



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

Resistencia de la bacteria prebiótica *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada y libre frente a condiciones de estrés simuladas relacionadas con la producción de alimentos

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTORES

Brayan CHOQUE CONTRERAS

Allison Valeria HUARINGA OLAVE

ASESOR

Dra. Miriam Estela MEMENZA ZEGARRA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Choque, B. & Huaranga, A. (2023). *Resistencia de la bacteria prebiótica Lactobacillus plantarum ATCC 1407 microencapsulada y libre frente a condiciones de estrés simuladas relacionadas con la producción de alimentos*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Autor 1	
Nombres y apellidos	ALLISON VALERIA HUARINGA OLAVE
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72078560
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0008-7540-4065
Autor 2	
Nombres y apellidos	BRAYAN CHOQUE CONTRERAS
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71714839
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0007-3620-3685
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Miriam Estela Memenza Zegarra
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41564297
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4650-9027
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Fernando Suca Apaza
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40375320
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Noemí Bravo Aranibar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10672520
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Miriam Estela Memenza Zegarra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41564297

Datos de investigación	
Línea de investigación	C.7.0.4 Biotecnología Agroindustrial
Grupo de investigación	Agrobiotecnología Ambiental (AGROTEC)
Agencia de financiamiento	Vicerrectorado de Investigación y Posgrado-UNMSM contrato N° C23070911
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Química e Ingeniería Química, Laboratorio de Biotecnología Microbiana, País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Av. República de Venezuela s/n, Lima 15081 Latitud: -12.06035 Longitud: -77.08370
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2023
URL de disciplinas OCDE	Ingeniería de procesos https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.04.02 Biotecnología alimentaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú. DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central Telefónica: 619-7000

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado Calificador nombrados por el señor Presidente del Comité Ejecutivo del "Programa Ciclo Taller de Titulación Profesional por la Modalidad de Tesis y Trabajo de Suficiencia Profesional para la Facultad de Química e Ingeniería Química 2023", bajo la Presidencia de la **Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR; Dr. FERNANDO SUCA APAZA (Miembro)** y la **Dra. MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA (Asesora)**; habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada "**Resistencia de la bacteria prebiótica *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada y libre frente a condiciones de estrés simuladas relacionadas con la producción de alimentos**" después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la tesis elaborado por el bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **BRAYAN CHOQUE CONTRERAS**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL de INGENIERO AGROINDUSTRIAL**, acordaron calificarlo con la **NOTA** de:

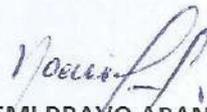
DIECISEIS

(LETRAS)

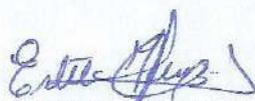
16

(NÚMEROS)

Ciudad Universitaria, 16 de diciembre del 2023.


Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR
Presidenta


Dr. FERNANDO SUCA APAZA
Miembro


Dra. MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA
Asesora


Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL
Director de la E.P. de Ingeniería Agroindustrial



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central Telefónica: 619-7000

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado Calificador nombrados por el señor Presidente del Comité Ejecutivo del "Programa Ciclo Taller de Titulación Profesional por la Modalidad de Tesis y Trabajo de Suficiencia Profesional para la Facultad de Química e Ingeniería Química 2023", bajo la Presidencia de la **Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR; Dr. FERNANDO SUCA APAZA (Miembro)** y la **Dra. MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA (Asesora)**; habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada "**Resistencia de la bacteria prebiótica *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada y libre frente a condiciones de estrés simuladas relacionadas con la producción de alimentos**" después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la tesis elaborado por la bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **ALLISON VALERIA HUARINGA OLAVE**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL** de **INGENIERA AGROINDUSTRIAL**, acordaron calificarla con la **NOTA** de:

DIECISEIS

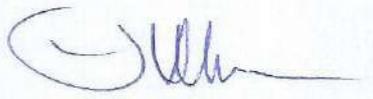
(LETRAS)

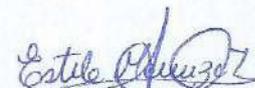
16

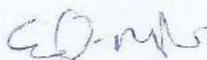
(NÚMEROS)

Ciudad Universitaria, 16 de diciembre del 2023.


Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR
Presidenta


Dr. FERNANDO SUCA APAZA
Miembro


Dra. MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA
Asesora


Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL
Director de la E.P. de Ingeniería Agroindustrial





CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Miriam Estela Memenza Zegarra en mi condición de asesora acreditado con la Resolución Decanal N° 000025-2024-D-FQIQ/UNMSM de la tesis, cuyo título es **“Resistencia de la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada y libre frente a condiciones de estrés simuladas relacionadas con la producción de alimentos”**, presentado por los bachilleres en Ingeniería Agroindustrial **Brayan Choque Contreras – Allison Valeria Huaranga Olave** optar el título Profesional de Ingeniera Agroindustrial CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **15%** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención el título correspondiente.

Firma del Asesor

DNI: 41564297

Miriam Estela Memenza Zegarra
Asesora



Huella digital

DEDICATORIA

El primer lugar quiero dedicar a mi papá, German Choque, por el apoyo y la confianza que me brindó durante este periodo, mostrándome confianza y siendo un modelo a seguir como persona, lo admiro y lo quiero mucho.

A mi mamá, Sonia, por su motivación, empuje, y perseverancia que tuvo siempre para que mi educación sea la mejor posible.

A mis hermanos, Kevin y Einer por el apoyo incondicional, la muestra de amor y solidaridad en los momentos más difíciles.

A Sam que me enseñó el amor incondicional y lealtad. Y que fue una motivación para terminar mi etapa educativa.

Y a todos mis familiares que con consejos y muestras de apoyo me guiaron por un buen camino para poder consolidarme como un profesional.

Y a mi compañera, que fue una pieza fundamental como motivación y un gran apoyo para concluir de manera exitosa este trabajo. Le deseo lo mejor siempre.

“Brayan Choque”

DEDICATORIA

A mis padres, Alfredo y Mirian, que son el pilar fundamental de mi vida, por la paciencia y el amor que siempre me han brindado, ejemplos de admiración por el esfuerzo y dedicación que hizo posible mi formación académica y personal.

A mis hermanos por el apoyo incondicional durante toda esta etapa y ser la alegría en momentos complicados.

A mis abuelos por ser mi fuente de inspiración y ganas de superación día tras día.

A todos mis familiares que creyeron en mí, acompañándome con sus consejos y palabras de aliento para lograr este objetivo.

A mi compañero de este trabajo de investigación, por el soporte, motivación y perseverancia que ha sido indispensable para superar cada obstáculo y seguir adelante juntos.

“Allison Huaringa”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, comenzamos agradeciendo a Dios, por acompañarnos a lo largo de la carrera, brindarnos la fortaleza para dar este paso y colocar a las personas indicadas que contribuyeron en este proyecto.

A nuestra alma máter, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por brindarnos la oportunidad de culminar nuestra carrera profesional. De la misma manera, a la Escuela de Ingeniería Agroindustrial por su formación académica durante los años de estudio.

A nuestra asesora, la Dra. Miriam Memenza Zegarra, por la confianza, disposición, guía y medios brindados en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana para poder llevar a cabo este trabajo.

A los profesores, por transmitirnos los conocimientos necesarios para hoy poder estar aquí e inculcarnos el compromiso, responsabilidad y ganas de superación.

A nuestro amigo y futuro ingeniero Alexander Jimenez, por su amabilidad y disponibilidad para orientarnos y apoyarnos en el laboratorio.

A personas en general que aportaron, apoyaron y se preocuparon por la culminación de este proyecto de investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	3
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	4
1.1	4
1.2	6
1.2.1 Determinación del problema	6
1.2.2 Formulación del problema	8
1.3	9
1.4	11
1.4.1 Objetivo principal	11
1.4.2 Objetivos específicos	11
1.6	12
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LA LITERATURA	13
2.1 Marco teórico	13
2.1.1 Probióticos	13
2.1.2 Beneficios de los probióticos	14
2.1.3 Probióticos en los alimentos	15
2.1.4 Bacterias Ácido lácticas	17
2.1.5 Lactobacillus plantarum	18
2.1.6 Viabilidad de probióticos bajo condiciones gastrointestinales	19
2.1.7 Microencapsulación	21
2.1.8 Agentes encapsulantes	22
2.2 Antecedentes	25
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES	30
3.1 Hipótesis	30
3.2 Variables	30
3.2.1 Variables Dependientes	30
3.2.2 Variables Independientes	30
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Lugar y tiempo	31
4.2 Descripción del material experimental	31
4.2.1 Microorganismo	31
4.2.2 Insumos y reactivos	31
4.2.3 Materiales	32

4.2.4 Equipos	32
4.3 Metodología	33
4.3.1 Preparación del inóculo	33
4.3.2. Microencapsulación de la bacteria <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407	34
4.3.3. Evaluación de la viabilidad de la bacteria <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en forma libre y microencapsulada.	34
4.3.4. Evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria <i>L. plantarum</i> ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión	35
4.3.5. Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión.	36
4.3.6. Evaluación del efecto del estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión	36
4.3.7. Determinación de la supervivencia de la bacteria <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión.	37
4.3.8. Evaluar la cinética de crecimiento de la bacteria <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 libre y microencapsulada sometida a las condiciones de estrés.	37
4.4 Diseño experimental u observacional	38
CAPÍTULO V: ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
5.1 Evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria <i>L. plantarum</i> ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.	39
5.2 Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria <i>L. plantarum</i> ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.	45
5.3 Evaluación del efecto del estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria <i>L. plantarum</i> ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.	51
5.4 Evaluación de la cinética de crecimiento de la bacteria libre y microencapsulada sometida a las condiciones de estrés.	56
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
6.1 Evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria <i>L. plantarum</i> ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.	59
6.2 Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria <i>L. plantarum</i> ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.	60
6.3 Evaluación del efecto del estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria <i>L. plantarum</i> ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.	62
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES	64
CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Indicadores de EDA por grupos de edad	7
Tabla 5.1 Concentraciones microbianas en Log (UFC/ml) de la cepa microencapsulada a diferentes condiciones de temperatura	39
Tabla 5.2 Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs T° microencapsulada).	41
Tabla 5.3 Comparación en pareja utilizando método Tukey (T° microencapsulada)	42
Tabla 5.4 Concentraciones microbianas en Log (UFC/ml) de la cepa en forma libre a diferentes condiciones de temperatura	43
Tabla 5.5 Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs T° en forma libre)	44
Tabla 5.6 Comparación en pareja utilizando método Tukey (T° forma libre)	44
Tabla 5.7 Concentraciones microbianas en Log (UFC/ml) de la cepa microencapsulada a diferentes condiciones osmóticas	46
Tabla 5.8 Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs % NaCl microencapsulada)	47
Tabla 5.9 Comparación en pareja utilizando método Tukey (% NaCl microencapsulada)	48
Tabla 5.10 Concentraciones microbianas en Log (UFC/ml) de la cepa en su forma libre a diferentes condiciones osmóticas	49
Tabla 5.11 Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs % NaCl libre)	50
Tabla 5.12 Comparación en pareja utilizando método Tukey (% NaCl libre)	50
Tabla 5.13 Concentraciones microbianas en Log (UFC/ml) de la cepa en su forma microencapsulada a diferentes condiciones oxidativas	52
Tabla 5.14 Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs % H ₂ O ₂ microencapsulada).	53
Tabla 5.15 Comparación en pareja utilizando método Tukey (% H ₂ O ₂ microencapsulada)	53
Tabla 5.16 Concentraciones microbianas en Log (UFC/ml) de la cepa en su forma libre a diferentes condiciones oxidativas	54

Tabla 5.17 Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs % H ₂ O ₂ libre)	55
Tabla 5.18 Comparación en pareja utilizando método Tukey (% H ₂ O ₂ libre)	56
Tabla 5.19 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación en condiciones de estrés de la cepa ATCC 1407 microencapsulada	57
Tabla 5.20 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación en condiciones de estrés de la cepa ATCC 1407 en su forma libre	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Mecanismo de acción de los probióticos	15
Figura 2.2 Morfología de la cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i>	19
Figura 2.3 Fases de crecimiento de bacteria	19
Figura 2.4 Efectos de los probióticos sobre la función de la barrera intestinal	20
Figura 2.5 Estructura química de Alginato	23
Figura 2.6 Desacetilación de la quitina a quitosano y posterior reticulación con diferentes agentes bifuncionale para reticular el quitosano	25
Figura 5.1 Cinética de crecimiento del <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 microencapsulada a diferentes condiciones de temperatura	40
Figura 5.2 Valores de pH a diferentes condiciones de temperatura	41
Figura 5.3 Gráficas de intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad y T° (Microencapsulado)	42
Figura 5.4 Cinética de crecimiento del <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones de temperatura	43
Figura 5.5 Gráfica de intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad (forma libre)	44
Figura 5.6 Cinética de crecimiento del <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en su forma microencapsulada a diferentes condiciones de estrés osmótico	45
Figura 5.7 Valores de pH a diferentes condiciones osmóticas microencapsulado	46
Figura 5.8 Gráficas de intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad y % NaCl (Microencapsulado)	48
Figura 5.9 Cinética de crecimiento del <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones osmóticas	49
Figura 5.10 Valores de pH a diferentes condiciones osmóticas en forma libre	50
Figura 5.11 Gráficas de intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad y % NaCl (Forma libre)	51
Figura 5.12 Cinética de crecimiento del <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en su forma microencapsulado a diferentes condiciones oxidativas	52
Figura 5.13 Gráficas de intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad y % H2O2	

(Microencapsulado)	53
Figura 5.14 Cinética de crecimiento del <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones oxidativas	54
Figura 5.15 Valores de pH a diferentes condiciones de estrés oxidativo en forma libre	55
Figura 5.16 Gráfica de intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad y % H ₂ O ₂ en forma libre	56

ÍNDICE DE ANEXO

ANEXO 1: Preparación de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407

ANEXO 2: Microencapsulación de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407

ANEXO 3: Evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407

ANEXO 4: Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407

ANEXO 5: Evaluación del efecto del estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407

ANEXO 6: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas microencapsulada para temperatura

ANEXO 7: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas microencapsulada para estrés osmótico

ANEXO 8: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas microencapsuladas para estrés oxidativo

ANEXO 9: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas en forma libre para temperatura

ANEXO 10: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas en forma libre para estrés osmótico

ANEXO 11: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas forma libre en estrés oxidativo

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
UFC/ml	Unidades Formadoras de colonia por mililitro
H	Horas
pH	Potencial de hidrogeniones
T°	Temperatura
N	Normalidad
µm	Micrómetros
v/v	Volumen/volumen
NaCl	Cloruro de sodio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacteria ácido lácticas

RESUMEN

Diversos estudios refieren a los múltiples beneficios por parte de los probióticos para la salud humana, lo cual ha generado un mayor interés sobre el comportamiento de estos. En la presente investigación se evaluó el efecto de diferentes condiciones de estrés comúnmente presentes en la elaboración de los alimentos sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada por el método de extrusión y libre in vitro cultivado en caldo MRS a 37 °C, 150 rpm por 24 h. Las condiciones evaluadas fueron diferentes niveles de temperatura 37°, 40° y 50°, presión osmótica (5, 7 y 10 % de NaCl) y estrés oxidativo (0.1 y 0.5 % de H₂O₂). Así también, se evaluó la cinética de crecimiento y tiempo de duplicación en cada condición evaluada. Los resultados obtenidos mostraron que la bacteria microencapsulada y libre sometidas a 37 y 40 °C presentaron una mayor tasa de crecimiento celular a diferencia de 50 °C, en el cual la bacteria microencapsulada tiene una disminución de células viables al 56.7 %, mientras que en la forma libre presentó una tasa específica de crecimiento celular tan solo del 0.3%. Por otro lado, el crecimiento de la bacteria en porcentajes de NaCl mayores al 5% presento una disminución del 66 %, mientras que, el crecimiento en condiciones oxidativas en porcentajes del 0.1 y 0.5 % de H₂O₂ tanto en la forma libre como la microencapsulada presentaron comportamiento lineal y constante en el tiempo. En comparación con la forma libre, la microencapsulación genera una protección de la bacteria para tener una mejor viabilidad y sea resistente, sin embargo, al estar aislada no está en un medio con nutrientes lo que también impide un mayor crecimiento a comparación con la forma libre. Se determinaron los valores de la función matemática utilizando el software Minitab, los ensayos son realizados por duplicado en ensayos independientes.

Palabras clave: Probiótico, viabilidad, *Lactobacillus plantarum*, microencapsulación, inóculo, osmótico, oxidativo, cinética, tiempo de duplicación.

SUMMARY

Several studies refer to the multiple benefits of probiotics for human health, which has generated a greater interest in their behavior. In the present investigation, the effect of different stress conditions commonly present in food processing on the viability of *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulated by the extrusion method and free in vitro cultivated in a MRS broth at 37 °C, 150 rpm for 24 h, at thermal conditions of 37°, 40° and 50°, osmotic (5, 7 and 10 % NaCl) and oxidative (0.1 and 0.5 % H₂O₂) conditions was evaluated. The growth kinetics and doubling time were also evaluated. As a result, the microencapsulated and free strains subjected to 37 and 40 °C show a higher growth rate since they have not been stress temperatures as in 50 °C which, being microencapsulated, has a decrease of viable cells to 56.7 %, while in the free form remains constant. On the other hand, the bacteria at NaCl percentages higher than 5% generate stress since the higher the salt concentration, the growth decreases to 66%, while in the oxidative conditions in the free and microencapsulated form showed us that these percentages of 0.1 and 0.5% did not mean an oxidative stress since there is a linear and constant behavior over time. In comparison with the free form, the microencapsulation generates a protection of the bacteria to have a better viability and be resistant, however, being isolated it is not in a medium with nutrients which also prevents a greater growth compared to the free form. The values of the mathematical function were determined using Minitab software, the tests were performed in duplicate in independent trials.

Key words: probiotic, viability, *Lactobacillus plantarum*, microencapsulation, inoculum, osmotic, oxidative, kinetics, doubling time.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Los consumidores modernos se han ido interesando cada vez más por su salud personal y, en específico, por los alimentos capaces de prevenir y/o curar enfermedades. Durante años, se han utilizado microorganismos en la fermentación de alimentos y bebidas alcohólicas, pero recientemente han estado surgiendo estudios para examinar sus posibles beneficios y su viabilidad en un proceso industrial.

Los probióticos son microorganismos vivos que nos aportan efectos beneficiosos a la salud al consumir cantidades apropiadas (Guarner y Schaafsma, 1998). Un ejemplo de ello es *Lactobacillus plantarum* conocida como una bacteria ácido láctica heterofermentativa facultativa, muy versátil en su metabolismo ya que se pueden encontrar en diversos ambientes desde productos lácteos y cárnicos. También nos ayudan a resistir los ácidos biliares en la ingestión, su paso por el intestino para colonizar los tejidos y evitar la presencia de microorganismos patógenos, evitando que estos puedan absorber los nutrientes o vitaminas en el huésped y una protección de las células epiteliales de la pared del intestino (Kleerebezem et. al., 2003).

La reducción de posibles afecciones gastrointestinales y con ello, la mejora de la flora intestinal son efectos de la presencia de probióticos. Para lograr que todos los beneficios del probiótico lleguen a darse en el huésped, se tiene que constatar la cantidad mínima consumida que se recomienda por la FAO y la OMS, que es $10^6 - 10^7$ UFC/g. Un inconveniente que suele ocurrir con respecto a la viabilidad y estabilidad de la bacteria es que depende de la preparación del alimento y del recorrido que realiza por el tracto intestinal, estando expuesta a las condiciones adversas del pH, cambios de temperatura, estrés osmótico y estrés oxidativo que reducen el crecimiento del microorganismo o en todo caso termine con muerte celular.

La técnica de microencapsulación permite aislar a los microorganismos para mejorar su resistencia frente a condiciones de estrés, la formación de microcápsulas mantiene un ambiente donde puedan estabilizar o aumentar su tasa de crecimiento (Anal y Singh, 2007).

Por ello usamos el alginato que es uno de los principales polímeros usados en la industria el cual nos brinda una matriz más versátil, biocompatible y resistentes a cambios de pH, luz y temperatura (González et al., 2012).

Hay pocos estudios acerca de las resistencias de bacterias ácido lácticas y el gran impacto que pueden generar su comportamiento, por lo tanto, en este estudio se propone evaluar la resistencia de la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada y libre frente a condiciones de estrés simuladas relacionadas con la producción de alimentos.

En el primer capítulo se describe la problemática, justificación y objetivos en que se basa la presente investigación. En el segundo se describe al *Lactobacillus plantarum*, sus características, la viabilidad en alimentos, el tipo de microencapsulación utilizada e investigaciones recientes que apoyen a nuestro estudio. En el capítulo cuatro se detalla los materiales y metodología utilizada. Finalmente se muestran los resultados obtenidos con respecto a la viabilidad de la bacteria ácido láctica a diferentes condiciones de estrés evaluados y sus respectivas conclusiones.

1.2 Planteamiento del problema

1.2.1 Determinación del problema

Desde hace algunas décadas, las enfermedades crónicas han llegado a ser la causa más recurrente de morbilidad y mortalidad en el mundo. Algunas investigaciones científicas han podido establecer que tales enfermedades se relacionan mayormente con la alimentación, desórdenes en la dieta, entre otros factores que son un problema importante de salud pública. Una mala alimentación es provocada por un consumo insuficiente o desmedido de macronutrientes y micronutrientes.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), estos malos hábitos alimenticios desencadenan una alteración en el sistema inmunológico, físico, psicológico y aumentan la susceptibilidad a las enfermedades como los padecimientos gastrointestinales. Esto viene reforzado por los cambiantes estilos de vida y el consumo de alimentos procesados que favorecen el incremento de bacterias proinflamatorias en el intestino.

El Ministerio de Salud (MINSA) ha identificado que las enfermedades gastrointestinales en el Perú se encuentran entre las once principales categorías de enfermedades que afectan la salud de personas de cualquier edad y condición social (Tabla 1), aunque los grupos más vulnerables son los niños y los adultos mayores. La incidencia anual de diarrea estimada en el mundo es de 1 500 millones de casos y el 70 % de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados. En el año 2023 se han notificado en el Perú un total de 567 681 enfermedades diarreicas agudas (EDA), el 35,15% fueron reportadas en los menores de 5 años (El Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - CDC MINSA).

Tabla 1

Indicadores de EDA por grupos de edad, Perú 2018, 2019 y 2023.

Indicadores	Edad	2018	2019	2023
Episodios por EDA	< 5 años	212,266	214,048	199,563
	≥ 5 años	302,006	323,685	368,118
	Total	514,272	537,733	567,681
Razón de episodios de EDA x cada 1000 Hab.	Acuosa	502,187	525,937	559,347
	Disentérica	12,085	11,796	8,334
Razón de episodios de EDA x cada 1000 Hab.	< 5 años	75.35	76.36	77.38
	≥ 5 años	10.29	10.89	11.78
	Total	15.99	16.53	16.78
Hospitalizaciones por EDA	< 5 años	1,817	1,943	1,696
	≥ 5 años	1,695	1,746	1,273
	Total	3,512	3,689	2,969
Razón de hospitalizaciones por EDA x cada 1000 Hab.	< 5 años	0.86	0.91	0.85
	≥ 5 años	0.56	0.54	0.35
	Total	0.68	0.69	0.52
Defunciones por EDA	< 5 años	21	20	22
	≥ 5 años	5	5	11
	Total	26	25	33
Tasa mortalidad x 100 000 habitantes	< 5 años	0.75	0.71	0.85
	≥ 5 años	0.017	0.017	0.036
	Total	0.08	0.08	0.10
Razón de defunciones por EDA x cada 100 episodios	< 5 años	0.01	0.01	0.01
	≥ 5 años	0.002	0.002	0.003
	Total	0.005	0.005	0.006

Fuente: (CDC MINSA)

Estas enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) son causadas por bacterias patógenas, principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*, parásitos como *Giardia lamblia* y *amibas*, y virus que se encuentran al consumir alimentos contaminados con materia fecal. Estas se adquieren por las inadecuadas prácticas de higiene y contaminación en la manipulación de los alimentos provocando diarrea infecciosa, complicaciones sépticas, alteraciones de la función intestinal (estreñimiento), la obesidad, la diabetes, el síndrome metabólico, la atopia, las enfermedades autoinmunes, entre ellas, la enfermedad celíaca, o el cáncer de colon.

Los microorganismos patógenos requieren de nichos y condiciones similares para la proliferación y colonización intestinal, es así que compiten por oxígeno, hidratos de carbono, aminoácidos y ácidos grasos que le permiten atravesar las barreras establecidas por la microbiota y producir toxinas, como proteinasas y bacteriocinas, responsables de la lisis microbiológica. Sin embargo, para regular la microbiota intestinal, evitar infecciones, tales como los cambios secretorios y las migraciones, es de gran importancia el papel de los probióticos.

Para lograr este efecto, los probióticos deben ser resistentes al paso por el tracto gastrointestinal ya que son sensibles durante la etapa de producción, conservación y distribución y se ven afectadas por factores ambientales con los que interactúan, tales como el pH, oxígeno, temperatura, condiciones de almacenamiento, etc. Las bacterias probióticas son microorganismos vivos bien definidos que, cuando se consumen en cantidades suficientes, confieren un efecto beneficioso para la salud del tracto gastrointestinal del huésped. Para proporcionar estos beneficios, las bacterias probióticas deben presentarse en un nivel mínimo de 10^6 a 10^7 UFC/g (unidades formadoras de colonias) cuando llegan al intestino. Las características propias de los alimentos tales como presentar concentraciones saturadas de solutos y pH ácidos, así también, como el tratamiento térmico a los que son sometidos, reducen significativamente la sobrevivencia de estos microorganismos disminuyendo significativamente la población microbiana.

1.2.2 Formulación del problema

¿La bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* microencapsulada, en comparación con la célula libre, será capaz de mantener su viabilidad frente a condiciones de estrés térmico, osmótico y oxidativo, factores comunes en la elaboración de alimentos?

1.3 Justificación

Los alimentos funcionales se han desarrollado en las diferentes industrias alimentarias, principalmente en los productos lácteos, confitería, bebidas, panadería y la alimentación infantil. Estos al estar constituidos de compuestos bioactivos, nos brindan beneficios más allá de su función nutricional. El propósito es favorecer las funciones fisiológicas, mejorar la condición física y reducir el riesgo de enfermedades. Una de las características importantes es que su consumo debe estar dentro de las cantidades normales y ser habitual en la dieta equilibrada.

A medida que el ajetreo de la evolución de la sociedad crece, el estilo de vida en la alimentación no es tan favorable para la salud de las personas, lo cual esto nos da un riesgo mayor en ciertas enfermedades crónicas. Estas enfermedades por lo general están ligadas al tipo de alimentos que ingerimos lo cual con ciertas dietas adecuadas se puede prevenir. Para ello se tiene que saber qué tipo de alimentos se deben ingerir para saber a qué tipo de afección se pueda prevenir.

Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped ejerciendo una acción moduladora sobre la microflora intestinal haciendo de esto una barrera que protege el tracto intestinal de la colonización de ciertos patógenos y mejorando la respuesta inmunitaria. Los probióticos en los alimentos cumplen una doble función ya que actúan como agentes para la fermentación de alimentos y, además, confieren beneficios a la salud. Estos reducen el riesgo de cáncer de colon (solo se trabajó en animales) ya que tienen la capacidad de suprimir la actividad de ciertas enzimas bacterianas que aumentan niveles de pro carcinógenos, aunque esto último aún no se haya concretado en los humanos (OMS, 2011).

Cada persona alberga diversos microorganismos lo cual esto nos hace únicos, por ello podemos requerir de la ayuda de cada probiótico que tiende a tener diversas funciones como productor de compuestos antimicrobianos, reductor de la adherencia y replicación de patógenos, funciones digestivas como absorción de nutrientes, biotransformación, síntesis de vitaminas y absorción de minerales, entre otras. También cumple la función inmunitaria que se ve influenciado en la estimulación de los mecanismos inmunitarios y no inmunitarios mediante el antagonismo y la competencia de patógenos, la activación de macrófagos para el aumento de antígenos y producción de inmunoglobulina. En consecuencia, al ingerir alguno de estos podemos tener una marcada línea de nueva flora intestinal que ayuda en el tratamiento y prevención de algunas enfermedades.

Otro punto importante es el medio de fermentación para el crecimiento de microorganismos como la composición de fuentes de carbohidratos, sólidos, nutrientes, entre otros. Debido a esto es fundamental realizar la evaluación de la viabilidad para conocer la capacidad de sobrevivencia de la cepa al someterla a diferentes condiciones físico-químicas, y así simular su crecimiento durante el periodo de vida útil. Entre los microorganismos más representativos y frecuentes está el género *Lactobacillus plantarum* que destaca por sus capacidades metabólicas y su adaptabilidad a diferentes condiciones.

Se sabe que la finalidad de cualquier tratamiento térmico es alargar la vida útil del producto alimenticio, en caso de la pasteurización es un proceso que se realiza casi al final donde se elimina bacterias patógenas y permite que los productos sean inocuos para el consumo humano; sin embargo, esto afecta también a los microorganismos probióticos, a raíz de eso se opta por microencapsular al probiótico y de esta forma apoyar en la viabilidad del mismo. Por lo antes expuesto, la microencapsulación resulta un método importante para incrementar la supervivencia de la bacteria probiótica *L. plantarum* frente a tratamientos térmicos o condiciones de estrés osmótico y oxidativo.

En conclusión, los probióticos nos aportan diversos beneficios a la salud, específicamente a nuestra microbiota intestinal en su función digestiva desde prevenir y aliviar pequeñas afecciones o hasta enfermedades gastrointestinales crónicas del ser humano. Estos estudios que cada vez son más específicos con el microorganismo *Lactobacillus Plantarum* nos dan una mejor visión en el aporte y elección de cepas con capacidad de resistir en diferentes condiciones para su posterior uso en procesos industriales de diversos alimentos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo principal

Evaluar el efecto de diferentes condiciones de estrés comúnmente presentes en la elaboración de los alimentos sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada y libre en condiciones in vitro.

1.4.2 Objetivos específicos

- i) Evaluar el efecto de la temperatura, presión osmótica y estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión.
- ii) Evaluar la cinética de crecimiento de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 libre y microencapsulada sometida a las condiciones de estrés.

1.5 Importancia y alcance de la investigación

La investigación de la viabilidad del *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 frente a estimulaciones de estrés (temperatura, estrés oxidativo, estrés osmótico) en condición libre y microencapsulada nos aporta nuevos conocimientos, lo cual este estudio tendrá una simulación in vitro donde podremos observar la reacción de la bacteria, lo cual sirve para analizar mejor el

comportamiento que este podría suscitar si se quiere utilizar en industrias alimentarias. de esta manera los resultados que fueron dados y nos brinda un mejor análisis sobre este probiótico.

1.6 Limitaciones de la investigación

Dentro de las limitaciones del estudio que se da al *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407, encontramos que los resultados tengan buena viabilidad en ciertas condiciones de estrés, no se pueda garantizar si la viabilidad sea la misma una vez ingeridas por los consumidores, para ello se tendría que realizar un estudio clínico.

Por otro lado, se obtuvieron resultados confiables del crecimiento y cinética de las bacterias. Es recomendable seguir realizando estudio con diferentes condiciones y características como: en condiciones ácidas, en sales biliares, con otro tipo de recubrimientos en la microencapsulación, en otras propiedades tecnológicas que complementen el estudio.

CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Marco teórico

2.1.1 Probióticos

Las definiciones de probióticos se han ido modificando a medida que se empiezan a estudiar más estos mismos, por ello encontramos diversas definiciones válidas.

El término probiótico en el lenguaje griego se entiende por: “a favor de la vida” en consecuencia muchos autores definieron como sustancias liberadas por un microorganismo que indican el crecimiento y desarrollo de algún otro (Lilly y Stillwell, 1965). Una de las definiciones más comunes y aceptadas es la que plasma Fuller (1989), que indica como un “suplemento alimenticio de microorganismos que mejoran y mantienen en equilibrio la flora intestinal” (Mitropoulou et al., 2013).

En 1970 el probiótico obtuvo la definición de “microorganismo que se utiliza como suplemento en la alimentación animal, para aumentar el crecimiento y reducir el estrés” (Rodríguez, 2009)

Años más tarde, Havenaar y Huis in 't Veld (1992), lo definieron como "un monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona" (Salminen et al., 1998.)

Luego de las diversas definiciones la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y la Organización Mundial de Salud (OMS), definieron a los probióticos como microorganismos que aportan ciertos beneficios a la salud, teniendo en cuenta que deben ser consumidas en concentraciones de 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) esto ayudando a

incrementar la microflora en el tracto intestinal, lo cual ayudará a una mejora en la salud del huésped (FAO/OMS, 2002; Parra, 2010).

Con todas estas definiciones se puede afirmar que las bacterias probióticas son microorganismos vivos que pertenecen a la microbiota intestinal teniendo como característica una mínima o nula capacidad patógena, así como también brindar funciones favorables en la salud del huésped.

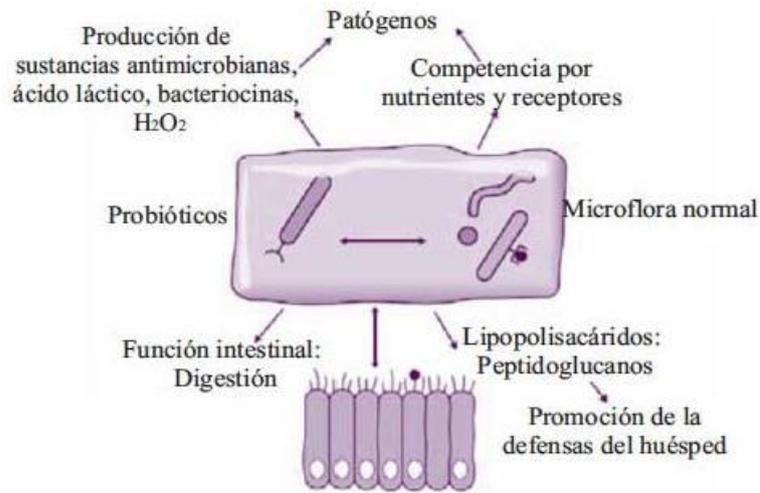
2.1.2 Beneficios de los probióticos

Para ser un microorganismo que se denomina probiótico debe tener ciertas características y requisitos, como ser seguro para el hospedador, no ser un patógeno, ni toxigénico y que tenga la fácil adhesión a las células epiteliales para el tracto intestinal, teniendo en cuenta que estas se adhieren mas no desplazan al microbiota ya presente. (Castro y De Rovetto, 2006). Debe estar caracterizado a nivel de género, especie y cepa de cultivos de confianza y reconocidas internacionalmente. (FAO/OMS, 2002; Saulnier et al., 2009).

El mecanismo de acción de los probióticas (Figura 2.1) incluye la disminución del pH intestinal que favorece el crecimiento de microorganismos beneficiosos, aumento de la resistencia a la colonización y estimulación de la respuesta inmune estimulando la producción de inmunoglobulina A (Alander et al., 1999; Isolauri et al., 2001; Collado et al., 2007). También participa en la producción de algunas enzimas digestivas, vitaminas y sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos orgánicos, lactonas, etc (Parra, 2010).

Figura 2.1

Mecanismo de acción de los probióticos.



Fuente: Guzmán, 2012.

Adicional a esto debe tener la capacidad de mantenerse viable al momento del consumo, en su paso por los ácidos del estómago, contacto con la bilis en el duodeno, colonizar el intestino delgado como el grueso, favoreciendo el equilibrio del microbiota intestinal (Saulnier *et al.*, 2009). La gran parte de los microorganismos probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Grajek *et al.*, 2005).

2.1.3 Probióticos en los alimentos

A lo largo de los años, los consumidores han ido cambiando sus hábitos alimenticios, optando por alimentos sanos que brindan beneficios adicionales a la salud (Cortés *et al.*, 2005). Los alimentos funcionales tienen importancia en este aspecto ya que más allá de su aporte nutricional básico nos pueden aportar beneficios en el sistema cardiovascular, gastrointestinal, neuronal y pueden tener efectos antioxidantes, anticancerígeno, antidiabético y antiinflamatorios (Ignat *et al.*, 2010). Un ejemplo de ello son los probióticos, compuestos bioactivos que se han aplicado a diversos alimentos, estos llegan a ser susceptibles frente a los

diversos procesos tecnológicos o factores como la temperatura, almacenamiento y la composición de matrices alimentarias, Por ello se ha visto necesario realizar investigaciones para favorecer estabilidad y viabilidad en el consumo (Rodríguez, 2016).

Al agregar los probióticos en los alimentos se puede modificar sus cualidades organolépticas, se han desarrollado investigaciones recientes referidas a cepas potencialmente probióticas que pueden actuar como biocatalizadores al realizar transformaciones indicando: mejoras en el producto final del alimento, atribuyéndole mejoras nutricionales tal es el caso de las bacterias ácido lácticas que aparte de producir ácido láctico también influyen en la creación de sabor, aroma, textura y dan un mayor aporte al valor nutricional en los alimentos fermentados brindándonos una mejor digestión y tiempo de anaquel (Parra, 2010; Makinen et al., 2012)

La supervivencia de los probióticos en los alimentos depende de múltiples parámetros como: pH, sólidos solubles, concentración de oxígeno y agitación durante su producción, procesamiento y almacenamiento. A nivel fisiológico son sensibles a la acidez del estómago y a la presencia de las sales biliares intestinales (Frakolaki et al., 2021; Chávarri et al., 2012), que afectan el crecimiento, metabolismo y propiedades funcionales del probiótico.

Por otro lado, también es necesaria una estabilidad microbiológica en la adición a los alimentos, los factores como la actividad de agua, pH y temperaturas son los que deterioran el alimento y forman medios de proliferación de microorganismos no deseados (Maris et al., 2004; Badui, 2006).

Por ende, para asegurar la estabilidad, viabilidad y la adecuada liberación de los microorganismos en el intestino se han desarrollado tecnologías para la aplicación en diversos campos de la industria y se ha dado diferentes enfoques como la elección de cepas resistentes, la microencapsulación, adición de nutrientes adicionales y la respuesta celular al estrés. En estos

enfoques podemos decir que el microorganismo más tolerante entre todos es el *Lactobacillus* (Ricciardi et al., 2012).

2.1.4 Bacterias Ácido lácticas

Un método de preservación relevante en la industria alimentaria por muchos años fue el uso de bacterias lácticas capaces de producir ácido láctico a partir de sustratos fermentables, esto debido a que la disminución de pH provocada impide el crecimiento de la flora que puede resultar patógena para el hombre (Piuri, 2003).

Lister (1873) presenció y aisló el primer cultivo bacteriano láctico que denominó *Bacterium lactis*, actualmente llamado *Lactococcus lactis*.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos anaerobios facultativos, Gram positivos, no esporulados, ácidos tolerantes, que carecen de citocromo y fermentativos (Makarova *et al.*, 2006). Su metabolismo requiere nutrientes muy complejos como aminoácidos, bases púricas, pirimídicas y vitaminas del grupo B (Stiles y Hozapef, 1997).

Son responsables de la fermentación láctica a partir de azúcares como es el caso de yogurt, leches y algunos tipos de quesos (Heenan et al, 2004; Vázquez et al., 2008).

Para ello, en su fermentación utilizan dos vías diferentes, ruta de Embden–Meyerhof, aquí se encuentran los homofermentativos que degradan la hexosa a sólo ácido láctico como producto final en su fermentación de carbohidratos y la vía de las pentosas, aquí están los heterofermentativos, este grupo convierte las hexosas en ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y ácido acético, mientras las pentosas en ácido láctico y ácido acético (Kandler, 1983; Lyhs, 2002; Ramírez, 2005).

Los microorganismos más empleados como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus, *Streptococcus* y otras especies pertenecientes al género *Saccharomyces* (Collado, 2004; Romero y Mestres, 2004; Gupta y Garg, 2009). Estos se encuentran en alimentos como la leche, siendo este el medio más eficaz en su proliferación, productos cárnicos, frutas o en el tracto gastrointestinal especialmente en la cavidad oral y el intestino delgado (Grajek et al., 2005).

2.1.5 *Lactobacillus plantarum*

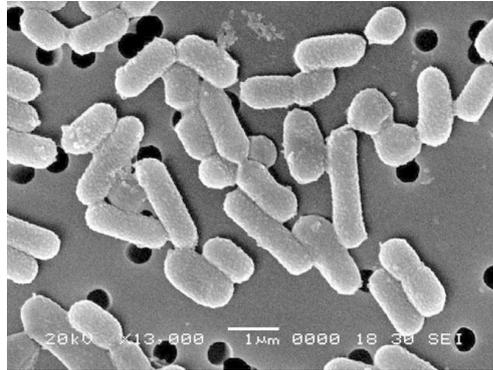
Dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas, la especie *Lactobacillus plantarum* es el más utilizado para la industria de alimentos ya sea de manera natural o añadidas con fines de conservación, al ser reconocidas por sus beneficios en la salud (Collado, 2004).

Estos son bacilos Gram positivos, heterofermentativos facultativos que producen ácido láctico, ácido acético o etanol y dióxido de carbono a ciertas condiciones. Son microorganismos de forma bacilar delgados y largos, aerotolerantes, no esporulados, sin flagelo (Giraffa et al., 2010) y es considerado como GRAS, generalmente reconocido como seguro (Figura 2.2).

La supervivencia en diversos procesos industriales es alta ya que se ha demostrado que es capaz de tolerar el entorno durante su paso por el tracto digestivo y adherirse a la mucosa durante su colonización evitando su rápida eliminación (James, 2000). Por consiguiente, se utiliza y comercializa como probiótico al tener mejoras en la salud (Papadopoulou et al., 2018; Salar-Behzadi et al., 2013). A pesar de sus múltiples mecanismos de defensa, se ve afectado por diversas condiciones de estrés como térmico, osmótico, sistemas ácidos y estrés oxidativo relacionado con las proteínas (Vázquez, 2008). Aunque esta especie ha desarrollado respuesta adaptativa frente a estas condiciones, pocos estudios se han publicado sobre su viabilidad, tolerancia y respuesta al estrés ambiental.

Figura 2.2

Morfología de la cepa de *Lactobacillus plantarum*.



Fuente: Valan, 2016.

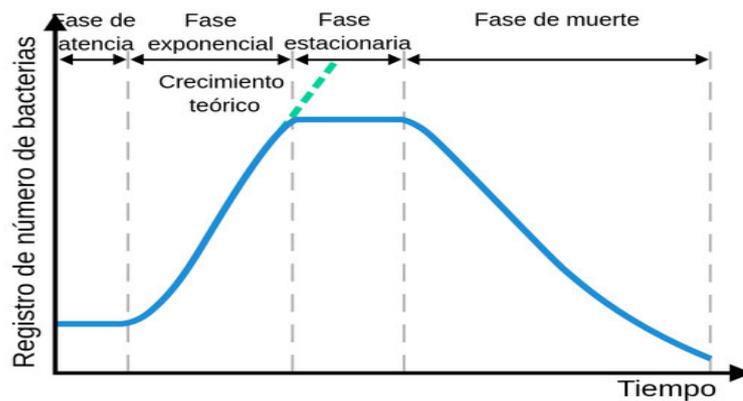
2.1.6 Viabilidad de probióticos bajo condiciones gastrointestinales

Una de las características más importantes en los probióticos es su resistencia frente a las condiciones gastrointestinales (Figura 2.3), así como ser capaces de tolerar la acidez gástrica, sales biliares en el intestino delgado, la actividad enzimática y la adherencia a las células epiteliales del tracto (Mejía et al., 2006).

Su exposición influye debido al pH gástrico presente en nuestro organismo que está alrededor de 2, las cepas probióticas anaerobias afectadas por la presencia de oxígeno y del estrés oxidativo exógeno limitando el crecimiento celular (fase lag) (Figura 2.4). La tolerancia de la cepa puede ser mejorada por modificación genética o adaptación al medio (Picard et al., 2005; Parra, 2010).

Figura 2.3

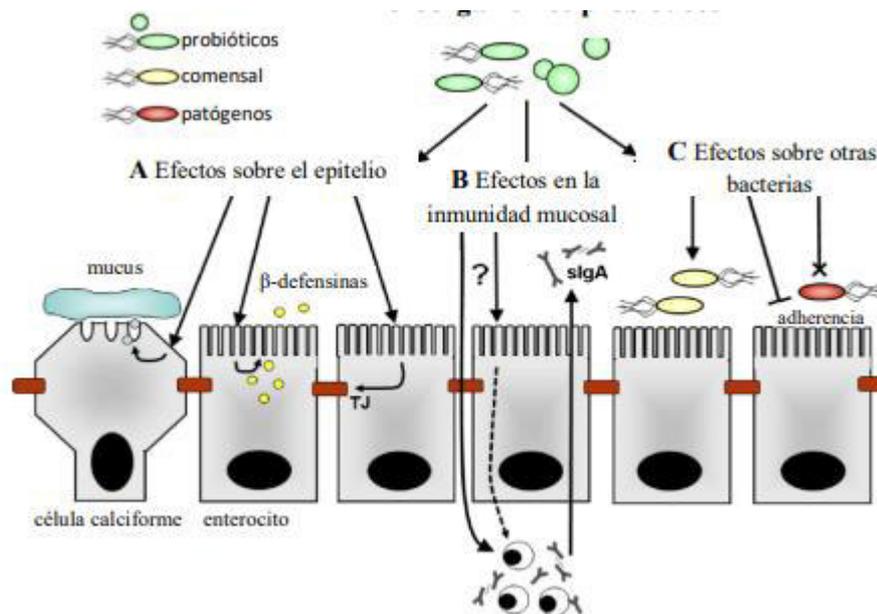
Fases de crecimiento de la bacteria



Para aumentar la resistencia a los jugos gástricos, evitar su degradación en el estómago y una liberación controlada en el intestino, se ha utilizado la encapsulación de las cepas y se ha notado su mayor viabilidad a comparación de cuando se encuentra en su forma libre (Pérez et al., 2013)

Figura 2.4

Efectos de las bacterias probióticas sobre la función de la barrera intestinal.



Fuente: Howart y Wang (2013).

2.1.7 Microencapsulación

El término microencapsulación se utiliza cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en menores cantidades. Esta técnica permite mejorar la viabilidad del microorganismo en la aplicación de alimentos en su paso por el tracto gastrointestinal, incrementando la estabilidad, vida media y mayor productividad que las bacterias no encapsuladas (Rao et al., 1989; Fuchs et al., 2006). El proceso consiste en la protección de las células que se encuentran inmovilizadas al interior de una matriz o membrana encapsulante, que crea un ambiente capaz de controlar las interacciones entre la parte interna y externa (Krasaekoopt et al., 2003).

Los objetivos de la utilización de esta técnica en la industria alimentaria son: evitar la pérdida de algún componente e impedir la degradación por alguna situación de estrés o cambios fisicoquímicos, tales como temperatura, pH, densidades, sales biliares, etc (Mitropoulou et al. 2013)

La liberación gradual de estas células encapsuladas depende del polímero utilizado, del compuesto activo y la propia microcápsula (Kailasapathy, 2002). Traen como beneficio la conservación de sus características nutricionales, facilitar el manipuleo y mejorar su aptitud frente al almacenamiento (Deladino et al., 2007; López, 2012).

Diversas técnicas de encapsulación aplicadas a probióticos han sido propuestas en las últimas décadas. Los métodos en función a la formación de microesferas se pueden clasificar en 3 grupos: Métodos físicos (secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión); Procesos fisicoquímicos (coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas; Procesos químicos (polimerización interfacial e inclusión molecular) (Yáñez et al., 2002). Tanto el método de extrusión como el de emulsión aumentan la supervivencia y viabilidad de

los probióticos hasta un 80-95% (Rao et al., 1989; Sheu & Marshall, 1993; Rodríguez et al., 2016).

La microencapsulación por extrusión consiste en la formación de cápsulas hidrocoloides al preparar una solución, añadirle microorganismos y extruir la suspensión celular a través de una aguja de jeringa en forma de gotas o esferas (pellets) que suelen oscilar de 2-5 mm que caen libremente en la solución endurecedora que reacciona en la superficie de la gota. Para la aplicación de esta técnica de microencapsulación se debe cumplir la permeabilidad, estabilidad térmica, estabilidad mecánica y estabilidad frente a cambios en pH y sales (King, 1995). Las condiciones de formulación suaves garantizan una alta viabilidad celular (80-95%) (Ming-Ju, et al., 2007; Mitropoulou et al., 2013).

2.1.8 Agentes encapsulantes

En la elección del material de recubrimiento se debe tener en cuenta diversas características como el grado alimenticio, costos y propiedades fisicoquímicas como el peso molecular, difusividad, solubilidad, fusión, formación de películas, biodegradabilidad y las propiedades de la matriz alimentaria a la que se incorporará o la viabilidad de la bacteria láctica (Rodríguez et al., 2016).

Los agentes encapsulantes más usuales y aplicados a los probióticos que sirven de recubrimiento y protección son: las proteínas, gomas (alginato), hidratos de carbono (sacarosa, maltodextrinas, derivados de almidón, ciclodextrinas, celulosa), lípidos, grasas, ceras, lecitinas (emulsionantes) y fibras. Estos pueden mezclarse dependiendo de las características esperadas (Sinton, 1998).

En todo este grupo de encapsulantes, resaltan los hidrocoloides que se pueden clasificar en polímeros naturales con gran relevancia como son los alginatos y quitosano, los cuales pueden adicionarse en soluciones salinas para la formación de geles. Cada hidrocoloide tiene

diferentes propiedades y dentro un mismo tipo de polímeros pueden tener variaciones significativas (Sheu y Marshall, 1993).

2.1.8.1 Alginato de sodio

El uso de polímeros naturales para la formación de geles como el alginato es el más frecuente por su sencillez, bajo costo y condiciones que aseguran una alta viabilidad celular. El alginato es un heteropolisacárido lineal de ácido D-manurónico y L-gulurónico (Figura 2.5) que se extrae de diversas algas, es usado en la industria farmacéutica y en la biotecnología como agente espesante, gelificante y estabilizador coloidal (Lakkis, 2007).

El alginato de sodio puede reticularse iónicamente con cationes divalentes (Ca^{+2}) que se unen al ácido l-gulurónico (Skjak-Braek et al., 1986). Su composición monomérica, estructura y tamaño influye en sus propiedades mecánicas y de hinchamiento. La longitud del polímero del ácido d-manurónico es, por tanto, la principal característica estructural que contribuye a la formación del gel (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990).

El tamaño y forma de las perlas dependen de la viscosidad de la solución y de la distancia de la jeringa en el goteo. Entonces podríamos decir que, al aumentar la concentración y viscosidad, el tamaño de perlas disminuye (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990).

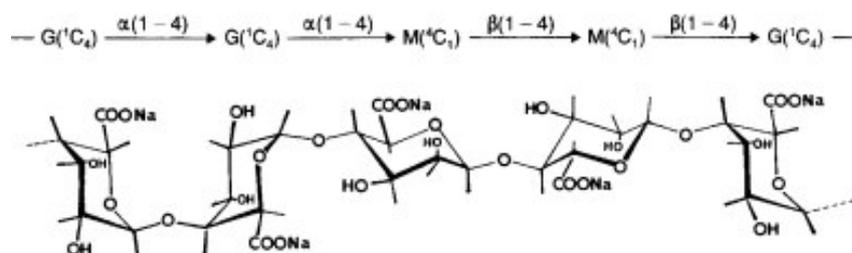
La formación de las microesferas comienza con la mezcla de la solución de alginato y la suspensión celular, se gotea la mezcla en una solución que contiene CaCl_2 , provocando el calcio la gelificación en la interfase gota/solución de alginato para luego realizar un lavado de las perlas. Generalmente se utiliza el ion calcio (Ca^{+2}) en forma de CaCl_2 por ser soluble en agua y no tóxico (Ortiz et al., 2021).

Las ventajas que presenta el uso del alginato de sodio en el método por extrusión son: facilidad de preparación y formación de geles, es segura y biocompatible, pero es susceptible a

la acidez del ambiente exterior, inestabilidad mecánica, y el deterioro del alginato por la presencia de iones (Mortazavian et al., 2007; Fávoro y Grosso, 2002).

Figura 2.5

Estructura química de Alginato.

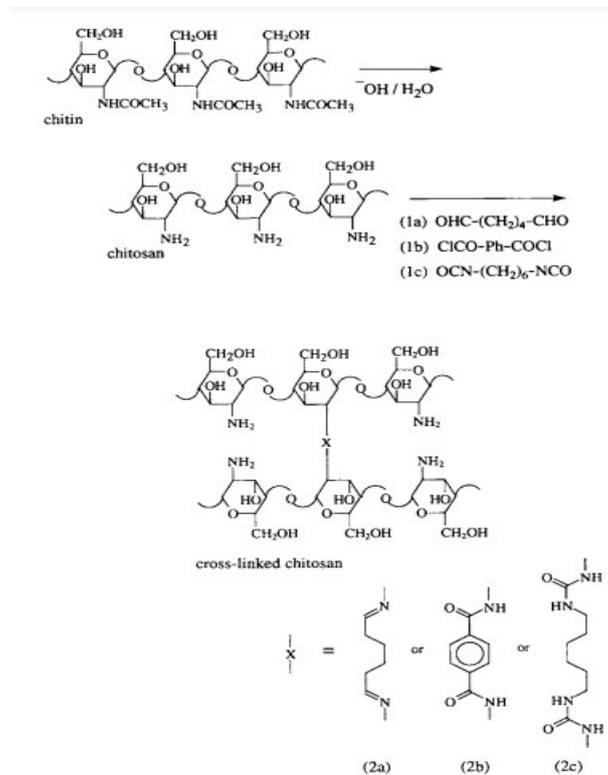


2.1.8.2 Quitosano

El quitosano es un polisacárido con carga positiva que se ha desacetilado de la quitina (Figura 2.6) que se encuentra en los caparazones de los crustáceos (King, 1995). La quitina es un polímero de N-acetilglucosamina, o N-acetil-2-aminocelulosa, por lo que el quitosano es esencialmente 2-aminocelulosa y puede ser reticulado por aniones o polianiones, como polifosfatos, ferrocianuro, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, ácido polialdehídocarbónico (Klein y Vorlop, 1983). Es soluble en pH menores a 6 y forma un gel por gelificación ionotrópica al igual que el alginato que se utiliza en la industria alimentaria y para la inmovilización de células vegetales (Knorr et al., 1985). El quitosano soluble ha demostrado tener efectos inhibidores en diferentes bacterias lácticas y se ha utilizado como formador de membranas en la microencapsulación de estas (Groboillot et al., 1993), es por ello que se utilizó recubrir las perlas de alginato remojadas en solución de quitosano (0,4%) con agitación suave durante 40 minutos (Mortazavian et al., 2007). La carga celular en las microesferas osciló de 10^8 a 10^{10} UFC.g-1 (Zhou et al., 1998).

Figura 2.6

Desacetilación de la quitina a quitosano y posterior reticulación con diferentes agentes bifuncionales para reticular el quitosano.



Fuente: Groboillot, 1993.

2.2 Antecedentes

Se han realizado diversas investigaciones en los últimos años sobre la viabilidad de los probióticos en condiciones gastrointestinales, así como también en el proceso y almacenamiento de diversos alimentos teniendo resultados para una selección óptima de las cepas resistentes en la industria alimentaria.

Gutierrez et al. (2014) evaluaron el crecimiento del *Lactobacillus plantarum* BAL-03, estudiando el efecto de temperatura, pH y agitación sobre la producción de ácido láctico mediante la densidad óptica (DO) y el recuento en placa (UFC/mL). Realizaron diversos

tratamientos con pH 6, temperaturas 30, 36 °C y la aireación con 0.1, 0.5 VVM. Los resultados indicaron que el crecimiento va disminuyendo con el aumento de temperatura en presencia de neutralizante y oxígeno. Así también, una mejora en el crecimiento bajo condiciones de pH 6 y temperatura de 30 °C alcanzando una concentración media de 6.25×10^{10} (UFC/mL) y una producción de ácido láctico de 19.26 g/L.

Por otro lado, Dalcanton et al. (2018) construyeron un modelo de superficie de respuesta a la tasa de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, evaluando su temperatura (4, 7, 10, 13 y 16 °C), el pH (5,5, 6,0, 6,5, 7,0 y 7,5), el cloruro sódico (2-8%) y el lactato sódico (0, 1, 2, 3 y 4%). El factor más importante en la fase de crecimiento fue la temperatura y el pH ya que se produjo un aumento correspondiente, mientras que se observó una relación negativa entre las concentraciones de NaCl y el parámetro de crecimiento.

En 2020, Mahmoud et al., evaluaron la supervivencia del *Lactobacillus plantarum* microencapsulado con alginato, simulado en alimentos y en condiciones gastrointestinales. Para ello realizó una comparación de diferentes agentes encapsulantes a base de alginato, exposición térmica (40, 45 y 60 °C), tratamiento osmótico (1, 3, y 5 % NaCl) y ácidos orgánicos (1, 2%). Nos aportan que los tratamientos van a depender del agente encapsulante utilizado, en el caso del Alginato-Quitosano se logra obtener una mejor viabilidad en jugo gástrico simulado y condición intestinal. En el estrés térmico es más tolerante a bajas temperaturas, es más apropiado en concentraciones de NaCl hasta el 5% donde las células van disminuyendo y las temperaturas 40 y 45 °C no parecen ser letales pero al aumentar van disminuyendo o inhibiendo el crecimiento. Se pudo concluir que las bacterias encapsuladas sobreviven mejor que las células no encapsuladas en diferentes condiciones de estrés.

Como en otras investigaciones, Mahreen et al. (2020) también demostraron la resistencia del *Lactobacillus plantarum* aislados del yogur tradicional paquistaní a un pH ácido (6-6,5),

sales biliares (0,01-1%), sal NaCl al 1-7% y actividad antibacteriana contra diez patógenos diferentes. Los aislados tenían diferentes concentraciones de NaCl (1 al 7 %) y se incubaron a 37 °C durante 4, 6, 12 y 24 horas, mostraron un crecimiento a una concentración del 1-4% NaCl mientras que del 6 al 7 % NaCl, disminuyó. Por lo tanto, nuestros aislados demostraron que tienen potencial probiótico y podrían usarse en diferentes alimentos como probióticos.

Soumitra et al. (2020), consideraron a *Lactobacillus plantarum* GCC_19M1 como una bacteria probiótica potencial ya que tuvo resistencia a diversas condiciones de estrés. Este aislado de un producto lácteo fermentado demostró tolerancia a pH bajos debido a que hubo disminuyó el 10,72 % en el recuento bacteriano a pH 3 en comparación con pH 7,2; con respecto a las temperaturas, presentó un crecimiento significativo entre 10 y 40 °C; la tolerancia del porcentaje de concentración de sales fue al 5% y al aumentar la concentración de NaCl al 7.5% disminuye su viabilidad, como que a 10 % de NaCl no presentó signos de crecimiento. Por otro lado, la cepa mostró una supervivencia del 93.48 % a 96.97 %.

Igualmente, Young et al. (2020) evaluó la viabilidad del *Lactobacillus plantarum* PMO-08 en diversas condiciones de estrés, los parámetros de fermentación y propiedades de la bebida. En este estudio el crecimiento celular se dio a 30 °C ($102,2 \pm 1,7\%$), con pH óptimo de 5,0 a 7,5, y con 1% de NaCl (103,2%). Los requisitos probióticos se cumplieron ya que la tasa de supervivencia en el jugo gástrico artificial y el jugo intestinal artificial fue 96% y del 95% respectivamente. Por otro lado, también la resistencia al peróxido de hidrógeno es fundamental a evaluar, es por ello que, Riane et al. (2019) estudiaron las propiedades probióticas, estrés en condiciones de pH ácido, sales biliares y la actividad antioxidante de *Lactobacillus plantarum* 15 aislado de la leche, afirmando que las cepas son viables a valores de pH ácido de 2,5-4,0, con una tasa de supervivencia del 86,40% y 80,58% para acidez y sales biliares respectivamente. También tuvo una resistencia al peróxido de hidrógeno (76,12%) con

actividad antioxidante del 21.33% siendo la mejor cepa aprobada por su mayor actividad en la eliminación de radicales DPPH.

En 2020, Lin et al. también evaluó la capacidad de supervivencia de *Lactobacillus plantarum* AR113, en diferentes condiciones de estrés, como pH bajo, bilis alta, presión osmótica alta (2-8 % NaCl) y estrés oxidativo (0-10 % H₂O₂). Los resultados nos indican que al aumentar la concentración de H₂O₂, disminuyó el crecimiento microbiano obteniendo una tasa de supervivencia mayor al 50% a 2,0 mM de H₂O₂ y menor del 1% cuando la ascendía a 6,0 mM de H₂O₂. A mayor concentración de H₂O₂ se inhibe el crecimiento y no había viabilidad.

Teniendo en cuenta a Jiage Ma et al. (2021), evaluaron los efectos que conllevan distintos tratamientos de adaptación de *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0628. Las condiciones sometidas fueron cambios de temperatura (37 control, 40, 45, 50, 55 y 60 °C), estrés por frío (4, 10, 15, 20 y 25 °C) oxidación (0 control, 0,2 0,5, 1, 2 y 5 mmol/L de H₂O₂), ácidos (2,5, 3, 4, 5 y 6 con HCl) y el estrés osmótico (0 control, 1, 2, 4, 6 y 8 % de NaCl), con el objetivo de determinar la tolerancia y la protección cruzada. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: una mayor tolerancia al estrés térmico, pero a temperaturas mayores a 50°C va disminuyendo, bajo crecimiento con el aumento de la concentración de H₂O₂ en el estrés oxidativo, inhibición del crecimiento microbiano a concentraciones mayores al 2% NaCl. El estudio sugiere que la adaptación previa a niveles subletales de las condiciones de estrés mejora la tolerancia al calor de *L. plantarum* KLDS 1.0628.

Por otro lado, tenemos a la resistencia osmótica de *L. plantarum* y su capacidad para fermentar alimentos con alta concentración de sal (0,5-10 %). Milesi et al. (2008), demostró que el *L. plantarum* tiene un buen desarrollo, supervivencia y crecimiento similar en dos matrices de quesos. El cultivo provocó cambios en la proteólisis secundaria que se evidenciaron

por la modificación de los perfiles peptídicos y el aumento de los niveles de aminoácidos y sus propiedades tecnológicas adecuadas para la fabricación de queso.

Los efectos de diferentes condiciones fisicoquímicas sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* demostraron que se mantiene el 100 % de viabilidad durante 7 días y 70.1 % al finalizar 18 días almacenada en agua estéril a 5 °C. El suero dulce (pH 6.0) propició una viabilidad de 90 % de *Lactobacillus plantarum*, superior al 73.3 % de viabilidad obtenido con el suero ácido (pH 4.4), almacenado a 5 °C, durante 21 días. Los tratamientos de yogurt natural, yogurt con mucílago de nopal, yogurt con mucílago de sábila y yogurt con nopal en polvo han sido utilizados como vehículos durante 21 días a 5 °C, disminuyendo en promedio su concentración celular. Todos los vehículos utilizados después de 21 días de almacenamiento a 5 °C, contiene una concentración celular de *Lactobacillus plantarum* superior a 10^6 UFC/mL, por lo que cumple con lo recomendado por la FAO y la OMS. (Cruz, 2014).

Zhang et al (2017) estudió la influencia de diversas condiciones de horneado y posterior almacenamiento en la supervivencia de una cepa de *Lactobacillus plantarum* P8. Se utilizaron muestras con diferente peso y temperatura respectivamente (5, 30 y 60 g) y (175, 205 y 235 °C.) durante 8 minutos, se determinó la viabilidad residual de las bacterias cada 2 minutos, esta disminuyó de 10^9 UFC/g a 10^{4-5} UFC/g tras el horneado. Se observó una diferencia en la viabilidad por la variación de temperatura y humedad y por los microsistemas desarrollados. En el almacenamiento la viabilidad bacteriana aumentó hasta 10^8 UFC/g en la corteza y 10^6 UFC/g en la miga, respectivamente. El rebrote de probióticos se acompañó de una disminución del pH del pan y un aumento de la acidez titulable total. total.

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis

Lactobacillus plantarum ATCC 1407 microencapsulada será capaz de mantener su viabilidad frente a condiciones de estrés térmico, osmótico y oxidativo, factores comunes en la elaboración de los alimentos, en comparación con la forma libre.

3.2 Variables

3.2.1 Variables Dependientes

- Viabilidad de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407

3.2.2 Variables Independientes

- Estrés térmico (T°)
- Estrés osmótico (NaCl %, concentración de sales)
- Estrés oxidativo (H₂O₂ %, concentración de peróxido de hidrógeno)

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Lugar y tiempo

La investigación se desarrolló entre los meses de agosto hasta diciembre del año 2023 en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana, departamento académico Química Orgánica en la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.2 Descripción del material experimental

4.2.1 Microorganismo

Lactobacillus plantarum ATCC 1407 perteneciente al cepario del laboratorio de Biotecnología Microbiana.

4.2.2 Insumos y reactivos

- Agua destilada (H₂O)
- Agar MRS
- Caldo MRS
- Alginato de sodio
- Quitosano
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Buffer pH 4
- Buffer pH 7
- Alcohol étlico

4.2.3 Materiales

- Tubos de ensayo
- Placas Petri
- Matraz
- Probeta
- Tips
- Vaso de precipitado
- Eppendorf
- Rack para tubos de ensayo
- Asa de siembra
- Mecheros

4.2.4 Equipos

- Incubadora
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Cámara de flujo laminar
- Estufa esterilizante
- Autoclave
- Agitador magnético
- Micropipetas
- Vórtex
- Agitador Orbital con temperatura
- Espectrofotómetro
- Estufa

4.3 Metodología

Evaluar el efecto de la temperatura, presión osmótica y estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión.

4.3.1 Preparación del inóculo

4.3.1.1 Preparación del Inóculo en su forma libre

Lactobacillus plantarum se cultivó en caldo MRS a 37 °C en agitación constante a 150 rpm por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se utilizó 3 mL para inocular los medios de cultivo correspondiente a cada tratamiento.

5.3.1.2 Preparación del Inóculo microencapsulado por el método de extrusión.

4.3.1.2.1 Preparación de los polímeros Alginato de sodio y quitosano

Se disolvió por separado alginato de sodio (P/V) al 2% en agitación constante (750 rpm) a temperatura ambiente por 24 horas. Por otro lado, se disolvió por separado quitosano (P/V) al 1% en una solución ácida del 4% de ácido cítrico en agitación constante (500 rpm) a temperatura ambiente por 24 horas hasta obtener una disolución homogénea en relación del 1:100 respectivamente. Una vez obtenida las soluciones de alginato y quitosano se esterilizaron por separado a 121°C por 15 min.

4.3.1.2.2 Preparación de la bacteria

Lactobacillus plantarum se cultivó en un caldo MRS y se incubó a 37 °C en agitación constante a 150 rpm por 24 horas. Después del tiempo de incubación, se recuperó el pellet celular por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante libre de células. El pellet celular fue lavado con un agua destilada y posteriormente se resuspendió en

agua destilada estéril. Se realizó la medida de la concentración celular a una densidad óptica de 2.858 en el espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda (Anexo 1).

4.3.2. Microencapsulación de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407

Después de obtener la mezcla de los polímeros alginato de sodio y quitosano en máxima agitación constante a temperatura ambiente, se añade la bacteria en una relación de (2:1) respectivamente con una máxima agitación por toques a temperatura ambiente. Con la ayuda de una jeringa se tomó la mezcla de polímeros, bacteria y prebiótico, la cual se hizo gotear en una solución de CaCl₂. Transcurrido el tiempo de endurecimiento (30 min), se realizó el lavado de las microcápsulas con agua destilada estéril para retirar todo el residuo del CaCl₂ (Anexo 2).

4.3.3. Evaluación de la viabilidad de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en forma libre y microencapsulada.

La evaluación de la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 en su forma libre se realizó a través de la medida de la densidad óptica en espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda, posteriormente la absorbancia fue convertida a UFC/mL mediante la ecuación (1). Por otro lado, para determinar la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 microencapsulada se calculó las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL), para la cual se tomó 6 gramos de microcápsulas que fueron agregadas al matraz para su posterior incubación a diferentes tratamientos. Se añadió 1 g de microcápsulas, previamente lisadas en 9 mL de citrato al 1%, luego se realizó diluciones seriadas en solución salina estéril para retirar 100 (µL) de cada dilución y sembrar en agar MRS por el método de disseminación. Se incubó a 37°C por 48 h. Las UFC/mL se obtendrán utilizando la siguiente fórmula (2).

$$y = 4.2222 x + 3.0955 \dots\dots\dots (1)$$

Donde:

x = absorbancia; y = UFC/mL

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de colonias por placa} \times \text{factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}} \dots\dots\dots (2)$$

Donde:

Factor de dilución = inversa de la dilución

4.3.4. Evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión

Para la evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria en su forma libre se realizó una lectura del crecimiento microbiano del caldo MRS inoculado con la bacteria *L. plantarum* con 24 horas de edad en diferentes temperaturas (37°, 40° y 50 °C) con 3 mL en el espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda. Por otro lado, para la forma microencapsulada por el método de extrusión, se realizó diluciones a partir de las microcápsulas lisadas de *L. plantarum* en 9 mL de citrato con 24 horas de edad a temperaturas de 37°, 40° y 50 °C y se tomó muestras a intervalos de tiempo predeterminados dentro de las 30 primeras horas. Tras el tratamiento térmico, de las dos últimas diluciones se realizó los recuentos bacterianos de células viables en agar MRS (37 °C - 48 horas).

El índice de resistencia (IR), definido como $IR = \log N_0/Nr$ (N_0 = recuento celular inicial; N_f = recuento celular final), se calculó en cada caso. Se evaluó la cinética de crecimiento y se determinó los valores de la función matemática utilizando el software Minitab. Los ensayos serán realizados por duplicado en ensayos independientes.

4.3.5. Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión.

Se utilizarán dos metodologías:

a) Para la forma libre, la cinética del crecimiento microbiano se evaluó en diferentes concentraciones de NaCl (De Angelis et al., 2004). Para ello, las células en fase exponencial se suspendieron en caldo MRS. Estas suspensiones se utilizaron para inocular (2%, v/v) con caldo MRS adicionado de diversas concentraciones de NaCl (5, 7 y 10%, p/v). Como control del crecimiento bacteriano se utilizó MRS sin sal. Se tomó valores de absorbancia (D.O._{600 nm}) a intervalos de 3 horas durante 30 horas a 37 °C.

b) Para la microencapsulación, se transfirió 1 g de microcápsulas de *L. plantarum* suspendidas en soluciones acuosas de NaCl a diversas concentraciones (5, 7 y 10% p/v) y se hidrolizaron con citrato hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, se tomaron muestras con un intervalo de 3 horas y se realizaron las diluciones seriadas y se mantuvieron a la temperatura de 37°C. Se realizaron recuentos celulares antes y después del tiempo de incubación (Anexo 4). Los ensayos se realizaron por duplicado en ensayos independientes.

4.3.6. Evaluación del efecto del estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión

Como se ha detallado anteriormente, la cepa en fase estacionaria de crecimiento se centrifugó y se suspendieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 0,1 y 0.5 % (p/v) (H₂O₂) y se mantuvieron a 37° C. A intervalos de tiempo predeterminados (0, 3, 6, 21, 24, 27, 30 horas), se tomaron muestras y se realizó los recuentos de células viables en agar MRS (37 °C - 24 h) (Anexo 5). En todos los casos, se trazó las cinéticas y se determinó los valores de las

funciones matemáticas utilizando el software Matlab. Los ensayos se realizaron mediante duplicado en ensayos independientes.

4.3.7. Determinación de la supervivencia de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión.

Se realizó el recuento de células viables a través de diluciones seriadas utilizando peptonas al 0,1%. Luego se sembró en agar MRS por el método de diseminación y se incubó a 37 °C por 48 h. El recuento de las células viables se determinó mediante la ecuación (1 y 2) desde el tiempo que se inició y luego al terminar todo el proceso. La capacidad de supervivencia de las células encapsuladas fue determinada de acuerdo a la ecuación (3).

$$Supervivencia = \frac{\text{Log}_{10}N_t}{\text{Log}_{10}N_i} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

Donde:

Ni: El número de células viables (UFC/g) en el tiempo cero.

Nt: El número de células viables (UFC/g) en cada periodo de tiempo.

4.3.8. Evaluar la cinética de crecimiento de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 libre y microencapsulada sometida a las condiciones de estrés.

Se realizó la evaluación de la cinética de crecimiento a través del tiempo de duplicación y la velocidad específica. La velocidad específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) se calculó para cada cinética de crecimiento y tratamiento para evaluar el aumento de las células por unidad de tiempo (4).

$$\mu = \frac{\text{Ln } OD_f - \text{Ln } OD_0}{\theta_f - \theta_0} \dots\dots\dots (4)$$

Donde: OD_f = densidad óptica final; OD_0 = densidad óptica inicial; θ_f = tiempo final; θ_0 = tiempo inicial

Las velocidades de crecimiento celular se expresan generalmente en términos del tiempo de duplicación (Td), el cual es el tiempo requerido para que, a partir de una célula, se formen dos células y la población microbiana se duplique (5).

$$Td = \frac{T}{n} \dots\dots\dots (5)$$

Donde (T) = Tiempo evaluado del crecimiento exponencial y (n) = 3.3 (LogNf - LogN0)

4.4 Diseño experimental u observacional

En la evaluación de la temperatura se determinó la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 a 37, 40 y 50 °C. En el caso de la evaluación del estrés oxidativo, se evaluó a 0.1% y 0.5% de peróxido de hidrógeno; mientras que, para la evaluación del estrés osmótico, se evaluó al 5, 7 y 10% de NaCl, todos los tratamientos en su forma libre y microencapsulada por el método de extrusión. Las variables de respuesta analizadas para la elección de la mejor formulación fueron: la viabilidad y concentración de *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407.

Se utilizó un diseño experimental por duplicado y completamente al azar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor y comparación múltiples de medias mediante la prueba de rango Tukey utilizando el programa estadístico MINITAB versión 19.1 a un nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO V: ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.

- **En forma microencapsulada**

Se evaluó la viabilidad, resistencia térmica y el crecimiento microbiano encapsulado con 24 horas de edad, a tres temperaturas (37, 40 y 50 °C). Posteriormente a la microencapsulación se determinó la sobrevivencia de la bacteria en los intervalos de tiempo de 0, 3, 6, 21, 24, 27 y 30 horas, obteniendo un recuento bacteriano de las células viables.

En la Tabla 5.1 se observa que el crecimiento microbiano donde se tuvo una fase exponencial notoria para 37 °C a partir de las 3 hasta las 6 h con una carga inicial promedio de 9.73 a 10.68 Log (UFC/mL), después de ese tiempo se mantuvo estable. Lo mismo sucedió a 40°C donde hubo un crecimiento notorio de *L. plantarum* ATCC1407 encapsulado en las primeras 3 horas con un promedio de 10.81 y 10.86 Log (UFC/mL). Sin embargo, en la temperatura de 50°C se observó muerte celular que redujo significativamente la concentración celular inicial de 11.61 Log (UFC/mL) hasta 5.7 Log (UFC/mL) a las 24 h de evaluación (Ver a Anexo 3).

Tabla 5.1

Concentraciones microbianas en Log (UFC/mL) de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada a diferentes condiciones de temperatura.

T°	Repetición	Tiempo (horas)						
		0 h	3 h	6 h	21 h	24 h	27 h	30 h
37 °C	1	9.86	9.74	10.44	10.61	9.53	9.92	11.17
	2	10.01	9.72	10.83	10.81	9.78	10.20	9.85
40 °C	1	10.20	10.14	10.12	10.99	10.98	9.98	10.15
	2	11.05	11.12	11.01	11.96	11.95	10.96	10.93
50 °C	1	10.97	9.73	9.69	7.30	6.00	6.00	6.60
	2	11.86	10.35	9.99	0.00	0.00	0.00	6.30

Por otro lado, la fase exponencial ocurrió en las primeras 6 horas del tiempo de evaluación (Gráfica 5.1). La tasa de supervivencia de *L. plantarum* tras 30 horas de exposición fue de 105.8 y 99.2 % a 37 y 40°C respectivamente. Mientras que, a 50°C hubo una disminución constante de células viables con una tasa de supervivencia del 56.7 %.

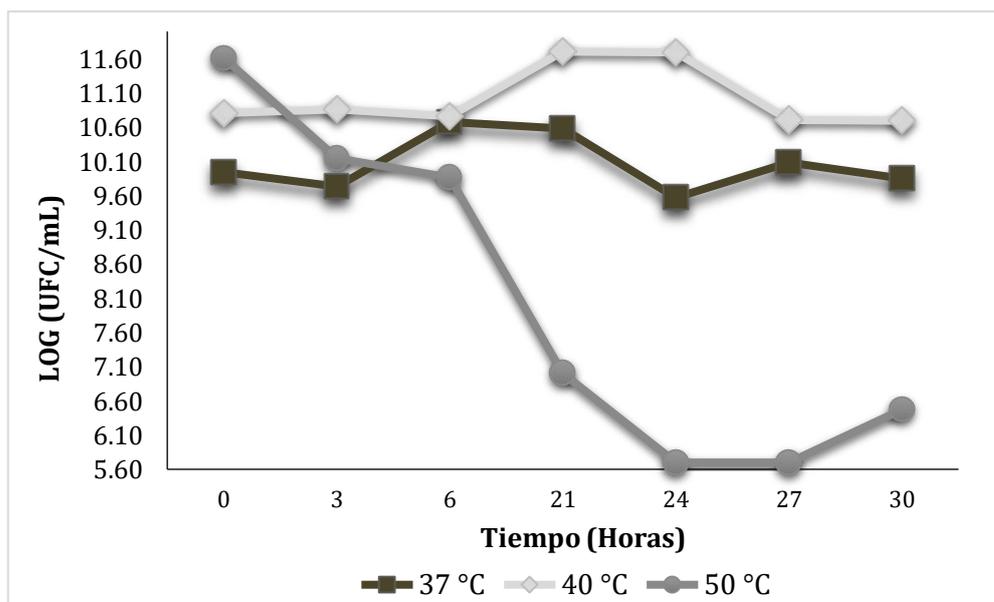


Figura 5.1

Cinética de crecimiento del *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada a diferentes condiciones de temperatura.

Asimismo, se aportan los valores relativos a la evolución del pH a lo largo del período en estudio. Notamos en la Figura 5.2, un menor pH en las temperaturas que obtuvimos un mayor crecimiento de población microbiana (37 y 40 °C).

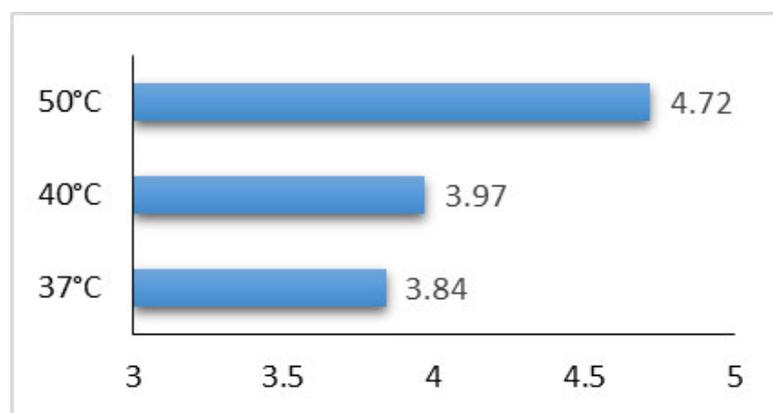


Figura 5.2

Valores de pH a diferentes condiciones de temperatura. (Microencapsulado).

Como apreciamos en las Tablas 5.2 y 5.3, las adaptaciones térmicas a 37°C y 40°C no mostraron ningún efecto significativo sobre los recuentos viables de *L. plantarum* en comparación con la temperatura 50°C que si tuvo una diferencia significativa ($P < 0,05$) (Figura 5.3).

Tabla 5.2

Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs Temperatura).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TEMPERATURA	2	132.8	66.383	11.16	0.000
Error	39	231.9	5.947		
Total	41	364.7			

Tabla 5.3

Comparación en pareja utilizando método Tukey.

TEMPERATURA	N	Media	Agrupación
40	14	10.824	A
37	14	10.176	A
50	14	6.77	B

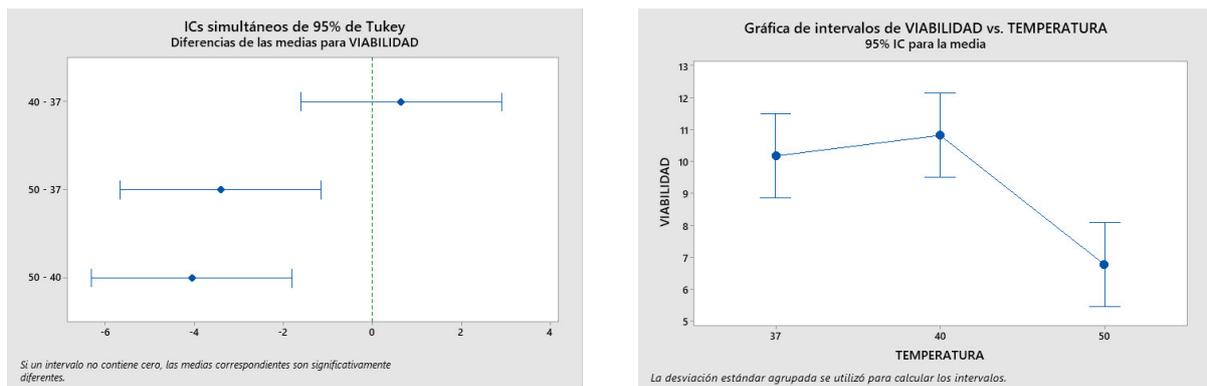


Figura 5.3

Intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad y T° (Microencapsulado).

- **En forma libre**

Se determinaron las concentraciones de la cepa microbiana *L. plantarum* con 24 horas de edad inoculadas en caldo MRS a tres temperaturas (37, 40 y 50 °C). Luego se realiza una lectura en el espectrofotómetro a 600 nm de longitud.

Por consiguiente, se observa en la Tabla 5.4 que para las temperaturas 37 y 40°C tuvo su fase exponencial notoria y constante las primeras 21 horas con valores similares de 3.53 a 12.34 Log (UFC/mL) y 3.80 a 12.18 Log (UFC/mL) respectivamente. Luego de las 21 h la concentración de biomasa se mantuvo constante y lineal.

Tabla 5.4

Concentraciones microbianas de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones de temperatura.

T°	Tiempo (horas)						
	0 h	3 h	6 h	21 h	24 h	27 h	30 h
37 °C	3.53	5.03	8.42	12.34	12.37	12.46	14.56
40 °C	3.80	5.00	7.58	12.18	12.24	12.23	12.42
50 °C	3.97	4.86	5.01	4.90	4.93	4.88	4.87

En la temperatura de 50°C hubo un crecimiento mínimo las 3 primeras horas, pero luego empezó a mantenerse en la fase estacionaria con valores promedios de 4.9 Log (UFC/mL) (Figura 5.4)

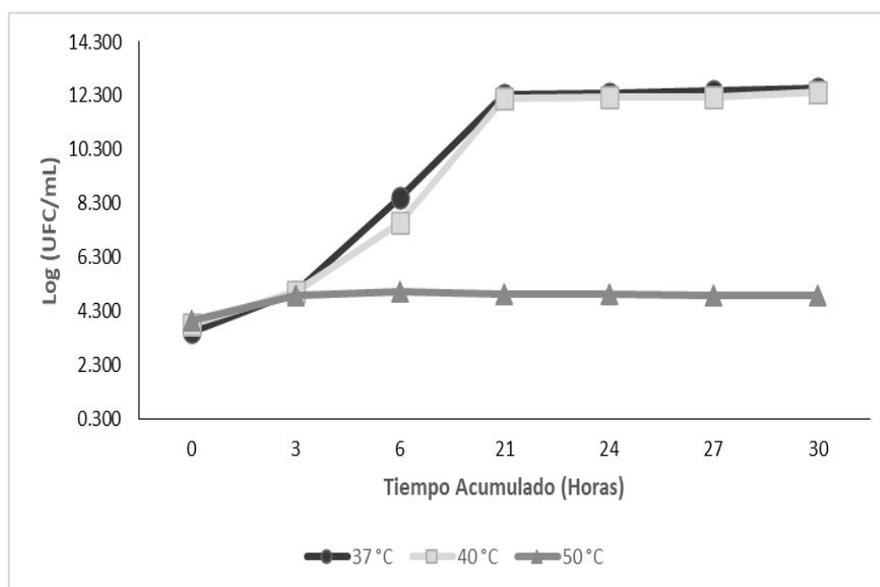


Figura 5.4

Cinética de crecimiento del *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones de temperatura.

Igual que en los resultados obtenidos en la microencapsulación (Tabla 5.1), las temperaturas de 37 °C y 40 °C presentaron los mayores valores de viabilidad de la bacteria *L. plantarum* sin

diferencia significativa (Tabla 5.6) en comparación con la temperatura de 50°C, la cual presentó la menor viabilidad con diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a las demás temperaturas evaluadas (Figura 5.5).

Tabla 5.5

Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs Temperatura).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TEMPERATURA L	2	204.1	102.032	11.13	0.000
Error	39	357.4	9.164		
Total	41	561.5			

Tabla 5.6

Comparación en pareja utilizando método Tukey.

TEMPERATURA	N	Media	Agrupación
37	14	9.54	A
40	14	9.350	A
50	14	4.7743	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

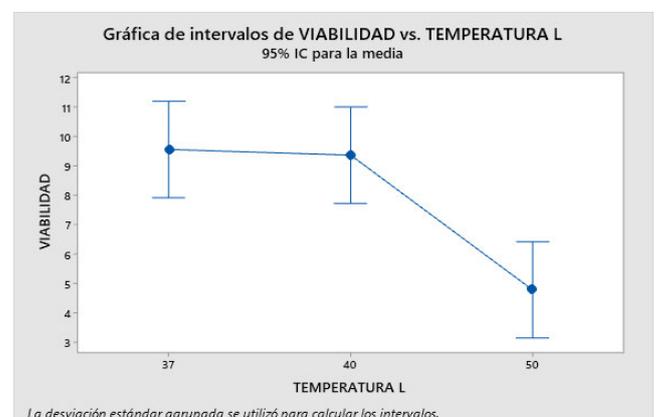
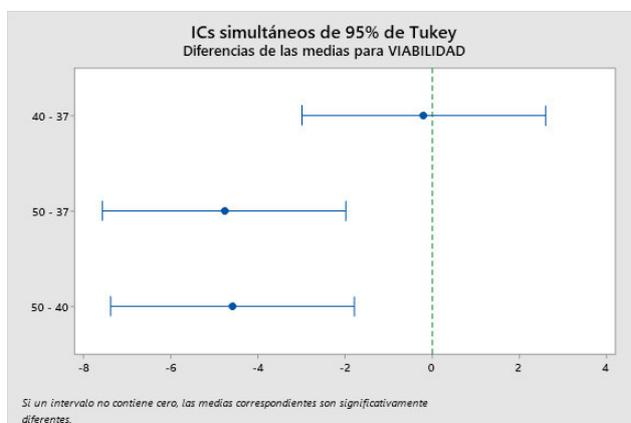


Figura 5.5

Intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad (forma libre).

5.2 Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.

- **En forma microencapsulada**

Se determinó su viabilidad de la bacteria *L. plantarum* microencapsulada después de 1 día de crecimiento, para luego ser microencapsulada e incubada en condiciones de estrés osmótico (NaCl) en concentraciones al 5, 7 y 10%, se tomaron muestras en intervalos de tiempo 0, 3, 6, 21, 24, 27 y 30 horas. Al 5% de NaCl la bacteria presentó un ligero crecimiento promedio de 9.42 a 9.65 Log (UFC/mL) en las primeras 6 horas durante su fase exponencial seguido posteriormente de una disminución de concentración celular hasta mantenerse constante. Bajo estas condiciones, *L. plantarum* presentó un 93% de tasa de supervivencia. Al 7% de NaCl la bacteria presentó una disminución progresiva en su crecimiento celular durante el tiempo de evaluación, presentando una tasa supervivencia del 86 %; mientras que, al 10% de NaCl la bacteria presentó muerte celular desde el inicio del tiempo, obteniendo un 66 % de tasa de supervivencia y llegando a 6.6 Log (UFC/mL) (Figura 5.6).

Tabla 5.7

Concentraciones microbianas en Log (UFC/ml) de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada a diferentes condiciones osmóticas.

NaCl (%)	Repetición	Tiempo (horas)						
		0 h	3 h	6 h	21 h	24 h	27 h	30 h
5 %	1	9.86	9.24	9.34	9.30	8.71	9.21	9.04
	2	10.01	9.55	9.83	9.75	9.44	9.43	9.47
7 %	1	9.86	8.68	9.52	8.63	8.11	8.09	8.45
	2	10.01	9.67	0	8.95	8.30	8.23	8.72

10 %	1	9.86	9.40	9.50	7.83	7.11	7.28	6.60
	2	10.01	10.01	9.93	8.26	7.70	0.00	0.00

En la Tabla 5.7 se observa en las primeras 6 horas una pendiente negativa que indica lisis celular en las diferentes concentraciones (5, 7 y 10% NaCl), lo cual a medida que pasa el tiempo el estrés osmótico empieza a observar la muerte celular de las bacterias microencapsulada.

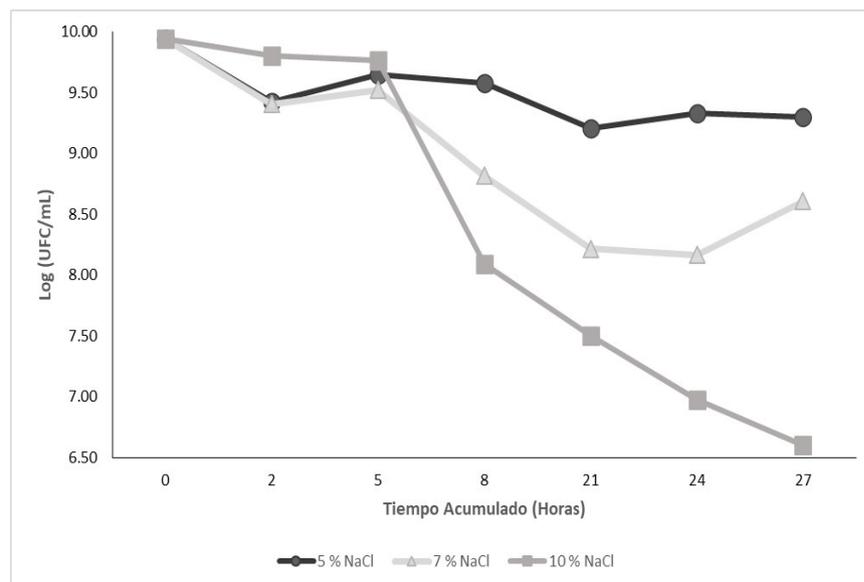


Figura 5.6

Cinética de crecimiento del *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada a diferentes condiciones de estrés osmótico.

Asimismo, se aportan en la Figura 5.7 los valores relativos a la evolución del pH a lo largo del período en estudio.

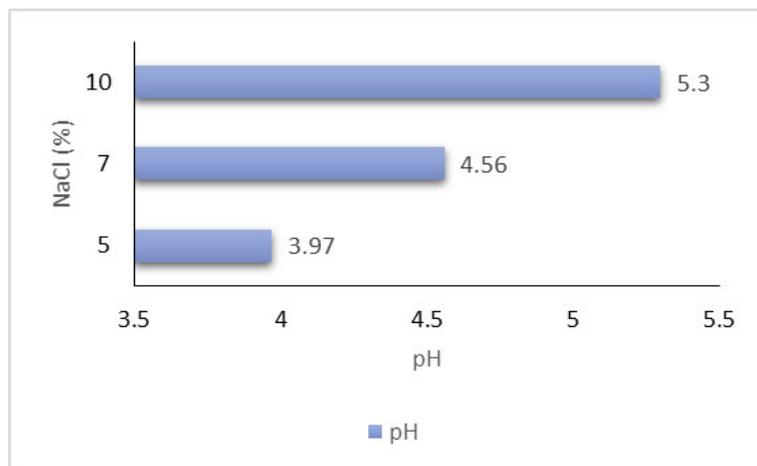


Figura 5.7

Valores de pH a diferentes condiciones de estrés osmótico microencapsulado.

El análisis de varianza ANOVA (p-value con un valor de 0.090) y la prueba de comparación de medias de Tukey mostraron que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (5, 7 y 10% de NaCl) como nos indica la Tabla 5.8 y 5.9.

Tabla 5.8

Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs % NaCl).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
NaCl	2	29.68	14.842	2.56	0.090
Error	39	225.89	5.792		
Total	41	255.58			

Tabla 5.9

Comparación en pareja utilizando método Tukey

NaCl	N	Media	Agrupación
5	14	9.4411	A
7	14	8.232	A
10	14	7.393	A

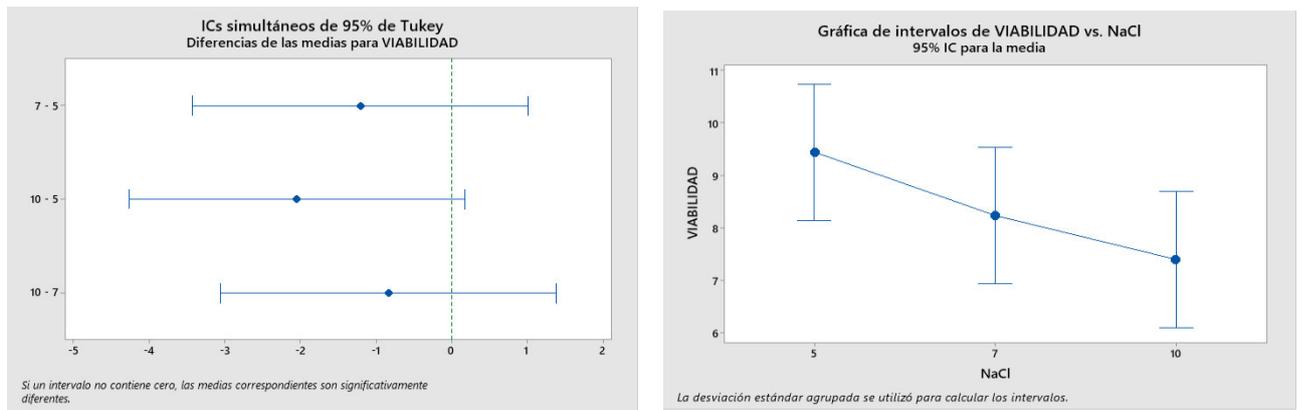


Figura 5.8

Intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad (% NaCl microencapsulado)

- **En forma libre**

Evaluamos el crecimiento de *Lactobacillus Plantarum* ATCC 1407 en su forma libre a diferentes concentraciones de NaCl (5, 7 y 10 %) como efecto del estrés osmótico. En la Tabla 5.10 se observa que al 5% de NaCl la bacteria presentó un crecimiento microbiano de 4.15 a 8.76 Log (UFC/mL) en las primeras 21 horas a comparación con los demás tratamientos. Sin embargo, a una mayor concentración de sales (10% NaCl) la bacteria no presento un crecimiento significativo.

Tabla 5.10

Concentraciones microbianas en Log (UFC/ml) de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones osmóticas.

NaCl (%)	Tiempo (horas)						
	0 h	3 h	6 h	21 h	24 h	27 h	30 h
5 %	3.56	3.61	4.15	8.76	8.91	8.93	9.10
7 %	3.47	3.43	3,42	4.42	4.97	6.03	6.96
10 %	4.43	4.24	4.22	4.17	4.16	4.16	4.16

En la Figura 5.9, nos muestra que la fase exponencial más significativa fue entre las 6 y 21 horas por el tratamiento de 5% NaCl teniendo lecturas de 4.15 a 8.76 Log (UFC/ mL).

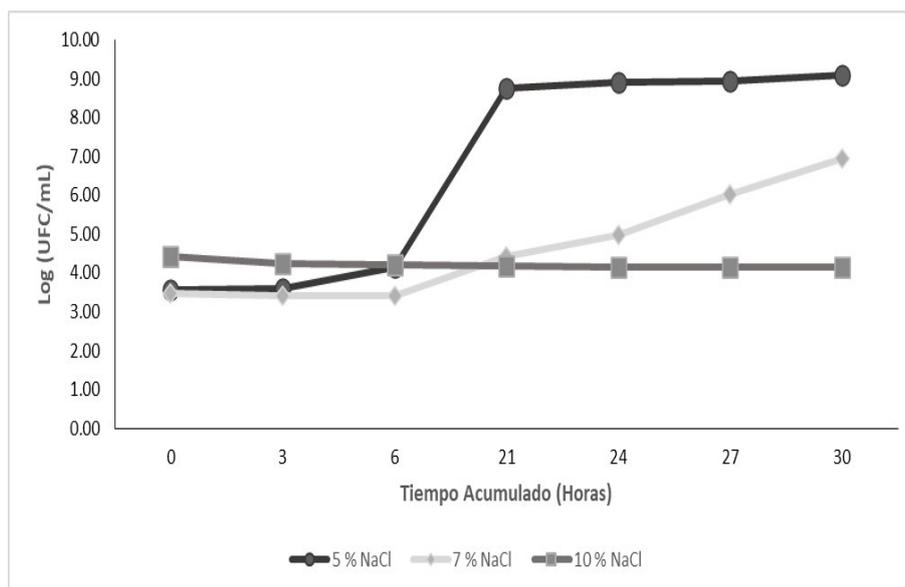


Figura 5.9

Cinética de crecimiento del *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones osmóticas.

Asimismo, se aportan en la Figura 5.10 los valores relativos a la evolución del pH a lo largo del período en estudio.

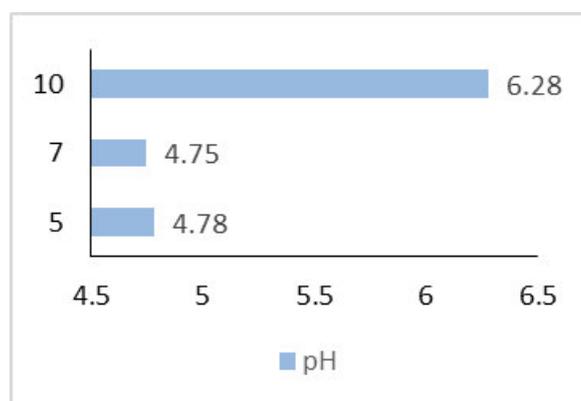


Figura 5.10

Valores de pH a diferentes condiciones de estrés osmótico en su forma libre.

En las Tablas 5.11 y 5.12, obtenemos el valor p en el análisis de varianza ANOVA con un valor 0.001 ($P < 0.05$) y en la comparación Tukey se evidencia la diferencia significativa en las dos últimas concentraciones 7 y 10 % de NaCl.

Tabla 5.11

Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs % NaCl forma libre).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
NaCl Libre	2	49.58	24.790	8.39	0.001
Error	39	115.23	2.955		
Total	41	164.81			

Tabla 5.12

Comparación en pareja utilizando método Tukey (% NaCl libre).

NaCl	N	Media	Agrupación
5	14	6.717	A
7	14	4.671	B
10	14	4.2200	B

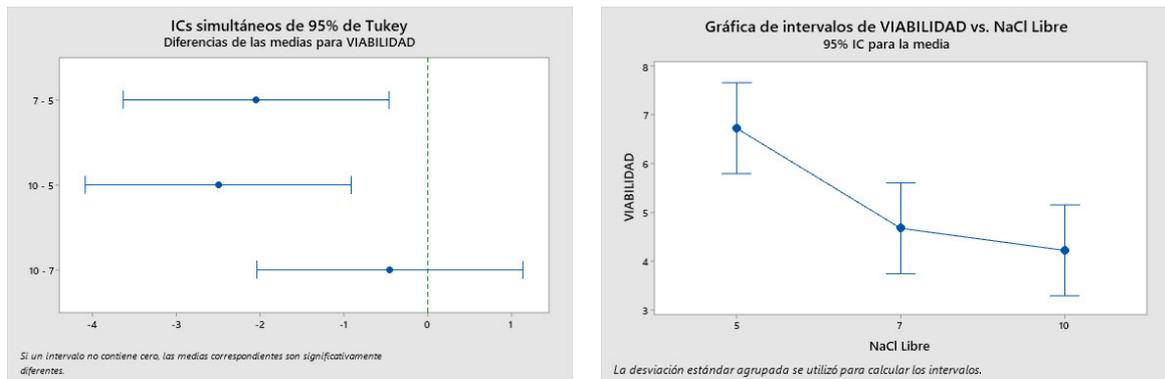


Figura 5.11

Intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad y % NaCl libre.

5.3 Evaluación del efecto del estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.

- En forma microencapsulada

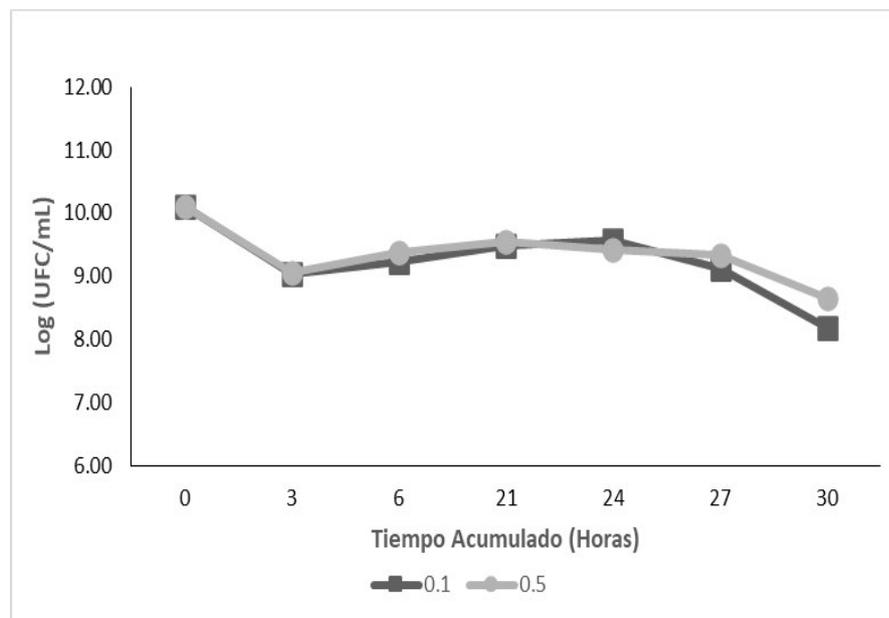
Se evaluó la viabilidad de la bacteria *L. Plantarum* después de 24 horas de crecimiento para posteriormente ser microencapsulada y puesta a estrés oxidativo (H_2O_2) en concentraciones al 0.10% y 0.50%. Los resultados según la Tabla 5.13 mostraron que a la concentración del 0.10% de H_2O_2 presentó un crecimiento lento con una etapa estacionaria posterior lo cual marcará la tendencia en las siguientes muestras que se tomarán. La concentración del 0.50% de H_2O_2 presentó resultados parecidos mostrando en la etapa estacionaria y una estabilidad en las primeras 24 horas de 9.05 a 9.41 Log (UFC/mL) para que luego aumente ligeramente el número de población. En ambos casos la bacteria tuvo un mínimo crecimiento y se mantuvo constante en el tiempo.

Tabla 5.13

Concentraciones microbianas en Log (UFC/mL) de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada a diferentes condiciones oxidativas.

H ₂ O ₂ (%)	Repetición	Tiempo (horas)						
		0 h	3 h	6 h	21 h	24 h	27 h	30 h
0.1 %	1	9.90	8.91	9.03	9.26	9.24	9.18	8.20
	2	10.25	9.15	9.36	9.64	9.76	9.07	8.18
0.5 %	1	9.90	9.10	9.39	9.37	9.21	9.24	8.31
	2	10.25	9.00	9.38	9.69	9.55	9.40	8.85

En la Figura 5.12 podemos observar en las condiciones oxidativas en la etapa de latencia las primeras 3 horas dónde hay muerte celular teniendo la pendiente negativa, a partir de ello en la segunda etapa exponencial llega a aumentar el número de colonias en menor medida lo cual marcará un precedente en las siguientes muestras.

**Figura 5.12**

Cinética de crecimiento del *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada a diferentes condiciones de estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que no hubo una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno como se observa en la Tabla 5.14 y Tabla 5.15.

Tabla 5.14

Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs % H₂O₂ microencapsulado).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
H2O2	1	0.08143	0.08143	0.30	0.590
Error	26	7.11289	0.27357		
Total	27	7.19433			

Tabla 5.15

Comparación en pareja utilizando método Tukey (% H₂O₂ microencapsulado).

H ₂ O ₂	N	Media	Agrupación
0.5	14	9.331	A
0.1	14	9.224	A

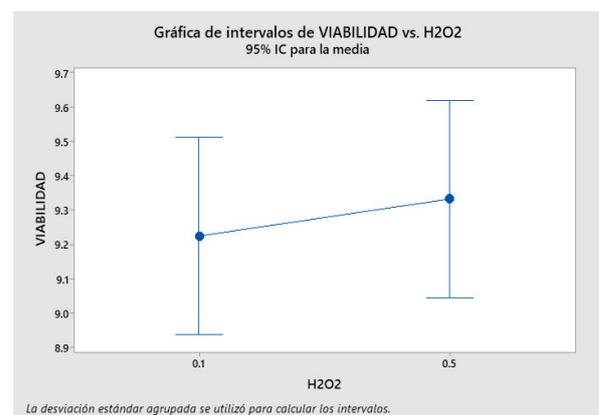
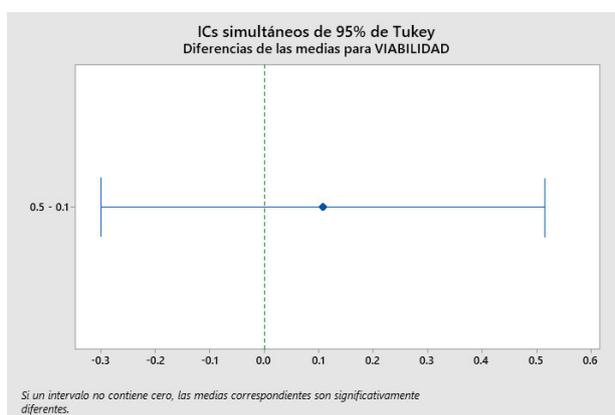


Figura 5.13

Intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad (% H₂O₂ microencapsulado).

En forma libre.

En este caso, la cepa *L. plantarum* con 24 horas fue inoculada en caldo MRS a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.1% y 0.5%). En la Tabla 5.16 se observa que en ambas concentraciones hubo un crecimiento similar las primeras 21 horas para luego tener una fase estacionaria teniendo valores de 3.55 hasta 12.57 Log (UFC/mL) para una concentración de 0.1% y de 3.61 a 12.69 Log (UFC/mL) al 0.5%.

Tabla 5.16

Concentraciones microbianas en Log (UFC/mL) de la cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones oxidativas.

H_2O_2 (%)	Tiempo (horas)						
	0 h	3 h	6 h	21 h	24 h	27 h	30 h
0.1 %	3.55	5.08	8.73	12.17	12.25	12.41	12.57
0.5 %	3.61	5.01	8.47	12.32	12.41	12.49	12.69

En la Figura 5.14 podemos notar que las últimas 9 horas ambos tratamientos son estables en una fase estacionaria que llega a 12.6 Log (UFC/mL)

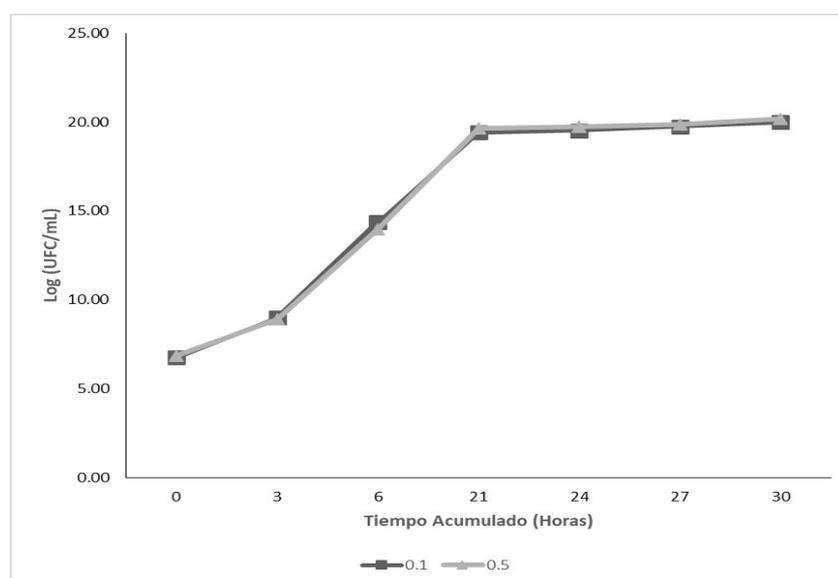


Figura 5.14

Cinética de crecimiento del *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 en su forma libre a diferentes condiciones oxidativas.

Asimismo, se aportan en la Figura 5.15 los valores relativos a la evolución del pH a lo largo del período en estudio.

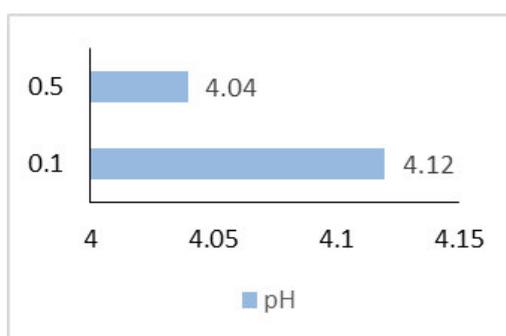


Figura 5.15:

Valores de pH a diferentes condiciones de estrés oxidativo en forma libre.

Nuestros resultados obtenidos en este estudio nos indican que no hubo una diferencia significativa ($P > 0.05$) en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como se observa en las Tablas 5.17 y 5.18.

Tabla 5.17

Análisis de varianza ANOVA de un solo factor (Viabilidad vs % H_2O_2 libre).

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
H_2O_2 Libre	1	0.008	0.0082	0.00	0.981
Error	26	359.041	13.8093		
Total	27	359.049			

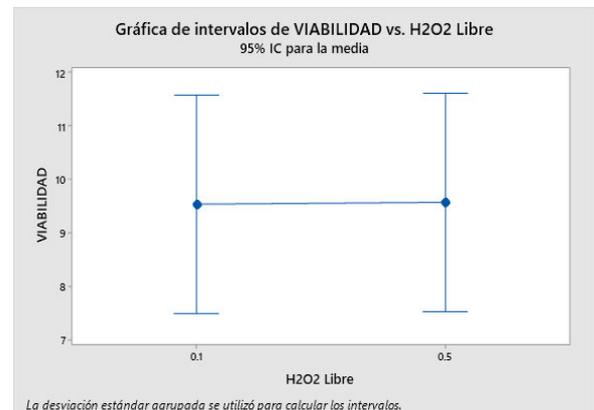
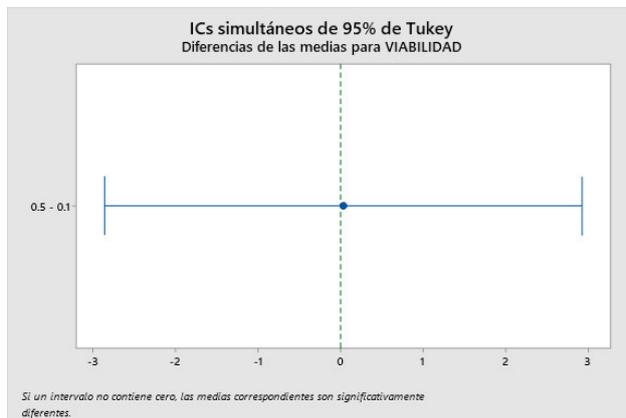
Tabla 5.18

Comparación en pareja utilizando método Tukey (% H₂O₂ libre)

<i>H₂O₂</i>			
Libre	N	Media	Agrupación
0.5	14	9.57	A
0.1	14	9.537	A

Figura 5.16

Intervalos y diferencias de las medias para Viabilidad y % H₂O₂ en forma libre.



5.4 Evaluación de la cinética de crecimiento de la bacteria libre y microencapsulada sometida a las condiciones de estrés.

La cinética de crecimiento de la cepa ATCC 1407 microencapsulada en diferentes condiciones térmicas puede observarse en la Figura 5.1 y Tabla 5.19, podemos identificar la fase logarítmica que va desde la hora 3 hasta la hora 6 en la temperatura de 37 °C y con esta se obtuvieron los parámetros cinéticos propios de la cepa, velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de 0.31 h⁻¹ y 0.97 h respectivamente. Los resultados obtenidos para la

temperatura 40 °C son 0.02 h⁻¹ y 16.7 h respectivamente. Por otro lado, podemos notar que a mayor temperatura 50 °C no existe una fase exponencial, está en fase de muerte.

En el estrés osmótico al 10% de NaCl identificamos una disminución progresiva del número de células viables, donde su velocidad específica máxima es menor a 0.

A condiciones del estrés oxidativo obtenemos una fase exponencial más prolongada al 0.1% que va desde la hora 3 hasta la hora 24 obteniendo una velocidad específica y tiempo de duplicación de 0.03 h⁻¹ y 11.99 h respectivamente.

Tabla 5.19

Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación en condiciones de estrés de la cepa *L. plantarum* ATCC 1407 microencapsulada.

	Estrés térmico			Estrés osmótico (NaCl)			Estrés oxidativo (H ₂ O ₂)	
	37 °C	40 °C	50 °C	5 %	7 %	10 %	0.1 %	0.5 %
μ _{max}	0.31	0.02	-0.25	0.07	0.04	-0.13	0.03	0.02
Td	0.97	16.70	-1.23	4.06	7.81	-2.36	11.99	10.80

En la forma libre de la cepa ATCC 1407, su fase exponencial es notoria ya que va desde la hora 3 hasta las 21 horas en ambas temperaturas 37 y 40° C, teniendo parámetros de velocidad específica máxima y tiempo de duplicación son 0.41 h⁻¹ y 0.75; 0.4 h⁻¹ y 0.76 respectivamente. En comparación a 50 °C de la cepa ATCC 1407 que tuvo un crecimiento en las tres primeras horas y luego una lisis celular con los valores de 0.3 h⁻¹ y 1.01. (Tabla 5.20).

Para condiciones osmóticas notamos que la viabilidad de la cepa al 10% de NaCl se va perdiendo entrando a la fase de muerte. Los parámetros de velocidad específica máxima y tiempo de duplicación son -0.01 h⁻¹ y -23.92 h.

En la Figura 5.12 y 5.14, observamos que la fase exponencial en el crecimiento microbiano de la cepa en condiciones oxidativas añadiendo peróxido de hidrógeno fue similar y en las primeras 21 horas fue significativa de -0.41 h^{-1} y 0.7 h .

Tabla 5.20

Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación en condiciones de estrés de la cepa ATCC 1407 en forma libre.

	Estrés térmico			Estrés osmótico (NaCl)			Estrés oxidativo (H_2O_2)	
	37 °C	40 °C	50 °C	5 %	7 %	10 %	0.1 %	0.5 %
μ_{max}	0.41	0.40	0.30	0.29	0.15	-0.01	0.41	0.41
Td	0.75	0.76	1.01	1.06	2.06	-23.92	0.74	0.73

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.

El estrés térmico sometido a las BAL es esencial para predecir o simular las condiciones en la que tiene que sobrevivir por la temperatura corporal y en los procesos tecnológicos en la industria de alimentos. Las cepas de *L. plantarum* sometidas a temperaturas de 37 y 40 °C muestran una mayor tasa de crecimiento. Estas bacterias pueden ser sometidas hasta una temperatura de 40°C, teniendo un rango óptimo y sin alterar su crecimiento (Jurado et al., 2019). En cuanto al elevar a la temperatura de 50°C la bacteria microencapsulada, se presenta un estrés térmico con una disminución de células viables al 56.7 %, esto ocasiona una desestabilización de macromoléculas, desnaturalización de proteínas, daños en la pared celular y alteraciones en la fluidez de la membrana (Guchte et al., 2002).

Lactobacillus plantarum en forma libre tuvo el mismo comportamiento de crecimiento para 37 y 40 °C pero con un mayor tiempo de exposición a comparación del microencapsulado. En cambio, a 50 °C se mantuvo constante y lineal con una velocidad específica máxima de 0.3 h⁻¹ mientras que en la microencapsulada se obtuvo -0.2 h⁻¹. Este comportamiento de un mayor crecimiento de células viables en la forma libre que en la microencapsulada se debe a que la bacteria está libre en el ambiente con nutrientes para proliferar y no tiene una matriz reticulada que favorece su aislamiento o la protegen de otras condiciones de estrés, pero por otro lado está más sensible a los aumentos de temperatura que puedan ocurrir.

Investigaciones han comprobado que la microencapsulación tiene como beneficio una mejor supervivencia desde el tiempo 0 h que las células libres a diferentes condiciones letales de temperatura (Fareez et al., 2015) y durante el tránsito gástrico (Shori, 2017).

Por otro lado, las mediciones de pH a diferentes temperaturas nos permiten comprender que, a una mayor biomasa o crecimiento de microorganismos, también aumenta la producción de ácido láctico lo que nos arroja resultados bajos de pH a 3.84.

Los resultados de nuestro estudio fueron similares a los resultados reportados por Soumitra et al. (2020), donde nos demostraron un crecimiento óptimo de *L. plantarum* a un rango de temperatura de 10 - 40 °C y una inactivación de 40 - 55 °C, esta capacidad también ha sido demostrada por otros investigadores (Longhi et al. 2013). También Jiage Ma et al. (2021) observó que la tasa de crecimiento disminuyó ligeramente cuando la temperatura de tratamiento térmico era de 40 y 45°C y al aumentar a temperaturas mayores a 50°C, el crecimiento se inhibía significativamente.

6.2 Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.

Los microorganismos tienen una membrana plasmática permeable al agua que impide el pase de la mayoría de solutos del medio externo y del mismo citoplasma. Pueden ocurrir dos tipos de variaciones osmóticas por la síntesis de osmolitos (Gandhi y Shah, 2015): un flujo de salida de agua al exterior que provoca una disminución de la presión de turgencia, cambio de volumen y célula plasmolizada; y un choque hipotónico con un flujo de entrada de agua a la célula ocasionando un aumento de presión de turgencia y el hinchamiento. El metabolismo de las proteínas, carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos y ATP se modifica cuando se expone a

estrés salino (Li et al., 2019). Por ello poseen un sistema de transporte que aseguran la homeostasis dependiendo del tipo de estrés (Csonka et al, 1989).

En nuestro estudio evaluamos la resistencia de la cepa a diversas concentraciones de sales (5, 7 y 10 % NaCl) en forma libre y microencapsulada, esto debido a que en el procesamiento de algunos alimentos o en el recorrido intestinal se pueden enfrentar a un estrés por altas concentraciones de sales. Por ellos utilizamos el parámetro de NaCl que es muy empleado en la preservación y maduración de alimentos, dentro de ellos la producción de quesos, su alto contenido inhibe el crecimiento de diversas bacterias (Prabhurajeshwar y Chandrakanth, 2017) y puede causar lesiones, permeabilización de las membranas celulares (Sunny-Roberts y Knorr, 2009).

La tasa de supervivencia del *L. plantarum* microencapsulado a 10% de NaCl se redujo a 66 % comparado con 5 y 7 % que obtuvimos 93 y 86% respectivamente. Los porcentajes de NaCl a partir del 5 % si se consideraron condiciones que generan estrés ya que hay una reducción notoria de la bacteria. En comparación con la forma libre, la microencapsulación formó un ambiente de protección a la bacteria es por eso que tuvimos una mejor viabilidad en las microcápsulas. Estos resultados coinciden con Lin et al. (2020) que al utilizar tres variedades de cepas *Lactobacillus plantarum* con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (2-8 % NaCl) obtuvo una relación negativa entre las concentraciones y el parámetro de crecimiento. También, Mahreen et al. (2020) evaluó las cepas aisladas en concentraciones de 1 al 7% NaCl durante 24 horas incubadas a 37°C, demostrando el crecimiento continuo hasta el 4% mientras que del 6-7% una disminución. Para Soumitra et al. (2020) en su investigación, corroboró que al 10% de NaCl no se presentan signos de crecimiento.

6.3 Evaluación del efecto del estrés oxidativo en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407 en su forma microencapsulada y libre.

El estrés oxidativo se entiende como una alteración al equilibrio prooxidante-antioxidante (Powers et al., 2008; Pinchuk et al., 2012;). Su fisiopatología nos indica que al incrementarse las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede llegar a generar radicales como anión superóxido (O_2^-), hidroxilo, especies no radicales (H_2O_2) y el oxígeno singlete (O_2) (Sunil et al., 2013) ocasionando una oxidación al ácido nucleico, proteínas y los lípidos, una ruptura y acoplamiento de su ADN. Además, genera mutaciones, daños en la célula y por último hasta la muerte celular (Islam et al., 2018).

Existen diversos mecanismos de defensa para contrarrestar y equilibrar el estrés oxidativo como sistemas antioxidantes de las BAL que incluyen la participación de enzimas y tioles intracelulares que ayudan a mantener la homeostasis redox (Zhang et al., 2017). Últimos estudios nos indican que la mayoría de *Lactobacillus* poseen efectos (Lee et al., 2005) y son aptos para reducir la acumulación de ROS después de la ingestión (Pieniz et al., 2014).

Las diferentes concentraciones de H_2O_2 (0.1 y 0.5 %) en el crecimiento de *L. plantarum* en la forma libre y microencapsulada nos demostraron que no estos porcentajes no significaron un estrés oxidativo ya que se tiene un comportamiento lineal y constante en el tiempo.

Lin et al. (2020) realiza el tratamiento para evaluar el estrés oxidativo obteniendo como resultado una tasa de supervivencia superior al 50% a 2 mM de H_2O_2 y menos del 1% cuando la concentración de H_2O_2 ascendía a 6 mM, cuando la concentración de H_2O_2 era superior a 9 mM, no había cepas viables. También Jiage Ma et al. (2021) evaluó a 0.2, 0.5, 1, 2 y 5 mmol/L

de H_2O_2 demostrando un efecto perjudicial en el crecimiento celular al aumentar la concentración a 2-5 mmol/L de H_2O_2 .

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

- El crecimiento de la *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407 microencapsulada en condiciones de temperatura de 37 y 40 °C favoreció el crecimiento de la población con una tasa de supervivencia de 105 y 99 %, respectivamente, mientras que, al aumentar la temperatura a 50°C hay una reducción significativa del 50 % de la población.
- Los porcentajes de NaCl del 5 % al 10% reducen significativamente la concentración celular de la bacteria microencapsulada, donde a una mayor concentración de sales existió un menor crecimiento microbiano. Sin embargo, el crecimiento de la bacteria en su forma libre al 5, 7 y 10 % de NaCl fue menor.
- En condiciones de estrés oxidativo evaluada al 0.1 y 0.5 de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el crecimiento microbiano de *L. plantarum* ATCC1407 en su forma libre y microencapsulada no se afectó y fue constante.

CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES

Se recomienda usar el método de microencapsulación puesto que con ello se tendrá mejores resultados frente a estrés térmico, estrés oxidativo.

Se recomienda investigar más sobre posibles niveles de estrés que pueda recibir este probiótico porque es muy beneficioso tener la mejor viabilidad para las personas.

En base a este estudio se recomienda seguir en la línea investigativa para mejorar la adaptabilidad en diferentes condiciones de estrés que se pueden presentar para así desarrollar mejor su potencial del probiótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M. (1998). Persistencia de la colonización de la mucosa colónica humana por una cepa probiótica, *Lactobacillus rhamnosus* GG, tras su consumo oral. *Applied and Environmental Microbiology*, 0099-2240/99/\$04.0010 Jan. 1999, p. 351–354

Alves, M., et al (2015). Pasta de aceitunas como vehículo de administración de un probiótico potencial *Lactobacillus plantarum* 33. *Food Research International* 75 (2015) 61–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.048>

Anal A.K., Singh H. (2007). Avances recientes en la microencapsulación de probióticos para aplicaciones industriales y administración dirigida. *Trends in food science & technology* 18: 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>

Ávila R. S. V. 2011. Efecto del agente encapsulante en la viabilidad de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* B442). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional (Centro de desarrollo de productos bióticos), México. 115 p.

BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO DEL PERÚ VOLUMEN 32 - SE 23 Semana Epidemiológica (del 04 al 10 de junio del 2023). Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Recuperado de https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_202323_13_144515.pdf

Bueno-García, Gloria; Brizuela-Herrada, María Antonieta; Delgado-Arrieta, Grizel; Serrano-Méndez, Paulina; Pérez-Leonard, Heidy Predicción de la estabilidad del probiótico PROBICID de *Lactobacillus plantarum* B-103-1-5 por el método de máxima probabilidad ICIDCA. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, vol. 47, núm. 2, mayo-agosto, 2013, pp.

35-41 Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba.

Castro L.A. y De Rovetto, C. 2006. Probioticos: utilidad clínica. Colombia Médica, 37 (4): 308-314.

Cayra, E., Dávila, J., Villalta M., Rosales, Y. (2017). Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado. Información Tecnológica Vol. 28(6), 35-44 (2017) <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642017000600005>

Champagne C., R. Ross P., M. Saarela, K. F. Hansen y D. Charalampopoulos. 2011. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. International Journal of Food Microbiology 149:185-193

Champagne, C. (2011). Recomendaciones para la evaluación de la viabilidad de probióticos como cultivos concentrados y en matrices alimentarias. International Journal of Food Microbiology 149 (2011) 185–193. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005

Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. InTech. doi: 10.5772/50046

Collado A. M. C. (2004). Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia (Departamento de Biotecnología), España. 283 p.

Cortés M., Chiralt A., Puente L. (2005). Alimentos Funcionales: Una historia con mucho presente y futuro. Vitae, vol. 12, núm. 1, pp. 5-14 Universidad de Antioquia Medellín, Colombia.

Cruz P. K. 2010. Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas in vitro. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional (Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología), México. 124 p.

Cruz, Edilberto. (2014). Efecto de diferentes condiciones fisicoquímicas sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum*". Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutierrez.

Csonka, Laszlo N. (1991). Prokaryoti osmoregulation: Genetics and Physiology. Department of Biological Sciences, Purdue University.

Dalcanton, F., Carrasco, E., Pérez, R., Posada, G., Falcão de Aragão, F., García-Gimeno, R. (2018). "Modeling the Combined Effects of Temperature, pH, and Sodium Chloride and Sodium Lactate Concentrations on the Growth Rate of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014", *Journal of Food Quality*, vol. 2018, Article ID 1726761 <https://doi.org/10.1155/2018/1726761>

Deladino L., A. Navarro y M. N. Martino. 2007. Encapsulation of Active Compounds: Ionic gelation and cocrystallization as case studies. In *Functional Properties of Food Components*. Lupano C. C. (ed.), Ed. Research Singpost. Canadá. ISBN: 978-81-308- 0197-1 p.p.125-157

Diario Oficial el Peruano (2023). Salud Digestiva: Conoce las claves para adoptar hábitos saludables y promover tu bienestar, previniendo enfermedades. Recuperado de <https://www.elperuano.pe/noticia/214481-salud-digestiva>

FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In *Probiotics in food*. Ed. FAO/WHO. Roma p.p. 39-52.

Fareez, I., Meng Lim, S., Mishra, R., Ramasamy, K. (2015). Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 72, Pages 1419-1428, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.054>.

Favaro-Trindade C.S., Grosso C.R.F. (2000) The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Michwissenschaft*, 55: 496–9.

Frakolaki, G., Giannou, V., Topakas, E., Tzia, C. (2021). Effect of various encapsulating agents on the beads' morphology and the viability of cells during BB-12 encapsulation through extrusion. *Journal of Food Engineering*, Volume 294, 110423, ISSN 0260-8774, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110423>.

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

Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., & Dumoulin, E. (2006). *Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. Journal of Food Engineering*, 75(1), 27–35. [doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.03.0](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.0)

García C. A. y López M. A. 2012. Biopolímeros utilizados en la encapsulación. Ed. Fundación Universidad de las Américas Puebla. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6:84-97

González-Cuello, R.E., Ramos-Ramírez, E.G., Cruz-Orea, A. *et al.* Rheological characterization and activation energy values of binary mixtures of gellan. *European Food Research and Technology* 234, 305–313 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1626-2>

Grajek W., A. Olejnik and A. Sip. 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. Department of Biotechnology and Food Microbiology. Journal *Acta Biochimica Polonica* 52:665-671.

Groboillot, A. F., Champagne, C. P., Darling, G. D., & Poncelet, D. (1993). Formación de membranas mediante reticulación interfacial de quitosano para la microencapsulación de *Lactococcus lactis*, 42(10), 1157–1163.

Guarner F, Schaafsma GJ. Probióticos. *Revista Internacional de Microbiología Alimentaria* 39 (1998) 237–238. PMID: 9553803. doi:[10.1016/s0168-1605\(97\)00136-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00136-0)

Gupta, V., Garg, R. (2009). Probióticos. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3): 202-9. doi: 10.4103/0255-0857.53201

Gutierrez Sarmiento, W., Tovilla Coutiño, M., & Ventura Canseco, L. (2015) Evaluación de factores extrínsecos sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y su producción de ácido láctico en un reactor de tanque agitado. ISSN 1946.53.51 Online. Volumen 7, No. 1.

Havenaar, R.; Huis in't Veld, J.H.J. (1992). Probiotics: A general view. In: Wood BJB: *The Lactic Acid Bacteria, Vol. 1: The lactic acid bacteria in health and disease*, Chapman & Hall, New York, NY: 209–224.

Ignat I., Volf I., Valentin I. Popa, (2010). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, Volume 126, Issue 4, Pages 1821-1835, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

Islam, M., Hossain, M., Hossen, F. et al. (2018). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Crotalaria pallida* stem extract. *Clin Phytosci* 4, 8
<https://doi.org/10.1186/s40816-018-0066-y>

Isolauri E., Arvola T., Sue Tas E., Moilanen E, Salminen S. (2001). Los probióticos en el tratamiento del eczema atópico. *Clinical and Experimental Allergy*, 2000, Volume 30, pages 1604±1610.

Jeongmin Lee,¹ Kwon-Tack Hwang,¹ Moon-Soo Heo,² Jun-Haeng Lee,³ and Kun-Young Park Resistance of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099 from Kimchi to Oxidative Stress. *J Med Food* 8 (3) 2005, 299–304

Jiage Ma , Cong Xu , Fei Liu , Juncai Hou , Hong Shao & Wei Yu (2021) Adaptación al estrés y protección cruzada de *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0628, *CyTA - Journal of Food*, 19:1, 72-80, DOI: [10.1080/19476337.2020.1859619](https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1859619)

Jurado-Gámez H, Sinsajoa-Tepud M, Narváez-Rodríguez M. (2019). Evaluación de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado y su viabilidad bajo condiciones gastrointestinales simuladas e inhibición frente a *Escherichia coli* O157:H7. *Rev Med Vet Zoot.* 66(3): 231-244.
Doi: [10.15446/rfmvz.v66n3.84260](https://doi.org/10.15446/rfmvz.v66n3.84260)

Kailasapathy, Kaila. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria:Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* (2002) 3: 39-48

King, Alan. (1995). Encapsulation of Food Ingredients A Review of Available Technology, Focusing on Hydrocolloids. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*

Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ. (2003). Secuencia completa del genoma de *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(4):1990-5. doi: [10.1073/pnas.0337704100](https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100)

Klein J. and Vorlop K. (1983). Immobilized Cells Catalyst Preparation and Reaction Performance. Technical University of Braunschweig, Institute of Chemical Technology, Federal Republic of Germany

Klein, J., & Vorlop, K. D. (1983). Células inmovilizadas, preparación del catalizador y rendimiento de la reacción. En H. Blanch, E. T. Papoutsakis & G. Stephanopoulos (Eds.), Foundations of biochemical engineering kinetics and thermodynamics in biological systems, Simposio de la ACS., Series No. 207 (pp. 475–486). Washington DC: American Chemical Society.

Knorr, D., Miazga, S.M., Teutonico, R.A. 1985. Inmovilización y permeabilización de células vegetales cultivadas. Food Technol. 39: 135-142.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B and Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. International Dairy Journal 13 (2003) 3–13.

Lilly, DM y Stillwell, RH (1965) Probióticos: factores promotores del crecimiento producidos por microorganismos. Ciencia, 147, 747-748.
<https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>

Lin, X., Xia, Y., Yang, Y., Wang, G., Zhou, W., Ai, L. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* AR113 and its molecular mechanism of antioxidant, LWT, Volume 126, 109278, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109278>

Lin, X., Xia, Y., Yang, Y., Wang, G., Zhou, W., Ai, L. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* AR113 and its molecular mechanism of antioxidant, LWT, Volume 126, 109278, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109278>

Longhi, D., Dalcanton, F., Falcão de Aragão, G., Mattar Carciofi, B., Borges, J. (2013). Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions, Journal of Theoretical Biology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.06.030>

López E, Frutos M y Valero E. (2021). Microencapsulación de *L. Plantarum* en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y de la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica. Tesis para optar grado de magister. Universidad Miguel Hernández de Elche.

López Martínez, E. (2021). Microencapsulación de *L. Plantarum* en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y de la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica. Máster Universitario en Tecnología y Calidad Agroalimentaria.

Lyhs, Ulrike. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish product. Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki

Mahmoud, M., Abdallah, N., El-Shafei, K., Tawfik, N., El-Sayed, H. (2020). Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated

food processing and gastrointestinal conditions. Heliyon 6.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03541>

Mahreen, Ul., Nayab, H., Shafique, F., Williamson, M., Saud. T., Asim, N., Shafi, N., Attacha, S., Khalid, M., Ali, N., Akbar, N. (2020). "Probiotic Properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* Isolated from Traditional Pakistani Yoghurt", *BioMed Research International*, vol. 2020, Article ID 8889198 <https://doi.org/10.1155/2020/8889198>

Makarova K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Journal Proceedings of the National Academy of Sciences* 42:15611-15616.

Makinen K, Berger B, Bel-Rhlid R, Ananta E. (2012). Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products, *Journal of Biotechnology*, Volume 162, Issue 4, Pages 356-365, ISSN 0168-1656, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.006>.

Martinez N. N., A. M. Andrés G., A. Chiralt B. y P. Fito M. 2000. *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. Segunda edición. Ed. Servicio de Publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia, España. ISBN: 84-7721-703-3. 371 p.

Mejía, J., Chacón, Z., Guerrero, B., Otoniel, J y López G, (2006). Obtención de cepas de *lactobacillus*. Caracterización *in-vitro* como potenciales probióticos. *Rev. Cient. (Maracaibo)* v.17 n.2

Mendoza M., A. G., 2009. Determinación de la viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* inmovilizado, tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas In-vitro. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional (Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología), México. 88 p.

Milesi, M., Mc Sweeney, P., Hynes, E., (2008). Viabilidad y contribución a la proteólisis de un cultivo adjunto de *Lactobacillus plantarum* en dos sistemas de queso modelo: tipo queso cheddar y tipo queso blando. J. Appl. Microbiol. 105, 884-892.

Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., y Kourkoutas, Y. (2013). Tecnologías de inmovilización en la producción de alimentos probióticos, Hindawi Publishing Corporation Journal of Nutrition and Metabolism, 2013(716861), 15.

Mohammadi, R.; Mortazavian, A.; Khosrokhavar, R.; da Cruz, A. (2011). Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. Annals of Microbiology. 61(3): 411-424

Parra Huertas, R. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol. 8 N0 1.

Pérez-Leonard, Heidy; Bueno-García, Gloria; Brizuela-Herrada, María Antonieta; Tortoló-Cabañas, Keyla; Gastón-Peña, Cristina (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. 47, núm. 1, pp. 14-25 Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba

Pinchuk, I., Shoal, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays, Chemistry and Physics of Lipids, Volume 165, Issue 6, Pages 638-647, ISSN 0009-3084, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.05.003>

Piuri, Mariana. (2003). Caracterización de la respuesta a estrés osmótico en *Lactobacillus casei* : rol del sistema proteolítico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3599_Piuri.pdf

Piuri, Mariana. (2003). Caracterización de la respuesta a estrés osmótico en *Lactobacillus casei* : rol del sistema proteolítico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3599_Piuri.pdf

Powers, S., & Jackson, M. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev* 88: 1243–1276, 2008; doi:10.1152/physrev.00031.2007

Prabhurajeshwar C, Chandrakanth RK, (2017). Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances, *Biomedical Journal* [http:// dx.doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.008)

Rahman M. S. 2007. Manual de conservación de alimentos. Segunda edición. Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, USA. ISBN: 1-57444-606-1. 1068 p

Ramírez C. M. S. 2005. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis Profesional. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería), México. 86 p

Ramírez Cuenca, M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas deterioradoras de alimentos. Tesis para obtener el título de Lic. Químico en Alimentos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Rao, A., Shiwnarain, N and Maharaj, N. (1989). *Survival of Microencapsulated Bifidobacterium pseudofongum in Simulated Gastric and Intestinal Juices*. *Inst. FoodSci. Technol. J. Vol. 22, No. 4, pp. 345-349,198*

Rodríguez YA, Rojas AF, Rodríguez-Barona S. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud* 2016; 15(2): 106-115 doi: 10.17151/biosa.2016.15.2.10

Rodríguez, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmoduladora. Universidad Autónoma de Barcelona

Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fondén R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. (1998). Demonstration of safety of probiotics - A review. *International Journal of Food Microbiology* 20;44(1-2):93-106. PMID: 9849787. doi: [10.1016/s0168-1605\(98\)00128-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00128-7)

Saulnier D. M. A., J. K. Spinler, G. R. Gibson and J. Versalovic. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. Ed. Elsevier. *Current Opinion in Biotechnology* 20:135-141.

Schrezenmeir J. and M. De Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:361S-364S

Sheu, T and Marshall, R. (1993). Microentrapment of *Lactobacilli* in Calcium Alginate Gels Volume 54, No. 3, 1993-JOURNAL OF FOOD SCIENCE-559

Shori, A., Albaik, M., M. Bokhari, F. (2017). Fast food consumption and increased body mass index as risk factors for weight gain and obesity in Saudi Arabia, *Obesity Medicine*, Volume 8, Pages 1-5, ISSN 2451-8476, <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2017.09.002>.

Skjak-Braek, G., Larsen, B., & Smidsrod, O. (1986). Adaptación de alginatos mediante modificación enzimática in vitro. *Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas*, 8(6), 330–336.

Soumitra, N., Sikidar, J., Roy, M., and Bibhas Deb. (2020). In-vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. *Food Quality and Safety*, Volume 4, Issue 4, December 2020, Pages 213–223, <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa026>

Stiles M. and W. Holzapef. (1997)h. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36:1-29.

Sunil, C., Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S., Abdullah Al-Dhabi, N. (2013) Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azma tetracantha* Lam. leaves, *Food Chemistry*, Volume 139, Issues 1–4, Pages 860-865, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.041>

Sunny-Roberts, E. O., & Knorr, D. (2009). The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. *International Dairy Journal*, 19(4), 209–214. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.10.008

Van de Guchte M. Serror P., Chervaux C., Smovkina T., Dusko Ehrlich S. 8LMaguin E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol 82, 187-216.

Vázquez A. M. M. (2008). Viabilidad y propiedades fisicoquímicas de leche fermentada probiótica. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla (Departamento de Ingeniería Química y Alimentos), México. 95 p.

WGO. 2011. Probióticos y Prebióticos. In *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y Prebióticos*. Ed. WGO. 29 p.

Yáñez Fernández J., Salazar Montoya, J., Chaires Martínez, L., Jiménez Hernández, J., Márquez Robles, M y Ramos Ramírez, G. (2005). Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. Mundo Alimentario

Young, Oh, J., Kim, T. S., Moon, H. W., Lee, S. Y., Lee, S. Y., Ji, G. E., & Hwang, K. T. (2020). *Lactobacillus plantarum* PMO 08 as a Probiotic Starter Culture for Plant-Based Fermented Beverages. *Molecules*, 25(21), 5056. doi: 10.3390/molecules25215056

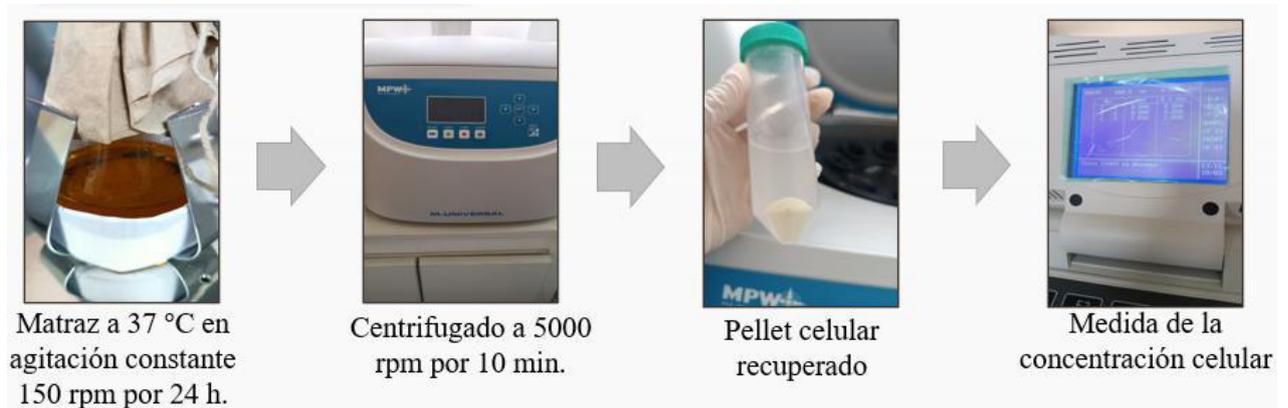
Zamora V. R. 2011. Elaboración de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e inulina. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional (Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional - Michoacán), México. 72 p

Zhang, L et al. (2017). Efecto de las condiciones de horneado y almacenamiento sobre la viabilidad del *Lactobacillus plantarum* suplementado en el pan. *Food Science and Technology* 87 (2018) 318-325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.005>

Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, A., Champagne, C. P., & Neufeld, R. J. (1998). Cuantificación espectrofotométrica de bacterias lácticas en alginato y control de la liberación celular con recubrimiento de quitosano. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3), 342–348.

ANEXOS

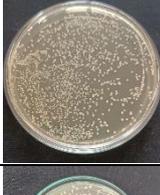
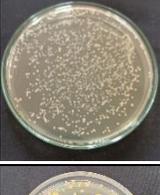
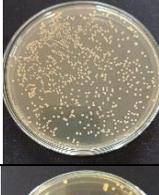
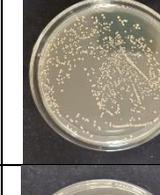
ANEXO 1: Preparación de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407



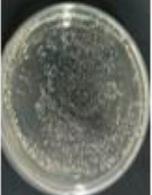
ANEXO 2: Microencapsulación de la bacteria *Lactobacillus plantarum* ATCC 1407



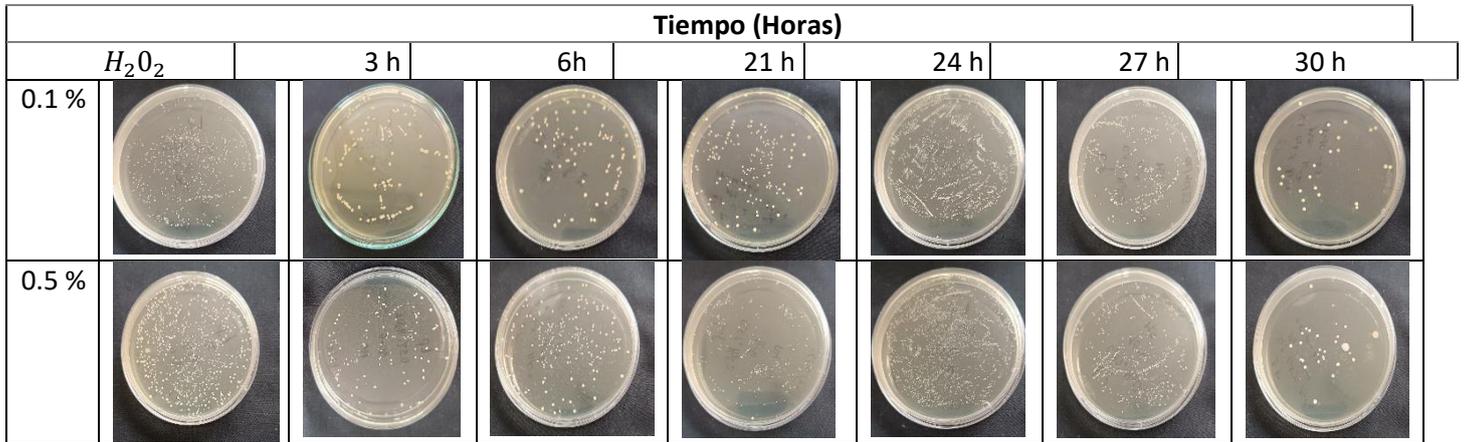
ANEXO 3: Evaluación del efecto de la temperatura en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407

T°	Tiempo (horas)						
	0 h	3 h	6 h	21 h	24 h	27 h	30 h
37 °C							
40 °C							
50 °C							

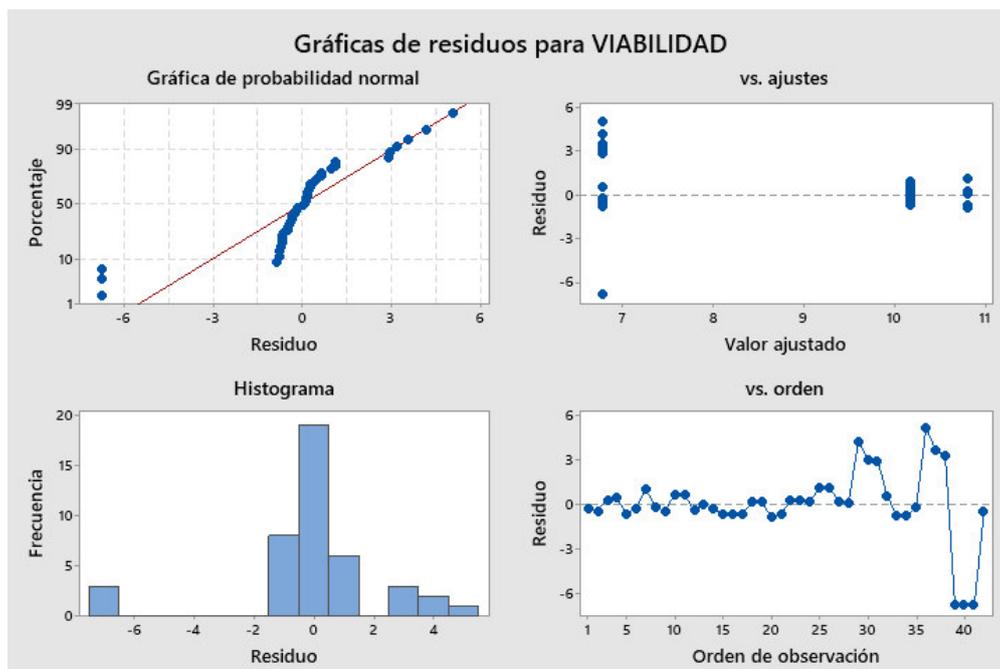
ANEXO 4: Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407

NaCl (%)	Tiempo (horas)						
	0 h	3 h	6 h	21 h	24 h	27 h	30 h
5 %							
7 %							
10 %							

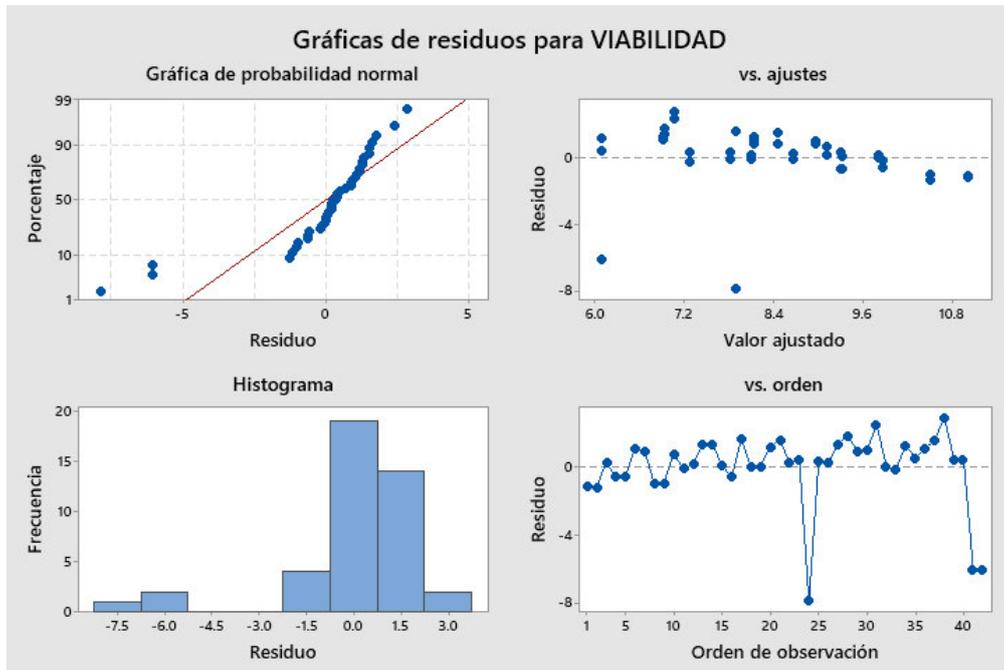
ANEXO 5: Evaluación del efecto del estrés osmótico en la viabilidad de la bacteria *L. plantarum* ATCC 1407



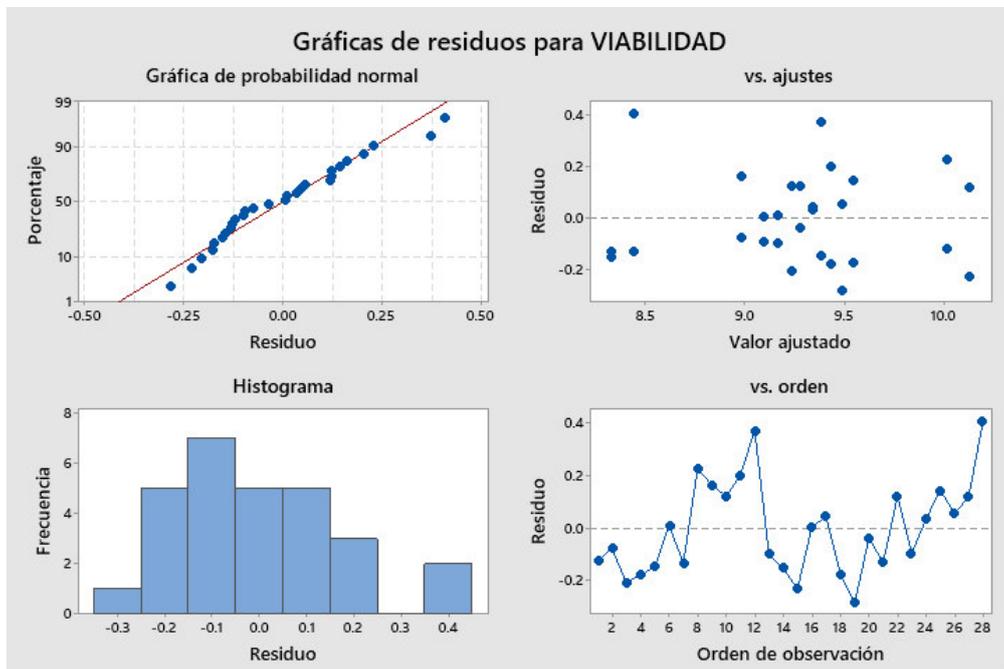
ANEXO 6: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas microencapsuladas para temperatura



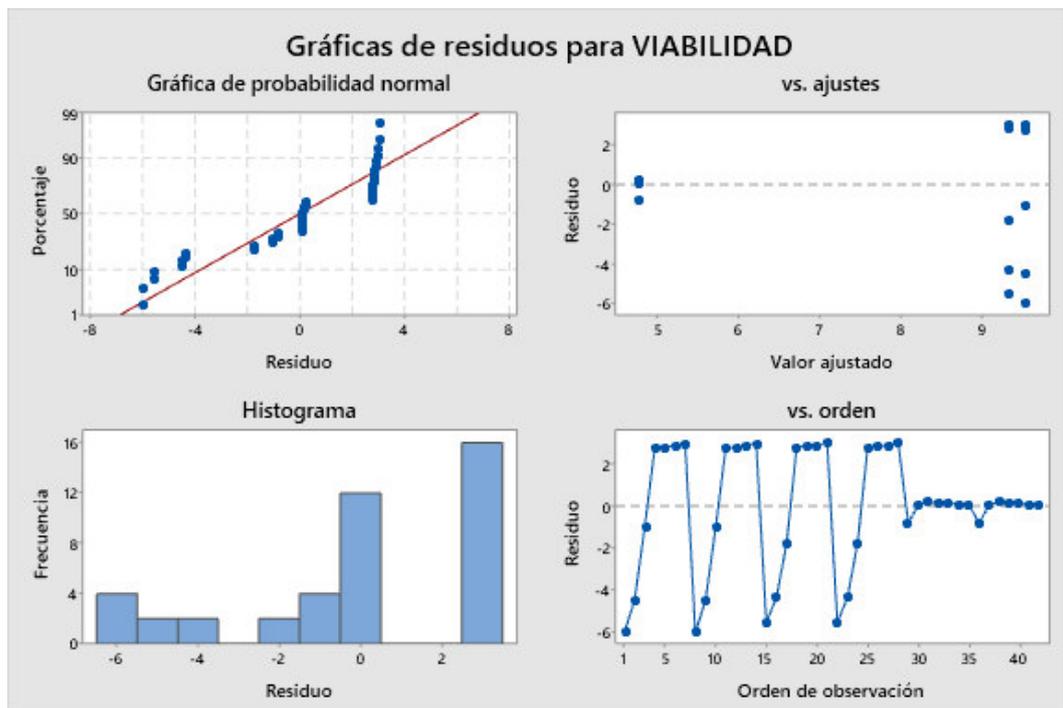
ANEXO 7: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas microencapsuladas para estrés osmótico



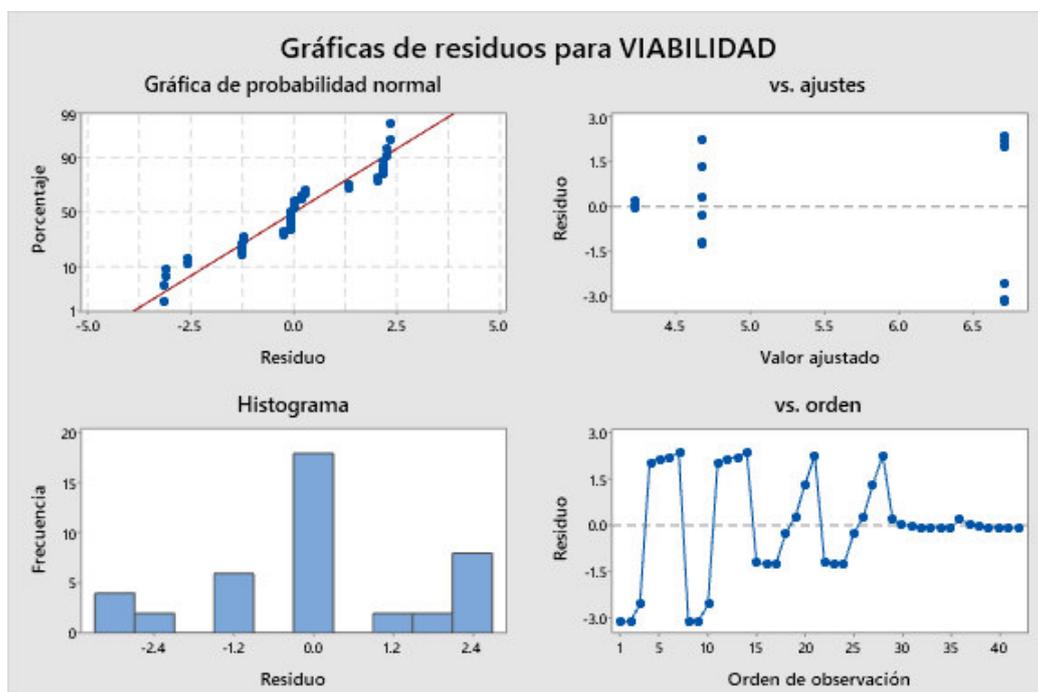
ANEXO 8: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas microencapsuladas en estrés oxidativo



ANEXO 9: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas en forma libre para temperatura



ANEXO 10: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas en forma libre para estrés osmótico



ANEXO 11: Gráficos de residuos para la viabilidad en cepas forma libre en estrés oxidativo

