambas cepas. En el almacenamiento, F1 y F3 disminuyeron significativamente su viabilidad, mientras F2 mantuvo la viabilidad constante, resultados corroborados por microscopía electrónica de barrido. Estos resultados demostraron que FBD es eficiente para la microencapsulación, la leche descremada mejora la protección en dicho proceso y adicionar maltodextrina genera una mayor estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo.

Palabras clave: lecho fluidizado; probióticos; microencapsulación; almacenamiento

Evaluation of the Stability and Viability of Two Probiotic Strains Microencapsulated by Fluidized Bed

Abstract

Two probiotic strains (*Bacillus sp. 2.* and *Saccharomyces sp. 4.*) were microencapsulated using the fluidized bed spraying technique (FBD), using three formulations, F1: skim milk (33%), F2: milk (23%) + maltodextrin (10%) and F3: maltodextrin (33%), evaluating in each of them the percentage of viability after FBD and the survival rate during storage (90 days), by counting CFU in plaque. The percentage of viability indicated that F1 obtained the best results for *Bacillus sp. 2.* (97.49%) and *Saccharomyces sp. 4.* (97.85%), followed by F2 in both strains. In storage, F1 and F3 significantly decreased their viability, while F2 maintained constant viability, results that were corroborated by scanning electron microscopy. These results demonstrated that FBD is efficient for microencapsulation, skim milk improves protection in this process and adding maltodextrin generates greater stability during long-term storage

Keywords: fluidized bed; probiotics; microencapsulation; storage

INTRODUCCIÓN

Los Probióticos son definidos como "microorganismos vivos, los cuales al ser consumidos en cantidades adecuadas, confiere una ventaja de salud para el hospedero" (Reid et al., 2003), mediante diferentes mecanismos, como la competencia por nutrientes, la modulación de la respuesta inmunitaria no específica, la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por el sitio de fijación en el tracto gastrointestinal frente a una enfermedad determinada, la mejora de la calidad de agua, entre otros (Lauzon et al., 2014; Villamil y Martínez, 2009). Dentro de las bacterias probióticas, el género *Bacillus* ha sido extensamente usado como probiótico en la acuicultura (Ninawe y Selvin, 2009), mientras que la adición de levaduras en combinación con bacterias probióticas mejora su efectividad (Irianto y Austin, 2002). *Bacillus sp. 2* y *Saccharomyces sp. 4* fueron aislados del tracto digestivo del langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*), con características probióticas, cuya efectividad ya fue demostrado y en la actualidad junto a otras cepas seleccionadas, son usadas como probióticos en el cultivo de langostinos (Motte et al., 2010; Cornejo, 2009).

Pero existe una problemática en cuanto al manejo, conservación y/o almacenamiento de cepas probióticas, ya que son microorganismos vivos muy sensibles y se ven afectados por factores ambientales con los que interactúan, tales como el pH, oxígeno, temperatura, etc. (Chávarri et al., 2012; Kailasapathy, 2014). En este sentido, existen diversos estudios enfocados a desarrollar tecnologías que ayuden a mejorar la estabilidad y viabilidad de las cepas probióticas durante su aplicación en los diferentes campos de la industria. Una de estas tecnologías es la microencapsulación, que consiste en la protección de los microorganismos mediante un agente encapsulante que funciona como una barrera física que evita su exposición a las condiciones adversas del entorno, este proceso da lugar a cápsulas de tamaño micrométrico que pueden liberar su contenido de manera controlada bajo la influencia de condiciones específicas (Xing et al., 2015; Gonzalez-Cuello et al., 2014).

Los agentes de recubrimiento más usados en la microencapsulación de cepas probióticas son alginato, quitosano, carboximetilcelulosa (CMC), carragenina, gelatina, almidón, pectina, gomas (arábica, aguar y xantano), maltodextrinas, proteínas del suero de leche, etc. (Chávarri et al., 2012; Estevinho et al., 2013; Kailasapathy, 2014), también se pueden utilizar mezclas con la finalidad de aprovechar propiedades específicas de estas sustancias tales como la resistencia al ambiente ácido, estabilidad mecánica, grado de porosidad en la superficie de la cápsula y difusión de la humedad, así como algunas ventajas al momento de su manipulación tales como viscosidad y grado de solubilidad (Estevinho et al., 2013).-Existen diversos métodos de microencapsulación tales como método de extrusión o goteo, método de emulsión o sistemas de dos fases, método de secado por atomización o desecación por atomización, coacervación, liofilización, secado por pulverización en lecho fluidizado, etc. (Gouin, 2004). Cada una de estas métodos ofrece ventajas y desventajas, es por eso que para la elección de un método apropiado para aplicaciones a gran escala es muy importante considerar otros factores, además de los costos de producción (Martín et al., 2015).

Diversas investigaciones han realizado estudios comparativos de tres métodos más comunes para la microencapsulación de probióticos; liofilización, secado por aspersión y pulverización en lecho fluidizado (Guijarro et al., 2006; Larena et al., 2003;). El secado por congelamiento o también denominada liofilización es una de las técnicas más importantes, convenientes y exitosas para la preservación a largo plazo de microorganismos probióticos (Chávez y Ledebor, 2007; Strasser et al., 2009), sin embargo resulta ser muy costoso y laborioso para ser desarrollado a escala industrial (Augustin y Hemar, 2009); el secado por atomización en contraste al liofilizado permite procesar grandes volúmenes de solución, su principal desventaja son sus altas temperaturas de proceso que pueden afectar drásticamente a la supervivencia de los microorganismos y por ende reducir significativamente la eficiencia (Silva et al., 2014). Por el contrario, el método de secado por pulverización en lecho fluidizado o FBD por sus siglas en inglés, permite recuperar un mayor porcentaje de células viables debido a sus bajas temperaturas de proceso. Es una técnica que consume menos tiempo y energía que el secado por liofilización, por lo que es considerada una alternativa rentable para la conservación de microorganismos sensibles al calor (Frey, 2014; Strasser et al., 2009).

Considerando lo expuesto anteriormente, el objetivo general de esta investigación fue evaluar la estabilidad y viabilidad de dos cepas probióticas, *Bacillus sp. 2* y *Saccharomyces sp. 4*, mediante tres formulaciones encapsulantes utilizando la técnica de pulverización en lecho fluidizado.

METODOLOGÍA

La ejecución del estudio se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo de Postlarvas de Langostino blanco de la empresa acuícola Marinazul S.A. (Tumbes, Perú), proporcionando además las cepas probióticas, una bacteria (*Bacillus sp. 2*) y una levadura (*Saccharomyces sp. 4*), las cuales están criopreservadas con glicerol al 10%, a una temperatura de -80°C. Los agentes encapsulantes utilizados fueron leche descremada (LD) (DARIGOLD Inc., EE UU), maltodextrina (MD) (Zhucheng Donxiau Biotechnology co. Ltd., China),

sacarosa (S) (Merck, USA) goma xantan (GX), carboximetilcelulosa (CMC) (Aromas del Perú S.A., Perú). Como soporte de encapsulación se utilizó cristales de azúcar blanca refinada (Cartavio S.A.A., Perú).

Producción de Biomasa bacteriana

Se inoculó 20 µL de las cepas criopreservadas en 1 mL de medio de cultivo para su reactivación y se incubó a 30°C por 24 horas, luego se realizó la masificación de la cepa a 50 ml y posteriormente a 500 ml en las mismas condiciones descritas anteriormente. El medio de cultivo fue caldo TSB (Tryptic-Soy-Broth) para *Bacillus sp. 2* y caldo GYPE (Glucosa-Yeast extract-Peptona) para *Saccharomyces sp. 4*. La curva de crecimiento de cada cepa se estableció midiendo regularmente su absorbancia a 600 nm con un espectrofotómetro modelo 9500 (YSI, USA) y fue correlacionado por conteo de UFC mediante recuento de placa aplicando el método oficial de la AOAC 966.23 (Association of Official Agricultural Chemists, 2000).

Para la obtención de la biomasa final se utilizó el procedimiento seguido por Chávez y Ledebøer (2007) y Montes (2013), con algunas modificaciones. Se realizó durante la fase exponencial, las células fueron precipitadas con una centrifuga Z 36 HK (Hermie Labortechnik, Alemania) a 6000 rpm durante 10 min. descartándose el sobrenadante. Posteriormente, las células se lavaron con solución salina estéril (NaCl 0.85% p/v). Finalmente fueron resuspendidas en 50 mL de solución salina estéril y conservada a 4°C, hasta su posterior uso.

Microencapsulación

Para cada microorganismo se prepararon tres formulaciones encapsulantes, en relación a la concentración de leche descremada y maltodextrina. Cada una de estas formulaciones se completó a 40% de sólidos totales con sacarosa, Carboximetilcelulosa y goma xantan, tal como se muestra en la Tabla 1. Todas las formulaciones fueron hidratadas con agua destilada estéril a temperatura ambiente y fueron homogeneizadas con un agitador magnético PC420 (Corning, USA).

Tabla 1: Formulaciones encapsulantes utilizados en el estudio, los datos están porcentaje (peso/volumen).

	<i>Formulación 1 (F1)</i>	<i>Formulación 2 (F2)</i>	<i>Formulación 3 (F3)</i>
Leche descremada (%)	33	23	
Maltodextrina (%)		10	33
Sacarosa (%)	6.7	6.7	6.7
Carboximetilcelulosa (%)	0.15	0.15	0.15
Goma xantan (%)	0.15	0.15	0.15

Las suspensiones estériles fueron inoculadas con la biomasa microbiana hasta una concentración inicial de 8.8×10^{10} UFC/mL en promedio para cada tratamiento (F1, F2 y F3). Luego fueron homogeneizadas con un agitador magnético PC420 por 2 horas a 30°C. Este mismo procedimiento se realizó por separado para cada una de las cepas ensayadas. La obtención del soporte (azúcar blanca) se realizó mediante tamizado con una malla de 650 micras. Los cristales obtenidos fueron de un diámetro entre 650 y 900 µm.

Secado por pulverización en lecho fluidizado

Las suspensiones inoculadas e incubadas fueron sometidas a un proceso de secado por pulverización en lecho fluidizado, mediante un Fluid Bed Processor (Shakti Pharmatech PVT, India) incorporado con una bomba peristáltica y una boquilla de atomización en la parte superior de la cámara (Top Spraying System), a través de la cual se alimentó la formulación encapsulante inoculada en forma discontinua, en una relación de 100 mL de suspensión microbiana por cada 500 g de soporte. Los parámetros constantes en todos los procesos fueron: flujo de aire caliente = 460 m³/h, flujo de aspersión = 14 mL/min, temperatura de la cámara de fluidización = 49 ± 2 °C y tiempo de proceso = 13 min. El proceso y los parámetros se mantuvieron constantes para todos los ensayos realizados en esta etapa.

Determinación del porcentaje de viabilidad de las cepas

Se calculó la concentración de microorganismos viables, antes y después del pulverizado en los ensayos de cada tratamiento, mediante recuento de placa, aplicando el método oficial de la AOAC 966.23. En este procedimiento, para el agente encapsulante inoculado con la cepa probiótica, antes del proceso de pulverizado, se midió 50 µL y se disolvió en 450 µL de agua de mar estéril y para el pulverizado final se pesó

una muestra de 0.5 g y se disolvió en 1.5 mL de agua de mar estéril. Se realizó diluciones seriadas hasta una dilución de 1/10000, sembrando 10 μ L por diseminación en placas de agar TSA y PDA para *Bacillus sp.* 2 y *Saccharomyces sp.* 4 respectivamente e incubando a 30°C durante 24 horas en el caso del *Bacillus sp.* 2 y por 48 horas para *Saccharomyces sp.* 4. El recuento de células viables se realizó mediante un Contador de colonias (KERT LAB, CM-1) y se utilizó las siguientes ecuaciones para el cálculo de las UFC/mL y UFC/g.

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{NC} \times 100}{\text{FD}} \quad (1)$$

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{NC} \times 100 \times 1.5}{\text{FD} \times 0.5} \quad (2)$$

Donde, UFC/mL es la cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro, UFC/g es la cantidad de unidades formadoras de colonia por gramo, NC es el número de unidades formadoras de colonia contabilizadas en placa y FD es el Factor de Dilución (1/10000).

Finalmente se usó la siguiente ecuación para el cálculo del %viabilidad de las cepas (Schell y Beermann, 2014; Strasser et al., 2009).

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\log(\text{N.W})}{\log(\text{N}_0.V)} \times 100 \quad (3)$$

Dónde, N es UFC/g después del proceso de pulverización, W es el peso del pulverizado final, N₀ es UFC/mL antes del proceso de pulverización y V es el volumen del agente encapsulante alimentado.

Determinación de la viabilidad durante el almacenamiento

El producto obtenido después del proceso de secado, se empacó en bolsas de polietileno-poliamida y se almacenaron a una temperatura de 18 \pm 2 °C protegidas de la luz (Schell y Beermann, 2014), durante un periodo de 90 días. Con el fin de validar la tasa de supervivencia de los encapsulados se realizó el recuento de las UFC periódicamente cada 15 días siguiendo el método AOAC 966.23. Se realizó muestreos por duplicado para los ensayos de cada tratamiento.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Un microscopio electrónico de barrido digital Inspect S50 (FEI Company, Inc., USA), operado con un voltaje de aceleración entre 5-30 kV, se empleó para examinar la morfología de la superficie de las partículas de azúcar microencapsuladas con la cepa pulverizadas, las cuales se colocaron en un portamuestra de aluminio mediante la adhesión con una cinta de doble cara. Luego fueron recubiertas con una lámina de oro mediante un revestidor iónico (SPI-Module sputter coater, SPI-Supplies).

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizaron 9 ensayos para cada cepa probiótica, en base a un Diseño Completamente Aleatorio (DCA). El factor evaluado fue la formulación encapsulante, con tres niveles y tres repeticiones para cada nivel. Las variables de respuesta analizadas para la elección de la mejor formulación fueron: el porcentaje de viabilidad de las cepas después del proceso de pulverizado y la viabilidad de las cepas durante el almacenamiento. El análisis de datos se realizó utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI (StatPoint Technologies) versión 16.1.18. La evaluación de las diferencias significativas entre las formulaciones se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor con un nivel de significancia < 0.05 para el rechazo de hipótesis de igualdad de medias, seguido de pruebas comparativas de Tukey. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Los valores de la media y la desviación estándar se calcularon para n = 3.

RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis de ANOVA mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las tres formulaciones, en relación al porcentaje de viabilidad celular después del secado. En ambos microorganismos, las microcápsulas con F1 muestran mayor porcentaje de viabilidad que F2 y esta a su vez es mayor que F3, tal como se muestra en la Tabla 2. Estos datos sugieren que la leche descremada tiene un efecto positivo sobre la protección de los microorganismos durante el proceso de encapsulación. Abadias et al. (2007), usaron leche descremada al 10%, mejorando la sobrevivencia de la levadura *Candida sake*. Asimismo, Costa et al. (2002), obtuvieron

mejores resultados con leche descremada para la bacteria *P. agglomerans*, esto debido a la capacidad de este medio complejo para reparar células dañadas y mejorar la recuperación final después del proceso de secado. Esto fue corroborado por Silva et al. (2011), que afirman que la leche descremada es capaz de prevenir daños en las células mediante la estabilización de la membrana celular, ya que contiene proteínas que proporcionan un recubrimiento protector.

A pesar de las diferencias significativas, los dos microorganismos muestran alta viabilidad celular después del secado con todas las formulaciones encapsulantes, esto demuestra una buena eficiencia del método de pulverización en lecho fluidizado (FBD) para la microencapsulación de probióticos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por otros autores con el mismo método, quienes obtuvieron viabilidades en el rango de 95% y 96%. (Schell y Beermann, 2014; Strasser et al., 2009; Larena et al., 2003).

Tabla 2: Viabilidad de las cepas después del pulverizado en tres formulaciones de agente encapsulante. Promedios en la misma columna con diferentes letras a, b, c difieren significativamente ($p < 0.05$) según las pruebas de Tukey

Agente Encapsulante	Inicial (Log UFC)	Final (Log UFC)	Viabilidad (%)
<i>Bacillus sp. 2</i>			
F1	11.00 ± 0.03	10.72 ± 0.02	97.49 ± 0.14 ^a
F2	11.00 ± 0.03	10.68 ± 0.02	97.12 ± 0.17 ^b
F3	11.00 ± 0.03	10.61 ± 0.02	96.50 ± 0.17 ^c
<i>Saccharomyces sp. 4</i>			
F1	10.88 ± 0.06	10.65 ± 0.03	97.85 ± 0.20 ^a
F2	10.88 ± 0.06	10.59 ± 0.04	97.34 ± 0.23 ^b
F3	10.88 ± 0.06	10.51 ± 0.03	96.61 ± 0.20 ^c

En relación a los carbohidratos, Schell y Beermann (2014) sugieren que los azúcares de bajo peso molecular pueden estabilizar la membrana y las cadenas de proteínas de las células, mediante la sustitución de las moléculas de agua con enlaces de hidrógeno molecular durante los procesos de secado. Los polisacáridos y disacáridos incluyendo lactosa, manitol, maltodextrina, maltosa, lactulosa y la inulina desempeñan un papel importante en la protección de la viabilidad de las células en proceso de secado. El efecto protector de los azúcares durante el secado se atribuye a su capacidad para formar estructuras cristalinas que proporcionan protección a las proteínas funcionales de la célula y su capacidad para reemplazar el agua asociada a los grupos polares de los lípidos de membrana (Çabuk y Harsa, 2015; Carvalho et al., 2004).

La deshidratación daña la pared celular, la membrana citoplasmática, varias proteínas y la estructura de los ácidos nucleicos de las bacterias (Goderska, 2012). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que la supervivencia de los microorganismos después del secado dependen en gran medida de la composición y del tipo de agente encapsulante (Golowczyc et al., 2011; Lian et al., 2002; Reddy et al., 2009). Además de la diferencia en las características químicas, los agentes encapsulantes poseen diferentes propiedades físicas tales como conductividad térmica, difusividad térmica, etc. Por lo tanto, es normal esperar que las tres formulaciones encapsulantes probadas en el presente estudio ejerzan diferente grado de protección en cada microorganismo ensayado, afectando directamente la viabilidad de las cepas probióticas. López et al. (2012), resaltaron que bacterias del género *Bifidobacterium* encapsuladas solamente con carbohidratos mostraron menor protección que las encapsuladas con proteínas de suero de leche, lo cual corroboraría los resultados obtenidos con F3. Mientras que el resultado obtenido para ambas cepas con F1, sugiere que el contenido de proteínas y carbohidratos de la leche descremada juega un papel importante en el efecto protector de los microorganismos (Lian et al., 2002).

La reducción de la viabilidad celular después del secado se debe principalmente al calor del proceso (Silva et al., 2011). Por lo tanto, la mayor supervivencia mostrada por *Saccharomyces sp. 4* en relación a la cepa de *Bacillus sp. 2*, en la misma formulación encapsulante, puede ser atribuido a la menor sensibilidad de este microorganismo al calor, la cual está estrictamente relacionada con su estructura celular más compleja.

Sobre el efecto de la formulación encapsulante en la viabilidad de las cepas durante el almacenamiento de los encapsulados, la figura 1 muestra que la concentración de la cepa *Bacillus sp. 2*, encapsulada con F1 disminuyó de forma significativa en los primeros 60 días de almacenamiento luego se mantuvo significativamente constante hasta el día 90, al final se obtuvo una disminución de 0.14 unidades logarítmicas. Mientras que con F3 redujo significativamente la concentración celular durante los 90 días, con una disminución de 0.16 unidades logarítmicas. En contraste a esto, se tiene que F2 mantuvo su concentración durante todo el periodo de almacenamiento. Por lo tanto después de 90 días la cantidad de células bacterianas en F2 es mayor que en F1 y F3. Las concentraciones iniciales de *Saccharomyces sp. 4* tienen la misma tendencia que en la cepa de *Bacillus sp. 2* La figura 2 muestra que en este caso F1 y F3 disminuyeron significativamente su viabilidad durante los 90 días, a diferencia de F2 que mantuvo la viabilidad significativamente constante durante todo el tiempo de almacenamiento.

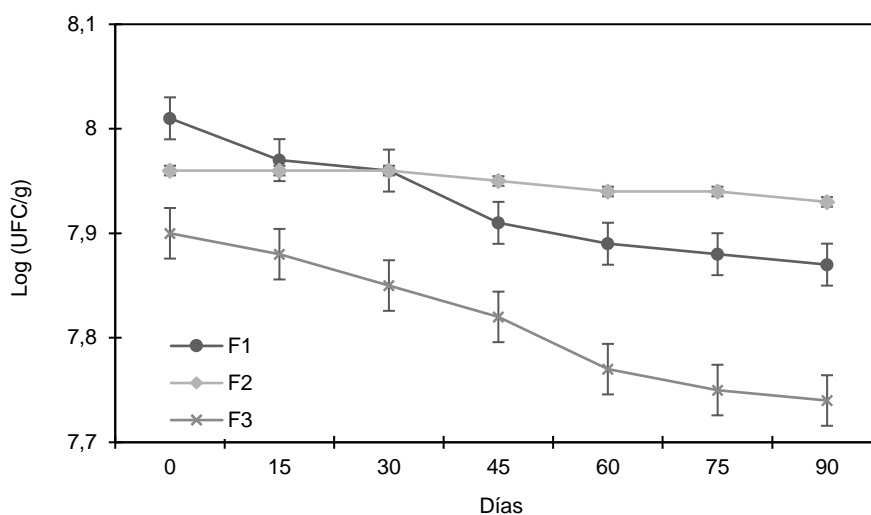


Fig. 1: Viabilidad de *Bacillus sp. 2* durante 90 días de almacenamiento con diferentes formulaciones encapsulantes.

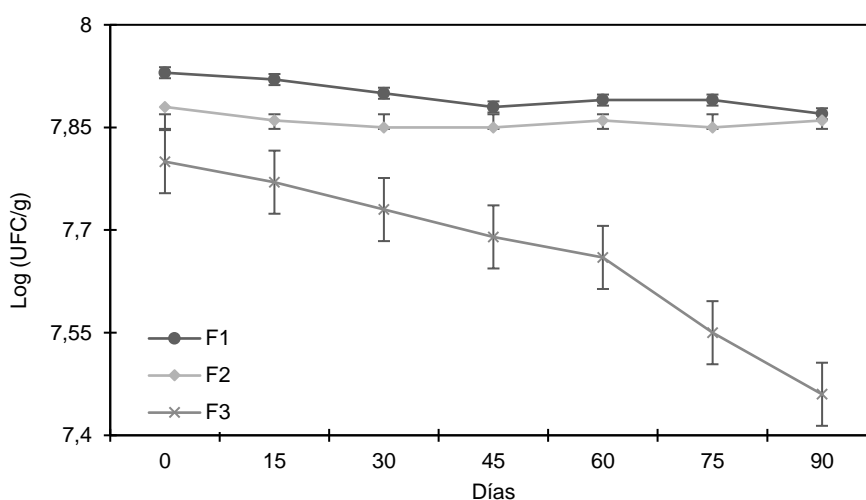


Fig. 2: Viabilidad de *Saccharomyces sp. 4* durante 90 días de almacenamiento con diferentes formulaciones encapsulantes

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Young et al. (1993), los cuales demostraron el efecto sinérgico de proteínas y carbohidratos para la microencapsulación de bacterias acidolácticas. Chavez et al. (2007) evaluaron diversas combinaciones de proteínas (proteína de soya, leche descremada) y carbohidratos (maltodextrina, trehalosa, sacarosa, lactosa, goma arábica), para la encapsulación de *Bifidobacterium lactis*, demostrando que la leche descremada ofrecía una buena protección solo si se mezclaba con un carbohidrato. Mientras que Semyonov et al. (2012), usando trehalosa y maltodextrina para la encapsulación de *L. paracasei*, mejoraron su estabilidad durante el almacenamiento, de igual manera, Fritzen et al. (2012) encontraron una alta supervivencia en un periodo de 180 días para *Bifidobacterium BB-12* encapsuladas con una mezcla de leche descremada y prebióticos como inulina y oligofruktosa.

La estructura de la morfología de las partículas de azúcar recubiertas con cada una de las formulaciones se muestra en la figura 3, donde se observa que la capa de revestimiento es homogénea con las tres formulaciones, además no se observa las partículas de azúcar, lo cual sugiere que existe una buena adhesión con el agente encapsulante, siendo muy positivo para las aplicaciones de partículas recubiertas, tal como lo sugiere Beekman (2000). Donde se observa diferencias es en relación a la estructura superficial, siendo F1 porosa y F3 quebradiza, en cambio con F2 la superficie de los cristales de azúcar se muestra más homogénea y mejor protegida, ésta sería la razón por la que el almacenamiento de F2 es más estable. Lian et al. (2002), mencionan que estructuras porosas facilitan el escape de calor desde el interior de la partícula, causando menos lesiones a los microorganismos encapsulados, por lo tanto esto puede ser una de las razones que contribuyeron a la mayor supervivencia después del secado de F1, pero al no estar bien protegidos a los efectos perjudiciales del oxígeno atmosférico y la humedad, aumenta las probabilidades de muerte o destrucción de las células en un posterior almacenamiento (Fatemeh et al. 2011; Semyonov et al., 2012).

Ademas, Pastuña-Pullutasig et al. (2016), mencionan que la obtención una superficie lisa compacta y libre de poros evita el contacto directo con el oxígeno, previniendo así su degradación y alargando su tiempo de vida útil. Sin embargo, algunos autores señalan que la supervivencia durante el secado, no necesariamente se relaciona con la supervivencia durante el almacenamiento (Chávez y Ledebøer, 2007; Kurtmann et al., 2009).

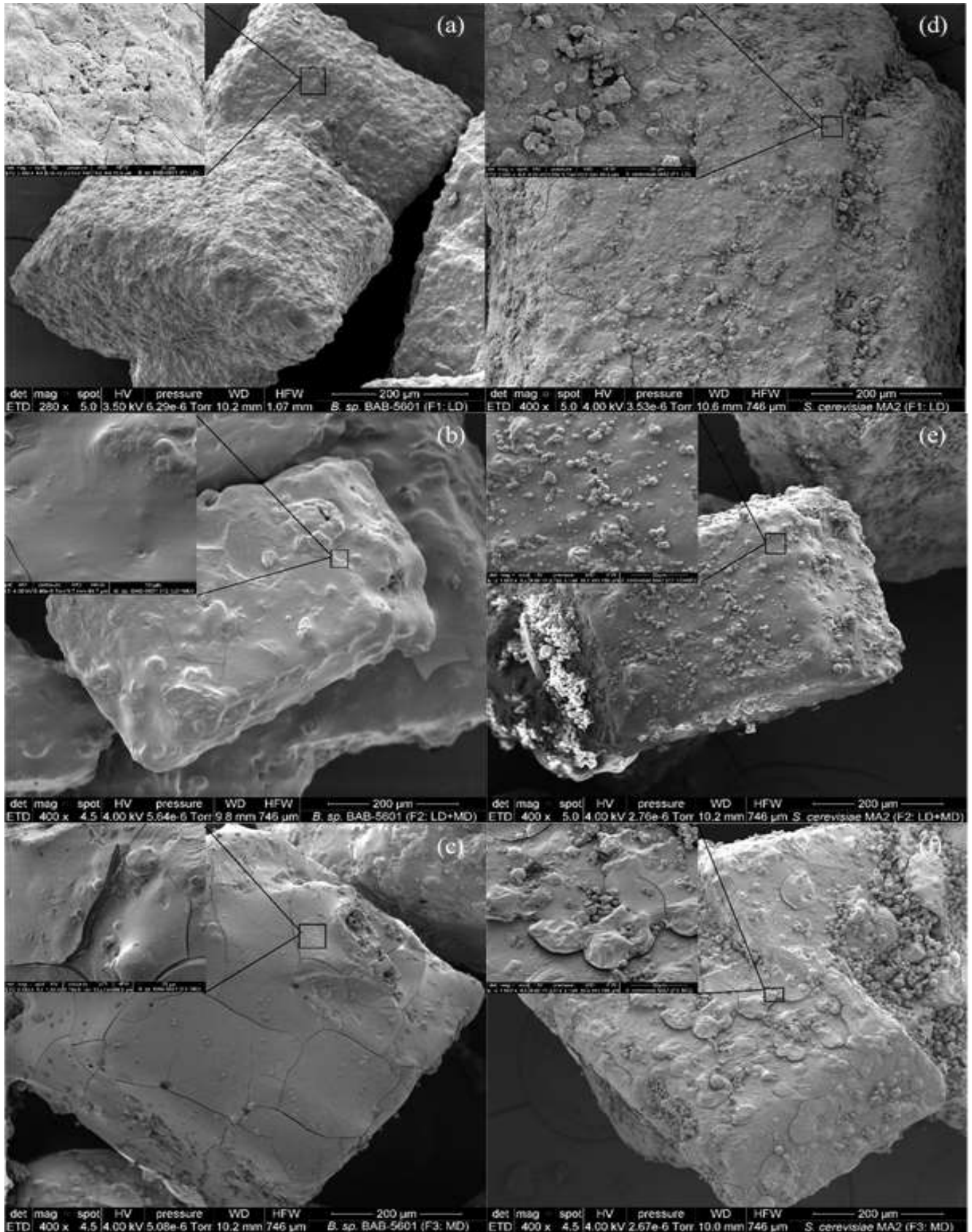


Fig. 3: Imágenes de MEB a 200 µm de los cristales de azúcar cubiertos por la formulación encapsulante. a) F1, (b) F2 y (c) F3 para *Bacillus sp. 2* y (d) F1, (e) F2 y (f) F3 para *Saccharomyces sp. 4*

A pesar de las diferencias significativas en el almacenamiento de las dos cepas probióticas con los distintos encapsulantes, se obtuvo un alto recuento de células viables en todas las formulaciones, las cuales se mantuvieron por encima de los niveles recomendados por la FAO (2001) que es entre 10^6 - 10^7 UFC/g de microorganismos viables para un alimento probiótico, durante los 90 días de almacenamiento, Kailaspathy y Chin (2000), señalan que esto es lo más importante para evaluar la aplicabilidad de un producto pulverizado.

CONCLUSIONES

La formulación de leche descremada y maltodextrina (F2), proporcionaron una protección mejorada en la estabilidad de las cepas probióticas durante el almacenamiento, además la evaluación individual de cada agente encapsulante, demostró que la presencia de leche descremada en las formulaciones encapsulantes ayuda a mejorar la protección de las células en dicho proceso, pero que la presencia de maltodextrina en estas formulaciones mejora la supervivencia de las cepas probióticas pulverizadas durante el almacenamiento a largo plazo. Además, mediante el método de secado por pulverización en lecho fluidizado, se obtuvieron altos porcentajes de viabilidad para las dos cepas después del proceso de secado, aportando así una nueva tecnología eficiente para la microencapsulación de microorganismos.

AGRADECIMIENTOS

La ejecución del estudio fue financiada por la empresa Camarones SAC y el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - Innóvate Perú.

REFERENCIAS

Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 17^a Ed., 17-18. AOAC International, Maryland, USA (2000)

Augustin, M. V. y Y. Hemar, Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. doi: 10.1039/b801739p, Chemical Society Reviews, 38(4), 902–912 (2009)

Beekman, W. J., Measurement of the Mechanical Strength of Granules, Ph.D. Thesis, Technische Universiteit Delft (2000)

Çabuk, B. y Ş. T. Harsa, Improved viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 during freeze-drying in whey protein-pullulan microcapsules. doi: 10.3109/02652048.2015.1017618, Journal of Microencapsulation, 32(3), 300–307 (2015)

Carvalho, A.S., J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata y P. Gibbs, Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.02.001, Inter. Dairy Journal, 14, 835–847 (2004)

Chávarri, M., I. Marañón y M. Villarán, Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria, In Probiotics, 1^a Ed., by E. Rigobelo, pp. 501–540, Intech, USA (2012)

Chávez, B.E. y A.M. Ledebøer, Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. <http://dx.doi.org/10.1080/07373930701438576>, Journal of Drying Technology, 25(7–8), 1193–1201 (2007)

Cornejo, S., Caracterización y domesticación de la flora microbiana del tracto digestivo del langostino *Litopenaeus vannamei* para la prevención de enfermedades bacterianas y el incremento de productividad, Contrato: 024-fincyt-pitea-2009 (En la web: <https://goo.gl/rkpLNA>, acceso: 21 de Agosto 2017) InnóvatePerú, Perú (2009)

Costa, E., N. Teixidó, J. Usall, V. Gimeno, J. Delgado e I. Viñas, Survival of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 in a spray-drying process. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-65.1.185>, Journal of Food Protection 65, 185-191 (2002)

Estevinho, B. N., F. Rocha, L. Santos y A. Alves, Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. doi: 10.1016/j.tifs.2013.04.001, Trends in Food Science and Technology, 31(2), 138–155 (2013)

FAO, Informe de la Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Argentina (2001)

- Fatemeh, S., S. Mustafa, A. Ariff y Y. Manap, Optimization of a cryoprotective medium and survival of freeze-dried *Bifidobacterium infantis* 20088 throughout storage, rehydration and gastrointestinal tract transit for infant formula probiotic applications. doi: 10.5897/AJMR11.319, African Journal of Microbiology Research, 5(21), 3373–3384 (2011)
- Frey, C., Fluid Bed Coating-Based Microencapsulation, In Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide, 1ª Ed., by Gaonkar, A., N. Vasisht, A. Khare y R. Sobel, pp. 65–80, USA (2014)
- Fritzen, C., B. Carlise y otros 10 autores, Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics doi: 10.1016/j.foodres.2011.09.020, Food Research International, 45(1), 306–312 (2012)
- Goderska, K., Different Methods of Probiotics Stabilization, In Probiotics, 1ª Ed., by E. Rigobelo, pp. 541-550, Intech, USA (2012)
- Golowczyc, M. A., C. L. Gerez, J. Silva, A.G. Abraham, G. L. De Antoni y P. Teixeira, Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. doi: 10.1007/s10529-010-0491-6, Biotechnology Letters, 33(4), 681–686 (2011)
- González-Cuello, R.E., J. Pérez-Mendoza y N.A. Urbina-Suarez, Efecto de la Microencapsulación sobre las Propiedades Reológicas y Físicoquímicas del Yogurt Blando. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642014000600007>, Inf. Tecnol., 25(6), 45–56 (2014)
- Gouin, S., Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. doi: 10.1016/j.tifs.2003.10.005, Trends in Food Science y Technology, 15(7–8), 330–347 (2004)
- Guijarro, B., I. Larena, P. Melgarejo y A. De Cal, Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia spp*, Biocontrol Science and Technology, 16(3), 257–269 (2006)
- Irianto, A. y B. Austin, Probiotics in aquaculture. doi: 10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x, J. Fish Dis. 25, 633-642 (2002)
- Kailaspathy, K. y J. Chin, Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp*. doi:10.1046/j.1440-1711.2000.00886.x, Immunol Cell Biol, 78, 80–88 (2000)
- Kailasapathy, K., Microencapsulation for Gastrointestinal Delivery of Probiotic Bacteria. In Nano- and Microencapsulation for Foods, 1ª Ed., by Kwak H, pp. 167–199, Wiley Blackwell, UK (2014)
- Kurtmann, L., C.U. Carlsen, L.H. Skibsted y J. Risbo, Water activity temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): influence of physical state on bacterial survival during storage. doi: 10.1002/btpr.96, Biotechnology Progress 25 (1), 265–270 (2009)
- Larena, I., A. De Cal, M. Liñan y P. Melgarejo, Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01860.x, Journal of Applied Microbiology, 94, 508–514 (2003)
- Lauzon, H. L., A. Dimitroglou, D. L. Merrifield, E. Ringø y S. J. Davies S. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. In Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics, 1ª Ed., by Merrifield, D y E. Ringø , pp. 169–185, Wiley Blackwell, UK (2014)
- Lian, W.C., H.C. Hsiao y C.C. Chou, Survival of bifidobacteria after spray-drying. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00733-4, International Journal of Food Microbiology, 74(1–2), 79–86 (2002)
- López, A., E. Sanchez, S. Wilkanowicz, Y. Sanz y J. M. Lagaron, Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.12.008, Food Hydrocolloids, 28(1), 159–167 (2012)
- Martín, M.J., F. Lara-Villoslada, M.A. Ruiz, y M.E. Morales, Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. doi: 10.1016/j.ifset.2014.09.010, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 27, 15–25 (2015)

- Montes, L., Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469), Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, Colombia (2013)
- Motte, E., D. Serpin, T. Vera, M. Valdez y E. Cayra, Domestication of gut microbiota can improve shrimp aquaculture, *Global Aquaculture Alliance*, 13(3), 58–60 (2010)
- Ninawe, A.S. y J. Selvin, Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. doi: 10.1080/10408410802667202, *Crit. Rev. Microbiol.*, 35, 43–66 (2009)
- Pastuña-Pullutasig, A., O. López-Hernández, Orestes, A. Debut, A. Vaca, E. Rodríguez-Leyes, R. Vicente, V. Gonzalez, M. González-Sanabia y F. Tapia-Hernández, Microencapsulación de aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante secado por aspersión. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62029>, *Rev. colomb. cienc. quim. farm.* 45(3), 422–437 (2016)
- Reddy, K.B.P.K., A.N. Madhu y S. G. Prapulla, Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. doi: 10.1111/j.1471-0307.2009.00480.x, *International Journal of Dairy Technology*, 62(2), 240–248 (2009)
- Reid, G., M.E. Sanders, H.R. Gaskins, G.R. Gibson, A. Mercenier, R. Rastall, M. Roberfroid, I. Rowland, C. Cherbut y T.R. Klaenhammer, New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. doi: 10.1097/00004836-200308000-00004, *J. Clin. Gastroenterol.*, 37, 105–118 (2003)
- Semyonov, D., O. Ramon, A. Kovacs, L. Friedlander y E. Shimoni, Air-suspension fluidized-bed microencapsulation of probiotics. doi: 10.1080/07373937.2012.708692, *Drying Technol.*, 30, 1918-1930 (2012)
- Schell, D. y C. Beermann, Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.016, *Food Research International*, 62(3), 308–314 (2014)
- Silva, J., R. Freixo, P. Gibbs y P. Teixeira, Spray-drying for the production of dried cultures. doi: 10.1111/j.1471-0307.2011.00677.x, *International Journal of Dairy Technology*, 64(3), 321–335 (2011)
- Silva, R.C., L. Finkler y C.L.L. Finkler, Microencapsulation of *Lactobacillus casei* by spray drying. <http://dx.doi.org/10.3109/02652048.2014.932026>, *Journal of Microencapsulation*, 2048(8), 759–767 (2014)
- Strasser, S., M. Neureiter, M. Gepl, R. Braun y H. Danner, Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04192.x, *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 167–177 (2009)
- Villamil, D. y M. A. Martínez-Silva, Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 38(2), 165–187 (2009)
- Xing, Y., Q. Xu, L. Jiang, D. Cao, H. Lin, Z. Che, Y. Ma, X. Li y Y. Cai, Effect of different coating materials on the biological characteristics and stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. doi: 10.1039/C4RA13578D, *RSC Adv.*, 5(29), 22825–22837 (2015)
- Young, S., X. Sarda y M. Rosenberg, Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of whey proteins with carbohydrates. doi: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77626-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77626-2), *J. Dairy Sci*76, 2878–2885 (1993)