



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

ÁREA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

T E S I S

**Evaluación del efecto probiótico de *Saccharomyces boulardii*
adaptado a un yogurt elaborado con inulina y aceite vegetal**

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a:

QFB. Eunice Tranquilino Rodríguez

Director de Tesis:

Doctor en Ciencias Héctor Eduardo Martínez Flores

Co-Director de Tesis:

Doctor en Ciencias José Octavio Rodiles López

Morelia, Michoacán, Marzo 2015

DEDICATORIAS

A Dios; por darme la oportunidad de vivir, por su gran amor y por haberme permitido llegar hasta esta etapa de gran satisfacción.

A mis padres; Teresa y Enrique porque gracias a su ejemplo, a su apoyo, a sus consejos, a sus oraciones, y a la inmensa motivación de superación constante, me han convertido en una persona de bien, no me alcanzará la vida para agradecerles todo lo que me han y me siguen dando ¡los quiero mucho!

Al amor de mi vida; Yamin, por el gran amor, comprensión, confianza y tranquilidad que me has brindado siempre y saber que estás y estarás toda la vida.

A mis hermanos; Kike y Kevin por estar a mi lado siempre; compartiendo toda clase de momentos, por crecer y formarnos juntos y saber que estamos para apoyarnos incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor E. Martínez, a quien admiro y respeto mucho le agradezco haberme dado la oportunidad y confianza para realizar este proyecto, por su apoyo incondicional y por su valiosa dirección para llegar a la conclusión de esta tesis.

Al Dr. J. Octavio Rodiles, por ser un gran guía el transcurso de este proyecto, sus valiosas sugerencias, gran apoyo y sobre todo paciencia por ser parte fundamental de este crecimiento como persona y como estudiante le agradezco mucho el haber compartido sus conocimientos.

Al Dr. Rosalío, al Dr. Salgado y al M.C. Rafael por la revisión cuidadosa que realizaron de este trabajo y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

A la empresa SI O SI ALIMENTOS S.A de C.V.; Al Ing. Geronimo el apoyo brindado para utilizar las instalaciones de la empresa, al Ing. Rafael por su gran apoyo en la utilización del equipo para liofilización, por sus comentarios y sugerencias para la realización de este trabajo y a todos los integrantes de la empresa muchas gracias por el apoyo brindado durante el proceso de liofilización.

A la empresa AarhusKarlsham México S.A de C.V.; a la Ing. Laura Calderón y a la Ing. Nereida Calderón por el apoyo y tiempo brindado en las determinaciones de perfil de ácidos grasos.

Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Q.F.B. de la U.M.S.N.H.; al Q.F.B. Ricardo Soria, a la Q.F.B. Karla G. Domínguez por facilitarme la cepa probiótica empleada en este trabajo.

Al Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Q.F.B. de la U.M.S.N.H.; a la M.C. Rosy García y a la M.C. Diana Maya, y a la Q.F.B. Gloria por permitirme el uso del equipo de laboratorio y por el material facilitado.

A Yvette por ser una amiga incondicional, por su apoyo constante en el laboratorio, por haber compartido pensamientos e ilusiones a lo largo de todo este tiempo, por estar conmigo en las buenas y en las malas dándome ánimos y aconsejándome ¡fue un placer volver a trabajar contigo! a Robe por el tiempo y dedicación al enseñarme el manejo de los animales (ratas) y ayudarme durante las determinaciones de las mismas, sin ti no hubiera sido posible, ¡muchísimas gracias por tu apoyo! por ser una gran amigo y contagiarme de tu ánimo y alegría por tus valiosos consejos y compartir tus conocimientos, a Anai por compartir esta experiencia juntas y por haber encontrado en ti un gran sostén a lo largo de todo este tiempo, muchas gracias por tu amistad y por todo lo que pasamos ¡siempre te estaré agradecida!

A la Dra. Martha por sus sugerencias y consejos para la mejora de este trabajo le agradezco mucho la orientación que me brindó y el impulsarme a la mejora constante.

Al QFB. Rodrigo y a la QF. Patricia por la orientación y accesibilidad que me brindaron resolviendo algunas de mis dudas de una manera sencilla.

A mis compañeros de laboratorio: que de una forma u otra me ayudaron y apoyaron siempre que lo necesite de una manera cordial, ya sea con un consejo, con su compañía o con orientación académica durante la realización de este trabajo: Susy, Gaby, Esther, Pedro, Janet, Xitlaly, Mariana, Diana, Gustavo, Yuli, Juan Carlos, Mary, Erendira, Jazz.

“Gracias a todas las personas que ayudaron directa o indirectamente en la realización de este trabajo”

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. YOGURT UN ALIMENTO FUNCIONAL	4
2.2. PROBIÓTICOS.....	5
2.2.1. <i>Saccharomyces boulardii</i>	9
2.3. MICROENCAPSULACIÓN	12
2.4. PREBIÓTICOS	14
2.4.1. INULINA	14
2.5. ÁCIDOS GRASOS	16
2.6. LIOFILIZACIÓN	18
2.7. VIDA DE ANAQUEL	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	22
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1. MATERIA PRIMA	23
6.2. MÉTODOS	23
6.2.1. MICROENCAPSULACIÓN DE <i>Saccharomyces boulardii</i>	23
6.2.2. ELABORACIÓN DEL YOGURT	25
6.2.3. LIOFILIZACIÓN DEL YOGURT	26
6.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS LIOFILIZADOS	27
6.2.5. VIDA DE ANAQUEL.....	28
6.2.6. CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DEL ALIMENTO <i>in vivo</i>	31
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1. MICROENCAPSULACIÓN DE <i>Saccharomyces boulardii</i>	34

8.1.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA	34
8.1.2. MICROENCAPSULACIÓN.....	37
8.2. ELABORACIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.....	38
8.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS LIOFILIZADOS	40
8.3.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO	40
8.3.2. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL.....	44
8.3.3. ANÁLISIS SENSORIAL.....	47
8.4. VIDA DE ANAQUEL	48
8.4.1. HUMEDAD	48
8.4.2. PH.....	49
8.4.3. ACIDEZ.....	50
8.4.4. COLOR	51
8.4.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	53
8.5. CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DEL ALIMENTO <i>in vivo</i>	57
9. CONCLUSIONES	64
10. REFERENCIAS	65
11. ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Beneficios de Agentes Probióticos	7
Tabla 2. Mecanismos de Acción de Agentes Probióticos	9
Tabla 3. Clasificación Taxonómica de <i>S. boulardii</i>	10
Tabla 4. Escala Hedónica para Análisis Sensoriales.	28
Tabla 5. Especificaciones Microbiológicas para el Yogurt de acuerdo a la NMX-F-444-1983.	29
Tabla 6. Tratamientos Administrados.	32
Tabla 7. Viabilidad de <i>S. boulardii</i> antes y después de la Microencapsulación.....	37
Tabla 8. Viabilidad de Levaduras presentes en los Productos Liofilizados.	39
Tabla 9. Contenido de Humedad antes y después del Proceso de Liofilizado	40
Tabla 10. Determinación de Color en las Formulaciones de Yogurt.	41
Tabla 11. Determinación de pH y Acidez de las Formulaciones de Yogurt.	42
Tabla 12. Propiedades de Polvos Instantáneos Elaborados.	43
Tabla 13. Análisis Químico Proximal de las Formulaciones de Yogurt.	44
Tabla 14. Perfil de Ácidos Grasos.	46
Tabla 15. Análisis Sensorial de las Formulaciones de Yogurt.....	48
Tabla 16. Morfología Colonial de las Levaduras Aisladas en Agar Papa Dextrosa.	58
Tabla 17. Identificación de Levaduras por Asimilación de Azúcares.....	59
Tabla 18. Recuperación de la Levadura <i>S. boulardii</i> en Heces.....	62
Tabla 19. Recuperación de la Levadura <i>S. boulardii</i> en Colon.....	62
Tabla 20. Recuperación de la Levadura <i>S. cerevisiae</i> en Heces.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Concentración y distribución de los diferentes microorganismos en los segmentos del tracto gastrointestinal humano.	6
Figura 2. Esquema de los mecanismos de acción de los probióticos.	8
Figura 3. Efectos fisiológicos de <i>Saccharomyces boulardii</i>	11
Figura 4. Estructura de las microcápsulas	13
Figura 5. Estructura química de la inulina.	15
Figura 6. Etapas del proceso de liofilización	18
Figura 7. Microcápsulas con <i>S. boulardii</i>	24
Figura 8. Yogurt elaborado.....	25
Figura 9. Yogurt antes y después de la liofilización.....	27
Figura 10. Empaque de los yogures liofilizados.	30
Figura 11. Jaulas metabólicas utilizadas durante el estudio.	31
Figura 12. Administración del antibiótico y del yogurt en ratas con cánula intragástrica a los diferentes grupos en estudio.	32
Figura 13. Cinética de crecimiento medida por turbidez (DO_{620}) a 25°C/150 rpm durante 72 h en los medios de cultivo CN y CDS	34
Figura 14. Variación del pH durante el crecimiento de <i>S. boulardii</i> a 25°C/150 rpm durante 72 h en los medios de cultivo CN y CDS	35
Figura 15. Curva de crecimiento de células viables de <i>S. boulardii</i> a 25°C/150 rpm durante 72 h en los medios de cultivo CN y CDS	36
Figura 16. Microfotografía electrónica de barrido de las cápsulas conteniendo <i>Saccharomyces boulardii</i>	38
Figura 17. Comparación de color de los productos fresco, liofilizado y rehidratado.	41
Figura 18. Comparación del contenido de ácidos grasos insaturados	47
Figura 19. Variación de humedad en función del tiempo	49
Figura 20. Variación de pH en función del tiempo.....	50
Figura 21. Variación de la acidez titulable en función del tiempo	51
Figura 22. Variación del color “L” en función del tiempo	52
Figura 23. Variación del color “coordenada b” en función del tiempo.....	52
Figura 24. Viabilidad de levaduras en función del tiempo	54
Figura 25. Viabilidad de las bacterias lácticas en función del tiempo.....	55
Figura 26. Levaduras aisladas del colon y heces de ratas alimentadas con las diferentes formulaciones de yogurt.	57

ÍNDICE DE UNIDADES Y ABREVIATURAS

°C: grado(s) Celcius

%: tanto por ciento

µm: micrómetro(s)

AAK: AarhusKarlshamn

a.C. : antes de Cristo

AC: adenilato ciclasa

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

AL: ácido linoleico

ALN: Ácido linolénico

AO: Ácido oleico

atm: atmósfera(s)

B. bifidum: Bifibobacterium bifidum

CDH: enfermedad coronaria

C. difficile: Clostridium difficile

CDS: caldo dextrosa sabouraud

Cl: cloruro

CN: caldo nutritivo

cm: centímetro(s)

D1: día 1

D3: día 3

D5: día 5

D7: día 7

DO₍₆₂₀₎: densidad óptica ₍₆₂₀₎

g/día: gramo(s) por día

g: gramo(s)

g/L: gramo(s) por litro

HDL: Lipoproteína de alta densidad

h: hora(s)

IgAs: Inmunoglobulina A secretora

K: grados kelvin

kDa: kilodalton

L1: Levadura 1

L2: Levadura 2

L. acidophilus LC1: Lactobacillus acidophilus LC1

L. acidophilus NCFM: Lactobacillus acidophilus NCFM

L. bulgaricus: Lactobacillus bulgaricus

L. casei: Lactobacillus casei

LDL: Lipoproteína de baja densidad

L. jonsonii LA1: Lactobacillus jonsonii LA1

Log UFC/mL: Logaritmo de unidades formadoras de colonia por mililitro

Log UFC/g: Logaritmo de unidades formadoras de colonia por gramo

L. plantarum: Lactobacillus plantarum

LPS: Lipopolisacáridos

L. rhamnosus GG: Lactobacillus rhamnosus GG

L. reuteri: Lactobacillus reuteri

mg/ml: miligramo(s) por mililitro

min: minuto(s)

mm: milímetro(s)

mm de Hg: milímetro(s) de mercurio

n=3: número de repeticiones igual a tres

n-3: omega 3

n-6: omega 6

O/W: aceite en agua

pH: potencial hidrogeno

PF= producto fresco

PL= producto liofilizado

PR: producto rehidratado

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

rpm: revoluciones por minuto

S.A. de C.V: Sociedad Anónima de Capital Variable

Sb: Saccharomyces boulardii

S. boulardii: Saccharomyces boulardii

S. cerevisiae: Saccharomyces cerevisiae

SFA: ácidos grasos saturados

S. termophilus: Streptococcus termophilus

TC: Toxina del cólera

UFC/g: unidades formadoras de colonia por gramo

UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro

UMSNH: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

W/O: agua en aceite

RESUMEN

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen un componente con actividad selectiva beneficiosa a la salud humana. El yogurt es un alimento mundialmente consumido debido a sus efectos positivos en la digestión, atribuida a su contenido de microorganismos probióticos vivos, ácido lácticos. En la presente investigación se elaboraron dos formulaciones de yogurt a base del probiótico *S. boulardii*, el prebiótico inulina y aceite vegetal alto en ácidos grasos insaturados, en el primero *S. boulardii* fue adicionado en forma de células libres; y en el segundo en forma microencapsulada. Estos productos se sometieron a un proceso de liofilización por 24 h manteniendo una temperatura de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ y 3 mmHg de presión, en donde la viabilidad del *S. boulardii* no fue afectada. Los alimentos liofilizados fueron caracterizados químicamente, fisicoquímicamente y sensorialmente, en todas las mediciones realizadas los parámetros estuvieron dentro de lo establecido por las Normas Mexicanas e Internacionales. La evaluación de la vida de anaquel acelerada a 35°C por 21 días, mostró que la viabilidad de *S. boulardii* microencapsulada se incrementó en 1.77-Log UFC/g a diferencia de cuando se encuentra en forma de células libres, incrementando la vida de anaquel del producto. Los alimentos fueron sometidos a un proceso de digestión *in vivo* usando ratas Wistar macho de 60 días de nacidas, donde se evaluó la viabilidad de *S. boulardii* en heces y en colon. Se evaluaron grupos con flora microbiana normalmente equilibrada presente en el tracto gastrointestinal y grupos con flora microbiana dañada por el antibiótico ampicilina. La evaluación tras la ingesta de los alimentos mostró que solo cuando la flora del tracto gastrointestinal fue afectada por ampicilina, la *S. boulardii* presente en los alimentos se recuperó en heces y en colon, cuando se consumió la levadura tanto en forma de células libres como microencapsulada. Estos resultados muestran que *S. boulardii* resistió pH gástrico, acción de sales biliares y enzimas digestivas y debido a que la levadura logró instalarse en el tracto gastrointestinal, se considera como un alimento probiótico.

Palabras clave: alimento funcional, microencapsulación, liofilización, vida de anaquel acelerada y tracto gastrointestinal.

ABSTRACT

Functional foods are those containing a component to human health beneficial selective activity. Yogurt is a food globally consumed because of its positive effects on digestion, attributed to its content of live, lactic acid probiotic microorganisms. In this study, two formulations based yogurt *S. boulardii* probiotic, the prebiotic inulin and vegetable oil high in unsaturated fatty acids, were developed the first *S. boulardii* was added as free cells; and the second in microencapsulated form. These products were subjected to a freeze-drying process for 24 h maintaining a temperature of $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ and 3 mmHg pressure, wherein *S. boulardii* viability was not affected. The freeze-dried foods were characterized chemically, physicochemically and sensory, in all measurements were within the parameters established by the Mexican and International Standards. Assessing accelerated shelf life at 35°C for 21 days showed that the viability of *S. boulardii* increased microencapsulated 1.77-Log CFU/g unlike when in the form of free cells, increasing the shelf life of product. The foods were subjected to a process of *in vivo* digestion using male Wistar rats 60 days old, where the viability of *S. boulardii* in feces and colon were evaluated. Groups balanced microbial flora normally present in the gastrointestinal tract and microbial flora groups damaged evaluated antibiotic ampicillin. The evaluation after food intake showed that only when the flora of the gastrointestinal tract was affected by ampicillin, *S. boulardii* in foods was recovered in feces and colon, when yeast is consumed both as free cells as microencapsulated. These results show that *S. boulardii* resisted gastric pH, bile salts and action of digestive enzymes and because the yeast achieved installed in the gastrointestinal tract, is considered as a probiotic food.

Keywords: functional food, microencapsulation, lyophilization, accelerated shelf life and gastrointestinal tract.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de alimentos funcionales constituye una oportunidad real para mejorar la calidad de la dieta y seleccionar alimentos que afecten positivamente la salud del consumidor. Un alimento funcional contiene en su formulación una o más sustancias que generan bienestar a la salud humana. Algunos agentes funcionales que se encuentran en el mercado son: I) Probióticos. *Lactobacilos* y *bifidobacterias* que mejoran la función intestinal; II) Prebióticos. Fructooligosacáridos que favorecen el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas. III) Ácidos grasos. Omega 3 que reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores y los Omega 6 que mantienen la piel saludable y aseguran una adecuada coagulación de la sangre (Ramírez, 2010).

Los microorganismos probióticos se incorporan cada vez más en los alimentos como complementos alimenticios con el propósito de beneficiar a la salud humana; éstos son típicamente *lactobacilos* o *bifidobacterias* (Lourens y Viljoen, 2001). Levaduras como *Saccharomyces boulardii* también son comercializadas como probióticos (Martins *et al.*, 2007) debido a que muestran características como resistencia a la acidez gástrica y a la proteólisis y puede almacenarse rápidamente en grandes cantidades en el tracto gastrointestinal, manteniendo niveles constantes en forma viable, interactuando con la microflora intestinal residente y mucosa (Buts, 2005).

Debido a los beneficios de los probióticos para la salud estos han sido incorporados en una gran variedad de productos lácteos, incluyendo el yogurt. En alimentos funcionales probióticos la viabilidad de los microorganismos se ve afectada por factores medioambientales (Ranadheera *et al.*, 2010) siendo la microencapsulación una tecnología muy utilizada para proteger sustancias activas mediante una barrera física que puede favorecer la supervivencia de los microorganismos (Semyonov *et al.*, 2010) debido a que los probióticos tienen una vida útil limitada en el yogurt convencional. La liofilización es un proceso que no sólo conserva el yogurt, sino también ayuda a mantener una cantidad suficiente de probióticos viables (Capela *et al.*, 2006). Dentro de los ingredientes funcionales también se encuentran agentes prebióticos, que son compuestos que no son absorbidos o hidrolizados durante su tránsito por el aparato digestivo, hasta llegar al colon, donde sirven como sustratos estimulando el crecimiento y/o actividad metabólica de los probióticos, dentro de los prebióticos se encuentra la inulina (Xu *et al.*, 2003). A su vez los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico (omega 6) y el ácido linolénico (omega 3) son clasificados como ingredientes

funcionales, estos ácidos grasos esenciales se incorporan a los alimentos debido a que su consumo está relacionado con la disminución de triglicéridos y colesterol en sangre, además intervienen en el desarrollo temprano del cerebro, en la visión, entre otros beneficios, estos ácidos grasos se encuentran mayormente en los aceites vegetales (Aires *et al.*, 2005).

El yogurt tiene gran aceptación a nivel mundial debido a las características probióticas de las bacterias lácticas que contiene y puede servir como vehículo para adicionarle probióticos, prebióticos y sustituir la grasa de la leche, incrementando el valor funcional del alimento. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue elaborar un yogurt liofilizado adicionado con inulina, sustituyendo grasas de la leche por un aceite vegetal, además de un agente probiótico, la levadura *Saccharomyces boulardii* en forma de células libres o microencapsulada, y evaluar su efecto en un modelo biológico.

2. ANTECEDENTES

2.1. YOGURT UN ALIMENTO FUNCIONAL

Se cree que el yogurt se descubrió por accidente, por Mesopotámicos, alrededor del año 5000 a.C. (Kosikowski y Mistry, 1997). Durante este tiempo los pastores ordeñaban cabras y ovejas, llevaban con ellos la leche en bolsas hechas del estómago de un animal, que contenían enzimas naturales llamadas quimosinas, que formaban un gel o coágulo cuando se añadían a la leche. Teniendo en cuenta que el clima era cálido en esta parte del mundo y en ese momento eran las únicas condiciones de almacenamiento disponibles y debido a la presencia de "cultivos iniciadores naturales" en la leche, se hacía, ya sea yogurt o queso, la fermentación comenzaba en unas pocas horas. Estas personas notaron que este producto de leche agria tendía a mantenerse y prefirieron el sabor del yogurt al de la leche fresca. También se dieron cuenta de los beneficios de comer el yogurt y más tarde, algunos observadores escribieron acerca de vivir una vida larga y saludable, con el consumo frecuente de este producto fermentado (Andrews, 2000).

El científico ruso Elie Metchnikoff, postuló que el consumo de las bacterias que intervenían en la fermentación del yogurt contribuía al mantenimiento de la salud

mediante la supresión de las bacterias putrefactivas de la microbiota intestinal y que está era la causa de la longevidad de los campesinos búlgaros, grandes consumidores de yogurt. Se ha comprobado que el consumo de yogurt con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* reducen los síntomas de intolerancia a la lactosa, contribuyendo al prestigio de un producto que, durante varias décadas, solo se adquiría en farmacias y que se empleaba para prevenir o aliviar trastornos tan diversos como la diarrea, estreñimiento, colitis mucosa, colitis ulcerativa crónica, cistitis o dermatitis (Tribby, 2001).

En la última década del siglo XX comenzaron a desarrollarse nuevos conceptos en nutrición, como fruto de los nuevos estilos de vida en la sociedad desarrollada y la preocupación por una elevada calidad de vida, lo que promovió la aparición del término “alimento funcional”. De esta forma, los alimentos que son capaces de modificar la flora intestinal, derivándose en consecuencias positivas en la salud del individuo, pueden considerarse como funcionales.

El consumo de yogurt con *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* reducen síntomas de intolerancia a la lactosa, cuando la concentración bacteriana sea superior a 10^8 UFC/mL de yogurt (Salminen *et al.*, 1996). Estos efectos se deben a la presencia de la enzima beta-galactosidasa de origen microbiano en el yogurt, que se encuentra protegida de la secreción gástrica por la pared bacteriana y que es posteriormente liberada en el intestino delgado donde ejerce su acción (Tribby, 2001). Por otra parte, se ha demostrado que tras el consumo en adultos de 250 g/día de yogurt, al tercer día se aumenta la población fecal de *S. thermophilus*; cuando cesa el aporte de yogurt, se produce una disminución gradual del microorganismo en heces, justificándose el carácter probiótico de estas bacterias, al encontrarse presentes en heces (Torres, 2009).

2.2. PROBIÓTICOS

Los probióticos son microorganismos que sobreviven a secreciones gástricas, biliares y pancreáticas, se adhieren a células epiteliales y colonizan el intestino humano (Piano *et al.*, 2006). Se estima que cada individuo alberga unos 100 mil millones de bacterias de unas 400 especies distintas, en conjunto esta población viva del colon puede alcanzar hasta 400 o 500 g (Guarner, 2002). En la Figura 1 se muestran los microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal humano.

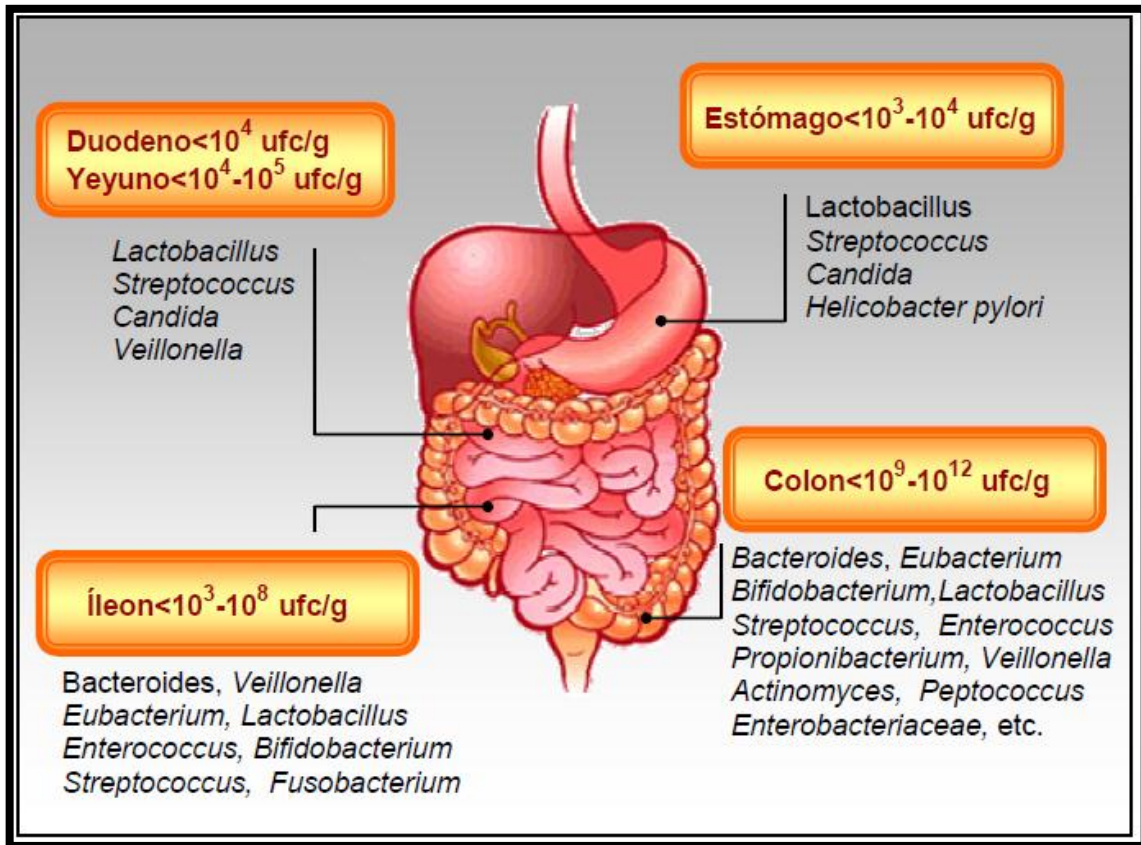


Figura 1. Concentración y distribución de los diferentes microorganismos en los segmentos del tracto gastrointestinal humano (Arribas, 2009).

Los cambios en la flora intestinal se ven afectados por el envejecimiento, estrés, dieta, drogas, contaminación bacteriana y estreñimiento. Así, el consumo diario de productos probióticos se recomienda para la buena salud y la longevidad. Hay numerosas aplicaciones terapéuticas de bacterias probióticas en seres humanos, para el mantenimiento de la microflora intestinal, mejora del estreñimiento y del sistema inmune, tratamiento de la diarrea, reducción de la intolerancia a la lactosa de los niveles de colesterol en suero, la actividad anticancerígena y un mejor valor nutricional de los alimentos (Kailasapathy y Chin, 2000; Lourens y Viljoen, 2001).

Los probióticos son microorganismos vivos que al administrarse en cantidades de 1×10^7 UFC/mL, confieren beneficios de salud al huésped (FAO/WHO, 2001). Estos deben cumplir con: I) Ser de origen humano. No obstante, también se han utilizado probióticos de otras fuentes como *Saccharomyces cerevisiae*; II) Poseer tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal, como pH gástrico, enzimas digestivas y acción de las sales biliares; III) Colonizar el intestino en un tiempo

corto de replicación y adherirse a la mucosa intestinal para modular la respuesta inmune, así como excluir microorganismos patógenos. El mecanismo por el que los probióticos actúan, puede implicar la modificación del pH intestinal, antagonizando patógenos al producir agentes antimicrobianos y antibacterianos, competir por el sitio de unión de patógenos, así como por los nutrientes disponibles y factores de crecimiento, estimulando las células inmunomoduladoras y produciendo lactasa (Kopp, 2001). En la Tabla 1 se presentan algunos beneficios en la salud de los probióticos.

Tabla 1. Beneficios de Agentes Probióticos (Amores *et al.*, 2004).

MICROORGANISMO	EFEECTO BENEFICIOSO
<i>L. acidophilus</i> LC1	Equilibrio de la flora intestinal, efecto en el sistema inmunitario
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Reducción de la actividad de enzimas pro-cancerígenas
<i>L. jonsonii</i> LA1	Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras
<i>L. rhamnosus</i> GG	Inmunoestimulador, diarrea, inflamación del intestino
<i>L. bulgaricus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa
<i>L. casei</i>	Promotor del crecimiento y de viabilidad de probióticos
<i>B. bifidum</i>	Diarrea por rotavirus, equilibrio de la microbiota
<i>S. thermophilus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa
<i>S. boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis

En la Figura 2 se muestra el beneficio de los probióticos en el hospedero, en la Tabla 2 se muestra el mecanismo de acción de algunos probióticos y como se muestra no todos los probióticos ejercen los mismos efectos, existiendo una gran variabilidad inmunológica entre especies, e incluso entre cepas pertenecientes a la misma especie (Amores *et al.*, 2004).

La mayor parte de los probióticos comercializados para consumo humano son bacterias lácticas. Sin embargo, el consumo de microorganismos probióticos eucariontes como las levaduras puede presentar interesantes ventajas. Por un lado, resultan resistentes a antibióticos, por otro, las levaduras presentan, en general, mayor resistencia a cambios ambientales bruscos, que las bacterias

láticas, así como menores requerimientos nutricionales lo que reduce los costos en los procesos de producción (Pardo *et al.*, 2009).

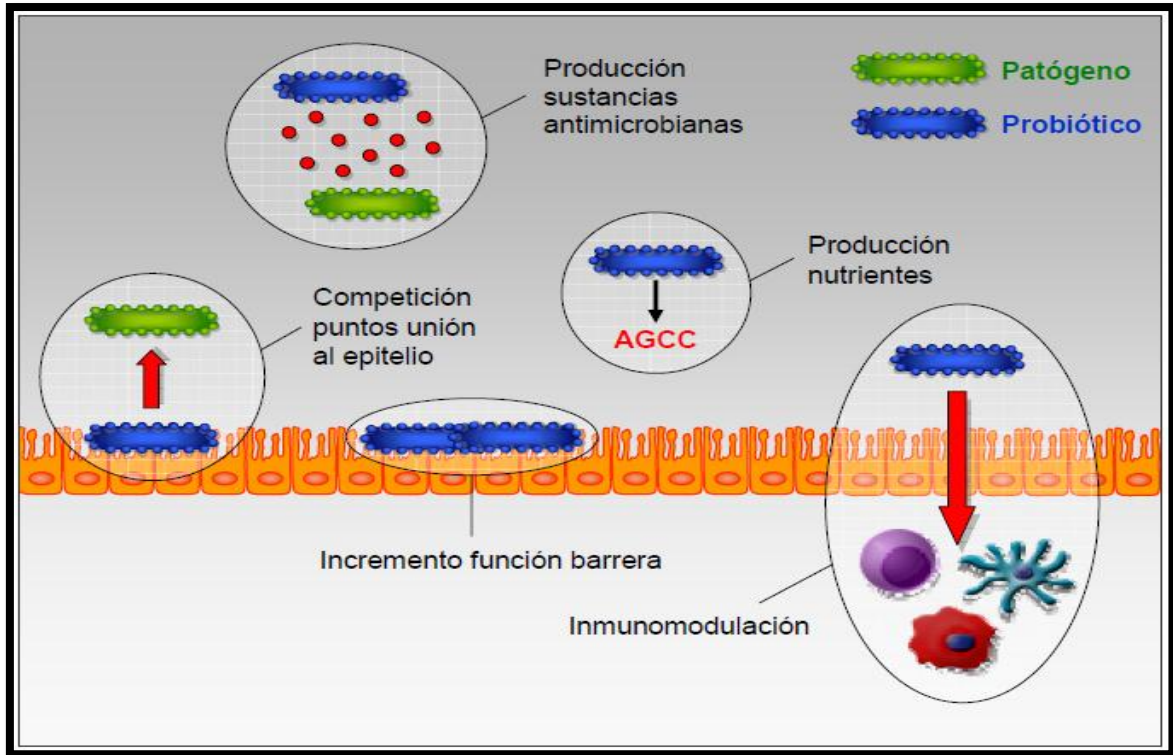


Figura 2. Esquema de los mecanismos de acción de los probióticos (Arribas *et al.*, 2008).

Tabla 2. Mecanismos de Acción de Agentes Probióticos (Amores *et al.*, 2004).

ACCIÓN	MECANISMO	EJEMPLO
Prevención de la colonización por microorganismos patógenos	Bloqueo de receptores específicos (adherencia) y competencia por nutrientes.	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. paltarum</i> , <i>S. boulardii</i> .
Actividad antimicrobiana	Producción de sustancias antimicrobianas: H ₂ O ₂ , bacteriocinas, ácidos orgánicos.	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>S. boulardii</i> .
Inmuno-moduladora	Regulación de la respuesta inmunitaria humoral y celular.	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>L. reuteri</i> .
Actividad enzimática	Disminución en la actividad de enzimas asociadas con la síntesis de lactosa, pro-carcinógenos, etc.	<i>S. thermophiles</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> .

2.2.1. *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii es una levadura natural no modificada genéticamente aislada de la corteza del árbol del litchi en Indochina. Es una célula elipsoidal, oval o esférica cuya pared tiene una estructura de polisacáridos, mientras que el citoplasma contiene aminoácidos, vitaminas del complejo B, enzimas, entre otros. Su clasificación taxonómica (Zamora, 2011) se muestra en la Tabla 3.

S. boulardii es utilizado como un microorganismo probiótico ya que a medida que recorre el tracto gastrointestinal, genera efectos farmacodinámicos semejantes a los efectos fisiológicos de la flora intestinal normalmente equilibrada (Buts, 2005). Estudios muestran que *S. boulardii* induce protección contra agentes patógenos entéricos (Mumy *et al.*, 2007), modula la respuesta inmune del huésped (Ozkan *et al.*, 2007), disminuye la inflamación, inhibe toxinas bacterianas (Tasteyre *et al.*, 2002) e incrementa las enzimas de la membrana del borde en cepillo y transportadores de nutrientes (Buts *et al.*, 1994).

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de *S. boulardii* (Zamora, 2011).

<i>S. boulardii</i>	
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Sacharomycotina
Clase	Sachcaromycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Sachcaromycetaceae
Género	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>S. boulardii</i>

En la Figura 3 se muestra el efecto fisiológico atribuido a esta levadura (Vidon *et al.*, 1986; Czerucka *et al.*, 1989; Czerucka *et al.*, 1994). Acorde a la misma, tenemos que:

- A. *S. boulardii* (Sb) aumenta la concentración de la Inmunoglobulina A secretora (IgAs) en el lumen intestinal y la expresión de las enzimas de membrana en el borde en cepillo. El aumento de su expresión parece correlacionarse con una secreción de las poliaminas en el catabolismo de la levadura.
- B. La toxina del cólera (TC) cuando se une a la superficie celular del epitelio intestinal induce a la adenilato ciclasa (AC) y la expresión resultante es una secreción de cloruro (Cl) con aparición de una diarrea acuosa con una concentración de electrolitos similar a la plasmática. *S. boulardii* produce una proteína de 120 kDa, que participa en la regulación de (AC) que resulta en una disminución de la secreción de cloruro.
- C. *S. boulardii* produce una proteinasa de 54 kDa, que ejerce una actividad proteolítica en las toxinas A y B de *Clostridium difficile* causante de colitis. Además, esta levadura produce una proteína fosfatasa de 63 kDa que desfosforila los lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli enteropatógena*, inhibiendo así la toxicidad su endotoxina, que es la causante de diarrea aguda.

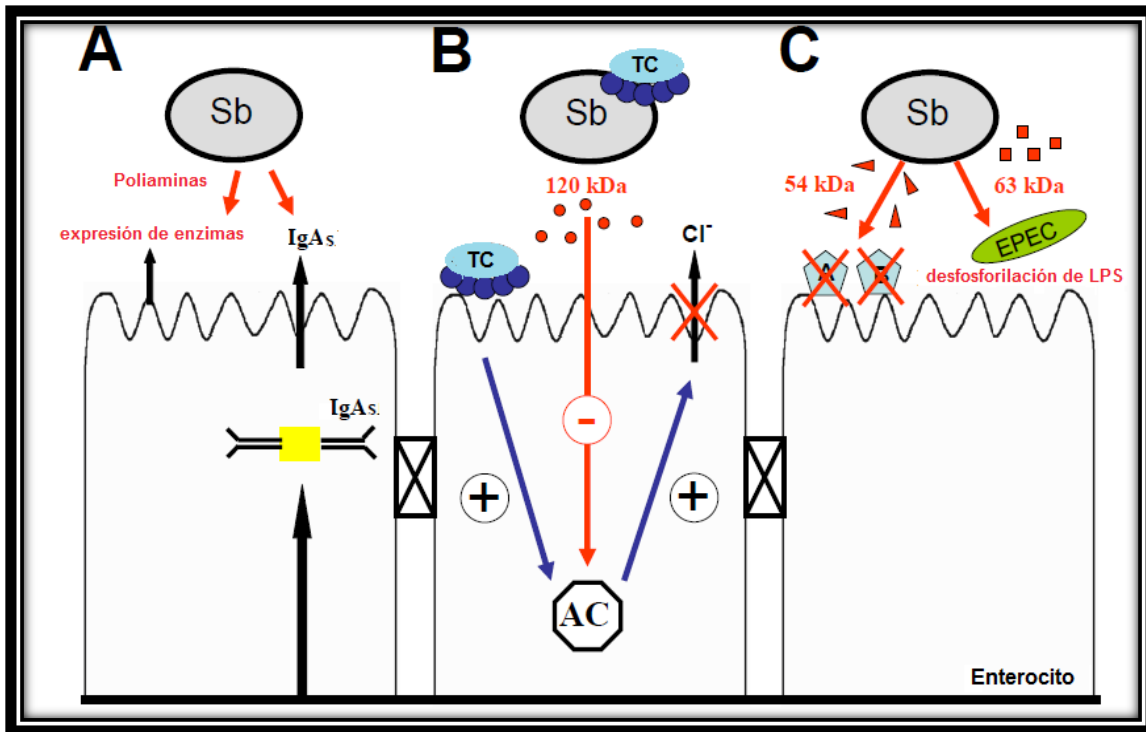


Figura 3. Efectos fisiológicos de *Saccharomyces boulardii* (Zanello *et al.*, 2009).

A. Efectos de *S. boulardii* en infecciones intestinales

Se ha evaluado el efecto de la administración oral de *S. boulardii* en varios patrones de infección y/o colonización gastrointestinal por diferentes microorganismos.

Clostridium difficile

La administración de *S. boulardii* reduce la mortalidad por colitis provocada por *Clostridium difficile* en hámsteres tratados con clindamicina (Toothaker y Elmer, 1984) y ratones inoculados oralmente ya sea con *Clostridium difficile* (Corthier *et al.*, 1986) o directamente con toxinas A y B producidas por esta bacteria.

Escherichia coli

En el modelo de diarrea inducida por la bacteria *Escherichia coli* productora de enterotoxinas termoestables en ratones jóvenes, la administración concomitante de una suspensión de *S. boulardii* produjo un efecto inhibitorio importante en la hipersecreción intestinal (Massot *et al.*, 1984).

Como se ha mencionado *S. boulardii* es clínicamente eficaz en la prevención y tratamiento de la enteritis infecciosa y *C. difficile* asociada a enteropatías (Surawicz *et al.*, 2000). La eficacia de *S. boulardii* se correlaciona con las concentraciones levadura viable en heces, en pacientes con la enfermedad de *C. difficile* recurrente (Elmer *et al.*, 1999). Además de su uso como un agente antidiarreico, estudios sugieren que *S. boulardii* también muestran efectos beneficiosos en otras patologías intestinales como la enfermedad de Crohn (Guslandi *et al.*, 2003).

La forma comercializada de la levadura está disponible como un polvo liofilizado. Sin embargo, para que estos microorganismos ejerzan sus efectos benéficos, tienen que sobrevivir el tránsito gastrointestinal y llegar vivos a su sitio de acción. Bléhaut *et al.* (1989) han demostrado que la viabilidad de liofilizado *S. boulardii* es mínima por vía oral en el hombre y en la rata y que menos del 1% de las levaduras vivas administradas por vía oral son recuperadas en las heces. La microencapsulación es una alternativa para mejorar la viabilidad de los probióticos en los alimentos, así como en condiciones gastrointestinales (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

2.3. MICROENCAPSULACIÓN

La muerte de las células de los probióticos en los productos alimenticios durante almacenamiento e incluso a temperaturas de refrigeración, da como consecuencia la demanda industrial de tecnologías que garanticen la estabilidad de los probióticos en los alimentos, lo que conduce al desarrollo de la tecnologías donde se realice la inmovilización de células, para producir un aumento en la resistencia de las células probióticas a factores de estrés ambiental (Doleyres y Lacroix, 2005).

Uno de los métodos más utilizados para la conservación de las propiedades fisicoquímicas de sustancias químicas es la microencapsulación, la cual se define como una técnica en la que gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa (Araneda y Valenzuela, 2009). Esta película está generalmente hecha de componentes que crean una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas (Fuchs *et al.*, 2006).

Las microcápsulas pueden presentar una amplia variedad de estructuras, 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). Ver Figura 4.

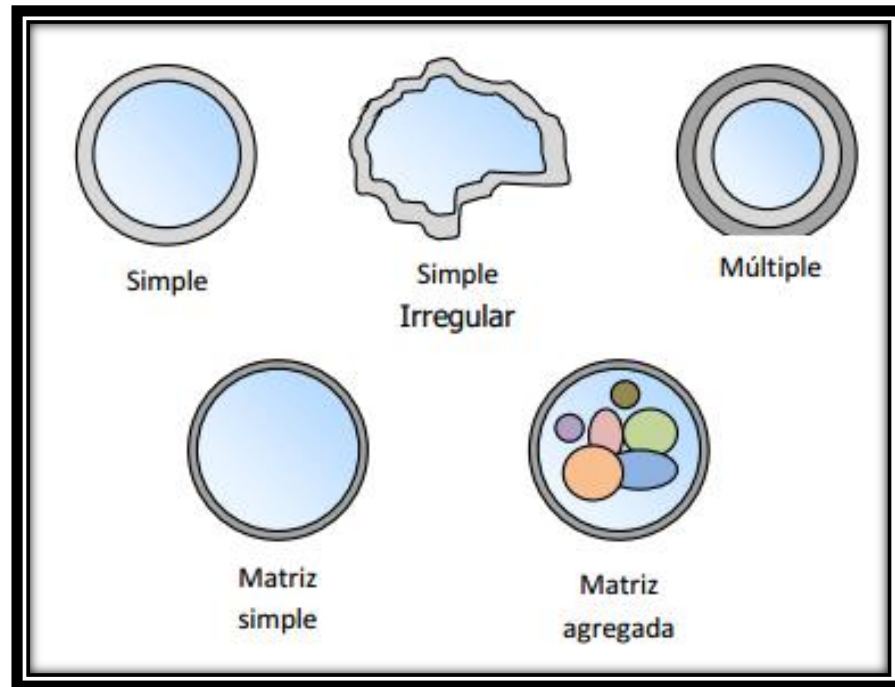


Figura 4. Estructura de las microcápsulas (Zamora, 2011).

Las matrices poliméricas se utilizan principalmente para proteger los probióticos contra el bajo pH y altas concentraciones biliares, pero también facilitar la manipulación, las técnicas de emulsificación y extrusión se aplican para producir perlas esféricas de polímeros que van de 0.3 a 3 mm de diámetro (Krasaekoopt *et al.*, 2003). La estabilidad durante el almacenamiento de las microesferas obtenidas por estos métodos se puede mejorar mediante secado por fluidización o secado por congelación utilizando aditivos crioprotectores como la leche desnatada con o sin 5% de sacarosa y/o 0.35% de ácido ascórbico (Goderska y Czarnecki, 2008).

2.4. PREBIÓTICOS

Los prebióticos son componentes que no son absorbidos o hidrolizados durante su tránsito por el aparato digestivo y sirven de sustrato a las bacterias beneficiosas, estimulando su crecimiento y/o su actividad metabólica, alterando la microbiota intestinal de manera favorable para el hospedador e inducen efectos beneficiosos no sólo en el medio intestinal, sino también sistémicos. Para clasificar a un ingrediente alimenticio como prebiótico debe cumplir tres requisitos: a) resistir la acidez gástrica, la hidrólisis por las enzimas digestivas de los mamíferos y la absorción gastrointestinal; b) ser fermentado selectivamente por un número limitado de microorganismos potencialmente beneficiosos, localizados principalmente en el colon, estimulando su crecimiento y/o actividad metabólica; c) alterar la microbiota del colon hacia una composición más saludable, incrementando la población de especies sacarolíticas y reduciendo la población de especies patógenas (Gibson *et al.*, 2004).

2.4.1. INULINA

La inulina es un carbohidrato no digerible presente en diversos vegetales, frutas y cereales. A nivel industrial se extrae de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*) y se utiliza como ingrediente en alimentos funcionales. Por otro lado, en la familia *Agavaceae* (agaves) se han encontrado diversas estructuras de fructanos, como en el *Agave americano*, donde la inulina fue identificada como principal carbohidrato de reserva. Los tallos del *Agave Vera-cruz* y *Agave tequilana* almacenan una mezcla compleja de fructooligosacáridos, inulinas, neoserias de inulinas y fructanos ramificados (Ulloa *et al.*, 2010).

La inulina y sus derivados son generalmente llamados fructanos y están constituidos básicamente por cadenas lineales de fructosa con una molécula terminal de glucosa (Madrigal y Sangronis, 2007). En la Figura 5 se observa la estructura química de la inulina, donde se muestra A: con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil); B: con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil).

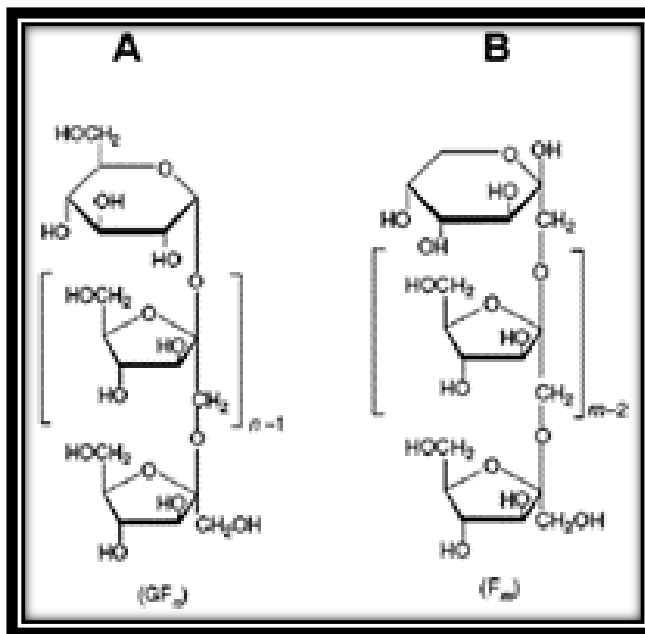


Figura 5. Estructura química de la inulina (Madrigal y Sangronis, 2007).

Los fructanos tipo inulina tienen una serie de efectos beneficiosos cuando se incluyen en la dieta, tanto en el hombre como en animales, sobre la composición y actividad de la microflora intestinal, la producción de heces, la absorción de calcio y otros minerales, la inmunidad y resistencia a infecciones y la homeostasis lipídica. Además, estos carbohidratos también reducen el riesgo de infecciones intestinales, la enfermedad inflamatoria intestinal, el cáncer de colon, la osteoporosis y la obesidad. Estos efectos beneficiosos se han atribuido a su propia característica estructural química y a sus propiedades fermentativas (Roberfroid, 2007).

Los enlaces β-glucosídicos de los fructanos tipo inulina son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas de los mamíferos y las aves, que sólo hidrolizan los enlaces α-glucosídicos, impidiendo su absorción a través de la pared intestinal, y llegando, por tanto, intactos al intestino grueso (Niness, 1999).

Los fructanos tipo inulina pueden ser considerados carbohidratos no digeribles y, por tanto, parte de la fibra dietética. Sin embargo, su influencia sobre la función intestinal no es atribuible a sus propiedades físico-químicas, como ocurre con otros componentes de la fibra dietética, sino a sus efectos fisiológicos y a sus propiedades fermentativas específicas (Roberfroid, 2007).

Una vez en el intestino grueso, los fructanos fermentan por acción de la microbiota intestinal dando lugar a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como los ácidos acéticos, propiónico, butírico, y el ácido láctico, que se absorben fácilmente en el colon y alcanzan la circulación sistémica (sólo el 5-10% se excreta en las heces). En general, la concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico está en relación 60:20:20, pero como consecuencia de la fermentación de los fructanos se modifica a favor del ácido butírico, el más activo fisiológicamente. Este incremento en los AGCC produce una disminución del pH que da lugar a una reducción de bacterias proteolíticas de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, entre las que se pueden encontrar algunas especies patógenas, así como de *Escherichia coli*. Al mismo tiempo, se aprecia un aumento del número de bacterias intestinales sacarolíticas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* que, generalmente, se han asociado con efectos beneficiosos para la salud. Es decir, el proceso de fermentación de los fructanos en el colon es selectivo, pues se altera la microbiota hacia una composición más saludable (Xu *et al.*, 2003).

El efecto prebiótico de la inulina depende de varios factores, especialmente de la composición de la flora intestinal de cada individuo. Cuanto menor es la cantidad de bífidos en dicha flora, mayor es el efecto. Debido a esta variabilidad individual, no se puede establecer una relación directa entre la ingesta de inulina y el incremento de bífidos, ni definir una dosis de validez general (Roberfroid, 2005). No obstante, estudios *in vivo* muestran que solo 4 g de inulina/día son efectivos para incrementar el número de bacterias beneficiosas en el colon (Madrigal y Sangronis, 2007).

2.5. ÁCIDOS GRASOS

Durante los últimos años, los cambios en las dietas y los estilos de vida derivados de la industrialización, la urbanización, el desarrollo económico y la globalización del mercado han aumentado rápidamente, especialmente en los países en vías de desarrollo, donde se están produciendo grandes cambios socioeconómicos. Si bien se ha observado una mejora general del estándar de vida, ésta ha venido acompañada de hábitos alimentarios no saludables y de un nivel de actividad física insuficiente para mantener un equilibrio de energía óptimo y un peso saludable. El resultado neto ha sido el aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta en todos los grupos

socioeconómicos, las cuales constituyen actualmente la principal causa de mortalidad y discapacidad a nivel mundial (FAO y FINUT, 2012).

Las grasas y los aceites son alimentos fundamentales en la dieta, que además de constituir la principal fuente de energía para el organismo, aportan elementos indispensables como vitaminas liposolubles, ácidos grasos esenciales, esteroides precursores de hormonas, entre otros, y además, son responsables de la palatabilidad y aroma de los alimentos (Gil y Sánchez, 2010).

Tanto las grasas como los ácidos grasos deben considerarse nutrientes clave que afectan con el tiempo al crecimiento, el desarrollo inicial y las enfermedades crónicas. Por ejemplo, los ácidos grasos linolénico (n-3) y linoleico (n-6) son nutrientes esenciales y también, como parte del aporte dietético de grasa, afectan a la prevalencia y gravedad de las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, el cáncer y la disminución funcional vinculada a la edad (FAO y FINUT, 2012).

Kinsell *et al.* (1952) fueron los primeros en reportar que la sustitución de grasa animal por aceite vegetal en la dieta de humanos producía una disminución en la concentración de colesterol en suero. La acción hipocolesterolémica e hipotriglicéridémica del ácido linoleico en humanos se confirmó por varios grupos de investigación, observándose que el consumo de este ácido graso disminuía la concentración de triglicéridos y colesterol en un 50% en sujetos hiperlipidémicos.

Es por ello que sustituir los ácidos grasos saturados (SFA) (C12:0-C16:0) por ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) disminuye la concentración de la lipoproteína de baja densidad (LDL), la cual se encarga del transporte del colesterol del hígado a los tejidos a través de las arterias y cuando esta fracción se encuentra en exceso se puede acumular en arterias y favorecer la arteriosclerosis además estos ácidos grasos poliinsaturados son conocidos por incrementar la concentración de la lipoproteína de alta densidad (HDL) que se encarga de recolectar el colesterol de la tejidos y llevarlo al hígado para su excreción, y con ello retirar el colesterol de arterias, evitando así que se acumule. Al sustituir los SFA por ácidos grasos monoinsaturados se consigue un efecto similar pero menor. La sustitución de SFA por PUFA disminuye el riesgo de enfermedad coronaria (CHD). Por tanto la ingesta dietética recomendada de grasa total en adultos es de 20-35% de un 100% de calorías, que incluyen: 10% de ácidos grasos saturados, 6-11% de ácidos grasos poliinsaturados (2.5-9% de ácido linoleico n-6 y 0.5-2% del ácido linolénico n-3 y la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados se obtiene por diferencia (FAO y FINUT, 2012).

2.6. LIOFILIZACIÓN

La industria alimentaria en todo el mundo produce millones de toneladas de polvos instantáneos cada año, ya que reducen costos de transporte y almacenamiento mediante la eliminación de agua de los productos y también se utilizan para fines industriales. Se fabrican con tecnologías como el secado por pulverización, secado en tambor y secado por congelación. La liofilización o el secado por congelación es un método de desecación que elimina el agua mediante la congelación del producto húmedo y posteriormente la sublimación del hielo en condiciones de baja presión. La liofilización se produce por debajo del punto triple del disolvente (agua), para evitar el paso por la fase líquida. El punto triple es aquel en el que coexisten en el equilibrio agua líquida, agua sólida y agua vapor, y se produce a 0.006 atm de presión (4.56 mmHg) y a 273.16 K de temperatura (0.16°C) (Moreno *et al.*, 2011).

Básicamente es un proceso que se realiza en tres etapas (Figura 6):

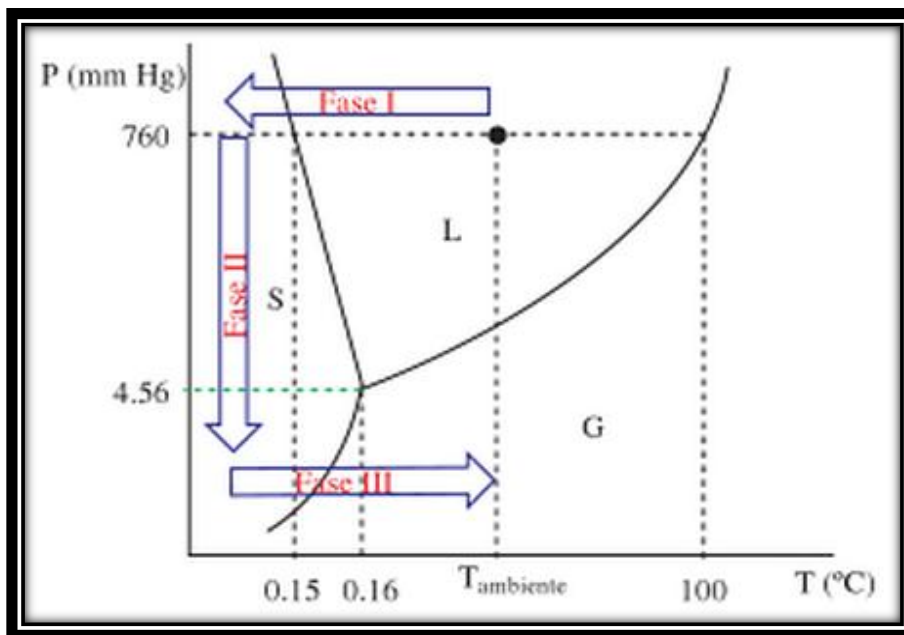


Figura 6. Etapas del proceso de liofilización (Moreno *et al.*, 2011).

Fase I: Congelación completa de la disolución o del producto a liofilizar. Consiste en el enfriamiento de la muestra a presión constante, por debajo de la temperatura de fusión del agua (273.15 K o 0.15°C).

Fase II: Fase de vacío. Exposición de la muestra a un vacío manteniendo constante la temperatura, con el fin de situar al sistema por debajo de la presión del punto triple (4.56 mmHg).

Fase III: Sublimación del disolvente. Aumento de la temperatura a presión constante, con el objetivo de sublimar la muestra y eliminar el disolvente.

En los últimos años ha aumentado el interés en el desarrollo de polvos altamente funcionales, tales como ingredientes tecnológicos y biofuncionales que requieren buena solubilidad en agua fría en un tiempo relativamente corto y el mantenimiento de la integridad de los componentes en polvo. Por lo tanto, mejorar la funcionalidad de los polvos y en particular las características de rehidratación, está teniendo importancia crítica, por lo que la liofilización resulta un método de deshidratación adecuado ya que los productos obtenidos son de disolución rápida, ya que al sublimar el hielo deja una red de poros en los que el agua penetra fácilmente (Moreno *et al.*, 2011).

Los productos liofilizados suelen tener un contenido de humedad menor al 5 %, y al rehidratar estos productos liofilizados se obtienen productos parecidos a los originales con un valor nutritivo y cualidades sensoriales similares a los del alimento fresco, si se comparan con otras técnicas de secado (Barbosa y Vega, 2000). Sumado a esto los probióticos liofilizados son muy estables durante el almacenamiento, especialmente a bajas temperaturas y en una atmósfera inerte (nitrógeno o al vacío). Hay que tener en cuenta que la liofilización es una tecnología muy cara; sin embargo, el secado por congelación es uno de los métodos de secado menos nocivos para los probióticos y por lo tanto es utilizado más a menudo para secarlos y también como un estándar para comparar con otros de técnicas de secado. La mayoría de los probióticos liofilizados sólo proporcionan la estabilidad durante el almacenamiento y no se presenta o está limitada en el tracto gastrointestinal (Zuidam y Nedović, 2010).

2.7. VIDA DE ANAQUEL

Un estudio de vida de anaquel consiste en seguir a través del tiempo la calidad del producto hasta que ésta llegue a niveles inaceptables, que incluye sus propiedades fisicoquímicas, organolépticas, microbiológicas, nutricionales entre otras. Para las compañías de alimentos, la capacidad de un producto de conservar su calidad total durante la línea de proceso, distribución, comercialización y

finalmente al consumidor, es el resultado de los intensos estudios para predecir su vida útil. Crear un producto con una vida útil fiable exige varios procesos y controles por el fabricante del alimento (Chica y Osorio, 2003).

Los factores fundamentales que influyen en la vida de anaquel de un alimento son:

- Formulación
- Procesamiento
- Empaque
- Condiciones de Almacenamiento.

En muchos casos la vida útil es el periodo de tiempo durante el cual el producto permanece en buenas condiciones de venta, éste es un juicio que debe llevar a cabo el fabricante o el vendedor del producto. El fabricante debe definir la calidad mínima aceptable del producto, la cual dependerá del grado de degradación que el fabricante permita en el producto antes de que decida no venderlo (Esperriela, 2010).

La vida útil o estabilidad durante el almacenamiento, se determina bajo condiciones de manejo y almacenamiento, que simulan las que el producto experimentará durante su manipulación y distribución. Ya que las pruebas de estabilidad durante el almacenamiento pueden requerir un año o más para que sean significativas, es frecuente diseñar experiencias que aceleren dichas condiciones, lo que se consigue incrementando la temperatura, humedad y otras variables con lo que se modifica la calidad del alimento en un tiempo más corto. Los métodos acelerados de la estimación de la durabilidad son útiles para disminuir el tiempo dedicado a los ensayos de estimación cuando se están estudiando productos no perecederos. El objetivo de este método es almacenar los productos terminados, bajo condiciones de abuso, examinar el producto periódicamente hasta que ocurra el final de la vida de anaquel y entonces usar estos resultados para proyectar la vida de anaquel bajo condiciones de verdadera distribución (Chica y Osorio, 2003).

Los estudios que implican el uso de altas temperaturas son utilizados para conocer las pérdidas de calidad del alimento, y la extrapolación de los resultados a las condiciones normales de almacenamiento utilizando ecuaciones como la de variación de la velocidad de reacción cada $10^{\circ}\text{C}:\text{Q}10$, debido a que el factor $\text{Q}10$ se utiliza para la determinación de la utilidad alimentaria, este se define como el número de veces que el deterioro del alimento se acelera o disminuye

dependiendo de si la temperatura aumenta o disminuye 10 grados centígrados (Esperriella, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos funcionales es cada vez más frecuente, ya que se les atribuye una gran cantidad de beneficios a la salud, inherentes a los nutricionales; sin embargo, este efecto benéfico debe de ser evaluado y autenticado para que el etiquetado del alimento sea fidedigno. *Saccharomyces boulardii* es una levadura considerada como un probiótico, ya que podría tratar o prevenir enfermedades gastrointestinales asociadas por ejemplo al consumo de antibióticos para contrarrestar la diarrea, enfermedades asociadas a *Clostridium difficile* recurrente, la diarrea del viajero y la diarrea aguda en niños. Así mismo, el yogurt es considerado un alimento funcional tipo “probiótico”, debido a que su contenido bacteriano ayuda a evitar algunos problemas estomacales e intestinales. En este proyecto se pretende formular un yogurt con aceite vegetal e inulina y adicionar la levadura *S. boulardii* microencapsulada e implementar la deshidratación por liofilización, como medio de conservación. Al evaluarse la viabilidad de la levadura, *in vivo*, se podría justificar el carácter probiótico del yogurt liofilizado, desarrollando así, un alimento funcional que va a mejorar la calidad de la dieta del consumidor y ayudar a prevenir una gran variedad de problemas intestinales. Sumado a esto, su vida de anaquel será mayor, en comparación con otros productos lácteos y por tanto puede tener un gran impacto en el mercado.

4. HIPÓTESIS

El yogurt liofilizado suplementado con inulina, aceite vegetal y el probiótico *Saccharomyces boulardii*, al ser sometido a un proceso de digestión *in vivo*, presentará características probióticas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar dos formulaciones funcionales de yogurt liofilizado que contengan aceite vegetal, inulina y la levadura *Saccharomyces boulardii*; el primero con la levadura en forma de células libres y el segundo en forma microencapsulada, así como evaluar el efecto probiótico *in vivo* usando ratas Wistar como modelo biológico.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Incorporar *S. boulardii* en forma de células libres o microencapsulada a un yogurt que contenga inulina y aceite vegetal.
- Liofilizar y caracterizar química, físico-químicamente y sensorialmente las formulaciones de yogurt.
- Evaluar la vida de anaquel acelerada a 35°C de los productos liofilizados.
- Determinar la presencia de la levadura probiótica *in vivo*, en colon y heces, tras la ingesta ambas formulaciones de yogurt liofilizados que incluyen a *S. boulardii*, inulina y aceite vegetal.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIA PRIMA

Se utilizó leche Silhouette® con 0.2% de grasa. El cultivo láctico fue *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus salvarius* subespecie *thermophilus* de la empresa Danisco®. El probiótico *S. boulardii* fue proporcionado por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). La inulina usado proviene del *Agave tequilana* subespecie Weber variedad azul, ésta tiene un 97% de inulina y un 3% de fructosa, proporcionada por el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. El sustituto de grasa de la leche es un aceite vegetal de palma, proporcionada por la empresa AarhusKarlshamn S.A. de C.V. ubicada en Morelia, Michoacán, México.

6.2. MÉTODOS

6.2.1. MICROENCAPSULACIÓN DE *Saccharomyces boulardii*

A. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

La levadura *S. boulardii* se inoculó en Caldo Nutritivo (BIOXON®) y Caldo Dextrosa Sabouraud (BIOXON®). La suspensión de levaduras se ajustó inicialmente a un patrón de turbidez igual a 1 (Patrón Mac Farland) en 10 mL de Caldo Nutritivo y Caldo Dextrosa Sabouraud, respectivamente. Las levaduras se incubaron a 25°C con agitación constante a 150 rpm durante 72 h.

Se realizaron curvas de crecimiento para la levadura en los dos medios de cultivo, los tiempos evaluados fueron: 0, 12, 24, 36, 48, 56 y 72 h; se midió absorbancia a 620 nm en un Espectrofotómetro (marca Unico® modelo UV2100PU, USA), el pH fue medido en un potenciómetro en base a la NMX-F-317 y se realizó un conteo en placa de la levadura en los diferentes tiempos de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994.

B. MICRO ENCAPSULACIÓN

La microencapsulación del microorganismo se realizó mediante una adaptación de la técnica de emulsión agua en aceite propuesta por Zamora (2011), la cual está basada en la formación de una emulsión de agua en aceite (W/O); que

consistió en preparar 100 mL de una dispersión (fase acuosa) de la formulación de hidrocoloides (0.05% de inulina, 0.05% de mucílago de nopal y 1% de alginato), adicionando la biomasa obtenida por centrifugación, resultado del crecimiento de la cepa pura de *S. boulardii* en Caldo Dextrosa Sabouraud.

Posteriormente, a la mezcla se agregó 0.5 g de CaCO_3 ; y de manera separada se mezclaron 200 mL de aceite de canola (Canoil®) con 2.5 mL de Tween 80 (fase oleosa). En agitación constante la fase acuosa se adicionó a la fase oleosa, permitiendo la formación de la emulsión W/O; y en seguida se agregaron 40 mL del mismo aceite, mezclado con 1.7 ml de ácido acético glacial para iniciar el proceso de gelificación. Este sistema se mantuvo en agitación durante 20 min hasta la completa formación de las cápsulas y posteriormente se dejó reposar por 30 min. Finalmente se decantó y filtró. Las cápsulas se lavaron con agua destilada estéril y dos veces con una solución buffer de fosfatos (pH = 7.2) para eliminar los residuos de aceite. Las microcápsulas obtenidas se observan en la Figura 7. Se evaluó la viabilidad de la levadura *S. boulardii* antes y después del proceso de microencapsulación, para la cuantificación de la levadura se utilizó la técnica acorde a la NOM-111-SSA1-1994 y para la cuantificación del microorganismo microencapsulado, se desintegraron las microcápsulas, con el pistilo de un agitador de vidrio estéril (Yañez, 2002) y se siguió la técnica anteriormente mencionada Estas microcápsulas se agregaron a la bebida funcional para su posterior análisis.



Figura 7. Microcápsulas con *S. boulardii*.

Adicionalmente, las microcápsulas obtenidas se liofilizaron en la empresa SI O SI Alimentos S.A. de C.V. y fueron observadas mediante microscopía electrónica

de barrido. En una placa de latón se colocó una lámina de carbón donde se depositaron las microcápsulas. Las muestras se metalizaron con cobre en condiciones de vacío y se introdujeron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-7600F SEG-SEM, se observó su morfología y su tamaño.

6.2.2. ELABORACIÓN DEL YOGURT

Se elaboró el alimento funcional tipo yogurt de la siguiente manera: se mezcló la leche Silluette® en porcentaje de 88.075% con inulina 4.0%, aceite vegetal 2.3%, mono y diglicéridos 0.5%, grenetina 0.125% y sacarosa 5%. Posteriormente se realizó la agitación y pasteurización a 63°C/30 min, se dejó enfriar a aproximadamente 4°C, y se adicionó el cultivo láctico (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*) a una concentración de 0.03 g/L y se incubó por 6 h a 43°C, se agitó y se enfrió a 4°C, ver Figura 8, a esta formulación se le denominó F1.



Figura 8. Yogurt elaborado.

La formulación elaborada contenía aceite vegetal como sustituto de grasa de la leche e inulina, así como mono y diglicéridos y grenetina, que lograron estabilizar el producto evitando la pérdida de la emulsión (O/W) y previniendo la sinéresis, respectivamente.

Se elaboraron dos productos más a partir de la formulación de yogurt F1, al primero se le adicionó la levadura *S. boulardii* (células libres), en forma de biomasa al 0.5% y al segundo la levadura fue incorporada de manera microencapsulada al 20% de volumen conteniendo 0.5% de biomasa.

Los ingredientes de los tres productos elaborados se presentan a continuación:

- **F1** = Yogurt con inulina + aceite vegetal (Control)
- **F2** = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* libre
- **F3** = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* microencapsulada

6.2.3. LIOFILIZACIÓN DEL YOGURT

La liofilización de los productos se llevó a cabo en la empresa SI O SI ALIMENTOS S.A. de C.V. ubicada en Morelia, Michoacán, México. Las formulaciones F1, F2 y F3 se liofilizaron bajo las siguientes condiciones:

- Congelado del producto. Se llevó a cabo durante 5 h donde se alcanzó una temperatura final de -20°C .
- Sublimación. Se llevó a condiciones de vacío a 3 mmHg (0.0039 atm) de presión.
- Secado. Se controló el proceso para que la temperatura del producto estuviera a $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, el tiempo total de secado fue de 24 h.

Durante las etapas del proceso de liofilizado se evaluó la viabilidad de *S. boulardii*. Para la cuantificación de *S. boulardii* en forma de células libres se utilizó la técnica acorde a la NOM-111-SSA1-1994 y para la cuantificación del microorganismo microencapsulado, se desintegraron las microcápsulas contenidas en el alimento, con el pistilo de un agitador de vidrio estéril (Yañez, 2002) y se siguió la técnica anteriormente mencionada. Se determinó la humedad de los productos antes y después de someterlos al proceso de liofilización por el Método de la AACC (2000). En la Figura 9 se observa el yogur fresco antes de liofilizarlo y el producto deshidratado después de liofilizarlo.



Figura 9. Yogurt antes y después de la liofilización.

6.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS LIOFILIZADOS

Una vez obtenidos los yogures liofilizados se realizaron los siguientes análisis:

A. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

- pH. Método potenciométrico (NMX-F-317).
- Acidez medida en función del ácido láctico. Titulación ácido-base (NMX-F-511-1988).
- Color. Medido por un colorímetro Hunter Lab Modelo Colorflex No. de serie CX0795 clave 00010211.
- Solubilidad. Método de propuesto por Cano *et al.* (2005); Shittu y Lawal (2007).
- Humectabilidad. Método estático modificado y descrito por Freuding *et al.* (1999) y Kim *et al.* (2002).

B. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

- Humedad, cenizas, extracto etéreo y proteínas por los métodos de la AACC (2000).
- Carbohidratos. Por diferencia de 100 menos la suma de humedad, cenizas, extracto etéreo, proteínas y fibra dietética.
- Perfil de ácidos grasos. El aceite vegetal AAK fue extraído por el método (AACC, 2000) a partir de los yogures liofilizados. Se cuantificó el perfil de ácidos grasos por el Método CHEM32, por Cromatografía de Gases.

Para ello se usó una columna de la marca Agilent Technologies®, técnica realizada en la empresa Aarhuskarlshamn (AAK) ubicada en Morelia, Michoacán, México.

C. ANÁLISIS SENSORIAL

Se realizaron pruebas panel para detectar el grado de aceptación en los parámetros de color, olor, sabor y textura en los productos liofilizados, después de rehidratarlos (3 partes de agua: 1 parte de liofilizado). Se aplicó una prueba afectiva a 15 panelistas no entrenados, utilizando una escala hedónica de cinco puntos como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Escala Hedónica para Análisis Sensoriales.

ESCALA HEDÓNICA	
Me gusta mucho	5
Me gusta	4
Ni me gusta ni me disgusta	3
Me disgusta	2
Me disgusta extremadamente	1

6.2.5. VIDA DE ANAQUEL

Los estudios de vida de anaquel acelerada se basaron en el concepto de Q_{10} , donde se señala que un aumento de 10°C a una determinada temperatura aumenta 2 veces la velocidad de reacción, incluyendo en este caso las reacciones de deterioro de alimentos almacenados. Los estudios de vida de anaquel acelerada incluyeron como variables de respuesta tanto pruebas fisicoquímicas como microbiológicas. La prueba se llevó a cabo durante 21 días a 35°C . Considerando que la temperatura ambiente estándar es de 25°C , una temperatura de 35°C tendrá un Q_{10} de 2 unidades.

- A 25°C el valor de $Q_{10} = 1$ Temperatura ambiente estándar.
- A 35°C el valor de $Q_{10} = 2$ $1 \text{ día} = 4 \text{ días } (2)^2$

Se evaluaron 21 días a 35°C , equivalentes a 84 días a 25°C .

A. PRODUCTOS A EVALUAR (PRODUCTOS LIOFILIZADOS):

- **F1** = Yogurt con inulina + aceite vegetal (Control)
- **F2** = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* libre
- **F3** = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* microencapsulada

Se ajustó la cantidad de *S. boulardii* a 7 Log UFC/g para realizar este estudio en las formulaciones F2 (0.0 5% de biomasa) y F3 (20% de microcápsulas).

B. PERIODO DE MUESTREO:

Días: 0, 3, 6, 9, 13, 17, 21

Análisis Fisicoquímicos

Se midió humedad por el método AACC (2000). El pH se midió con un potenciómetro siguiendo el método de la NMX-F-317. La acidez titulable por el método de la NMX-F-511-1988. El color fue medido por un colorímetro de reflectancia Hunter Lab Modelo Colorflex No. de serie CX0795 clave 00010211.

Análisis Microbiológico

De acuerdo a la NMX-F-444-1983, el yogurt debe cumplir con las especificaciones microbiológicas anotadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Especificaciones Microbiológicas para el Yogurt de acuerdo a la NMX-F-444-1983.

ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS	
Organismos coliformes. Máximo permitido.	10 UFC/g
Hongos. Máximo permitido.	10 UFC/g
Levaduras. Máximo permitido.	10 UFC/g
Bacterias lácticas vivas. Mínimo permitido.	2,000,000 UFC/g

El análisis microbiológico se realizó mediante las siguientes técnicas:

- Conteo de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en yogurt. Se usó la técnica acorde a la NC ISO 7889: 2009.
- Mohos y levaduras en alimentos. Se usó la técnica acorde a la NOM-111-SSA1-1994, y esta técnica se utilizó también para la cuantificación de *S. boulardii* en forma libre y para la cuantificación del microorganismo microencapsulado, se desintegraron las microcápsulas contenidas en el alimento, con el pistilo de un agitador de vidrio estéril (Yañez, 2002) y se siguió la técnica anteriormente mencionada.
- Para la cuenta de coliformes totales en placa, se usó la técnica acorde a la NOM-113-SSA1-1994.

C. PROCEDIMIENTO

Se tamizaron los productos elaborados (F1, F2 y F3) a un tamaño de partícula menor a 2 mm de diámetro y se colocaron 25 g de cada yogurt en bolsas metálicas individuales de 6 cm de ancho por 7 cm de largo, éstas se introdujeron a una incubadora con temperatura constante de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante los 21 días de estudio. Se sacaron las muestras conforme a los periodos de muestreo y se realizó el análisis fisicoquímico y microbiológico. En la Figura 10 se observa el empaque utilizado durante la vida de anaquel de los alimentos, dicho empaque fue proporcionado por la empresa SI O SI ALIMENTOS S.A. de C.V.



Figura 10. Empaque de los yogures liofilizados.

6.2.6. CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DEL ALIMENTO *in vivo*

En este estudio se evaluó la capacidad que tiene la levadura *S. boulardii* para alojarse en el colon, así como determinar su presencia en heces, la cual se corroboró con siembra en placa de esta levadura, de acuerdo con lo establecido en la NOM-111-SSA1-1994.

Este estudio se realizó en el Bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología, se utilizaron 24 Jaulas de acero inoxidable, cada una con bebedero, comedero y charola de desperdicio individual, en un ambiente aislado de ruidos y controlado; la temperatura fue de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa del $55\pm 10\%$ y con ciclos de 12 h luz por 12 h de oscuridad. Se formaron 6 grupos de 4 ratas Wistar por grupo, y fueron colocadas en jaulas de manera individual, ver Figura 11, los animales presentaron un peso entre 210 g y 270 g al inicio del experimento.



Figura 11. Jaulas metabólicas utilizadas durante el estudio.

Los animales fueron alimentados *ad libitum* durante los 14 días de tratamiento. Los tratamientos que se aplicaron a los 6 grupos se muestran en la Tabla 6, en donde se utilizó una cánula intragástrica para asegurar que los animales ingirieran las concentraciones adecuadas de la solución salina al 0.85%, la solución con antibiótico (5mg/ml) las muestras de yogurt rehidratados (3 g de agua destilada por 1 g de yogurt liofilizado) ver Figura 12.



Figura 12. Administración del antibiótico y del yogurt en ratas con cánula intragástrica a los diferentes grupos en estudio.

Tabla 6. Tratamientos Administrados.

GRUPO	TRATAMIENTO
I	1 ml de solución salina cada 12 h por 7 días, seguido por 4 g de solución salina cada 24 h por 7 días (Control).
II	1 ml de solución salina cada 12 h por 7 días, seguido por 4 g de la formulación F2 rehidratada cada 24 h por 7 días.
III	1 ml de solución salina cada 12 h por 7 días, seguido por 4 g de la formulación F3 rehidratada cada 24 h por 7 días.
IV	2 mg/100 g de peso/cada 12 h de ampicilina por 7 días, seguido por 4 g de solución salina cada 24 h por 7 días (Control).
V	2 mg/100 g de peso/cada 12 h de ampicilina por 7 días, seguido por 4 g de la formulación F2 rehidratada cada 24 h por 7 días
VI	2 mg/100 g de peso/cada 12 h de ampicilina por 7 días, seguido por 4 g de la formulación F3 rehidratada cada 24 h por 7 días

F2 = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* libre (7.17 ± 0.17 Log UFC/g), **F3** = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* microencapsulada (6.86 ± 0.24 Log UFC/g).

Se recolectaron las heces asépticamente de cada grupo en estudio el día 1 (D1), que fue antes de la administración del probiótico y los días 3 (D3), 5 (D5) y 7 (D7) durante la administración del probiótico y se realizó conteo en placa para evaluar la presencia de la levadura en heces durante el tiempo que duró la administración del yogurt. Las colonias se reportaron como UFC/g y se aislaron aquellas que fueron diferentes morfológicamente.

Terminada la administración del probiótico se sacrificaron los animales por dislocamiento cervical y se realizó la extracción de intestino grueso de la parte distal. El intestino grueso se colocó en caja petri y se pesó, se lavó con solución salina estéril y con un bisturí se realizó una incisión en el órgano para obtener la mucosa de los intestinos expuesta y con un asa bacteriológica se raspó el contenido intestinal y se resuspendió en solución salina y se sembró en placa de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994, se realizó el conteo en placa y se aislaron colonias diferentes morfológicamente para su identificación. Las colonias aisladas fueron identificadas mediante pruebas de asimilación de azúcares mediante el Sistema API 20C AUX® siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$) utilizando los software estadísticos GraphPad Prism 3.0. U.S.A. y JMP6.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. MICROENCAPSULACIÓN DE *Saccharomyces boulardii*

8.1.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA

La producción de biomasa de *S. boulardii* se llevó en dos medios de cultivos que fueron Caldo Nutritivo (CN) y Caldo Dextrosa Saboraud (CDS). Como se observa en la Figura 13, la cinética de crecimiento medida por turbidez (DO_{620}) de *S. boulardii* en el CN a la hora 48 se presentó la mayor absorbancia, 0.216, que no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a las 60 y 72 h. En el medio CDS, a medida que transcurrió el tiempo desde la hora 0 hasta la hora 36, se incremento la absorbancia, presentando a la hora 36 una absorbancia de 1.347, no presentando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en relación a las 48, 60 y 72 h. Por lo que el CDS fue el mejor medio de crecimiento para la *S. boulardii* comparado con el CN.

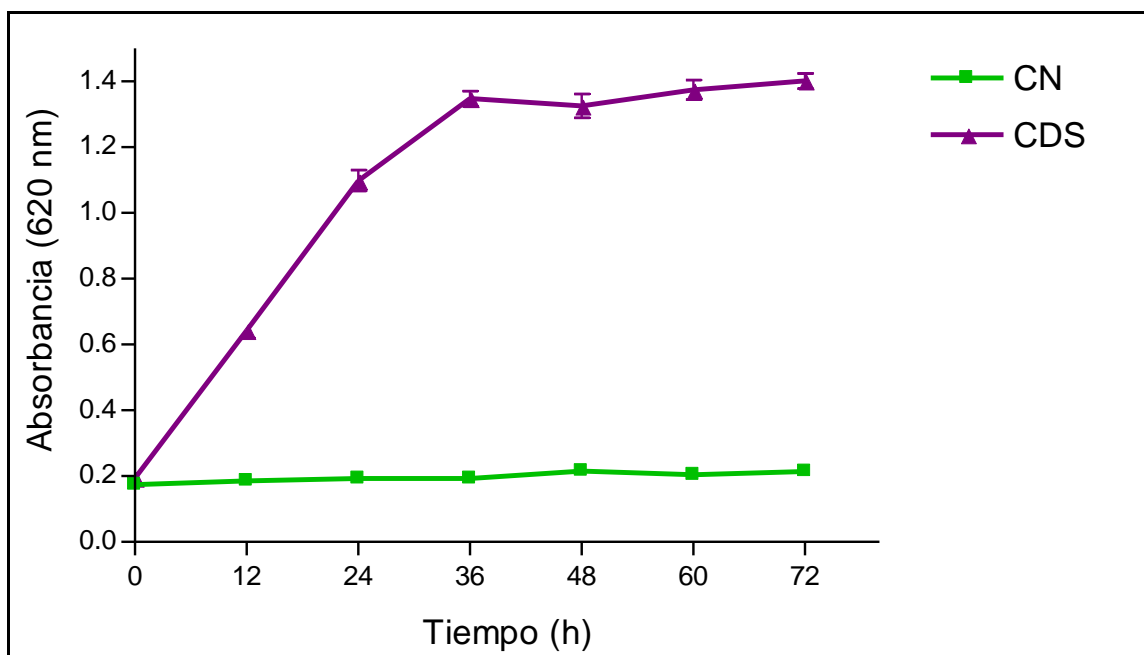


Figura 13. Cinética de crecimiento medida por turbidez (DO_{620}) a 25°C/150 rpm durante 72 h en los medios de cultivo CN y CDS (n=3).

En la Figura 14 se observa que en el medio de cultivo CN durante el periodo de crecimiento *S. boulardii* disminuyó ligeramente el pH en la hora 12, obteniéndose un cambio de pH del 2.18%. Sin embargo, al transcurrir el tiempo, el pH del medio de cultivo mantuvo un valor semejante al valor del pH inicial (hora 0). En cambio se observa que durante el crecimiento de la levadura en el medio de cultivo CDS, a medida que transcurrió el tiempo, el pH disminuyó de manera significativa prácticamente desde las primeras 12 h y disminuyendo constantemente en función del tiempo.

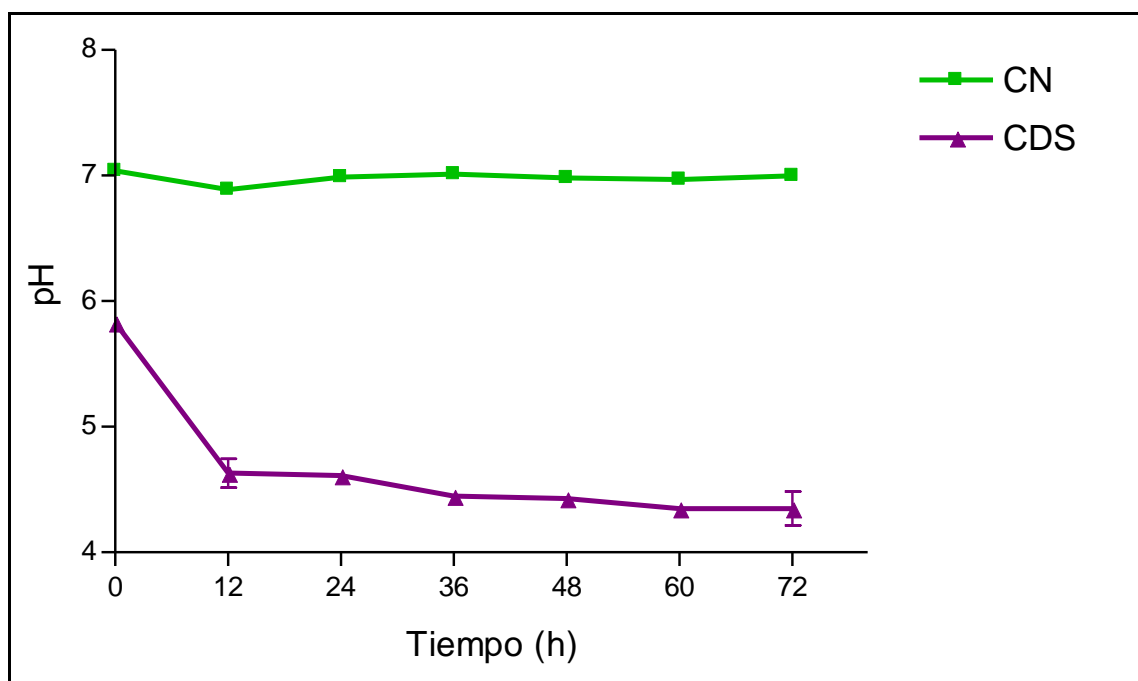


Figura 14. Variación del pH durante el crecimiento de *S. boulardii* a 25°C/150 rpm durante 72 h en los medios de cultivo CN y CDS (n=3).

En la Figura 15 se muestran las fases de crecimiento de *S. boulardii* en CDS, la cual presentó un periodo de adaptación entre las 0-12 h, una fase exponencial entre las 12-24 h, una fase estacionaria entre las 24-36 h y la fase de muerte a partir de la hora 36 hasta la 72. En cambio en el medio CN se observó un periodo de adaptación mayor entre 0-36 h, una fase logarítmica entre las 36-48 h, la fase estacionaria no se logró distinguir muy bien, presentándose alrededor de la hora 48 y finalmente la fase de muerte alrededor de la hora 48 hasta la 72. Se observa que en el medio de cultivo CN se presentó una mayor cantidad de células viables,

8.53-Log UFC/mL, en la hora 48 en cambio el mayor crecimiento en el medio de cultivo CDS se presentó en un tiempo menor, en la hora 24, con un número de células viables de 9.53-Log UFC/mL y en la hora 36 de 9.81-Log UFC/mL; y no presentando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre la hora 24 y 36.

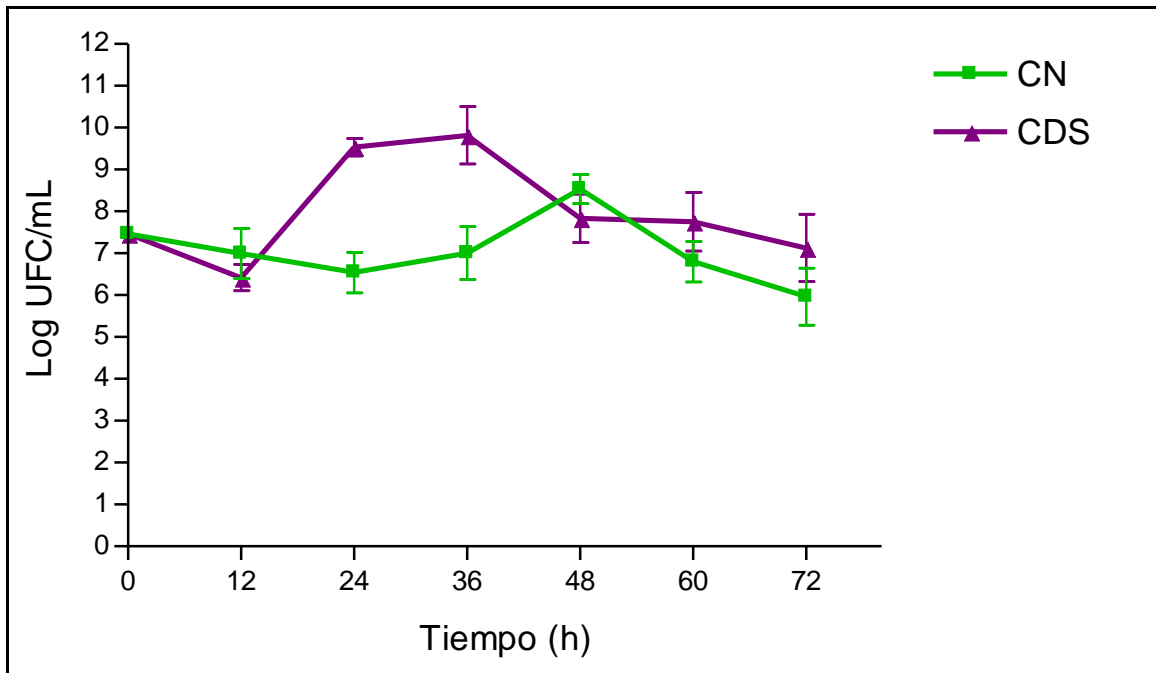


Figura 15. Curva de crecimiento de células viables de *S. boulardii* a 25°C/150 rpm durante 72 h en los medios de cultivo CN y CDS (n=3).

La absorbancia es una medida para evaluar el crecimiento microbiano (Tortora *et al.*, 2007). El crecimiento de la levadura en el medio de cultivo CN en la hora 48 presentó una mayor absorbancia: 0.21, que está relacionada con crecimiento de la levadura y esto se corroboró debido a que presentó una mayor cantidad de células viables 8.53-Log UFC/mL. En cambio el mayor crecimiento en el medio de cultivo CDS se presentó a las 24 h con un número de células viables de 9.53-Log UFC/mL y a las 36 h con 9.81-Log UFC/mL; no presentando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre la hora 24 y 36, que de igual manera se relaciona con la medición de una mayor absorbancia en ambos tiempos.

En el medio de cultivo CDS se presentó disminución de pH de 5.83 a 4.35 durante las 72 h del experimento posiblemente debido a un proceso de

fermentación de los componentes del medio de cultivo como la dextrosa (20g/L) y el digerido enzimático de caseína (10 g/L) presentes en el medio de cultivo, por lo que el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos orgánicos como el acético tal como lo manifiesta Bolla (2011). Esto indica un mayor metabolismo por parte de la levadura en este medio de cultivo y por tanto una mayor tasa de crecimiento de *S. boulardii* en un menor tiempo, a diferencia del medio CN donde no presentó diferencia el pH del medio siendo de éste, próximo a 7 durante las 72 h de crecimiento. Fajardo y Sarmiento (2007) reportaron que el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido por a un pH de 4.0 a 5.0, por tanto la disminución de pH pudo haber favorecido el crecimiento de la levadura en el medio de cultivo CDS, ya que a la hora 24 el medio de cultivo tenía un pH de 4.61 y a la hora 36 un pH de 4.45 y en estos tiempos 24 y 36, fue donde se presentó un mayor crecimiento del microorganismo. En cambio, en el medio de cultivo CN que contiene pluripeptona (5g/L) y extracto de carne (3g/L) la levadura *S. boulardii* pudo haberse adaptado a las condiciones del medio de cultivo; sin embargo, éstas influyeron en un menor crecimiento del microorganismo en comparación con el medio de cultivo CDS.

Por tanto, el CDS fue el mejor medio de cultivo para el crecimiento de *S. boulardii*, con un periodo de incubación de 24 h a 25 °C/150 rpm, condiciones que se utilizaron para la producción de biomasa en los experimentos posteriores.

8.1.2. MICROENCAPSULACIÓN

Se observó que el número de células viables de levadura después de realizar la técnica de microencapsulamiento disminuyó 1.59 unidades logarítmicas (Tabla 7).

Tabla 7. Viabilidad de *S. boulardii* antes y después de la Microencapsulación.

Log UFC/g Antes de Microencapsulación	Log UFC/g Después de Microencapsulación
9.70 ± 0.09	8.11 ± 0.10
Valor promedio de 3 repeticiones ± error estándar	

La visualización de las microcápsulas se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido (Figura 16).

En la microfotografía se muestra que las microcápsulas presentaron morfología esférica y no se observaron fisuras en su superficie lo que aseguró la integridad de las microcápsulas y un tamaño promedio de 7.5 μm de diámetro, lo cual se asemeja a lo reportado por Zamora (2011) quien reporta un tamaño promedio de las microcápsulas formadas de aproximadamente 9.2 μm de diámetro usando esta técnica de microencapsulación.

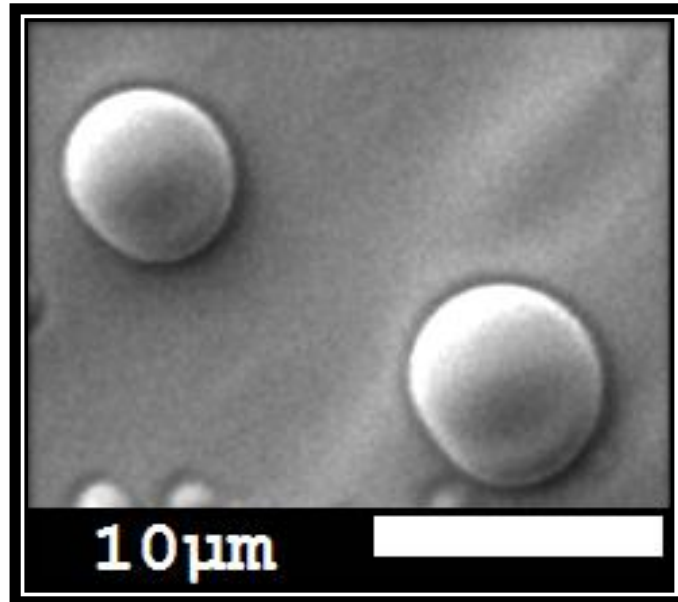


Figura 16. Microfotografía electrónica de barrido de las cápsulas conteniendo *Saccharomyces boulardii*.

8.2. ELABORACIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

Las formulaciones elaboradas fueron las siguientes:

- F1 = Yogurt con inulina + aceite vegetal (Control)
- F2 = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* libre
- F3 = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* microencapsulada

Durante el proceso de liofilizado se evaluó la viabilidad del probiótico *S. boulardii* en las formulaciones F1, F2 y F3 en tres etapas del proceso:

1. En el yogurt fresco, que fue antes de someterlo al proceso de liofilizado.

2. Después de la etapa de congelado del producto.
3. Producto liofilizado.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la viabilidad de *S. boulardii* presentes en los alimentos con respecto a las etapas del proceso de liofilización al cual fueron sometidas las formulaciones, se aplicó un análisis de varianza, el cual no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) para las formulaciones F2 y F3, las cuales contenían *S. boulardii*. Por lo tanto, las condiciones utilizadas para llevar a cabo el proceso de liofilización de los alimentos no afectó la viabilidad de *S. boulardii*.

El CODEX STAN-243-2003 establece que la concentración de levaduras en este tipo de alimentos fermentados debe presentarse en cantidades superiores a 4-Log UFC/g (1×10^4 UFC/g), por lo que los alimentos elaborados cumplen con el criterio de dicha Norma, considerándose así, como alimentos probióticos. En cambio para la muestra control F1, se detectó una cantidad mínima de levaduras presentes en el alimento, menor a 1-Log UFC/g (> 10 UFC/g) debido a que no contiene la levadura probiótica, la cantidad encontrada representa a otro tipo de levadura presente en el alimento que entra dentro de las especificaciones sanitarias establecidas por la NMX-F-444-1983.

Tabla 8. Viabilidad de Levaduras presentes en los Productos Liofilizados.

	Yogurt fresco Log UFC/g	Yogurt congelado Log UFC/g	Yogurt liofilizado Log UFC/g
F1	0.00 ± 0.00^c	0.59 ± 0.03^b	0.86 ± 0.11^a
F2	9.05 ± 0.39^a	8.29 ± 0.36^a	8.94 ± 0.66^a
F3	7.73 ± 0.23^a	7.61 ± 0.35^a	7.41 ± 0.12^a

Valor promedio de 3 repeticiones \pm error estándar. Letras iguales en el mismo renglón no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Así mismo se evaluó el contenido de humedad, antes y después de someter las formulación al proceso de liofilizado, los resultados se presentan en la Tabla 9. El contenido de humedad de los productos elaborados en este estudio presentaron un valor cercano a 5%, tal como lo sugieren Barbosa y Vega (2000), lo que evita el crecimiento microbiano que puede afectar la calidad sensorial y vida de anaquel del alimento durante el almacenamiento.

Tabla 9. Contenido de Humedad antes y después del Proceso de Liofilizado.

		F1	F2	F3
% Humedad	PF	79.14 ± 0.14 ^a	79.45 ± 0.24 ^a	79.20 ± 0.05 ^a
	PL	5.40 ± 0.45 ^a	5.30 ± 0.21 ^a	5.63 ± 0.31 ^a

Valor promedio de 3 repeticiones ± error estándar. Letras iguales en el mismo renglón no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.05). PF= Producto fresco, PL= Producto liofilizado.

8.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS LIOFILIZADOS

8.3.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

El cambio de color en las tres formulaciones fue similar, el parámetro L o luminosidad (donde el valor 0 representa el color negro y el valor de 100 representa el color blanco) no se afectó por el proceso de liofilización, al no presentar diferencia estadística significativa (p<0.05) (Tabla 10) entre los valores obtenidos entre el PF y el PR, presentando una mayor luminosidad cuando el alimento estaba liofilizado en comparación con el PF y PR, esto debido a la concentración de sólidos por la pérdida de agua. Los valores de luminosidad de los productos se encuentran en el rango de 82-86.

En cuanto a la coordenada “b” (asociada con los colores amarillos para valores positivos y azul para valores negativos), se observa que en los productos liofilizados este valor incrementó, no presentando diferencia estadística significativa (p<0.05) entre PF y PR y sí para PL. La coordenada b aumento, aunque no de manera trascendente, debido a que con la pérdida de humedad se concentraron los sólidos, predominando el ligero color amarillo característico del aceite vegetal adicionado.

De estos datos se determinó que el color de los tres productos elaborados fue blanco- ligeramente con tonalidad amarilla y este es un importante atributo de calidad, ya que este parámetro no se modificó por el proceso de liofilización. En la Figura 17 se observa el color de los productos elaborados PF, PL y PR.

Tabla 10. Determinación de Color en las Formulaciones de Yogurt.

	COLOR "Coordenadas"	PF	PL	PR
F1	L	83.91 ± 0.15 ^b	85.61 ± 0.49 ^a	83.12 ± 0.56 ^b
	a	-1.86 ± 0.08 ^b	-0.65 ± 0.06 ^a	-1.92 ± 0.16 ^b
	b	10.70 ± 0.20 ^b	15.81 ± 0.30 ^a	9.44 ± 0.59 ^c
F2	L	82.79 ± 0.96 ^b	85.24 ± 0.57 ^a	82.71 ± 0.09 ^b
	a	-1.85 ± 0.23 ^b	-1.00 ± 0.13 ^a	-1.36 ± 0.04 ^a
	b	10.58 ± 1.35 ^b	15.75 ± 0.12 ^a	11.91 ± 0.09 ^b
F3	L	82.69 ± 0.56 ^b	84.42 ± 0.14 ^a	82.47 ± 0.09 ^b
	a	-1.13 ± 0.14 ^b	-0.39 ± 0.05 ^a	-1.16 ± 0.04 ^b
	b	11.88 ± 0.16 ^b	15.85 ± 0.14 ^a	11.94 ± 0.20 ^b

Valor promedio de 3 repeticiones ± error estándar. Medias en la mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$). PF= Producto fresco, PL= Producto liofilizado, PR= Producto rehidratado (3 partes agua: 1 parte liofilizado).



Figura 17. Comparación de color de los productos fresco, liofilizado y rehidratado.

En la Tabla 11 se muestra que el pH no se afectó en el producto fresco al incorporar el probiótico, ya sea en su forma de células libres, o de manera microencapsulada. Los valores de los productos frescos se encontraron en un rango de pH de 4.4 a 4.5, no presentándose diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras; muy similar para los valores de pH de los productos rehidratados. El

pH presentado por los alimentos es una característica favorable ya que actúa como medio de conservación de estos alimentos evitando el crecimiento de microorganismos indeseables, incluidos los patógenos. El pH del yogurt estuvo en un intervalo de 4.43 a 4.51 y este valor contribuye a la mejor hidratación de las proteínas y por tanto a la consistencia del yogurt. Se menciona que a un pH inferior de 4.0 se favorece a la contracción del coágulo y a la sinéresis; por otro lado, a un pH superior a 4.6 influye desfavorablemente en la consistencia del producto terminado (Romero *et al.*, 2004).

En los valores de acidez en función del ácido láctico (Tabla 11) se observa que existió diferencia significativa ($p < 0.05$) para las muestras que contenían el probiótico, presentándose mayor acidez para F2 que es la que tenía el probiótico libre; la levadura *S. boulardii* provocó una acidez ligeramente mayor a la presentada por el control (F1) y se obtuvo un menor porcentaje de acidez para F3, esta disminución de acidez fue debido a la incorporación de las microcápsulas. El yogur debe de tener una acidez mínima de 0.5% de acuerdo con lo establecido por la NOM-181-SCFI-2010, por lo que todos los productos cumplen con esa característica de calidad. También se puede observar que la acidez incrementó aproximadamente de 11.5-14% después del proceso de liofilización, el cual fue atribuido a la producción de ácido láctico por parte de las bacterias lácticas y en cierta medida a ácidos orgánicos como el acético producido por *S. boulardii*, particularmente cuando está en forma libre, no así cuando está microencapsulada.

Tabla 11. Determinación de pH y Acidez de las Formulaciones de Yogurt.

		F1	F2	F3
pH	PF	4.46 ± 0.01 ^a	4.45 ± 0.03 ^a	4.51 ± 0.04 ^a
	PR	4.49 ± 0.01 ^a	4.43 ± 0.01 ^a	4.50 ± 0.06 ^a
% Acidez	PF	0.71 ± 0.005 ^b	0.75 ± 0.004 ^a	0.61 ± 0.007 ^c
	PR	0.81 ± 0.009 ^b	0.85 ± 0.009 ^a	0.71 ± 0.005 ^c

Valor promedio de 3 repeticiones ± error estándar. Medias en el mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$). PF= Producto fresco, PR= Producto rehidratado (3 partes agua: 1 parte liofilizado)

Se realizaron pruebas de solubilidad y humectabilidad para evaluar las propiedades de instantaneidad de los productos liofilizados (PL) elaborados, como

se observa en la Tabla 12, las determinaciones se hicieron con dos tamaños de partícula.

Los tres productos elaborados no mostraron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en su solubilidad, la cual se encontró de alrededor del 79% para un tamaño de partícula entre 1-2 mm de diámetro, en cambio sí se presentó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) para un tamaño de partícula entre 0.5-1 mm, la cual disminuyó en la F3 con respecto a la F1 y F2.

Los resultados de humectabilidad muestran que para F1 y F2 el tamaño de partícula impacto en el tiempo de humectación, el cual se incrementó por aproximadamente 20 min entre el tamaño de partícula menor con respecto al mayor, debido a que las partículas más grandes se sumergen más rápido que las pequeñas, por la diferencia de peso, esto no se observó para la muestra F3, la cual contenía las microcápsulas, las cuales favorecen una rápida humectación, esto puede ser debido a que al estar formadas por hidrocoloides presentaron mayor afinidad por el agua, y no se afectaron en gran medida por su tamaño de partícula.

Durante el proceso de humectación, hubo una fracción de partículas que no se sumergió y formaron unas láminas gelatinosas que permanecieron en la superficie. Esta fracción en todos los casos fue menor al 1% del peso de la muestra. Kim *et al.* (2002) encontraron igual comportamiento con leche en polvo tanto entera como descremada, y largos tiempos de humectabilidad, superiores a 15 min en ambos casos, sugiriendo que el fenómeno se debió a la presencia de proteína en la superficie.

Tabla 12. Propiedades de Polvos Instantáneos Elaborados.

	Tamaño de Partícula	F1	F2	F3
% Solubilidad	1 mm - 2 mm	79.53 ± 0.68 ^a	79.00 ± 0.78 ^a	78.35 ± 0.86 ^a
	0.5 mm - 1 mm	78.55 ± 0.86 ^a	76.40 ± 1.09 ^a	70.62 ± 0.64 ^b
Humectabilidad (minutos)	1 mm - 2 mm	13.23 ± 0.94 ^a	13.16 ± 0.55 ^a	5.00 ± 0.45 ^b
	0.5 mm - 1 mm	33.9 ± 0.30 ^a	32.33 ± 1.02 ^b	5.29 ± 0.08 ^c

Valor promedio de 3 repeticiones ± error estándar. Medias en la mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

8.3.2. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

En el análisis químico proximal realizado a las formulaciones liofilizadas se obtuvo una humedad del 5% aproximadamente en las tres formulaciones, el contenido de proteína (mayor al 13%) no se modificó por la incorporación del probiótico, sin embargo, se observó un incremento en la cantidad de lípidos de 4.42% y de 3.90% en la formulación F3 con respecto a la F1 y F2, respectivamente (Tabla 13). Este incremento fue debido a la incorporación del 20% de microcápsulas que contenían al probiótico; cabe hacer mención que estas microcápsulas se formaron por un proceso de emulsión y tenían una fracción lipídica, incrementando la cantidad de lípidos en el alimento, de manera contraría se presentó una disminución del contenido de minerales del 0.2% en la formulación F3 con respecto a las formulaciones F1 y F2 y el porcentaje de carbohidratos es menor en la formulación F3 en un 4.04% con respecto a F2 y de 5.02% con respecto a F1.

Tabla 13. Análisis Químico Proximal de las Formulaciones de Yogurt.

(%)	F1	F2	F3
Humedad	5.40	5.3	5.63
Proteína	13.08	13.53	13.59
Extracto etéreo	11.01	11.53	15.43
Cenizas	3.16	3.27	3.02
Carbohidratos	67.35	66.37	62.33

Como se muestra en la Tabla 14, al sustituir la grasa butírica de la leche por el aceite vegetal de palma desde el punto de vista de la salud existe un beneficio, debido a que el aceite vegetal de palma tiene menor cantidad de ácidos grasos saturados (21.35%) y en las formulaciones elaboradas se presentó 30.12% para F1, 32.46% para F2 y 19.77% para F3. Este aumento fue debido a la incorporación de los emulsificantes mono y diglicéridos al 0.5% en todas las formulaciones y en el caso de la formulación F3 también influyó la incorporación de las microcápsulas al 20% en la concentración de ácidos grasos; las

formulaciones elaboradas tuvieron menor cantidad de ácidos grasos saturados que la grasa butírica de la leche que contenía 62.80%. Además de que contienen mayor proporción de ácidos grasos insaturados, 68.02% para F1, 65.73% para F2 y 79.24% para F3, comparados con 33.60% de la grasa butírica de la leche. Rodríguez *et al.* (2005) reportaron que al incorporar una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados en la dieta ayuda a disminuir triglicéridos y colesterol-LDL y aumenta el colesterol-HDL en sangre, contribuyendo a disminuir riesgos de padecer una enfermedad cardiovascular en los consumidores.

En la Figura 18 se muestra el contenido de ácidos grasos insaturados más abundantes presentes en las formulaciones elaboradas, mismos que son de interés clínico y alimentario, al tratarse de ácidos grasos pertenecientes a las tres familias más importantes de los omegas, siendo el principal representante de la familia omega-9, el ácido oleico (C18:1, AO), el de la familia omega-6 es el ácido linoleico (C18:2, AL) y el de la familia omega-3 el ácido alfa linolénico (C18:3, ALN). En este gráfico se muestra que la cantidad de ácido oleico es del 43.41% para F1 y 42.64% para F2 y del 53.76% para F3 en comparación de 30.70% para la grasa de leche de vaca; se ha comprobado que un mayor consumo de ácido oleico incrementa la fracción de colesterol HDL y por tanto disminuye el riesgo cardiovascular, por otro lado la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados recomendados es del 18-33% en relación a un 100% de ácidos grasos consumidos en los alimentos, por lo que los productos elaborados en la presente investigación se encuentran dentro de estos valores, presentando un 23-24%; en cambio la grasa de leche contiene solo un 2.9%, cabe mencionar que numerosos estudios de alimentación controlada con ácidos grasos poliinsaturados han mostrado beneficios fisiológicos en la presión arterial, latido cardíaco y niveles de triglicéridos (FAO y FINUT, 2012), por ello la importancia de consumir una dieta de ácidos grasos equilibrada.

Tabla 14. Perfil de Ácidos Grasos.

Ácidos grasos	Grasa de leche de vaca * (%)	Aceite vegetal de palma (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
SATURADOS					
Butírico	3.6				
Caproico	2.3				
Caprílico	1.2				
Cáprico	2.2				
Láurico	3.6	0.20	0.35	0.25	
Mirístico	10.7		0.61	0.83	0.48
Pentadecanoíco	1.7				
Palmítico	25.9	15.75	20.13	21.09	12.90
Estearico	10.1	4.42	8.72	9.69	5.96
Elaidico		0.36	0.31		0.43
Araquidónico	0.7	0.62		0.60	
Otros	0.8				
Total	62.80	21.35	30.12	32.46	19.77
MONOINSATURADOS					
Miristoleíco	1.0				
Palmitoleico	1.9		0.18		0.24
Oleico	26.2	48.88	43.41	42.64	53.76
Otros	1.6				
Total	30.70	48.88	43.59	42.64	54.00
POLI INSATURADOS					
Linoleico	2.0	21.34	18.80	18.00	17.53
Alfa-Linolénico		3.59	3.23	3.18	5.09
Gamma-Linolénico		1.15	1.50	1.03	1.61
Linolénico	0.7				
Gadoleico		1.06	0.90	0.88	1.01
Otros	0.2				
Total	2.90	26.08	24.43	23.09	25.24

*(Fox y Cameron, 2002).

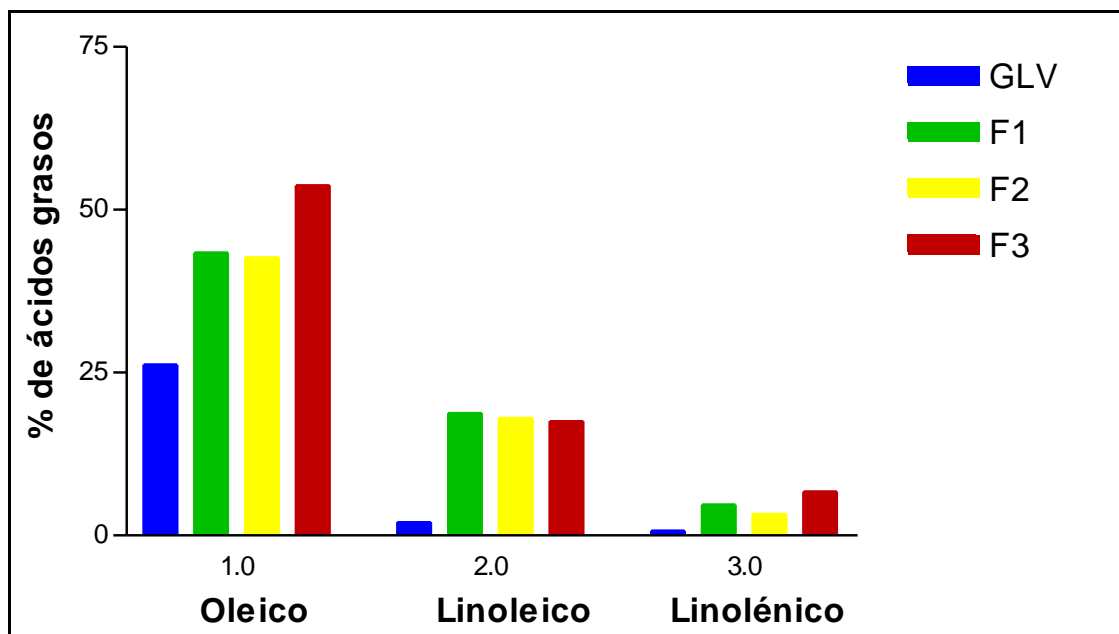


Figura 18. Comparación del contenido de ácidos grasos insaturados. **GLV**= Grasa de leche de vaca, **F1** = Yogurt con inulina + aceite vegetal (Control), **F2** = Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* libre. **F3**= Yogurt con inulina + aceite vegetal + *S. boulardii* microencapsulada.

8.3.3. ANÁLISIS SENSORIAL

Se realizó un análisis sensorial basado en una escala hedónica de 5 puntos, en donde se evaluó color, olor, sabor y textura de las formulaciones elaboradas (Tabla 15). En los parámetros de color y olor se presentó una buena aceptabilidad cercana al valor de 4 (Me gusta) en general para las tres formulaciones, habiendo una disminución de la aceptabilidad en los parámetros de sabor y textura para la formulación F3, debido a la presencia de las microcápsulas que fueron detectadas por el sentido del gusto, sin embargo, no existió diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en la aceptación general de los productos elaborados.

Tabla 15. Análisis Sensorial de las Formulaciones de Yogurt.

	F1	F2	F3
Color	3.46±0.91 ^b	4.2±0.77 ^{a,b}	3.93±0.70 ^a
Olor	3.46±0.91 ^a	3.2±1.01 ^a	3.46±0.51 ^a
Sabor	3.53±1.06 ^a	3.6±1.12 ^a	2.46±0.63 ^b
Textura	4.20±0.77 ^a	4.0±1.00 ^a	2.77±0.70 ^b
Aceptación general	3.71±0.77 ^a	3.75±0.93 ^a	3.15±0.52 ^a

Valor promedio de 15 repeticiones ± error estándar. Medias en la mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

8.4. VIDA DE ANAQUEL

8.4.1. HUMEDAD

La humedad tendió a incrementarse en función del tiempo de almacenamiento, terminando con una humedad alrededor del 8% (Figura 19). Puerta (2006) indicó que alimentos altamente perecederos como es el caso de la leche debe presentar una humedad del 8% al ser deshidratada, para de esta manera asegurar su estabilidad microbiológica. Cabe mencionar que uno de los ingredientes de la formulación es la inulina que es una fibra soluble altamente higroscópica contribuyendo de esta manera a que el alimento absorbiera humedad de su entorno, lo que es una característica favorable al momento de rehidratar el producto, aun así los productos no presentaron una humedad mayor al 8% al término de la vida de anaquel evaluada por lo que no se presentaron reacciones de deterioro microbiológico.

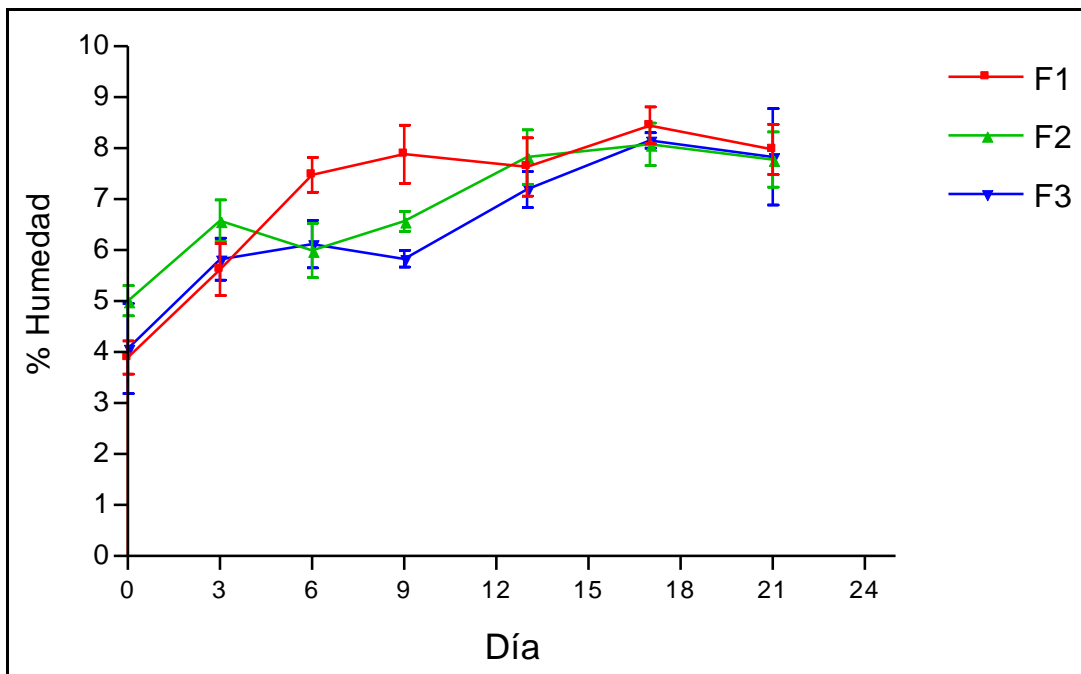


Figura 19. Variación de humedad en función del tiempo (n=3).

8.4.2. PH

En la Figura 20 se observa que el pH de las tres formulaciones disminuyó ligeramente conforme avanzó el periodo de almacenamiento, menos del 2.5% para las formulaciones F1 y F2 y de 4.3% para la formulación F3. La variación de pH fue mínima debido a que como se mencionó anteriormente, el bajo contenido de humedad controla el crecimiento microbiano presente en las formulaciones y por tanto producción de ácidos que puedan afectar el pH del producto, sin embargo, la disminución de pH pudo ser debido a que se continuaron dando algunas reacciones enzimáticas de fermentación por parte de las bacterias lácticas presentes en los productos y por tanto esta disminución en el pH, lo cual puede estar relacionado con el incremento de la humedad de los productos.

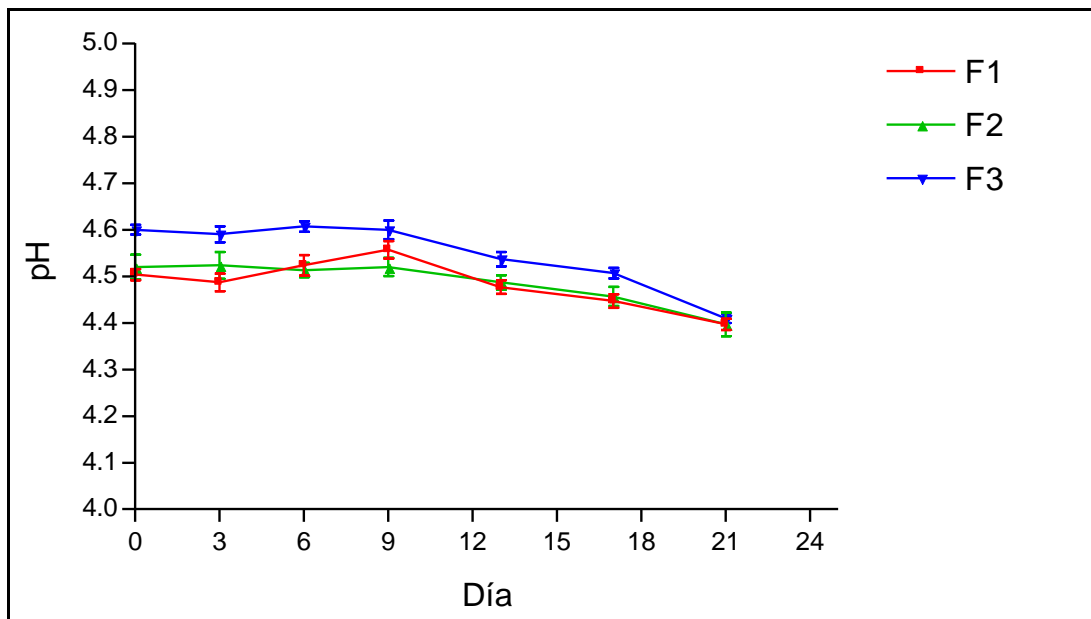


Figura 20. Variación de pH en función del tiempo (n=3).

8.4.3. ACIDEZ

En la Figura 21 se observa que en la F1 se incrementó un 5.5% la acidez en función del tiempo, a diferencia de las formulaciones F2 y F3 que son las que contenían la levadura probiótica donde no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en acidez desde el inicio de la vida de anaquel hasta el final de esta, por tanto, no hubo producción de ácido láctico por parte de las bacterias lácticas presentes en los alimentos.

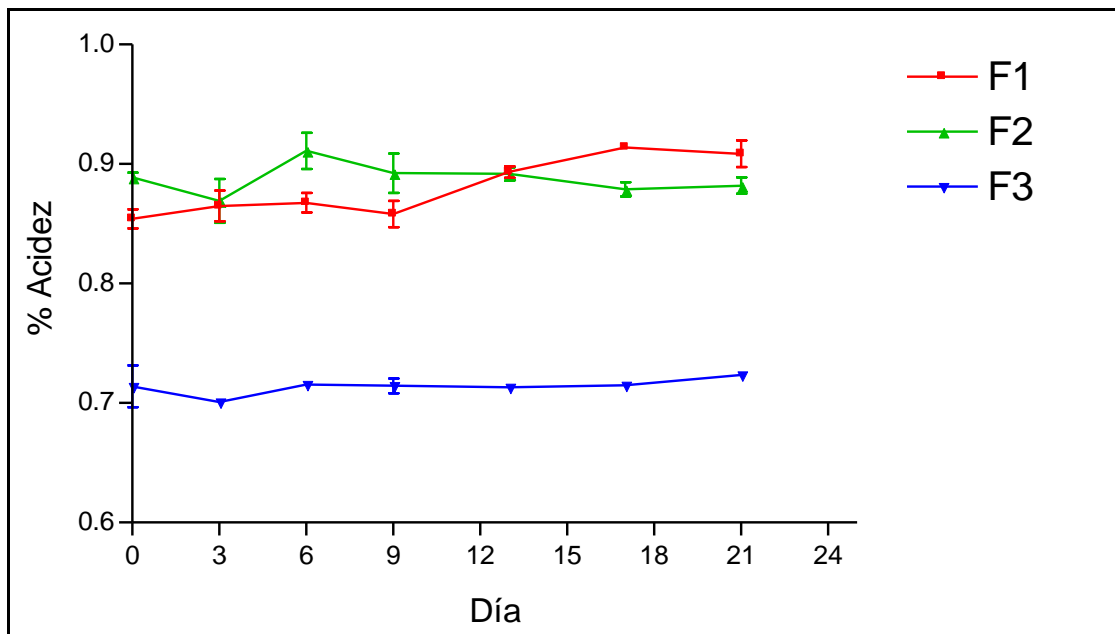


Figura 21. Variación de la acidez titulable en función del tiempo (n=3).

8.4.4. COLOR

La determinación de color se realizó para observar las variaciones de color que tuvieron las formulaciones durante el almacenamiento. En este estudio se graficaron la coordenada L y b, que son las que brindan mayor información acerca de las variaciones de color que tuvieron los productos en el almacenamiento. Como se observa en la Figura 22 el valor de “L” disminuyó conforme el periodo de almacenamiento transcurrió, disminuyéndose el color blanco aproximadamente entre un 2-4%, así mismo en la Figura 23, se muestra que la coordenada “b” incrementó aproximadamente 4% debido a que el color amarillo se hizo más evidente, este cambio de color en los productos pudo deberse al incremento de la humedad de los productos durante el almacenamiento.

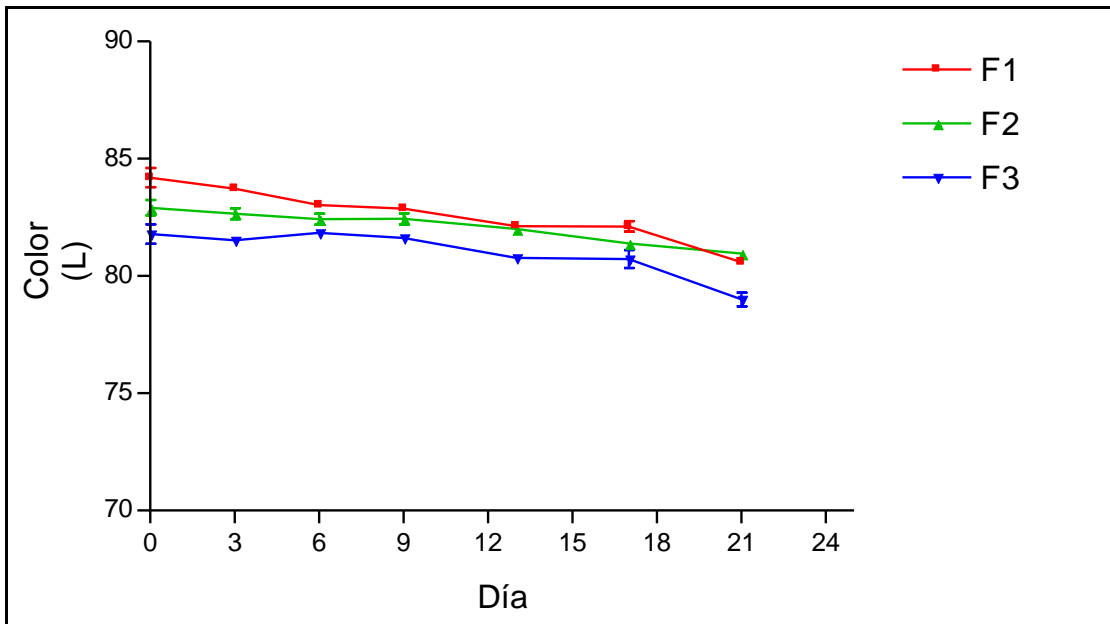


Figura 22. Variación del color “L” en función del tiempo (n=3).

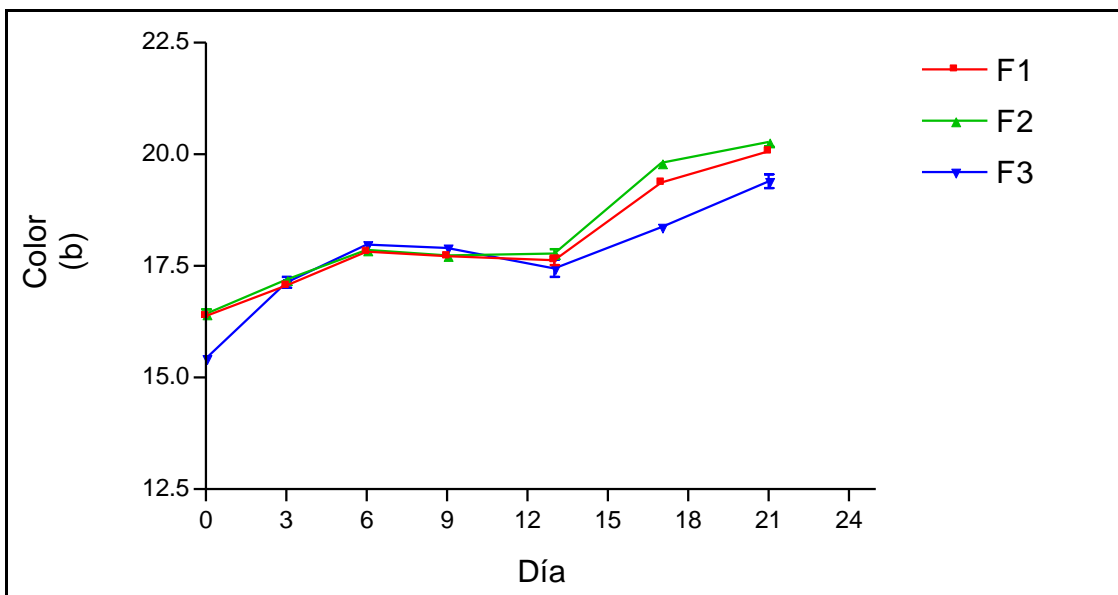


Figura 23. Variación del color “coordenada b” en función del tiempo (n=3).

8.4.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico realizado a las tres formulaciones de yogurt F1, F2 y F3, no detectó la presencia de coliformes totales ni hongos, desde el inicio hasta el final de la vida de anaquel de está.

La viabilidad del microorganismo probiótico disminuyó conforme el transcurso de los días (Figura 24), encontrándose que en la formulación F1 no se detectaron levaduras al término de la vida de anaquel ya que es el control sin la levadura probiótica; en la formulación F2 se inició a una concentración de 7.12 ± 0.15 -Log UFC/g y al día 17 aún se puede asegurar que la concentración de la levadura continua siendo la ideal para considerarse como un alimento probiótico siendo de 4.66 ± 0.1 -Log UFC/g y por tanto funcional, en cambio en la F3 que se presentó una concentración al inicio de la vida de anaquel de 6.55 ± 0.11 -Log UFC/g y la calidad probiótica se tiene hasta el día 21 con una concentración de 4.40 ± 0.45 -Log UFC/g a diferencia de la F2 la cual presentó concentraciones menores a 4-Log-UFC/g en el día 21, teniendo una pérdida de viabilidad de *S. boulardii* en la formulación F2 de 3.92 unidades logarítmicas, en cambio en la formulación F3 hubo una disminución de la viabilidad de 2.15 unidades logarítmicas, haciéndose notar el efecto protector de las microcápsulas que contenían a la levadura probiótica en la formulación F3, frente a factores ambientales de su entorno como temperatura, humedad y gases de la atmosfera entre otros.

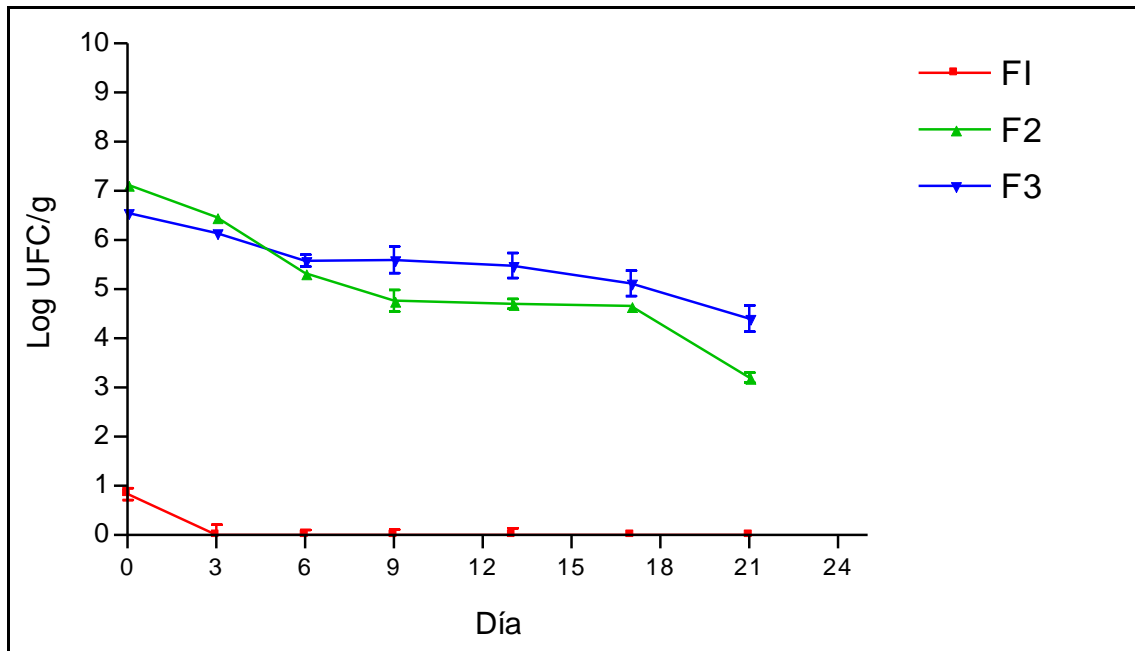


Figura 24. Viabilidad de levaduras en función del tiempo (n=3).

En la Figura 25 se presenta la concentración inicial de las bacterias lácticas que fue de aproximadamente 8-Log UFC/g y al final de la vida de anaquel en este trabajo se encontraron concentraciones superiores a 7-Log UFC/g, por lo tanto, esta concentración entra dentro de las normas establecidas como el CODEX STAN-243-2003 para ser considerado como un alimento probiótico y por tanto con los efectos benéficos que conlleva el consumo de dicho alimento.

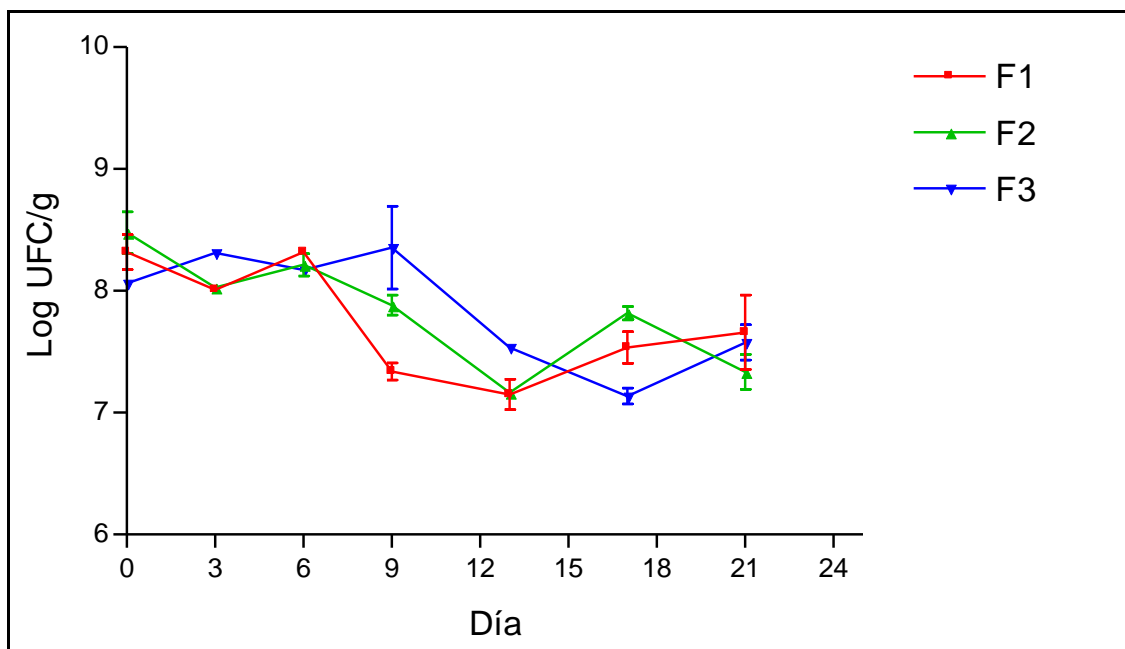


Figura 25. Viabilidad de las bacterias lácticas en función del tiempo (n=3).

Bolla (2011) realizó la fermentación de leche por mezclas microbianas de probióticos de 8-Log UFC/ml para bacterias y 6-Log UFC/ml para levaduras, los microorganismos que emplearon fueron *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactococcus lactis subsp lactis* CIDCA 8221, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112, las cuales fueron liofilizadas y almacenadas a 4°C y al término de 30 días, notaron una reducción de las tasas de supervivencia para todos los microorganismos entre 1.5 y 4.5-Log UFC/mL, estas tasas de supervivencia son muy parecidas a las obtenidas en este trabajo en donde se presentó una pérdida de viabilidad cercano a 1-Log UFC/g para las bacterias lácticas en las tres formulaciones (F1, F2 Y F3) y de 3.92-Log UFC/g para la formulación F2 donde se presenta la levadura en forma de células libres; es importante hacer notar que la temperatura empleada en nuestro experimento fue de 35°C durante 21 días y debido a que es una temperatura relativamente alta, incrementa las reacciones enzimáticas de los probióticos presentes en el alimento y por tanto la tasa de muerte de los mismos, a diferencia de la temperatura empleada por Bolla (2011) que fue de 4°C durante 30 días, temperatura ampliamente usada ya que ayuda a preservar a los microorganismos probióticos debido a que controla su metabolismo y por tanto la tasa de muerte.

Por otro lado, las microcápsulas que contenían al microorganismo probiótico *S. boulardii* logró incrementar la tasa de supervivencia en 1.77-Log UFC/g, por lo tanto incrementó la vida de anaquel del producto F3 que está en función de la viabilidad de la levadura, así mismo Zamora (2011) demostró que cuando el probiótico *S. boulardii* se incorporó en un queso fresco, incrementó su viabilidad en 1.22-Log UFC/g cuando el probiótico se presentaba microencapsulado en comparación con la levadura en forma de células libres, durante 35 días de almacenamiento a 4°C.

El efecto protector de las microcápsulas es de importancia ya que la viabilidad de la levadura se ve muy afectada durante su almacenamiento. Investigaciones anteriores han encontrado que ciertas cepas de probióticos son más capaces de sobrevivir el proceso de liofilización que durante el procesamiento y el almacenamiento de yogur liofilizado (Capela *et al.*, 2006), debido a que el contenido de oxígeno, alta temperatura, pH bajo, la actividad de agua y la elevada concentración de solutos puede afectar la viabilidad de los microorganismos probióticos (Carvalho *et al.*, 2004), como se mencionó anteriormente el proceso de liofilización no afectó la viabilidad de *S. boulardii* tanto en forma de células libres como microencapsuladas, no obstante, durante el almacenamiento a 35 °C su viabilidad fue disminuyendo significativamente ($p < 0.05$) conforme el tiempo de almacenamiento, un efecto similar reportó Bolla en (2011) durante el almacenamiento de leche fermentada por *S. cerevisiae* y liofilizada, en donde la levadura probiótica disminuyó su viabilidad de 7-Log UFC/mL a los 180 días de almacenamiento a 4°C.

En la Figura 25 se muestra la viabilidad de las bacterias lácticas en la que no se encontró que se afectara su tasa de supervivencia al término de los 21 días a 35 °C por la incorporación del probiótico *S. boulardii* a las formulaciones F2 y F3.

La capacidad de los microorganismos para seguir siendo viables y funcionalmente activos durante el almacenamiento a largo plazo es un requisito importante del potencial de cepas probióticas (Sanders, 2001). Por tanto en este estudio se observó que los yogures con la mezcla microbiana liofilizada cumplen con las características indicadas de viabilidad para evaluar sus características probióticas, en el caso de la formulación F2 hasta el día 17 y en la formulación F3 hasta el día 21 a 35°C.

8.5. CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DEL ALIMENTO *in vivo*

Durante la cuantificación de levaduras en heces y colon, se identificaron dos levaduras por sus diferencias morfológicas en Agar Papa Dextrosa, ver Figura 26. Las diferencias presentadas por las colonias fueron principalmente: el color; levadura L1 presentó un color beige y la levadura L2 presentó un color blanco y sus características ópticas, en particular la luz transmitida; la cual se determinó al observar a través de la colonia, la levadura L1 dejó pasar la luz sin permitir la completa visibilidad de los objetos observados a través de la colonia, por tanto fue una colonia traslúcida, en cambio la levadura L2 no dejó pasar la luz, por tanto fue una colonia opaca, las características de la morfología colonial de las levaduras aisladas se presentan en la Tabla 16.

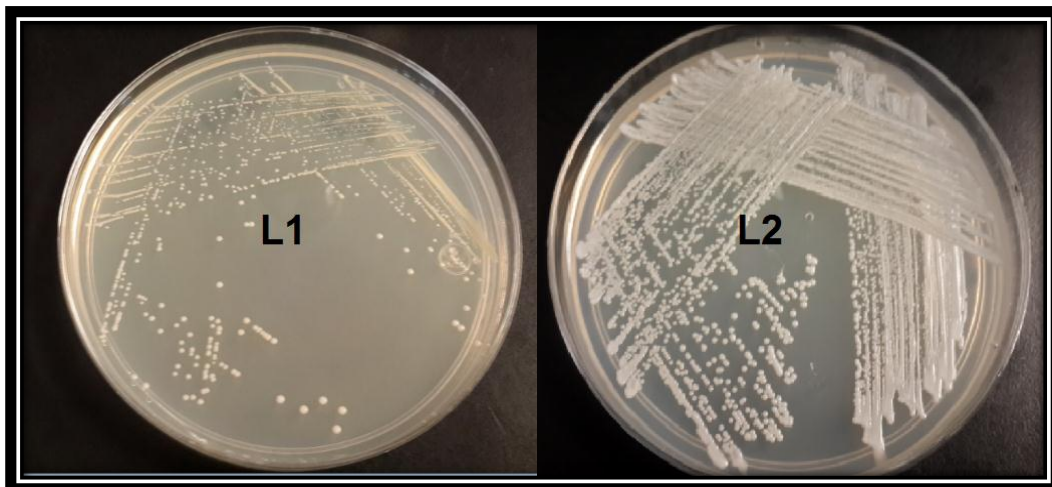


Figura 26. Levaduras aisladas del colon y heces de ratas alimentadas con las diferentes formulaciones de yogurt.

Tabla 16. Morfología Colonial de las Levaduras Aisladas en Agar Papa Dextrosa.

Característica de la colonia	Levadura 1 (L1)	Levadura 2 (L2)
Forma	Circular	Circular
Borde	Entero	Entero
Elevación	Convexa	Convexa
Superficie	Lisa	Lisa
Consistencia	Cremosa	Cremosa
Color	Beige	Blanco
Luz transmitida	Traslúcida	Opaca
Luz reflejada	Brillante	Brillante

Para la identificación de las levaduras se utilizó un sistema de identificación API AUX 20[®] basado en la asimilación de azúcares por parte de las levaduras, dichos resultados se presentan en la Tabla 17. Se utilizó como referencia el perfil bioquímico de *S. boulardii* para la identificación.

Como se puede observar en la Tabla 17, se muestra la caracterización bioquímica de la levadura *S. boulardii* y de las levaduras aisladas L1 y L2, mostrando que la levadura L2 corresponde al perfil bioquímico de *S. boulardii* ya que presentó la capacidad de asimilar otro azúcar, el Metil- α -D Glucopiranosida, por tanto difieren bioquímicamente; la levadura L1 se clasifica dentro del género y especie perteneciente a *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con lo reportado por Fajardo y Sarmiento (2007) debido a que esta levadura presentó asimilación de los azúcares D-glucosa, D-galactosa, D-maltosa, D-sacarosa y D-rafinosa, los cuales entran en el perfil de azúcares utilizados por esta especie. Ver Anexo B.

Tabla 17. Identificación de Levaduras por Asimilación de Azúcares.

AZUCAR	<i>S. boulardii</i>	Levadura 1 (L1)	Levadura 2 (L2)
D-glucosa	+	+	+
Glicerol	-	-	-
2-ceto-Gluconato cálcico	-	-	-
L- arabinosa	-	-	-
D-Xilosa	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Xilitol	-	-	-
D-Galactosa	+	+	+
Inositol	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-
Metil- α -D Glucopiranosida	+	-	+
N-Acetil- Glucosamina	-	-	-
D-Celobiosa	-	-	-
D-Lactosa	-	-	-
D-Maltosa	+	+	+
D-Sacarosa	+	+	+
D-Trehalosa	-	-	-
D-Melezitosa	-	-	-
D-Rafinosa	+	+	+

A continuación se muestran los datos obtenidos de la recuperación de la levadura *S. boulardii* tanto en heces como en colon tras la administración de las muestras de yogurt con el probiótico en forma de células libres como microencapsuladas en grupos con la flora gastrointestinal sin ser afectada por el antibiótico ampicilina (I, II y III) y en grupos tratados con el antibiótico ampicilina (grupo IV, V y VI).

En la Tabla 18, se muestra la viabilidad de *S. boulardii* en heces durante el periodo de administración del probiótico en los seis grupos en estudio; no se encontró la levadura *S. boulardii* viable durante la administración del probiótico en los grupos I, II, III, y IV durante los siete días de tratamiento, los grupos I y IV son grupos control por tanto no se le administro yogurt con *S. boulardii*, sin embargo, los grupos II y III a los que se les administró el yogurt con el probiótico en forma de células libres y en forma microencapsulado, respectivamente, no se encontró la levadura viable en heces, esto pudo deberse a que la toma de muestra se realizó cada 24 h posteriores a la administración del yogurt y la levadura pudo ser excretada antes o después de la toma de muestra, datos que no coinciden con lo reportado con Sandrine *et al.* (2008) que indica que la máxima excreción de *S. boulardii* se presenta a las 24 h posteriores a su administración vía oral tanto en forma de células libres como microencapsuladas con quitosano, por otro lado ya que la flora intestinal en estos animales se encontraba normalmente equilibrada, al no ser afectada por la administración del antibiótico o por alguna patología, de igual manera la levadura *S. boulardii* no se encontró viable en el colon, ver Tabla 19.

Algunos autores han demostrado que *S. cerevisiae* solamente es capaz de multiplicarse en el tracto digestivo de ratones gnotobióticos (libres de gérmenes intestinales), la levadura es drásticamente eliminada del tracto digestivo de ratones normales por efecto antagonista de la flora intestinal, pues su complejo ecosistema microbiano hace a la levadura incapaz de competir (Castro y Rodríguez, 2005). Así mismo Buts (2005) establece que en los animales hologénicos (con flora bacteriana normal) la levadura *S. boulardii* se elimina rápidamente en unos cuantos días en heces. Esto significa que cuando la flora es normal, *S. boulardii* no se instala en el tracto gastrointestinal, por tanto no se presentó viable en el colon en este estudio.

Sin embargo, la levadura *S. boulardii* se encontró viable en heces en el grupo V y VI, a estos grupos de estudio se les dio tratamiento con antibiótico durante 7 días previo a la administración del probiótico; está documentado que la ampicilina

vía oral daña la flora intestinal debido a que su absorción es del 40% y el fármaco restante al no absorberse recorre todo el tracto gastrointestinal por lo que destruye a los microorganismos susceptibles presentes a su paso, dejando sitios de unión libres y de esta manera el microorganismo probiótico *S. boulardii* pudo instalarse en el tracto gastrointestinal, durante los primeros días y posteriormente excretado en heces a los días D5 y D7 ver Tabla 18, la excreción del probiótico pudo deberse a varios factores entre los cuales se encuentran la mejora en la flora intestinal, por la inulina presente en las formulaciones, la cual se ha probado que favorece la flora intestinal benéfica ya que es utilizada como sustrato por los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* conocidos como agentes probióticos presentes en la flora intestinal (Xu *et al.*, 2003) y otro factor pudo haber sido que la levadura *S. boulardii* en los primeros días de su administración comenzó a llenar los sitios de unión del tracto gastrointestinal y por tanto comenzaron a aparecer en heces debido a que ya no había sitios de unión.

Ronka *et al.* (2003) utilizan un criterio donde mencionan que para que la colonización de un probiótico en el tracto gastrointestinal sea positiva es suficiente que el microorganismo colonizador se encuentre presente en un coprocultivo después de la ingestión, lo que simplemente significa que ha sido capaz de conservar su viabilidad a lo largo de su recorrido por el tracto gastrointestinal; en el actual estudio, la colonización del tracto gastrointestinal en estos dos grupos de animales se pudo corroborar debido a que se encontraron viables en el colon, el mecanismo de adhesión fue probablemente a través de las manoproteínas conocidas como adhesinas presentes en la membrana celular de la levadura, de acuerdo a lo reportado por Tuite *et al.* (1991), estas adhesinas se unen a aminoácidos específicos o residuos de azúcares de la superficie de otras células. Estos receptores pueden ser D-galactosa, N-acetilgucosamina, N-acetil galactosamina o N-acetilneuramino asociadas a las glicoproteínas intestinales, estos carbohidratos presentes en las mucinas pueden funcionar como receptores tanto de bacterias patógenas como de probióticas (Verstrepen y Klis, 2006).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los alimentos elaborados con la levadura *S. boulardii* presentan características probióticas debido a que fueron encontradas en heces demostrando su resistencia a pH gástrico, sales biliares y acción enzimática en los grupos V y VI, además se encontraron en el colon, cabe mencionar que la levadura se encontró viable solo en los grupos a los cuales se les administro ampicilina donde la flora intestinal se encontraba dañada y por tal

motivo la levadura pudo instalarse en el intestino, en cambio cuando la flora fue normal no se detectó ni en heces ni en colon.

Se ha reportado que *S. boulardii* es una levadura que resiste acidez gástrica, sales biliares y acción de enzimas digestivas (Buts, 2005), lo que se puede deducir de los datos del estudio *in vivo* es que la microencapsulación del probiótico fue eficiente debido a que existió una liberación del microorganismo en el tracto gastrointestinal, al encontrarse en el colon con una viabilidad de la levadura *S. boulardii* de 2.33-Log UFC/g cuando el alimento contenía la levadura en forma de células libres y de 3.10-Log UFC/g cuando *S. boulardii* se encontraba microencapsulada ver Tabla 19.

Tabla 18. Recuperación de la Levadura *S. boulardii* en Heces.

Tratamiento	Log UFC/g de heces			
	D1	D3	D5	D7
I	ND	ND	ND	ND
II	ND	ND	ND	ND
III	ND	ND	ND	ND
IV	ND	ND	ND	ND
V	ND	ND	6.02±0.37	5.1±0.57
VI	ND	ND	4.98±0.36	4.55±0.41

Valor promedio de 4 repeticiones ± error estándar. ND= No se detecto

Tabla 18. Recuperación de la Levadura *S. boulardii* en Colon.

GRUPO	Log UFC/g en colon
I	ND
II	ND
III	ND
IV	ND
V	2.32±0.48
VI	3.10±0.72

Valor promedio de 4 repeticiones ± error estándar. ND= No se detecto

En cuanto a la otra levadura encontrada en las heces (L1), clasificada dentro de la especie de *S. cerevisiae* (debido al perfil bioquímico presentado), esta levadura se encontró en todos los animales un una concentración de 5 a 7-Log UFC/g de

heces, ver Tabla 20. Se observó que los diferentes tratamientos no afectaron la viabilidad de este microorganismo y esta levadura no se encontró viable en el colon. Suarez *et al.* (1994) establecen que los microorganismos pertenecientes a la flora transitoria o pasajera, no se fijan al epitelio ni se establecen en el intestino y está formada por microorganismos no patógenos procedentes de la porción superior del tubo digestivo, los alimentos y el medio ambiente, por lo que la levadura encontrada está dentro de este criterio.

Tabla 19. Recuperación de la Levadura *S. cerevisiae* en Heces.

GRUPO	Log UFC/g de heces			
	D1	D3	D5	D7
I	5.82±0.79 ^a	6.48±0.58 ^a	6.62±0.56 ^a	5.50±0.49 ^a
II	6.00±0.51 ^a	5.65±0.32 ^a	6.79±0.61 ^a	5.07±0.40 ^a
III	6.06±0.90 ^a	6.18±0.69 ^a	6.71±0.33 ^a	4.87±0.31 ^a
IV	6.22±0.30 ^a	6.60±0.27 ^a	6.93±0.54 ^a	5.41±0.17 ^a
V	5.68±0.39 ^a	6.17±0.22 ^a	6.10±0.79 ^a	5.78±0.37 ^a
VI	6.19±0.30 ^a	6.84±0.58 ^a	6.66±0.46 ^a	5.44±0.40 ^a

Valor promedio de 4 repeticiones ± error estándar. Medias en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

9. CONCLUSIONES

Las formulaciones de yogurt elaboradas en este trabajo conteniendo *S. boulardii* son alimentos probióticos, debido a que cuando la levadura se ingiere en forma de células libres o microencapsuladas en grupos de ratas con flora intestinal afectada por ampicilina, esta levadura se encuentra viable en heces con lo que demuestra su resistencia al pH gástrico, sales biliares y acción de enzimas digestivas, además de su capacidad para alojarse en el colon. Finalmente, la incorporación de *S. boulardii*, inulina y aceite vegetal no afectaron los atributos sensoriales del yogurt.

10. REFERENCIAS

AACC. 2000. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods. 10th edition. Editado por la American Association of Cereal Chemists. Minneapolis, MN, USA.

Aires D., Capdevila N., Segundo M. J. 2005. Ácidos grasos esenciales. *Revista de la Oficina de Farmacia*, 24 (4): 96-102.

Amores R., Calvo A. Mestre J., Martínez Hernández R. 2004. Probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*, 17 (2): 131-139.

Andrews T. 2000. Nectar and Ambrosia: An Encyclopedia of Food in World Mythology. 250. Accessible online: <http://foodtimeline.org/foodfaq2html>. Accessed: 8/21/2006.

Araneda C., Valenzuela F. 2009. Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. *Ciencia Ahora*, 22(11): 9-19.

Arribas B., Rodríguez M., Camueco D., Zarzuelo A., Gálvez J. 2008. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Review article. Ars Pharmaceutica*, 49(1) 5-30.

Arribas B. 2009. Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Departamento de Farmacología. España. P. 35

Barbosa C., Vega M. 2000. Deshidratación de alimentos. *Ed. Acriba*. España.

Bléhaut H., Massot J., Elmer G., Levy R. 1989. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm Drug Dispos*, 10:353–364.

Bolla A. 2011. Desarrollo de un alimento funcional deshidratado constituido por microorganismos aislados de kéfir. Tesis Doctoral. Universidad nacional de la

plata, facultad de ciencias exactas, departamento de Química, Departamento de Ciencias Biológicas. Argentina. P 1-160.

Buts J. 2005. Ejemplo de un medicamento probiótico. *Saccharomyces boulardii* liofilizada. *Gastroenterología del Perú*, 25 (2): 176-188.

Buts J., Keyser N., Raedemaeker L. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatric Research*, 36 (4): 522-527.

Cano M., Stringheta P., Ramos A., Cal J. 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(4): 420-428.

Capela P., Hay T., Shah N. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39: 203-211.

Carvalho A., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F., & Gibbs P. 2002. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24:1587-91.

Castro M., Rodríguez F. 2005. Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Coproica*, 6 (1) 26-38.

Chica B., Osorio S. 2003. Determinación de la vida de anaquel del chocolate de mesa sin azúcar en una película de polipropileno bioorientado. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Ingeniería Química. Colombia. P 22-24.

Corthier G., Dubois F., Ducluzeau R. 1986. Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 294-6.

CODEX STAN 243-2003. Norma del Codex para leches fermentadas.

Czerucka D, Nano J, Bernasconi P, Rampal P. 1989. Réponse à la toxine cholérique de deux lignées de cellules épithéliales intestinales. Effet de *Saccharomyces boulardii*. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 13: 383-387.

Czerucka D., Roux L., Rampal P. 1994. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Clinical Gastroenterology Journal*, 106: 65-72.

Doleyres Y., Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *The International Dairy Journal*, 15(10): 973–988.

Elmer W., McFarland L., Surawicz C., Danko L., Greenberg R. 1999. Behaviour of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 13:1663-1668.

Esperriela I. 2010. Determinación de la vida útil de espagueti y fideos doria (elaborados en Barranquilla) bajo condiciones aceleradas. Tesis de licenciatura. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. P 20-23

Fajardo C., Sarmiento F. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogotá. P 37-40 y 110.

FAO y FINUT. 2012. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, 91: 9-20.

FAO/WHO. 2001. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (Cordoba, Argentina: Food and Agriculture organization of the United Nations and World Health Organization).

Freuding B. Hogekamp y Schubert H. 1999. Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical Engineering*, 75: 27-35.

Fuchs M., Turchiuli C., Bohin M., Cuvelier M., Ordonnaud C., Peyrat M., Dumoulin E. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Food Engineering*, 75(1): 27-35.

Gibson G., Probert H., Van L., Rastall J., y Roberfroid M. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17: 259-275.

Gil H., Sánchez F. 2010. Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. *Ed. Médica Panamericana*. P. 271-275.

Goderska K, Czarnecki Z. 2008. Influence of microencapsulation and spray drying on the viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Polish Journal of Microbiology*, 57(2):135-140.

Guarner F. 2002. El colon como órgano: Hábitat de la flora bacteriana. *Nutrición Hospitalaria*, 17(2):7-10.

Guslandi M., Giollo P., and Testoni P. 2003 A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *The European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 15:697-698.

Kailasapathy K., Chin J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology & Cell Biology*, 78:80-88.

Kim E., Chen X., Pearce D. 2002. Surface characterization of four industrial spray –dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26(3):197-212.

Kinsell L., W., Partridge, J., Boling, L., Margen, S., Michaels, G. 1952. Dietary modification of serum cholesterol and phospholipid levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 12: 909-928.

Kopp L. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 101(2):229-241.

Kosikowski, F. Mistry V. 1997. Cheese and Fermented Milk Foods. Volume I: Origins and Principles. F.V. Kosikowski and Sons, L.L.C, Westport, CT.

Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *The International Dairy Journal*, 13:3-13.

Lourens A., Viljoen B. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *The International Dairy Journal*, 11:1-7.

Madrigal L. y Sangronis E. 2007. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. *La inulina y sus derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales*, 57(4):387-396.

Martins F., Rodrigues A., Tiago F., Penna F., Rosa C., Arantes R., Nardi R., Neves M., Nicoli J. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates the

immune system in gnotobiotic and conventional mice. *Journal of Medical Microbiology*, 56:352–359.

Massot J., Sanchez O., Couchy R., Antoin J., Parodl A. 1984. Bacteriopharmacological activity of *Saccharomyces boulardii* in Clindamycin induced colitis in the hamster. *The Thieme journal Drug Research*; 34:794-7.

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.

Moreno F., García D., Anton F. 2011. Introducción a la fisicoquímica. Ed. *Universitat de Valencia*. Valencia. P 65-68.

Mumy, Chen X., Kelly C., McCormick B. 2007. *Saccharomyces boulardii* interferes with *Shigella* pathogenesis by post-invasion signaling events. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294:599-609.

NC ISO7889:2009 “Yogurt _ Enumeración de los microorganismos característicos- técnica del conteo de colonias a 37°C” (ISO 7889:2003, IDT).

Niness K. 1999. Inulin and oligofructose: what are they?. *Journal of Nutrition*, 129:1402-1406.

NMX-F-444-1983. ALIMENTOS. Yoghurt o leche búlgara. Foods. Yoghurt or bulgarian milk. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos.

NMX-F-511-1988. Alimentos. Determinación de acidez en leche reconstituida

Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010. Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.

Ozkan T., Sahin E., Erdemir G., Budak, F. 2007. Effect of *Saccharomyces boulardii* in children with acute gastroenteritis and its relationship to the immune response. *International Medical Research*, 35:201-212.

Pardo S., Galvagno M., Cerrutti P. 2009. Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del pre acondicionamiento fisiológico. *Iberoamericana de Micología*, 26(2):155-160.

Piano M., Morelli L., Strozzi G., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garello E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso L. 2006. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease Journal*, 38(2):248-255.

Puerta Q. 2006. La humedad del grano preserva la calidad del café. Programa Nacional de cafeteros de Colombia. Avances técnico Cenicafé. P 1-4.

Ramírez N. 2010. Alimentos funcionales. Tesis de doctorado en Ingeniería de Alimentos, Universidad del Valle, Cali, Colombia. P 101: 1-2.

Ranadheera R., Baines S., Adams M. 2010 Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1):1-7.

Roberfroid M. 2005. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. Boca Raton, USA: CRC Press; 370.

Roberfroid M. 2007. Inulin-type Fructans: Functional Food Ingredients. *Journal of Nutrition*, 137: 2493-2502.

Rodríguez C., Tovar R., Prado M., Torres N. 2005. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios a la salud. *Revista de Investigación Clínica*, 53(7):457-472.

Romero C., Shelly R., Mestres L. 2004. Productos lácteos. Tecnología. Ed. Ediciones UPC; P. 109-134.

Ronka E., Malinen E., Saarela M., Rinta-Koski M., Aarnikunnas J., Palva A. 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology*, 83(1):63-74.

Salminen S., Isoulari E., Salminen E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 7:347-358.

Sanders M. 2001 Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science*, 84:319-331.

Sandrine G., Sajjad H., Jean C., Christine C. 2008. Increased Intestinal Delivery of Viable *Saccharomyces boulardii* by Encapsulation in Microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25(6):1290-1296.

Semyonov D., Ramon O., Kaplun Z., Levin B., Gurevich N., Shimoni E. 2010. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, 43:193- 202

Shittu T., Lawal M. 2007. Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages. *Food Chemistry*, 100(1):91-98.

Surárez L., Perdomo M., Escobar H. 1994. Microflora bacteriana y ecosistema intestinal. Fisiopatología del intestino delgado contaminado. Diarreas agudas. Medio ambiente en España. *Gastroenterología*, 48(2):61-64.

Surawicz C., McFarland V., Greenberg R., Rubin M., Fekety R., Mulligan M., Garcia J., Brandmarker S., Bowen K., Borjal D., Elmer G. 2000. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clinical Infectious Diseases*, 31:1012–1017.

Tasteyre A., Barc M., Karjalainen T., Bourlioux P., Collignon A. 2002. Inhibition of in vitro cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. *Microbiol Pathogen*, 32:219-225.

Torres A.M.L. 2009. Los fermentos lácteos en el siglo XIX. Los sitios de Zaragoza, Enfermedad, Salud y Propaganda. P 449-462.

Tortora G., Berdell R., Funke C. 2007. Introducción a la Microbiología. *Ed. Médica Panamericana*. Argentina. P 182.

Toothaker R., Elmer G. 1984. Prevention of Clindamycin-induced mortality in hamster by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrobial Ag Chemother*, 26:552-6.

Tribby D. 2001. Flavor Criticims, Causes and Corrective Action for Cultured Dairy Products, Penn State University Cultured Products Short Course 3:191-192

Tuite M. 1991. *Saccharomyces*. En: Biotechnology Handbooks N4. *Ed. Plenum Press*. New York. P 10-23.

Ulloa J., Espinosa A., Cruz R., Ulloa P., Ulloa R., Ramírez R. 2010. Los fructanos y su papel en la promoción de la salud, *Fuente*, 2 (5):57-62.

Verstrepen K., Klis F. 2006. Flocculation, adhesión and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, 60:5-15.

Vidon N., Huchet B., Rambaud J. 1986. Influence de *Saccharomyces boulardii* sur la secretion jéjunale induite chez le rat par la toxine cholérique. *Gastroenterology Clinical Biology Journal*, 10:13-6.

Xu Z., Hu C., Xia M., Zhan X., Wang, M. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science*, 82:1030-1036.

Yañez J., Salazar J., Chaires L., Jiménez J., Márquez M., Ramos E. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*. 21:313-318.

Zamora V. 2011. Desarrollo de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e Inulina. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán. P 1-70.

Zanello G., Meurens F., Berro M., Salmon H. 2009. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Current Issues in Molecular Biology*, 11:47-58.

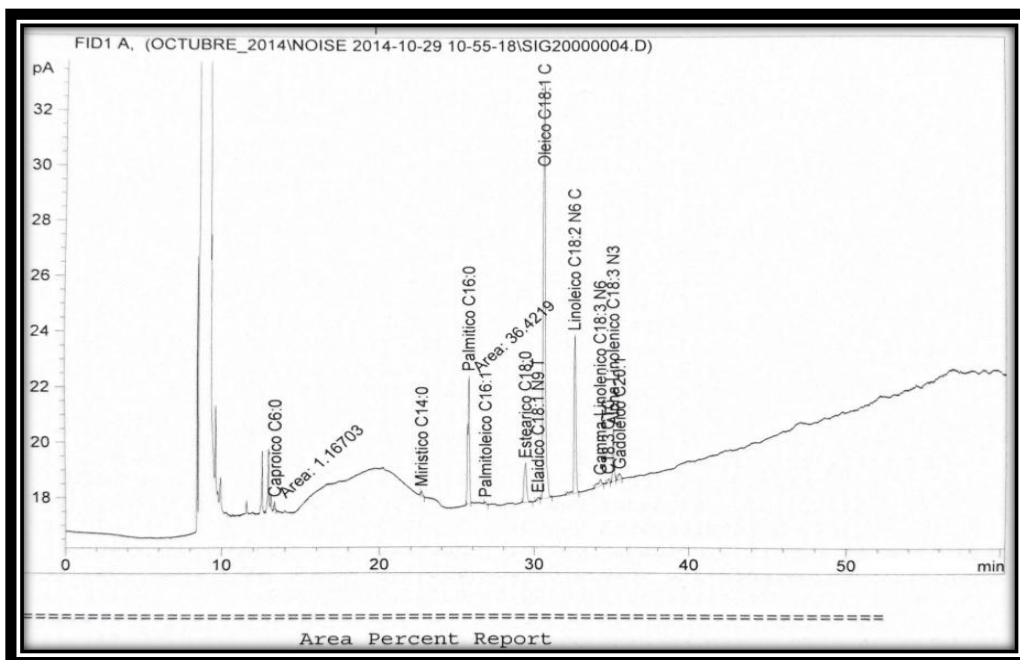
Zuidam N., Nedović A. 2010. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Chapter 10:269-273

11. ANEXOS

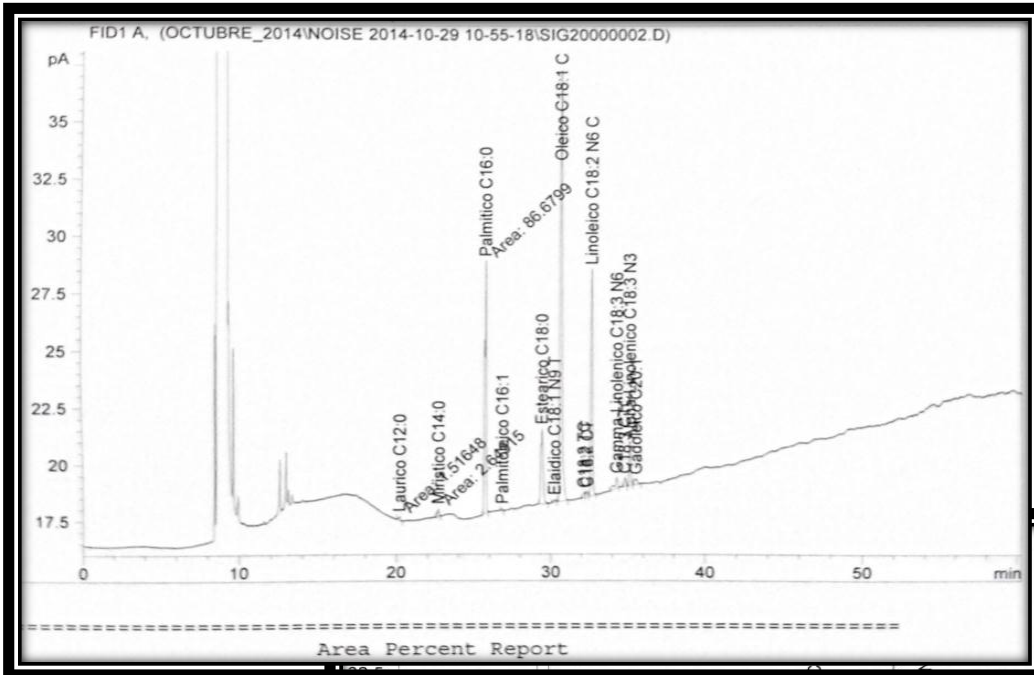
ANEXO A

A continuación se presentan los cromatogramas de los aceites analizados; aceite vegetal de palma y los aceites presentes en la formulación F1, formulación

F2 y
formulación F3



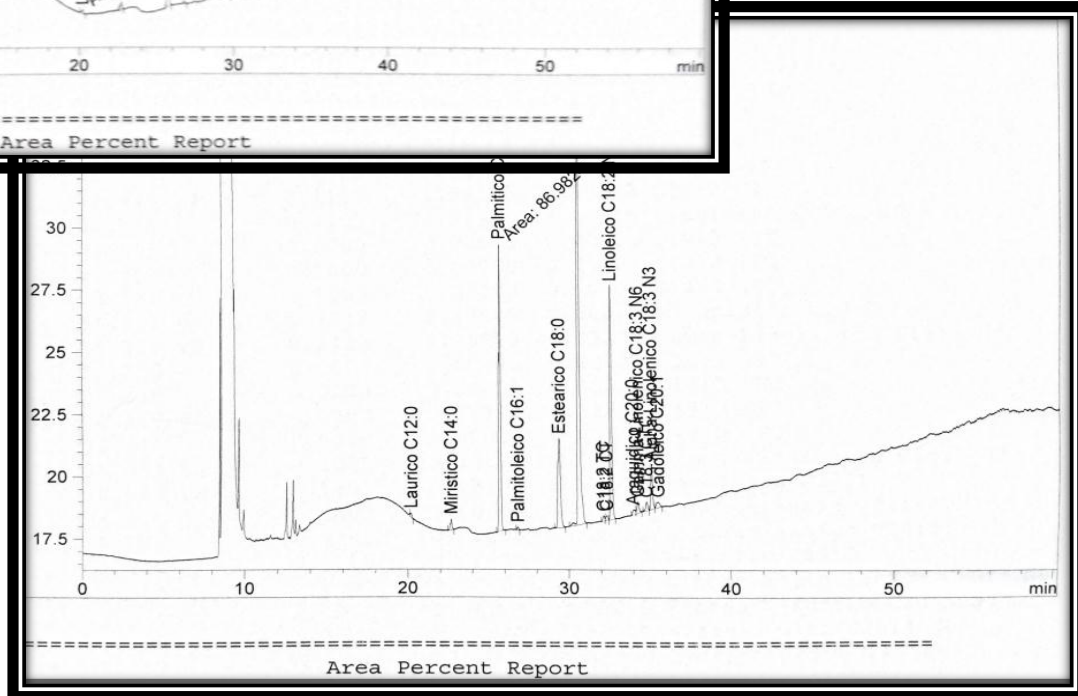
Cromatograma del aceite vegetal de palma.



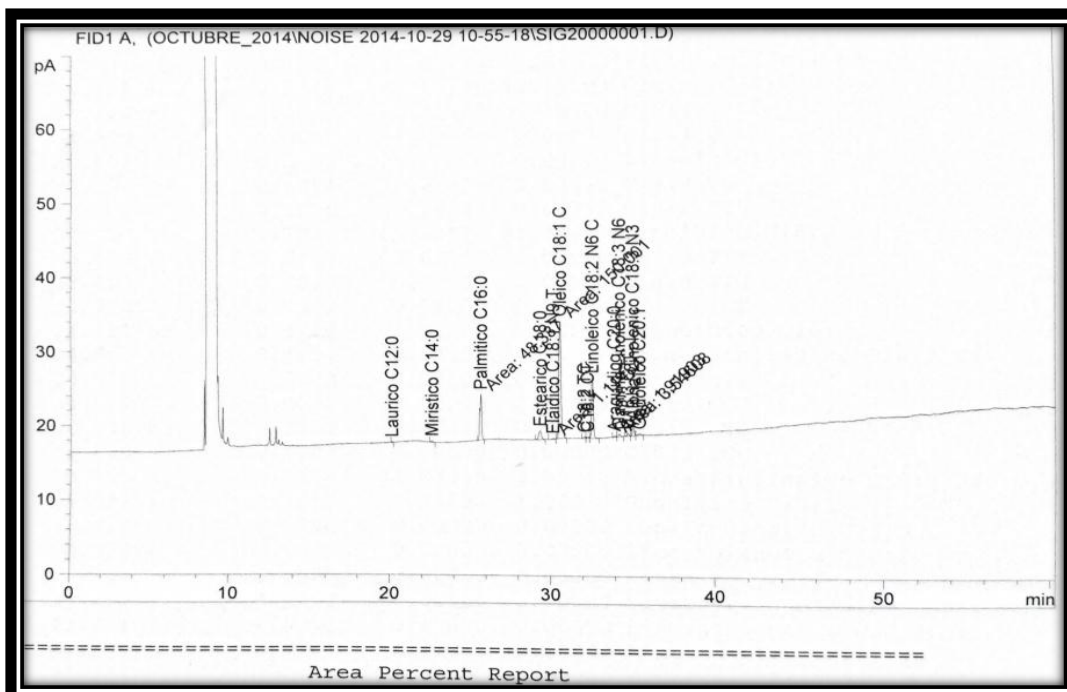
Cromatogram a del aceite de la formulación F1.

Cromatograma del aceite de la formulación F2.


Cromatograma del aceite de la formulación F3.



Ficha técnica del aceite vegetal AAK



empleado en las formulaciones F1.F2 y F3.

		
Fecha de emisión: 02.11.12	Grasa Vegetal AKOFLUID D20	N° de control: AAK-EPT-573a
Fecha de Revisión: 19.03.13		Página 1 de 3

1. CÓDIGO AAK

Producto en Desarrollo

2. GENERALIDADES: Grasa vegetal bombeable, de apariencia cremosa y consistencia semi-sólida a temperatura ambiente, con características de fluidez que le permiten ser bombeada conservando su textura, elaborada a base de aceites vegetales refinado, blanqueado y desodorizado.

3. APLICACIONES: Lácteos

4. CARACTERÍSTICAS SENSORIALES:

- ASPECTO SEMILÍQUIDA A TEMPERATURA AMBIENTE
- OLOR LIBRE DE OLOR RANCIO, LIGERO A LECHE
- SABOR LIBRE DE SABOR RANCIO, SABOR LIGERO A LECHE

5. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	MINIMO	MAXIMO	METODO DE ANALISIS
ÁCIDOS GRASOS LIBRES (% OLEICO)	0	0.10	AOCS Ca 5a -40
COLOR LOVIBOND (Cell 5 1/2")	0	4R40A	AOCS Cc 13e-92
VALOR DE PERÓXIDO MEQ/K	0	1.0	AOCS Cd 8b-90
ÍNDICE DE YODO	90	100	AOCS Cd 1b-87
PUNTO DE FUSIÓN POR DESLIZAMIENTO (°C)	31	35	AOCS Cc 3-25
SFC BRUKER p NMR			IUPAC 2.150
10°C	6	12	
20°C	4	10	
30°C	0	6	
35°C	0	4	
40°C	0	2	
COMPOSICION (% Acidos grasos)*			AOCS Ce 1f-96
Saturados	18	20	
Mono insaturados	50	60	
Poli insaturados	20	30	
Omega-3	3	7	
Omega 6	17	20	
Trans	NA	1.0	
METALES PESADOS (ppm)*			
Hierro	NA	1.5	
Cobre	NA	0.1	
Plomo	NA	0.1	
Arsénico	NA	0.1	

*Referencia

6. ANTIOXIDANTES Y ADITIVOS:

Sabor leche
Antioxidante BHT 150 ppm máx.

7. ENVASE:

Contenedores de polietileno de alta densidad de 1 ton
Pipas de acero inoxidable, con aislamiento, previamente verificadas en su limpieza.



8. METODO DE ENVASADO Y DISTRIBUCIÓN

- Presentación en contenedor: Envasado semiautomático. Distribución a temperatura ambiente en transporte cerrado, limpio, seco y libre de fauna nociva
- Presentación Granel: Envasado semiautomático a temperatura de 25-28°C. La pérdida de temperatura es de aproximadamente 2°C en 24 horas en transporte cerrado y con sellos de seguridad

9. CONDICIONES RECOMENDADAS DE ALMACENAMIENTO:

- En contenedor: Consérvese en lugar fresco y seco, alejado de la luz y el calor, preferentemente a una temperatura de entre 18-28°C. No Almacenar junto a materiales aromáticos. Mantener el empaque perfectamente cerrado. Manéjese con cuidado y no estibar más de 5 camas una sobre otra.
- A granel, almacenar a 30 °C máx. en tanques de acero inoxidable o acero al carbón con recubrimiento epóxico grado alimenticio, sin agitación turbulenta.

10. FECHA DE CONSUMO PREFERENTE (para asegurar cristalización adecuada)

- Granel: 2 meses en tanques (bajo condiciones recomendadas)
- Contenedor, tambor, cubeta: 6 meses. Se recomienda su uso preferentemente dentro de los primeros 4 meses a partir de su fecha de elaboración para garantizar la cristalización correcta y funcionamiento adecuado.

11. RECOMENDACIONES PARA LA PREPARACIÓN Y/O TRATAMIENTO PREVIO A SU USO O PROCESAMIENTO:

No requiere tratamiento previo a su uso.

12. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN RELACIONADOS CON LA INOCUIDAD

- Producto libre de materia extraña
- Presentación en contenedor: Empaque íntegro, cerrado y en buen estado. Empaque con identificación de número de lote, fecha de consumo preferente y nombre de producto.
- Presentación Granel: Domo y válvula de descarga con sellos de seguridad; el número de los sellos colocados son referenciado en el certificado de calidad y ticket de bascula

13. OBSERVACIONES:

*Referencia: monitoreo semestral. Solicitar en caso de requerir análisis

(K*) Producto Kosher

Durante el procesamiento del producto se utilizan tierras diatomeas y ácido fosfórico como coadyuvantes del proceso.

14. REGULACIONES APLICABLES:

- Las instalaciones y procesos de manufactura de los productos cumplen con la **NOM-251-SSA1-2009** "Prácticas de Higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios".
- **Reglamento de la ley de salud** en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios.
- **ACUERDO** por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes en alimentos y suplementos alimenticios del **16 de Julio de 2012** y adiciones.
- CODEX STAN 19 Rev.2 Enmienda 2009
- CODEX STAN 210.

15. ESTATUS GMO

El producto es formulado con aceites provenientes de semilla Genéticamente Modificada,

16. DECLARACIÓN DE ALÉRGENOS Y SUSTANCIAS SENSITIVAS (acorde con la Reglamentación de la FDA)

NOMBRE	PRESENTE EN EL PRODUCTO.	DERIVADOS
ALERGENOS		
Cacahuates	NO	
Nueces cualquiera (almendras, pistaches, macadamia, etc.)	NO	
Huevo y sus derivados	NO	



Leche y sus derivados	NO	
Soya y sus derivados	NO	
Trigo	NO	
Chocolate	NO	
Pescados	NO	
Mariscos	NO	
SENSITIVOS		
Colorante amarillo # 5	NO	
Mostaza	NO	
Ajo (Raíz, hojas u tallos)	NO	
Histamina	NO	
Sulfitos (Bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, dióxido de azufre.)	NO	
Amarillo 5 (Tartrazina)	NO	
Glutamato monosódico	NO	
Inosinato y guanilato disódicos (1+G)	NO	
Lupino	NO	
Nitratos	NO	
Nitritos	NO	
BHA	NO	
BHT	SI	
TBHQ	NO	
Levaduras	NO	
Maíz o derivados de maíz	NO	
Conservadores	NO	
Glutamatos	NO	
Aspartamefenilalanina	NO	

17. INFORMACIÓN NUTRIMENTAL (Base: 100 gr. de material)

Calorías (kcal)	900
Proteína (g)	0
Carbohidratos (g)	0
Fibras alimentarias (g)	0
Azúcar (g)	0
Grasa total (g)	99-100
Saturada (g)	20
Monoinsaturada (g)	55
Polinsaturada (g) de las cuales	25
Omega-3	5
Omega-6	18
Trans (g)	1.0 máx.
Colesterol (ppm)	0.0
Vitaminas	0.0

18. CONTROL DE CAMBIOS que aplican para no. de control a.

a) Declaración de Ácidos Grasos Omega

Elaborado por: Daniela Aguilar Técnico de Desarrollo	Revisado por: Laura Calderón Gerente de Innovación y Desarrollo	Aprobado por: Joaquín Barragán Gerente de Comercialización
Fecha: 19.03.13	Fecha: 19.03.13	Fecha: 19.03.13

ANEXO B

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA – PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable: Alba Alicia Trespalacios Rangel			
Número	CMDM - PUJ	213	
Microorganismo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Fuente	Laboratorio de Biotecnología	Origen	Melaza
Almacenamiento	Glicerol 20%	Historial PUJ	Abril 2006.
Nivel de seguridad	1	Conservación	Criopreservación – 70°C
Condiciones de crecimiento		Anaeróbio facultativo. Temperatura 37°C	
Pruebas Bioquímicas	Glucosa: Positiva Glicerol: Negativo 2-cetogluconato de calcio: Negativo L-arabinosa: Negativa D-Xilosa: Negativa Adonitol: Negativo Xilitol: negativo D-galactosa: Postiva Inositol: negativo D-Sorbitol: negativo	Metil – alfa- glucopiranosida: negativo N- acetilglucosamina: negativo D- Celobiosa: negativo D- Lactosa: negativo D- Maltosa: Positivo D- Sacarosa: Positiva D-trealosa: Negativa D-Melesitosa: Negativa D- Rafinosa: Postiva	
Reacciones atípicas			
Observaciones		Identificación con API 20C AUX. % ID: 99.0%	