

MICROCÁPSULA DE PROBIÓTICOS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 El desarrollo tecnológico está relacionado con la preparación de cápsulas, particularmente la encapsulación de microorganismos tipo probióticos para ser utilizados en alimentos funcionales.

DESCRIPCION DEL ESTADO DE LA TECNICA

10

Aunque el uso de revestimientos y películas comestibles para preservar la calidad de los alimentos no es un concepto nuevo, la investigación en la academia, el gobierno y laboratorios de la industria privada han intensificado recientemente su desarrollo debido a la creciente demanda de alimentos de alta calidad. En ese mismo sentido, el uso de bacterias probióticas en los alimentos es de creciente interés pues tiene el objetivo de proporcionar efectos beneficiosos para la salud, en donde tradicionalmente se han utilizado bacterias ácido lácticas en matrices lácteas refrigeradas que mantienen la viabilidad de estos microorganismos hasta el final de vida útil del producto.

15

20

Entre las tecnologías para proteger los microorganismos en las diferentes aplicaciones se encuentra la microencapsulación, una tecnología que se usa para mantener la viabilidad de las bacterias probióticas durante el procesamiento y almacenamiento de productos alimenticios. Actualmente existen desarrollos comerciales de probióticos tradicionales, sin embargo, diversas operaciones como tratamientos térmicos, de homogenización, pH, acidez, oxidación, etc. a las que son sometidos los alimentos, así como el tiempo de vida útil pueden afectar la supervivencia de los probióticos en el producto final y su desempeño a nivel funcional (Maathuis, Keller y Farmer, 2010; Corona-Hernández et al., 2013).

25

30

Por ejemplo se encuentra la solicitud de patente US2007/0098847 en donde a partir de *Lactobacillus casei* y una mezcla 50/50 de ácido esteárico y ácido palmítico se producen gránulos estables por 3 meses a temperatura ambiente. De acuerdo a lo divulgado en dicha patente, estos gránulos pueden incorporarse en leche estándar, leche fermentada, productos de leche fermentada, jugos de fruta y verdura.

35

También se encuentra la patente US8,871,266 dirigida a formulaciones de bacterias probióticas encapsuladas, en donde la matriz encapsulante está formada por una mezcla entre proteína y carbohidrato y en donde las bacterias se agregan como concentrado líquido o en forma liofilizada a la matriz encapsulante. En dicho método, el probiótico se dispersa en un aceite y luego en una mezcla de proteína y carbohidrato formadores de película. La encapsulación del probiótico se realiza al dispersar el microorganismo en aceite que es

40

subsecuentemente dispersado en una proteína formadora de película y un carbohidrato (Estrategia 3). En la Estrategia 3 una vez se agrega el microorganismo al aceite y se dispersa en la mezcla de proteína y carbohidrato, se seca por *spray dry* entre 120 y 160°C.

Sin embargo, actualmente hay pocas alternativas para la encapsulación de probióticos esporulados para su aplicación tanto en matrices sólidas como en matrices líquidas con alta actividad de agua. El desarrollo tecnológico de la invención propone una microcápsula en donde se estabiliza un probiótico en espora mediante al menos un recubrimiento que inhiba o retarde la germinación de la espora a temperatura ambiente de tal manera que no altere negativamente la matriz en la cual se incorpore.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente solicitud está dirigida a una microcápsula de un probiótico encapsulado en una esfera lipídica y recubierto con una película proteica que evita la migración del microorganismo al medio y no genera modificaciones indeseables a la matriz en donde sea incorporado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Conteo de esporas liberadas al medio líquido para cada uno de los tratamientos mostrados en la Tabla 3.

FIG. 2 Conteo de esporas viables en medio líquido, prueba efectividad de recubrimiento a los 0 y 5 días.

FIG. 3 Porcentaje de reducción de esporas viables en medio líquido, recubrimiento en comparación con esferas lipídicas sin recubrir.

FIG. 4 Recubrimiento con modificación del pH a 4,6 de la película proteica para mejorar la desnaturalización de las proteínas.

FIG. 5 Concentración de microorganismo en la fase líquida con recubrimiento de lecitina.

FIG. 6 Concentración de microorganismo en fase líquida para diferentes tamaños de esfera.

- FIG. 7** Concentración de microorganismo en la fase sólida, prueba de tamaño. AL (BLS esferas grandes), AM (BLS esferas medianas), AS (BLS esferas pequeñas), SL (BBF esferas grandes), SM (BBF esferas medianas) y SS (BBF esferas pequeñas).
- 5 **FIG. 8** Recuento de esporas viables dentro de los diferentes tamaños de partícula obtenidos del lecho fluido.
- FIG. 9** Conteo de esporas viables en la fase sólida presentes en la matriz BBF y conteo de esporas viables en la fase líquida presentes en la matriz BBF incubadas a 4°C.
- 10 **FIG. 10** Conteo de esporas viables en la fase sólida presentes en la matriz BLS y conteo de esporas viables en la fase líquida presentes en la matriz BLS incubadas a 4°C.
- FIG. 11** Conteo de esporas viables en la fase sólida presentes en la matriz BBF y
15 conteo de esporas viables en la fase líquida presentes en la matriz BBF incubadas a 25°C.
- FIG. 12** Conteo de esporas viables en la fase sólida presentes en la matriz BLS y conteo de esporas viables en la fase líquida presentes en la matriz BLS incubadas a 25°C.
- 20 **FIG. 13** Conteo de esporas viables en las matrices BBF y BLS incubado a 25°C.
- FIG. 14** pH de la matriz BBF y BLS con microorganismo incubado a 4°C y 25°C.
- FIG. 15** pH de las matrices BLS y BBF con Lactospore® incubados a 25°C.
- 25 **FIG. 16** °Brix de la matriz BLS y BBF incubado a 4°C y 25°C.
- FIG. 17** °Brix de las matrices BLS y BBF incubados a 25°C.
- 30 **FIG. 18** Porcentaje de humedad presente en cada tratamiento tras lecho fluido.
- FIG. 19** Conteo de esporas viables en medio acuoso tras cada recubrimiento.
- FIG. 20** Porcentaje de reducción de esporas liberadas en medio acuoso para cada
35 tratamiento.
- FIG. 21** Conteo de esporas para cada capa de recubrimiento (*Se realizó un tratamiento térmico a 50°C por 20 minutos).

FIG. 22 Porcentaje de liberación en medio acuoso de esporas viables (*Se realizó un tratamiento térmico a 50°C por 20 minutos).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Microcápsula de probiótico

La presente solicitud está dirigida a una microcápsula de un probiótico encapsulado en una esfera lipídica y recubierto con una película proteica que evita la migración del microorganismo al medio y no genera modificaciones indeseables a la matriz en donde sea incorporado, y un proceso para su elaboración.

Así, en el contexto de la presente invención se entiende como una microcápsula de probiótico aquella en la que comprende una esfera lipídica recubierta por una película proteica; en donde la esfera lipídica comprende un probiótico esporulado y un material de pared lipídico; y en donde la película proteica comprende un material proteico, un carbohidrato y agua.

- Esfera lipídica

El núcleo lipídico, esfera lipídica o esfera de la microcápsula está compuesto por al menos dos elementos: un ingrediente activo y un material de pared. El ingrediente activo puede ser un microorganismo, ingrediente de interés como un aroma, saborizante, colorante, bioactivo (antioxidante, energizante, tranquilizante, adaptógeno, potenciador de memoria, modulador anímico, entre otros) o combinaciones de los anteriores. Para efectos de la presente invención, se entiende por “esfera” a la fase sólida del producto, donde se encuentra el ingrediente activo.

El ingrediente activo es un microorganismo, preferiblemente un microorganismo probiótico de acuerdo a como está definido en la norma NTC 805 de 2006, International Dairy Federation 1997 o la Organización Mundial de la Salud. Un probiótico se refiere a un microorganismo vivo que, suministrado en la dieta e ingerido en cantidad suficiente de un humano u otro animal, ejerce un efecto benéfico sobre la salud, más allá de los efectos nutricionales.

Preferiblemente, el microorganismo probiótico es un probiótico esporulado o formador de esporas. Cuando el microorganismo probiótico es formador de esporas tiene ventajas sobre aquellos sin esta capacidad pues como ingrediente activo no requiere de cadena de frío o de procesos de deshidratación y tienen mayor versatilidad en el desarrollo de alimentos funcionales fuera de nevera. Se entiende por “espora” a la estructura de resistencia a

condiciones extremas (temperatura por encima de 60°C y limitación de nutrientes) que tras su germinación en condiciones favorables da lugar a una célula vegetativa.

Para efectos de la presente invención, el probiótico esporulado se selecciona del género
5 *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* o géneros relacionados. En una modalidad, los probióticos esporulados se seleccionan entre cepas de *B. subtilis*, *B. indicus*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. pumilus*, *B. polyfermenticus*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Paenibacillus polymyxa*, y combinaciones de los mismos. Las inventoras notaron que la espora es un microorganismo en estado latente y una
10 vez que las condiciones del entorno sean las que promuevan su crecimiento las esporas germinarán y crecerán y se multiplicarán a diferentes tiempos.

El microorganismo probiótico en la microcápsula tiene una concentración bacteriana suficiente para ejercer un efecto benéfico sobre la salud. De manera general la
15 concentración puede estar alrededor de 15 billones de esporas por gramo, en donde se entiende por alrededor a una variación entre +/-5% del valor de la concentración. Particularmente, el probiótico esporulado está en una concentración entre $1,5 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^8$ UFC/g en la microcápsula.

20 El probiótico esporulado se encuentra comprendido en la esfera lipídica entre 0,1 y 8%, entre 0,1 y 5%, entre 0,1 y 3%. Hay que tener en cuenta que entre más concentrada esté la cápsula, el gradiente de concentración al medio es más alto y más va a querer migrar el microorganismo. A menos que se indique lo contrario de forma implícita a partir del contexto o habitual en la técnica, todas las partes y porcentajes del presente Capítulo
25 Descriptivo están basados en peso.

El microorganismo se mezcla con un material de pared hasta formar una esfera lipídica de tal manera que no se disuelva en agua. El material de pared es un lípido con un punto de fusión inferior a 40°C de tal manera que se disuelva en contacto con las lipasas del
30 estómago y el microorganismo pueda ser liberado.

El lípido del material de pared es por ejemplo cera, aceite o grasa o combinación de los anteriores. Si el material de pared es un aceite se puede seleccionar de, pero no se limita a, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de
35 coco, aceite de palmiste, aceite de palma, aceite de palma africana, aceite de semilla de palma, aceite de cártamo, aceite de canola, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de linaza (lino), y mezclas de los mismos. Entre las posibles ceras se encuentran pero no se limitan a cera de abeja, cera carnauba, cera de candelilla, manteca de cacao, mantequilla de maní, y mezclas de las mismas.

Entre otros posibles materiales de pared que están en la esfera lipídica se encuentran lecitina, estearina de palma, ácido palmítico, ácido esteárico, goma laca, gelatina, agar, goma gellan, pectina, alginato y mezclas de los mismos, entre otros.

- 5 El material de pared lipídico se encuentra en la esfera lipídica entre 92 y 99,9%, entre 97 y 99,9%, o entre 98 y 99,9%.

- Película proteica

- 10 La película proteica, matriz de recubrimiento, recubrimiento proteico o matriz proteica tiene, entre otras funciones, proteger la esfera lipídica y reducir, retardar o evitar la liberación de los microorganismos esporulados. Durante el proceso de producción de la microcápsula, se forma una película, recubrimiento o matriz que embebe la esfera lipídica o que forma una película alrededor de dicha esfera. La microcápsula comprende al menos
- 15 película proteica. La película proteica es hidrofóbica e impermeable o semihidrofóbica y parcialmente impermeable.

- Para efectos de la presente invención se entiende por “*película proteica*” a cualquier tipo de material utilizado como cobertura, envoltura o capa de separación para los distintos
- 20 alimentos, de forma que permita extender la vida útil del producto y que se pueda consumir sin riesgos a la salud humana u otro animal. Cada material de película o recubrimiento proporciona una estructura, resistencia mecánica, solubilidad y otras propiedades características. Una película o recubrimiento comestible proporciona esterilidad a la superficie del alimento y evita la pérdida de compuestos importantes, en este caso, del
- 25 microorganismo. En general, su espesor debe ser lo suficientemente delgado para que su tamaño de partícula no se incremente y no sea perceptible en boca pero lo suficientemente grueso para que no permita la migración de los microorganismos.

- La película proteica comprende al menos un material proteico y al menos un carbohidrato.
- 30 Dicho material proteico se selecciona entre albúmina de huevo, proteína de la leche, suero de leche, clara de huevo, caseinato de sodio, proteínas de suero, lecitina, polisorbato, gelatina y combinaciones de los mismos. El material proteico puede o no estar liofilizado. El material proteico está en la película proteica entre 1 y 40%, entre 1 y 30%, o entre 5 y 25%.

- 35 El carbohidrato puede ser cualquiera comúnmente utilizado en la industria de alimentos o en la industria farmacéutica, preferiblemente de alto peso molecular, es decir mayor a 70000Da. El carbohidrato se selecciona entre pero no se limita a lactosa, maltodextrina, polietilenglicol, almidón y almidón modificado. Cuando el carbohidrato es almidón, el cual
- 40 se selecciona entre almidón modificado, almidón pregelatinizado, almidón sin gelatinizar,

almidón de maíz nativo, almidón de maíz modificado, almidón de yuca nativo, almidón de yuca modificado, y combinaciones de los mismos. El carbohidrato está en la película proteica entre 1 y 60%, entre 10 y 50%, o entre 20 y 35%.

- 5 Adicionalmente la película proteica también comprende agua, en donde el agua está en la película proteica en más del 30%, entre 40 y 75%, entre 45 y 60%, entre 45 y 75% o entre 55 y 75%. El agua actúa como vehículo entre el carbohidrato y el material proteico, permitiendo el *crosslinking* en la película proteica.

10 Proceso de producción de las microcápsulas de probiótico

En el método de obtención de las microcápsulas de la invención se realiza en dos grandes partes: la formación de una esfera lipídica y el recubrimiento de dicha esfera con una película proteica. En donde primero se mezcla un probiótico esporulado con un material de pared y se obtiene una esfera, y segundo se mezcla material proteico, un carbohidrato y agua formando una película proteica, finalmente se recubre la esfera con la película proteica homogeneizada.

En primer lugar se elaboran las esferas lipídicas (núcleo) a partir de al menos un microorganismo y al menos un material de pared mediante la mezcla de los mismos. Para la formación de dicha esfera es necesario que el material de pared se encuentre en estado líquido o fundido, de tal manera que los microorganismos se incorporen en el medio generando una multicapa. Las condiciones para que el material de pared lipídico se encuentre en estado líquido o fundido dependen del punto de fusión de su componente o mezcla de componentes. Por ejemplo, antes de la mezcla, el material de pared se lleva a fundición en una temperatura entre 23 y 130°C, entre 35 y 80°C, o entre 45 y 65°C.

La mezcla entre el microorganismo y el material de pared se puede realizar por ejemplo mediante agitación mecánica o magnética, usando entre otros, agitadores radiales, agitadores axiales, de hélices, de palas, agitadores verticales, agitadores horizontales, agitadores inclinados, agitadores descentrados u otros agitadores conocidos por una persona medianamente versada en la materia. En caso de ser necesario, la mezcla puede realizarse en temperaturas entre 20 y 90°C, entre 35 y 80°C, o entre 45 y 65°C.

35 Posteriormente, se forman las esferas mediante métodos manuales como pipetas, micropipetas o nanopipetas, métodos automáticos mediante un encapsulador o esferificador o cualquier otro método conocido por una persona medianamente versada en la materia para la formación de las mismas. En una modalidad primero se pone el material de pared fundido o en estado líquido y después se agrega el microorganismo.

Por otra parte, se mezcla un material proteico, almidón y agua hasta obtener una película proteica. Dicha mezcla se puede realizar por ejemplo mediante agitación mecánica o magnética, usando entre otros, agitadores radiales, agitadores axiales, de hélices, de palas, agitadores verticales, agitadores horizontales, agitadores inclinados, agitadores
5 descentrados, u otros agitadores conocidos por cualquier persona medianamente versada en la materia.

Se espera que del proceso de mezcla entre el material proteico, el carbohidrato y el agua, se dé un proceso de reticulación (*crosslinking*) que por un lado genera una película proteica
10 con enlaces más fuertes entre los compuestos y por otro permita una interacción física con la superficie del material lipídico (como adhesión o absorción). Preferiblemente, la mezcla de los componentes de la película proteica se mezclan en un equipo de dispersión como una plancha de agitación o un ultraturrax®. Con condiciones de agitación entre 100 y 20000RPM, entre 300 y 10000RPM, o entre 500 y 9000RPM, y una temperatura entre 35 y
15 75°C, entre 45 y 60°C, o entre 48 y 58°C.

Posteriormente se realiza la homogenización de la película proteica, por ejemplo mediante microfluidización, en donde se favorece el *crosslinking* y se reduce el tamaño de partícula de tal manera que entre más fino sea el *crosslinking* menos poros que permitan la liberación
20 de las esporas hay. La presión del microfluidizador debe ser mayor a 9000psi, mayor a 9500psi o mayor a 10000psi.

Adicionalmente, la película proteica se somete a una desnaturalización de las proteínas de la mezcla de recubrimiento antes de aplicarla sobre las esferas, mediante tratamientos
25 térmicos, tratamientos químicos o tratamientos enzimáticos o combinación de los mismos. Se entiende por desnaturalización al proceso en el cual se alteran las estructuras cuaternarias, terciarias y secundarias de la proteína.

En otra modalidad en que la desnaturalización se realiza mediante un tratamiento térmico,
30 la cámara en donde se realiza la atomización está a una temperatura tal que garantice cierto grado de desnaturalización de la proteína, por ejemplo entre 20 y 100°C, entre 30 y 70°C, o entre 40 y 60°C, y por un periodo entre 2 y 80 minutos o entre 20 y 40 minutos, de tal manera que la película proteica se fije a la esfera lipídica. Preferiblemente el tratamiento térmico se realiza a la película proteica a 30°C por una hora. Si las anteriores condiciones
35 no se cumplen (temperaturas más altas y periodos de tiempo más altos) es posible que la esfera lipídica se funda y no se pueda evitar la liberación de los microorganismos probióticos en el momento adecuado o, por el contrario, no se alcance a realizar un recubrimiento total de la esfera lipídica.

Finalmente, se realiza el recubrimiento en donde las partículas o gotas individuales de material sólido o semisólido (el núcleo) se rodean o recubren con una película continua de material proteico (el recubrimiento) para producir cápsulas en el rango de micrómetro a milímetro.

5

El recubrimiento se puede realizar mediante técnicas químicas, fisicoquímicas o físico mecánicas como secado por aspersión, secado por enfriamiento, secado por congelamiento, inmersión, coacervación y extrusión, suspensión, dispersión, emulsión y polimerización, ensamblaje capa por capa, encapsulación sol gel, extracción supercrítica de CO₂, secado por pulverización, revestimiento o recubrimiento de lecho fluido o encapsulación electrostática, entre otras. En una modalidad, el recubrimiento se realiza mediante la fluidización de la esfera lipídica y la aspersión de la película proteica sobre la esfera lipídica.

10

15 A lo largo de la fluidización de la esfera lipídica y la aspersión de la película proteica, la esfera o núcleo se solidifica de tal forma que la película proteica se queda fija en su superficie.

En una modalidad, la fluidización de la esfera lipídica y la aspersión de la película proteica se realiza mediante la tecnología de enfriamiento por aspersión (*spray-chilling*) o atomización en donde se asperja la esfera caliente (material de pared fundido que incorpora la microorganismo) en una corriente de aire frío que solidifique la cápsula. A medida que la película proteica se enfría, se forma una capa alrededor de la esfera (núcleo). La aspersión se realiza en una relación película proteica – esfera entre 1:10 y 1:15.

20

25

En una modalidad del proceso descrito anteriormente, dicho método comprende: (a) mezclar un probiótico esporulado con un material de pared lipídico fundido o en fase líquida hasta obtener una esfera lipídica; (b) mezclar un material proteico, un almidón y agua hasta formar una película proteica; (c) homogenizar la película proteica; y (d) fluidizar la esfera lipídica de la etapa (a) asperjando la película proteica de la etapa (c) sobre la esfera lipídica.

30

Las cápsulas obtenidas mediante el proceso descrito anteriormente son microcápsulas de tamaño micrométrico ($> 1 \mu\text{m}$), forma esférica y tamaño de partícula entre 1 y 4000 μm , entre 500 y 4000 μm , menores a 400 μm (pequeñas), entre 400 μm y 1200 μm (medianas) o entre 1180 μm y 2800 μm (grandes).

35

Usos

Las microcápsulas de probióticos de la invención pueden ser usadas en la producción de productos que contengan microorganismos esporulados por ejemplo en la elaboración de alimentos, medicamentos, cosméticos y productos biológicos de uso agrícola y para bioremediación.

5

Particularmente la invención se refiere a las microcápsulas de probióticos para ser utilizadas en matrices alimentarias para ser ingeridas por humanos u otros animales, de tal manera que los componentes de la misma deben ser aprobados para el consumo humano o animal. Las matrices alimentarias pueden ser de fase sólida o líquida. Preferiblemente el uso de la microcápsula en una matriz líquida o sólida que no requiera refrigeración, especialmente con matrices cuyo pH sea inferior 5,0.

10

Para efectos de la presente invención se entiende que la matriz líquida es la fase líquida en la que se incorpora la microcápsula. Preferiblemente la matriz líquida en donde se incluye la microcápsula de la invención tiene un pH entre 4 y 7, entre 4,5 y 6,5, o menor a 5.

15

Las matrices líquidas pueden ser lácteas o no lácteas. Por ejemplo las microcápsulas se pueden agregar a alimentos y/o bebidas funcionales, y/o suplementos dietarios que incluyen las microcápsulas de la invención. Entre las bebidas funcionales se encuentran pero no se limitan a bebidas a base de fruta (BBF), bebidas a base de vegetales, agua, leche, bebidas lácteas, bebidas lácteas saborizadas (BLS), bebidas a base de agua, bebidas a base de leche, bebidas carbonatadas o bebidas no carbonatadas.

20

Las bebidas a base de frutas o vegetales pueden incluir uno o más extractos de frutas o extractos vegetales. En donde se entiende por extracto a un jugo, néctar, puré, o pulpa, de la fruta o vegetal correspondiente. El extracto puede ser fresco, crudo, procesado (por ejemplo, pasteurizado) o reconstituido. El extracto de fruta se selecciona entre pero no se limita a jugo de manzana, jugo de piña, jugo cítrico (como naranja, mandarina, toronja, limón, tangelo, etc.) jugo de arándano, jugo de noni, jugo de acai, jugo de goji, jugo de arándano, jugo de mora, jugo de frambuesa, jugo de granada, jugo de uva, jugo de albaricoque, jugo de durazno, jugo de pera, jugo de mango, jugo de maracuyá y jugo de guayaba. El extracto vegetal se selecciona entre pero no se limita a jugo de aloe vera, jugo de remolacha, jugo de zanahoria, jugo de apio, jugo de col rizada, jugo de espinaca, jugo de tomate, jugo de jengibre y jugo de pasto de trigo.

30

35

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Evaluación de materiales de pared

Para la formación de la esfera lipídica, se evaluaron como componentes de materiales de pared: cera de abejas, aceite de palma, palmiste, estearina de palma y mantequilla de maní, y sus combinaciones que se muestran en la Tabla 1, con un factor categórico de pH alto de 6,5 y bajo de 4,5. Las grasas y ceras fueron calentadas con agitación constante hasta su fundición. Posteriormente se adicionó 0,1g de microorganismo esporulado a 10g del material de pared. Se realizaron esferas con micropipeta y se colocaron 15 esferas en 5mL de MRS por 0, 4, 6 y 12 días a 25°C.

Para el conteo microorganismos en la fase acuosa se tomó 1mL de cada tubo y se realizaron diluciones seriadas en medio MRS. Para la fase sólida, las esferas lipídicas se filtraron al vacío y se colocaron en 900µL y 2% de citrato de sodio, se calentaron y se realizaron diluciones seriadas.

Tabla 1. Esferas que presentaron la máxima viabilidad

No.	Cera de abejas	Aceite de palma	Palmiste	Estearina de palma	Mantequilla de maní	pH
1	0,000	0,800	0,000	0,000	0,200	Alto
2	0,491	0,000	0,000	0,000	0,509	Bajo
3	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	Alto
4	0,000	0,000	0,000	0,500	0,500	Bajo
5	0,496	0,000	0,007	0,486	0,000	Bajo
6	0,000	0,556	0,000	0,000	0,444	Bajo
7	0,487	0,513	0,000	0,000	0,000	Bajo
9	0,000	0,508	0,000	0,000	0,492	Bajo
13	0,000	0,491	0,000	0,000	0,503	Alto
14	0,506	0,494	0,000	0,000	0,000	Alto
16	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	Bajo
18	0,507	0,000	0,000	0,493	0,000	Alto
20	0,000	0,000	0,000	0,507	0,493	Alto
22	0,507	0,000	0,000	0,493	0,000	Alto
23	0,498	0,000	0,000	0,502	0,000	Bajo
30	0,000	0,505	0,000	0,495	0,000	Alto
32	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	Alto
37	0,000	0,499	0,000	0,501	0,000	Bajo
39	0,000	0,505	0,000	0,495	0,000	Alto

De la anterior tabla se seleccionaron las esferas lipídicas número 1, 3, 5 y 6, para evaluar las células viables en Log(UFC/g) y la consistencia (cualitativo).

Categoría cualitativa del material de encapsulación	
1	Baja rigidez y difícil manejo de la cápsula.
2	Dureza media y regular manejo de la cápsula.
3	Dureza y rigidez media, buen manejo de la cápsula.
4	Alta dureza y rigidez, buen manejo de la cápsula.

Tabla 2. Esferas seleccionadas para continuar con el estudio

No.	Células viables Log(UFC/g)	Dureza	Deseabilidad
1	7,79	3,55	0,992
3	7,73	3,79	0,065
5	7,70	3	0,951
6	7,32	3	0,787

Ejemplo 2. Evaluación de diferentes tipos de almidón

Para la formación de la película proteica, y en búsqueda de la mezcla de materiales óptimos para el recubrimiento que cumpliera con el objetivo de impedir la migración de esporas de la esfera lipídica a la matriz acuosa, en este caso, un producto comercial (por un lado una bebida láctea saborizada en adelante BLS y por el otro una bebida a base de frutas en adelante BBF), se evaluaron diferentes tipos y concentraciones de almidón (carbohidratos), clara de huevo y caseinato de sodio (materiales proteicos). De igual manera, se utilizaron diferentes técnicas de homogenización y tratamientos térmicos, como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Producción de recubrimiento con diferentes concentraciones, técnicas de homogenización y desnaturalización de los componentes de la película proteica.

	Almidón	Albúmina de huevo	Caseinato de sodio	Mezcla y homogenización	Método de recubrimiento	Secado	Tratamiento térmico
C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1	Yuca nativo: 25%	5%	5%	Plancha de agitación 500RPM, 50°C	Inmersión	NA	70°C - 3min
2	Maíz modificado: 25%	5%	5%	Plancha de agitación 500RPM, 50°C	Inmersión	NA	70°C - 3min
3	Maíz modificado: 25%	5%	5%	Ultraturrax® 9000RPM - microfluid.	Inmersión	T° ambiente	30°C - 1h
4	Maíz modificado: 30%	10%	10%	Ultraturrax® 9000RPM - microfluid.	Inmersión	T° ambiente	30°C - 1h
5	Maíz nativo: 25%	5%	5%	Plancha de agitación 500RPM, 50°C	Inmersión	T° ambiente	70°C - 2min
6	Yuca nativo: 25%	5%	5%	Plancha de agitación 500RPM, 50°C	Inmersión	T° ambiente	70°C - 2min

En la Tabla 3, se muestran las diferentes condiciones que se evaluaron en cuanto a concentración de los componentes de la película proteica, técnicas de homogeneización y tratamientos térmicos.

A partir de lo expuesto en la FIG. 1, se puede observar como el tratamiento 3 y 4 correspondientes a la mezcla de clara de huevo, caseinato de sodio y almidón de maíz modificado, homogeneizado con Ultraturrax® y microfluidizador al que se le aplicó un tratamiento térmico de baja temperatura (30°C) por una hora; fue el tratamiento más

efectivo para reducir el número de esporas libres en la matriz comercial obteniendo conteos inferiores al control, esto debido posiblemente a que los procesos de homogeneización presentes únicamente en estos tratamientos inician la desnaturalización de las proteínas y la gelificación del almidón permitiendo así una adhesión más efectiva entre la esfera lipídica y el recubrimiento de película proteica. Aunque la temperatura en el tratamiento térmico fue baja, esto permitió retirar más agua que un tratamiento térmico más corto (2-3 minutos) a una temperatura más elevada (70°C).

Los tratamientos 3, 4, 5 y 6 se diferenciaban por tener un proceso de secado adicional a temperatura ambiente durante 1 hora lo que pudo permitir la estabilización del recubrimiento al disminuir su humedad, sin embargo, el tratamiento térmico a altas temperaturas y cortos tiempos presentes en las pruebas 1 y 2 pudieron afectar la integridad de la esfera, deritiéndola y permitiendo la migración de los microorganismos esporulados al medio lo que explica porque los conteos son más elevados incluso que el control. Finalmente, frente a los resultados es posible establecer que la homogenización, el tiempo de secado y el almidón de maíz son factores de importancia a la hora de disminuir el número de esporas libres desde las esferas lipídicas hacia la matriz alimentaria.

Ejemplo 3. Evaluación de las combinaciones de materiales de recubrimiento

Se realizaron mezclas para materiales proteicos, almidón modificado y agua (A: Clara de huevo liofilizada; B: Caseinato de sodio; C: Almidón de maíz modificado; D: agua destilada). El efecto individual y las interacciones entre las mezclas de materiales sobre la variable de respuesta: porcentaje de reducción de UFC/ml de células viables del microorganismo *Bacillus coagulans* Lactospore®, fueron analizados a los 5 días de incubación a 4°C. Las células viables corresponden al recuento del número total de células viables presentes en la fase líquida (esporas y células germinables). Durante el montaje del experimento, las esferas lipídicas fueron realizadas con una concentración de 1,5 x 10⁸ UFC/g de microorganismo esporulado aproximadamente e inoculadas en 15mL de BLS.

$$\text{Porcentaje de reducción de células libres} = ((\text{esporas control (UFC)} - \text{esporas tratamiento (UFC)}) / \text{esporas control (UFC)}) * 100$$

Tabla 4. Mezclas de película proteica con el mayor porcentaje de reducción de número de células viables de las esporas en las esferas lipídicas al día 5 de incubación a 4°C

No.	A	B	C	D	Porcentaje de reducción	Deseabilidad
1	0,1	0,061	0,276	0,564	119,048	1
2	0,1	0,061	0,299	0,54	116,112	1
3	0,1	0,09	0,302	0,508	123,619	1

4	0,097	0,069	0,293	0,541	118,729	1
5	0,097	0,11	0,29	0,504	128,737	1
9	0,058	0,058	0,322	0,562	97,600	1
10	0,090	0,106	0,304	0,500	107,673	1
11	0,050	0,050	0,350	0,550	134,651	1
12	0,099	0,132	0,267	0,502	118,455	1
13	0,100	0,115	0,269	0,516	122,907	1
14	0,060	0,054	0,324	0,562	97,956	1
15	0,050	0,083	0,350	0,517	108,737	1
16	0,061	0,059	0,350	0,529	104,282	1
17	0,085	0,086	0,284	0,545	98,297	1
18	0,050	0,050	0,330	0,570	112,022	1
19	0,087	0,087	0,306	0,519	103,278	1
20	0,050	0,050	0,325	0,575	107,071	1
21	0,086	0,112	0,290	0,512	104,615	1
22	0,060	0,061	0,327	0,551	97,940	1
23	0,089	0,104	0,279	0,527	105,386	1

A: Clara de huevo liofilizada; B: Caseinato de sodio;
C: Almidón de maíz modificado; D: agua destilada

Se tomaron las primeras cinco combinaciones (Número 1 a 5) de materiales de pared del
5 diseño experimental pues contienen mayor concentración de clara de huevo que es el
material que más influye en la reducción de microorganismos libres, que presentaban un
mayor porcentaje de reducción de UFC/ml según optimización del modelo y se elaboraron
las microcápsulas con las esporas de *Bacillus coagulans* Lactospore® a una concentración
1,5 x 10⁹ UFC/g aproximadamente. Finalmente, estas microcápsulas fueron inoculadas en
10 una matriz láctea, 15 mL de BLS. Se realizaron conteos de los microorganismos de la fase
sólida y fase líquida a los días 0 y 5.

Como se evidencia en la FIG. 2, en el día cero se alcanza una reducción en la concentración
de microorganismos esporulado en comparación con el control (esferas sin recubrimiento)
15 para las mezclas 1 y 4 de casi dos unidades logarítmicas, mientras las mezclas 2 y 3 casi no
presentan diferencia con el control, esto se debe a que aunque la concentración de
materiales de la mezcla es muy similar, la forma de aplicación del recubrimiento es
fundamental para la efectividad y permanencia de la capa y esta al ser aplicada
manualmente no presentó exactamente las mismas condiciones en todas las pruebas.

La diferencia que fue evidente para el día cero desaparece casi por completo en el día 5
para todas las mezclas, esto debido a que el recubrimiento se encontró desprendido y
separado de las esferas lipídicas en todas las pruebas al momento de realizar los conteos,
esto puede deberse a la falta de afinidad entre los materiales de la esfera lipídica y la
25 película proteica ya que el proceso de desnaturalización de las proteínas no se alcanzó
debido que la temperatura necesaria no fue alcanzada pues superaba el punto de fusión de
la esfera y la deformaba es por esta razón que no se generó el *crosslinking* esperado entre
los materiales.

La FIG. 3 presenta el porcentaje de reducción de los microorganismos con relación al control, se observa entonces como para el día cero la mejor mezcla para el recubrimiento son las mezclas 1 y 4 alcanzando casi un 100% de reducción y de igual manera para el día 5 las mezclas 1 y 4 son las que presentan mayor reducción sin embargo la mezcla 1 fue la que más reducción vs el control presentó y es por esta razón que fue la mezcla seleccionada para las siguientes pruebas.

Ejemplo 4. Recubrimiento con pH modificado

Teniendo en cuenta que para que la mezcla del recubrimiento sea efectiva como barrera hidrofóbica e impermeable a la esfera de *Bacillus coagulans* Lactospore®, es necesario desnaturalizar las proteínas de la película proteica y gelificar el almidón. Para lograr la desnaturalización es necesario someter las proteínas a temperaturas altas, sin embargo, estas temperaturas afectan la integridad de las esferas lipídicas. Por lo anterior, se optó por desnaturalizar las proteínas de la mezcla de recubrimiento antes de aplicarla sobre las esferas, modificando el pH hasta 4,6 y realizando un tratamiento térmico a 92 °C por 10 min. Como se evidencia en la FIG. 4, este tratamiento mejoró los resultados disminuyendo aproximadamente una unidad logarítmica la concentración de esporas libres en comparación con el control (FIG. 4).

Ejemplo 5. Recubrimiento con lecitina

En búsqueda de disminuir la difusión de la microcápsula en el medio acuoso (BLS) se realizó una prueba de elaboración de las esferas lipídicas con cera de abejas con una mezcla al 1% de lecitina de forma que se pudiera observar si se presentaba algún cambio con respecto a la cera sola, las esferas fueron producidas por extrusión con un peso de 0,6g cada una y puestas en 15 ml de BBL, para cada tubo se agregaron 6 esferas con una concentración inicial de $1,5 \times 10^7$ UFC/g.

También se realizó una prueba paralela en la que se deseaba estudiar el efecto del tamaño de las microcápsulas en la difusión por lo que se tomó las mezclas para BLS y BBF y se realizaron pruebas con tamaño pequeño (0,1g) y tamaño medio (0,3g) se colocó un gramo de cada tamaño por tubo respectivamente en cada una de las matrices (15ml) y se midió la concentración de microorganismo.

Como se puede observar en la FIG. 5 existe en una pequeña disminución de la concentración de microorganismo al agregar lecitina a la cera, sin embargo no se evidencia un cambio tan marcado. Es posible que variando las concentraciones de lecitina en la

mezcla de lípidos se dé una disminución notable de la concentración de microorganismo difundido en el medio acuoso.

5 Como se observa en la FIG. 6 las poblaciones de microorganismo presentes en la fase sólida para los tamaños pequeño tanto en la matriz de BBF como en el BLS fueron mayores que en el tamaño medio, esto es debido a que al ser más pequeñas las microcápsulas el área de transferencia es mayor que en el tamaño medio permitiendo que la difusión se dé más rápidamente, adicional a esto, el recorrido que deben hacer los microorganismos para salir de la esfera lipídica (desde el centro) es mayor en el tamaño medio que en el pequeño esto
10 hace más difícil la difusión y retrasa la migración.

Ejemplo 6. Prueba de difusión tamaño de esferas

Se realizó una prueba de difusión en la que se quería observar el efecto que tenía el tamaño de las microcápsulas sobre la difusión del microorganismo en la fase líquida, se
15 seleccionaron tres tamaños de microcápsula que se colocaron en las dos matrices BBF y BLS: tamaño pequeñas (microcápsula entre 1180µm y 2800µm) mediano (0,3g/ microcápsula) y grande (0,6g/ microcápsula) las microcápsulas se elaboraron con cera de abejas, los tamaños grande y mediano fueron producidos por extrusión mientras el tamaño
20 pequeño se realizó en un equipo de *Spray Cooling* construido en la Universidad de la Sabana.

Las microcápsulas fueron colocadas en 15ml de BLS y puestas a incubar durante 5 días a temperatura de refrigeración (4°C). La notación utilizada para la prueba y los resultados se
25 encuentran en la FIG. 7. Las microcápsulas se prepararon con una concentración inicial de $2,5 \times 10^7$ UFC/g aproximadamente.

Como se evidencia en la FIG. 7 para el tiempo 0 no se encontró una diferencia marcada en la concentración del microorganismo dentro de las microcápsulas para ningún tamaño, sin
30 embargo, para el día 5 las diferencias se hacen más evidentes, tanto para BLS como para BBF la concentración de microorganismos presentes en las microcápsulas de tamaño pequeño al finalizar el quinto día fue menor que en los tamaños medio y grande con una diferencia de hasta casi 2 unidades logarítmicas entre el tamaño pequeño y el grande, esto es debido posiblemente a que al ser más pequeñas las microcápsulas el área de transferencia
35 es mayor que en el tamaño medio y grande permitiendo que la difusión se dé más rápidamente, adicional a esto el recorrido que deben hacer los microorganismos para salir de la esfera lipídica desde el centro es mayor en el tamaño medio y grande que en el pequeño esto hace más difícil la difusión y retrasa la migración.

Ejemplo 7 Vida útil corta (Lecho fluido)

Se escogió cera de abejas para realizar una prueba de recubrimiento en lecho fluido ya que es más fácil su manipulación debido en parte a su alto punto de fusión (65°C), su mayor disponibilidad y facilidad de obtención comercial; esta cera de abejas fue adquirida en Químicos Campota®. La cera fue fundida a 70°C, mezclada con el microorganismo esporulado al 5% y asperjada en el *Spray Cooling* construido en la Universidad de La Sabana y se procedió a recubrirlo en el equipo de Lecho fluido HDB 15 (Bäuer, Colombia) bajo las siguientes condiciones: 15 minutos de mezcla a 25°C (acondicionamiento), 52 minutos de atomización de la película proteica que se asperjó en una proporción de 330g de recubrimiento por 3300g de esferas lipídicas de cera de abejas con microorganismo lo que significa una relación de 1:10, la película proteica fue la seleccionada en FIG. 3 como la que presentó mayor porcentaje de reducción en cuanto a difusión. Finalmente, se generó un calentamiento en la cámara del lecho fluido por 30 minutos a 47°C para promover la desnaturalización de las proteínas del recubrimiento.

Del producto final se separaron por tamizado 3 tamaños de partícula: microcápsulas menores a 710µm (pequeñas), microcápsulas entre 710µm y 1180µm (medianas) y microcápsulas entre 1180µm y 2800µm (grandes) las cuales fueron colocadas en la matriz comercial (BLS y BBF de mandarina) durante una semana a dos temperaturas (temperatura ambiente 25°C y refrigeración 4°C) en la que se midieron 4 puntos (días 0, 2, 5 y 7) para determinar la difusión del microorganismo de las microcápsulas hacia la matriz y el cambio en pH y sólidos solubles de la misma. Durante la prueba se evaluó también los cambios que tienen las dos matrices debido únicamente a la influencia del microorganismo a temperatura ambiente por lo que se inocularon muestras a concentración similar a la presente en las microcápsulas y se evaluó la viabilidad del microorganismo a los mismos intervalos de tiempo y propiedades de la matriz como pH y sólidos solubles.

Vale aclarar que la concentración inicial de microorganismos presentes en los diferentes tamaños de microcápsula no varía independientemente del tamaño, como se observa en la FIG. 8.

En la FIG. 9 se puede observar como a pesar de que las poblaciones en la fase sólida para los tres tamaños en los cuatro puntos de monitoreo se mantuvieron más o menos constantes en 6 unidades logarítmicas, se presentó un aumento progresivo de la población en la fase líquida iniciando aproximadamente en 2 unidades logarítmicas y finalizando en 4 unidades logarítmicas, este aumento de la población en la fase líquida se puede atribuir a la reproducción de la población en el medio y un efecto de ello es el aumento del pH presente en esta matriz durante el tiempo del ensayo.

En la FIG. 10 se puede observar de igual manera que en las anteriores figuras que la población en la fase sólida se mantuvo más o menos constante en aproximadamente 6 unidades logarítmicas sin embargo en la fase líquida se mantuvo más o menos constante en 4 unidades logarítmicas. En este caso también se presentó una mayor difusión de microorganismos en las microcápsulas de tamaño medio y pequeño aún cuando la concentración de microorganismos era menor en el tamaño medio que en el grande (FIG. 8) debido a que como se explicó anteriormente el área de contacto para la difusión es mayor en el tamaño medio y la distancia que deben recorrer los microorganismos desde el centro de la esfera es menor que en el tamaño grande.

La FIG. 11 presenta los resultados de los diferentes tamaños de microcápsulas para las matrices de BBF y BLS a 25°C, en la fase sólida se observa la concentración de microorganismos estable para los 0 y 2 días, y un leve decaimiento para los tres tamaños en los días 5 y 7, a pesar de esto, este cambio no se ve reflejado en la concentración de microorganismos en la fase líquida pues esta se mantiene para los tres tamaños en los 7 días del estudio.

Tal y como en la FIG. 11, en la FIG. 12 se muestra una pequeña reducción en la población en BLS para los días 5 y 7 en la fase sólida mientras que para la fase líquida en estos mismos tiempos también se presentó una leve disminución de la población, los tamaños de las microcápsulas mantuvieron un comportamiento más o menos igual entre ellos, desde el principio en el cual se presentó una difusión casi inmediata del microorganismo al medio.

La FIG. 13 muestra la concentración de microorganismos presente en las matrices tanto de BBF como de BLS que fue inoculado deliberadamente para cuantificar el cambio en el medio a causa únicamente de éste. El crecimiento fue similar en la matriz de BBF y en la de BLS, los conteos de BBF iniciaron en 5,5 y finalizando en 5,7Log¹⁰(UFC/ml) mientras que para el BLS la concentración inicial fue de 5,7 y finalizó en 5,8Log¹⁰(UFC/ml).

En la FIG. 14, se presentan los valores de pH para el BBF a temperaturas de 4 y 25°C respectivamente, a pesar de la temperatura de refrigeración el crecimiento del microorganismo fue muy similar al crecimiento del microorganismo a temperatura ambiente (25°C) y la similitud también es evidente en el cambio de pH pues para las muestras a 4°C el pH del BBF cambió de 3,7 a 4 mientras para la temperatura ambiente cambió de 3,7 a 3,9; desde el inicio hasta el final de la prueba, a pesar de que el microorganismo es un Lactobacilo, se ha reportado que algunas poblaciones son capaces de aumentar el pH del medio para llevarlo hasta condiciones más óptimas para su supervivencia.

También se presentan los valores de pH para el BLS en el cual se ve una marcada diferencia entre las temperaturas que no se ve en el BBF, para la temperatura de

refrigeración el producto mantuvo un pH constante de 7 para todos los tamaños y durante todo el experimento, mientras que para la temperatura ambiente 25°C el cambio fue muy marcado, siendo el inicial de 7 y finalizando en 5,5.

5 En la FIG. 15 se presenta el cambio del pH para las matrices de BBF y BLS con microorganismo esporulado, en el caso del BBF se observa una disminución del pH desde un valor de 3,7 hasta 3,3 y para el BLS una disminución aún más marcada desde un valor de 7 hasta 3,4. Los cambios que se observan en el pH reflejan la necesidad de la encapsulación debido a los efectos físico químicos indeseables en las bebidas tanto láctea
10 como no láctea.

Respecto a los grados Brix, la FIG. 16 demuestran que los cambios en la matriz son significativos, sin embargo, en la FIG. 17 se demuestra la importancia de la encapsulación del microorganismo puesto que en matrices como el BLS el cambio en °Brix es evidente.

15

Ejemplo 8. Recubrimiento lecho fluido

Tras la realización de las pruebas anteriores se decidió probar nuevamente el recubrimiento con película proteica por medio de lecho fluido, sin embargo, para esta prueba se utilizaron
20 los materiales de pared seleccionados para el producto comercial BLS (aceite de palma completamente hidrogenado) el cual presentó mayor facilidad para ser asperjado en caliente en el equipo de *Spray Cooling* construido en la universidad. La cera fue fundida a 70°C, mezclada con el microorganismo esporulado al 1% y asperjada en el *Spray Cooling* construido en la Universidad de La Sabana. Se procedió a recubrirlo en el equipo de Lecho
25 fluido HDB 15 (Baüer, Colombia) bajo las condiciones reportadas en el anterior experimento; la película proteica se asperjó en una proporción de 400g de película proteica por 4000g de esferas lipídicas de aceite de palma completamente hidrogenado con microorganismo esporulado lo que significa una relación de 1:10, la película proteica fue la seleccionada en la FIG. 3 como la que presentó mayor porcentaje de reducción en cuanto a
30 difusión.

Durante el procedimiento de recubrimiento se establecieron tres ciclos de recubrimiento con sus respectivos tiempos de secado y acondicionamiento a temperatura ambiente, se tomaron esferas lipídicas (es decir muestras del producto sin recubrir), tras un primer,
35 segundo y tercer recubrimiento con película proteica para un total de cuatro muestras, a las cuales se les realizaron pruebas de humedad, a_w y difusión en medio acuoso, para esta prueba se utilizó buffer fosfato como medio acuoso para evitar conteos erróneos a causa de posible crecimiento del microorganismo en el medio.

En la FIG. 17 se observa la humedad con la que se obtuvieron las diferentes muestras, todas tuvieron humedades muy bajas menores a 1%, mismo fenómeno que se presentó para a_w . Estos valores son favorables para la conservación y elongación de la vida útil de este tipo de productos en anaquel pues se inhibe el crecimiento de microorganismos y la degradación por reacciones enzimáticas.

En la FIG. 19 se presentan los resultados que corresponden a una prueba de difusión en buffer fosfato tomando como base la concentración inicial de Lactospore® presente en las esferas lipídicas sin recubrimiento (cerca de 7 unidades logarítmicas) para determinar la difusión de los demás tratamientos, sin embargo, se encontró que la difusión en el medio se dio de manera inmediata (los porcentajes de liberación para esta prueba en cada uno de los procedimientos superaron el 50% (FIG. 20)). Es por esto que se procedió a repetir la prueba contando concentraciones iniciales de la fase sólida y líquida (FIG. 21 y FIG. 22). En estas dos últimas figuras se presenta la viabilidad de las microcápsulas tanto en la fase líquida como en la fase sólida. Se observa que la concentración en la fase sólida y líquida para cada una de las pruebas fue muy similar, la liberación se da de manera casi inmediata en cada uno de los recubrimientos incluso para el caso de las no recubiertas, esto se debe a que el recubrimiento posiblemente no se fijó uniformemente alrededor de todas las esferas dejando espacios por los que migraron los microorganismos fácilmente.

REIVINDICACIONES

1. Una microcápsula de probiótico que comprende una esfera lipídica recubierta por una película proteica:
 - 5 en donde la esfera lipídica comprende
 - un probiótico esporulado; y
 - un material de pared lipídico;en donde la película proteica comprende
 - un material proteico;
 - 10 - un carbohidrato; y
 - agua.
2. La microcápsula de la Reivindicación 1 en donde:
la esfera lipídica comprende:
 - 15 - entre 0,1 y 3% de probiótico esporulado; y
 - entre 97 y 99,9% de material de pared lipídico;y la película proteica comprende:
 - entre 5 y 25% de material proteico;
 - entre 20 y 35% de carbohidrato; y
 - 20 - entre 55 y 75% de agua.
3. La microcápsula de la Reivindicación 1 en donde el probiótico esporulado se selecciona del grupo que comprende *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y combinaciones de los mismos.
 - 25
4. La microcápsula la Reivindicación 1 en donde el material de pared lipídico se selecciona entre cera de abeja, aceite de palmiste, aceite de palma, estearina de palma, mantequilla de maní y mezclas de los mismos.
5. La microcápsula la Reivindicación 1 en donde el material proteico se selecciona entre albúmina de huevo, proteína de la leche, suero de leche, clara de huevo, caseinato de sodio, proteínas de suero, lectina, polisorbatos, gelatina y mezclas de los mismos.
 - 30
6. La microcápsula de la Reivindicación 1, en donde el carbohidrato es almidón el cual se selecciona entre almidón modificado, almidón pregelatinizado, almidón sin gelatinizar, almidón de maíz nativo, almidón de maíz modificado, almidón de yuca, y mezclas de los mismos.
 - 35
7. La microcápsula de la Reivindicación 1, en donde la relación película proteica:esfera lipídica está entre 1:10 y 1:15.
 - 40

8. La microcápsula de la Reivindicación 1 en donde la película proteica comprende:
- entre 5 y 12% de clara de huevo liofilizado,
 - entre 5 y 13% de caseinato de sodio, y
 - entre 45 y 75% de agua destilada.
9. La microcápsula de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la esfera lipídica comprende 1% probiótico esporulado y 99% aceite de palma; la película proteica comprende 5% albúmina de huevo, 5% caseinato de sodio, 25% almidón de maíz modificado, y 65% agua destilada; y en donde la relación película proteica:esfera lipídica es de 1:10.
10. La microcápsula de la Reivindicación 1, en donde la microcápsula tiene un tamaño de partícula entre 400 y 1200 μm .
11. La microcápsula de la Reivindicación 1 caracterizada porque no necesita refrigeración.
12. Un proceso para encapsulación de probióticos que comprende:
- a) mezclar un probiótico esporulado con un material de pared lipídico fundido o en fase líquida hasta obtener una esfera lipídica;
 - b) mezclar un material proteico, un almidón y agua hasta formar una película proteica;
 - c) homogenizar la película proteica; y
 - d) fluidizar la esfera lipídica de la etapa (a) asperjando la película proteica de la etapa (c) sobre la esfera lipídica.
13. El proceso de la Reivindicación 12, en donde la mezcla de la etapa (b) se realiza con una agitación entre 500 y 5000RPM.
14. El proceso de la Reivindicación 12, en donde la homogenización de la etapa (c) se realiza a una presión mayor a 10000psi.
15. El proceso de la Reivindicación 12, en donde la homogenización de la etapa (c) se realiza por medio de microfluidización.
16. El proceso de la Reivindicación 12 en donde la fluidización de la etapa (d) se realiza por atomización a una temperatura entre 40 y 60°C y entre 20 y 40min.

RESUMEN

La invención se dirige a una microcápsula y el método para la obtención de la misma. La microcápsula comprende un núcleo en forma de esfera lipídica recubierta por una película proteica, en donde la esfera lipídica comprende microorganismos esporulados y al menos un material de pared lipídico y la película proteica es una mezcla entre carbohidrato, material proteico y agua. El método de obtención de dicha microcápsula comprende las etapas de mezcla de componentes de la esfera, mezcla de componentes de la película proteica, la homogenización de la película proteica y el posterior recubrimiento por medio de la fluidización de la película proteica sobre la esfera lipídica.

FIGURAS

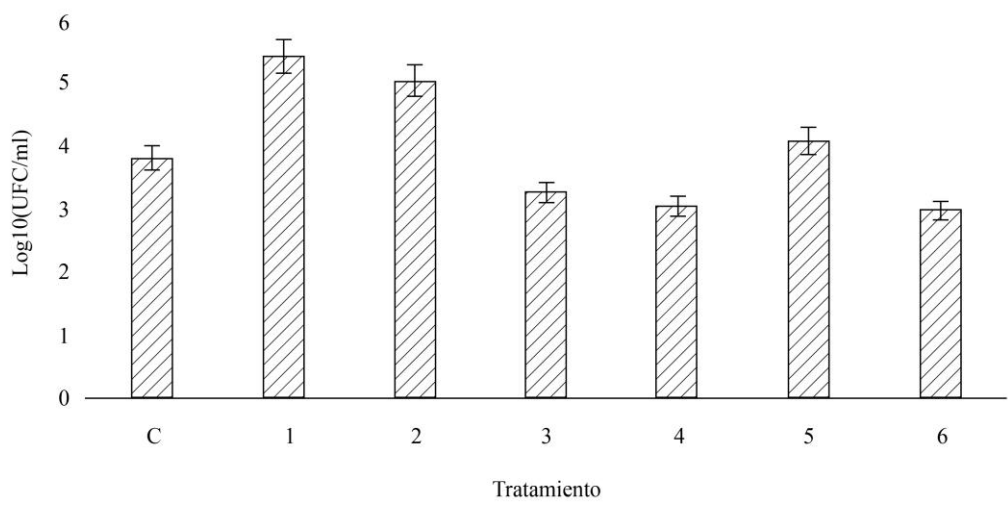


FIG. 1

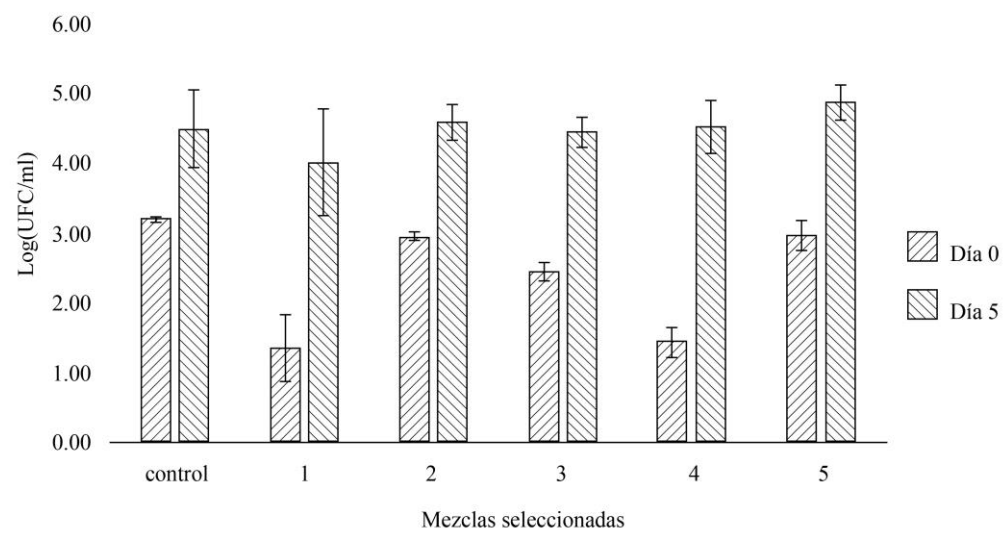


FIG. 2

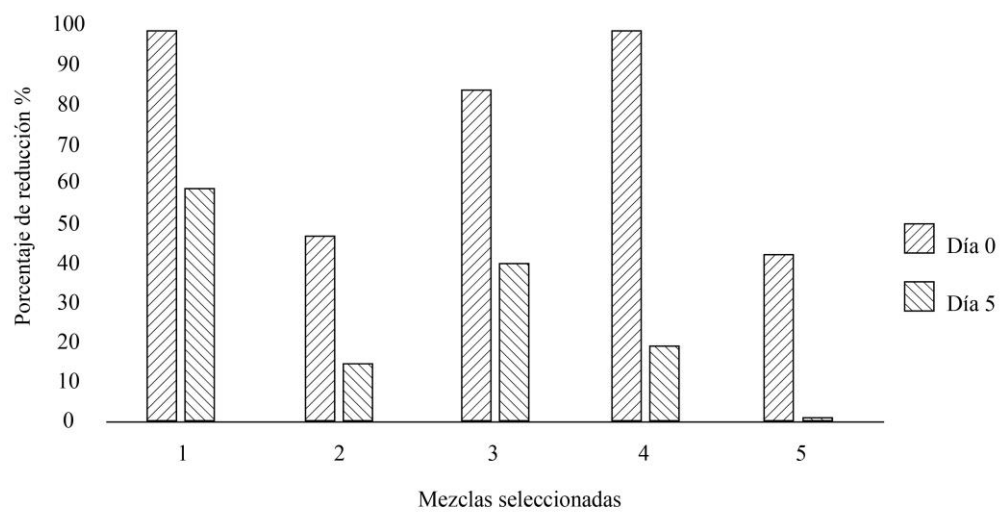


FIG. 3

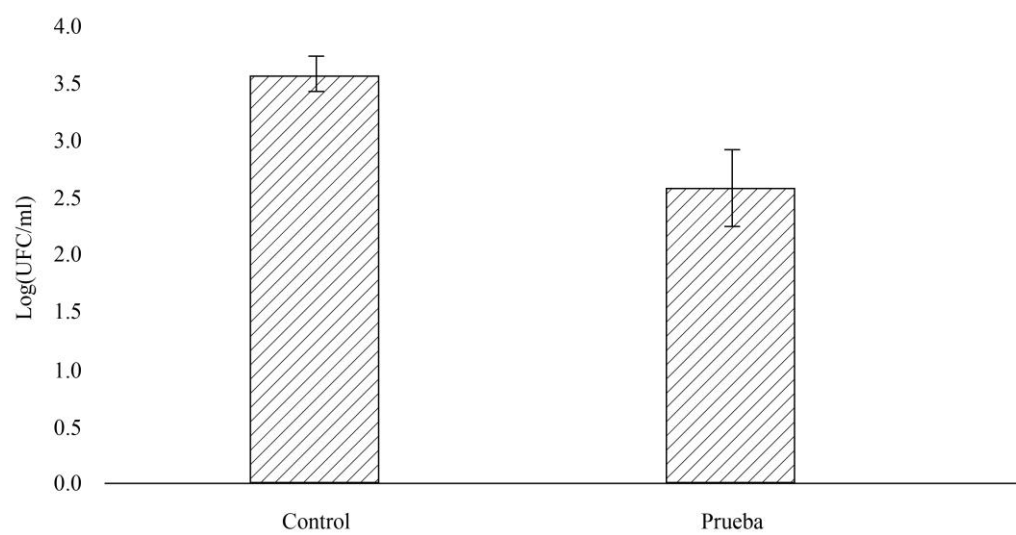


FIG. 4

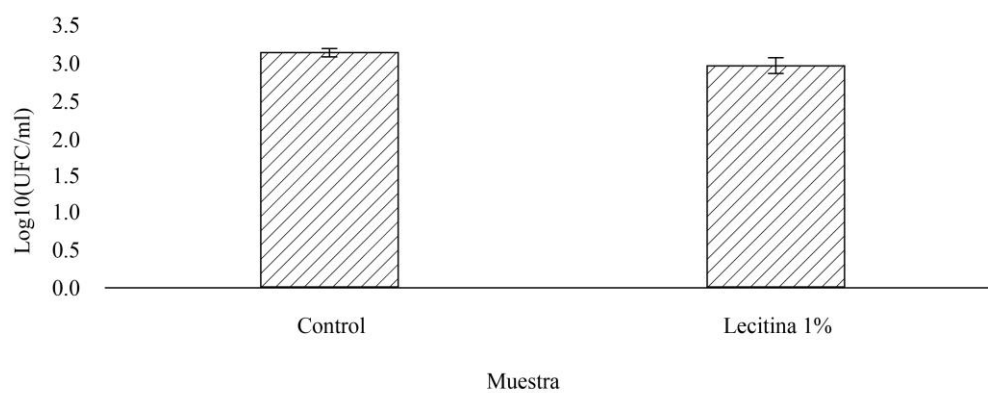


FIG. 5

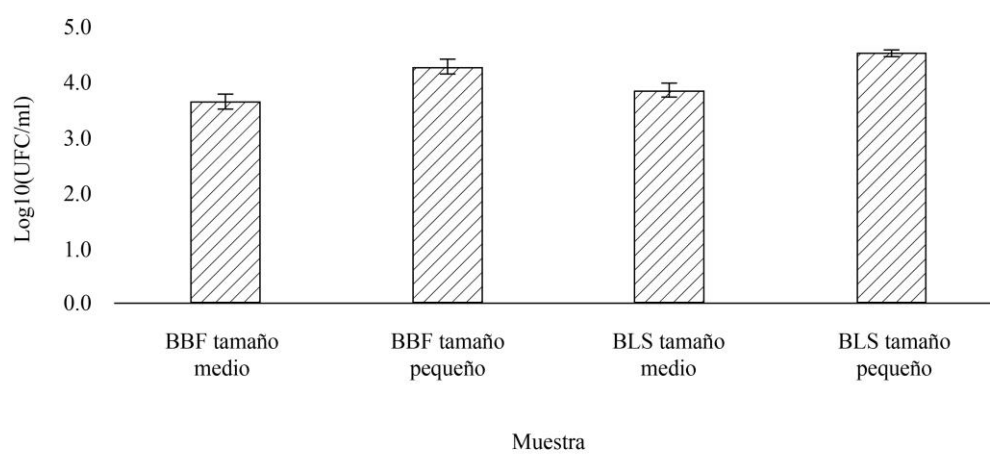


FIG. 6

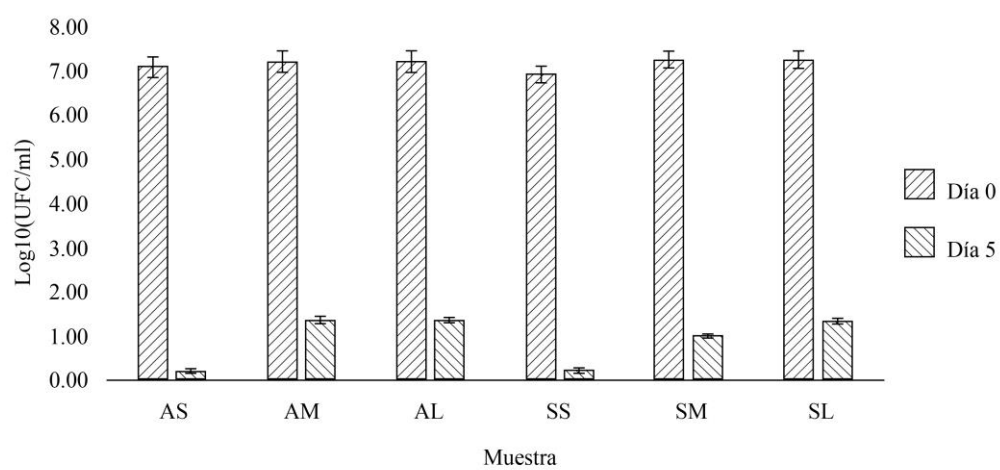


FIG. 7

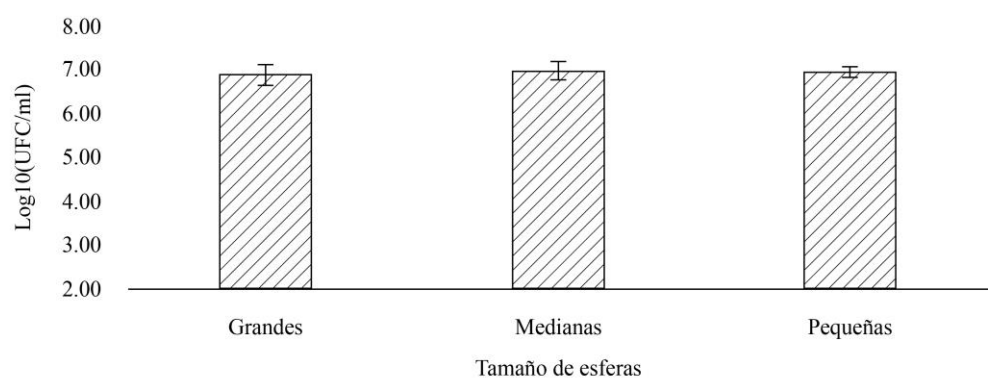


FIG. 8

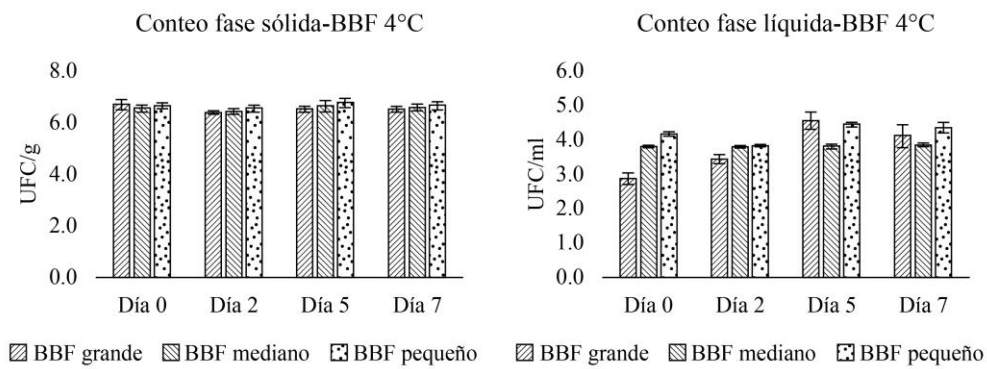


FIG. 9

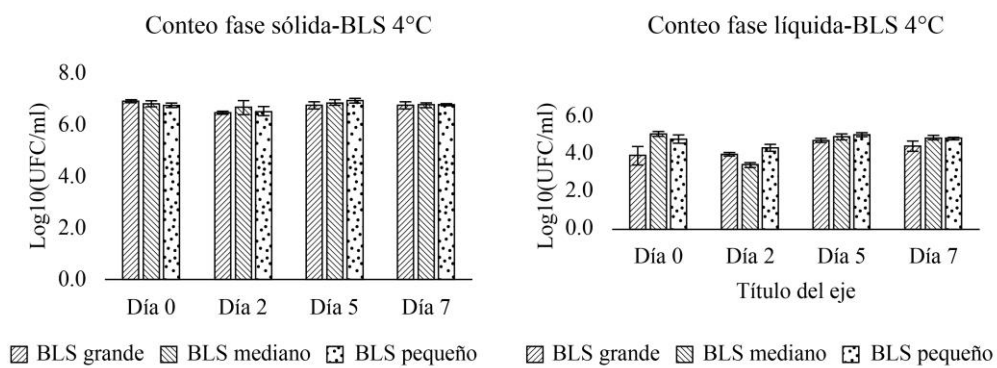


FIG. 10

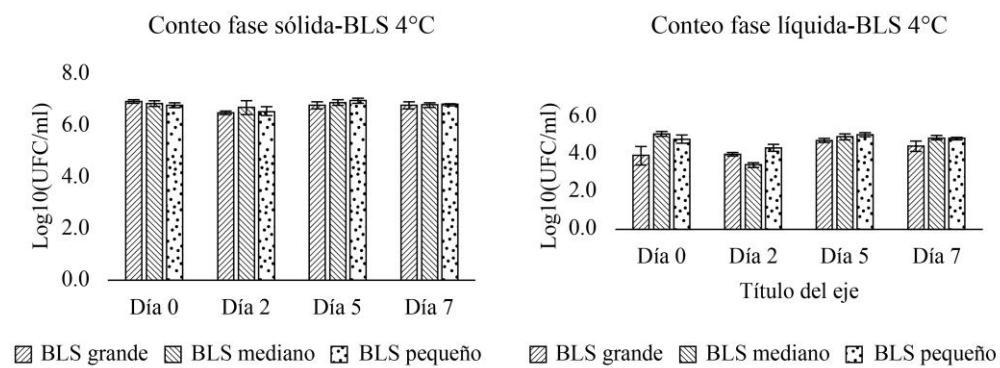


FIG. 11

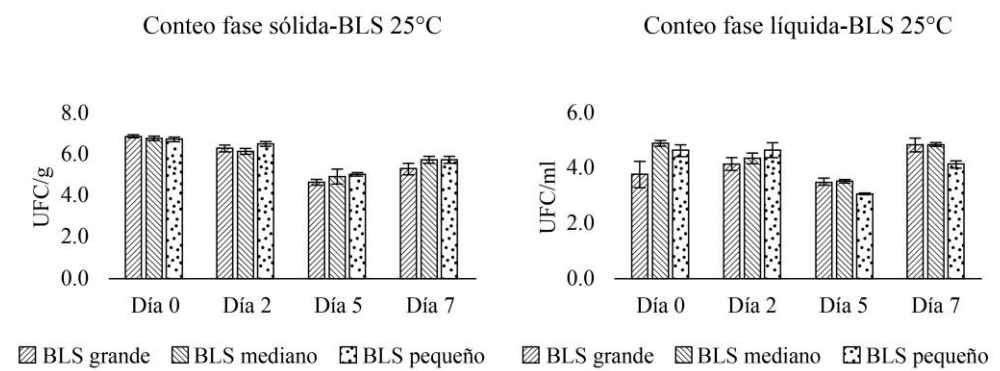


FIG. 12

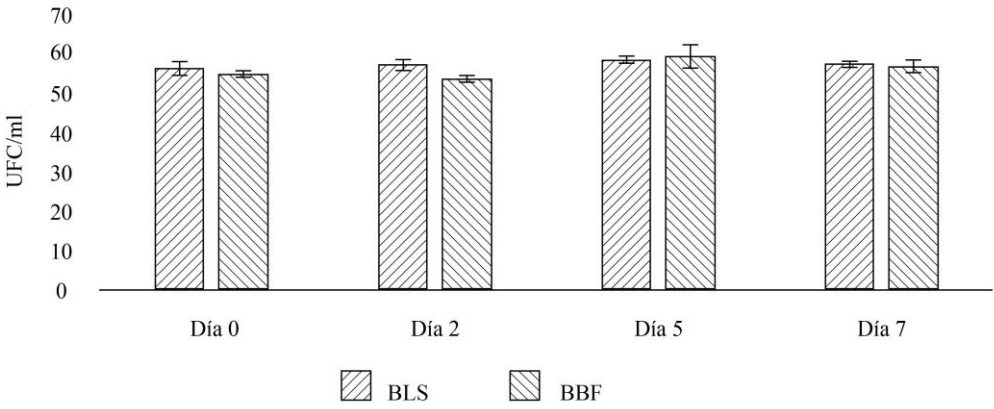


FIG. 13

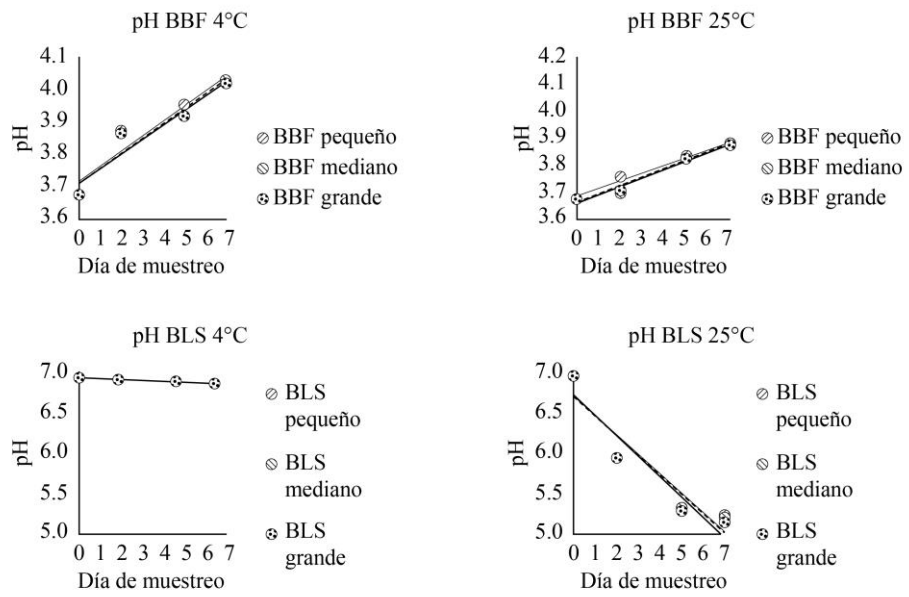


FIG. 14

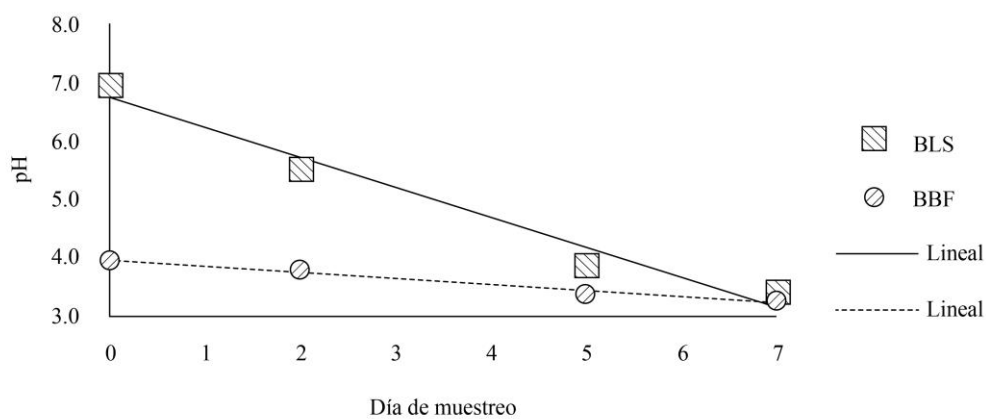


FIG. 15

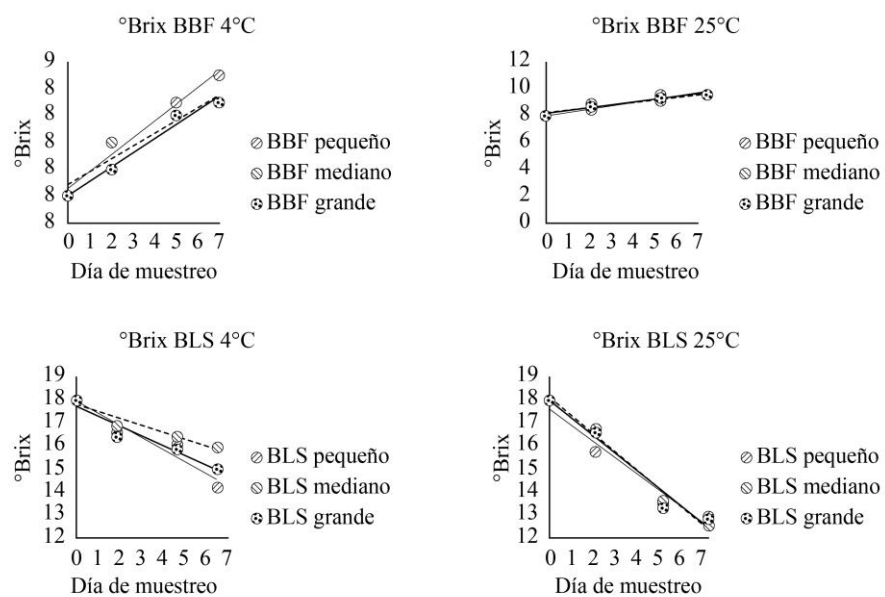


FIG. 16

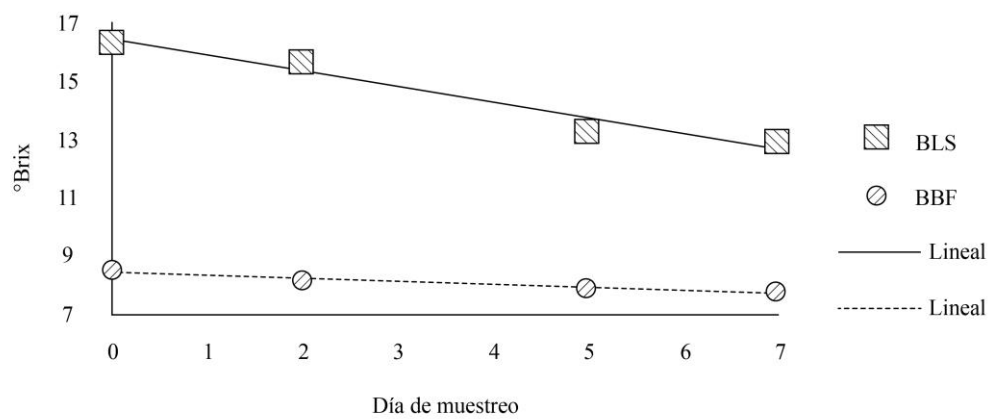


FIG. 17

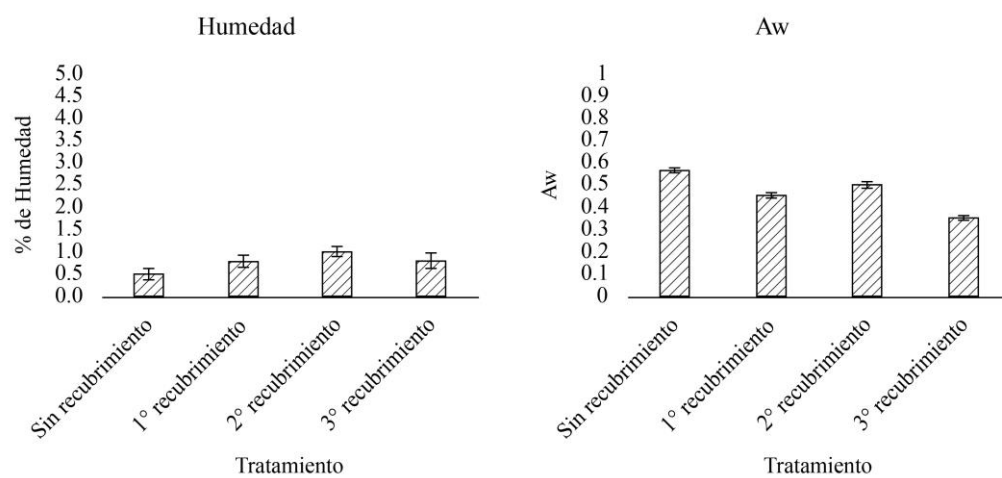


FIG. 18

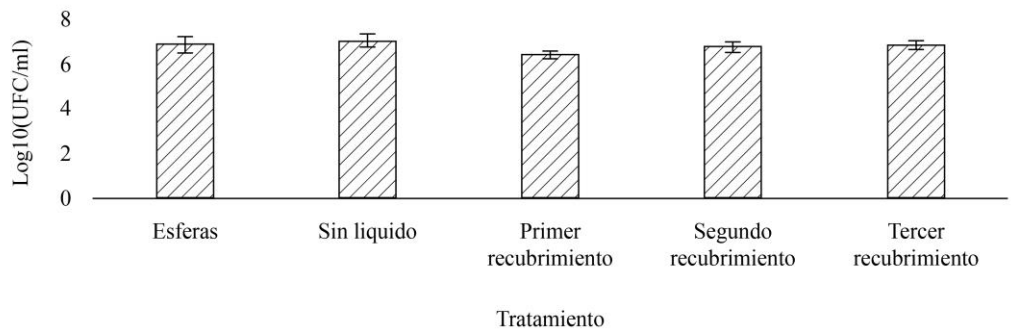


FIG. 19

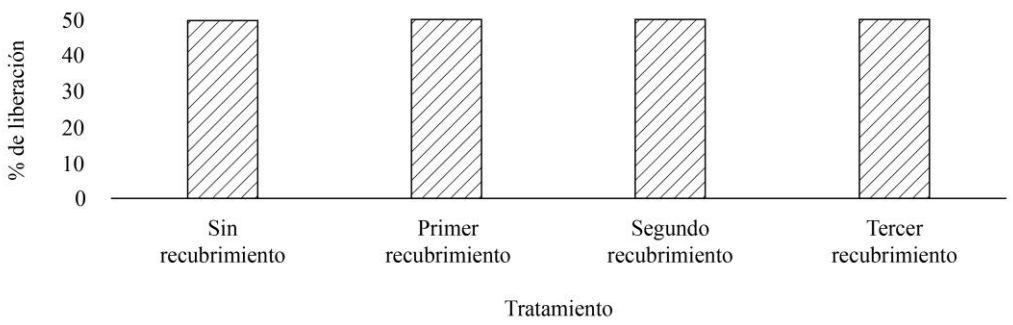


FIG. 20

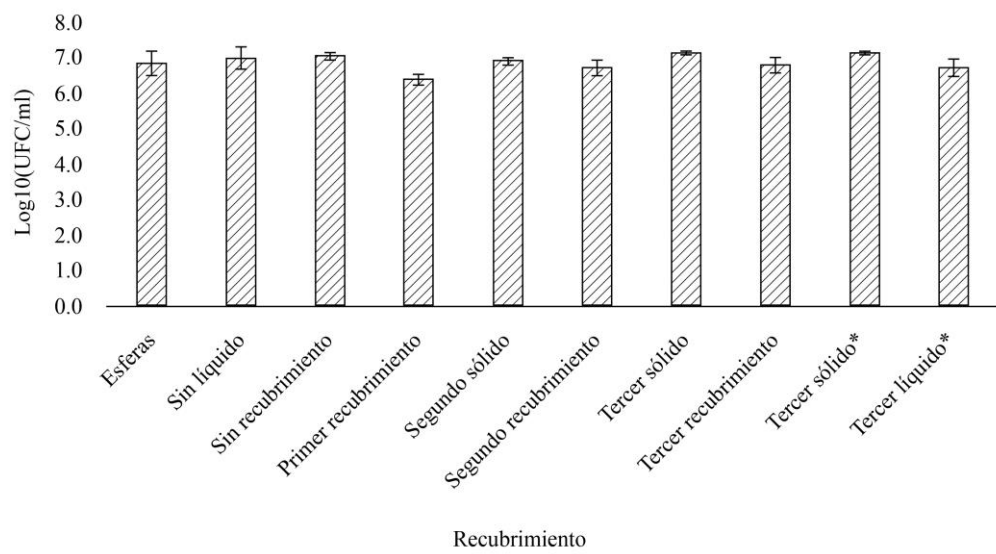


FIG. 21

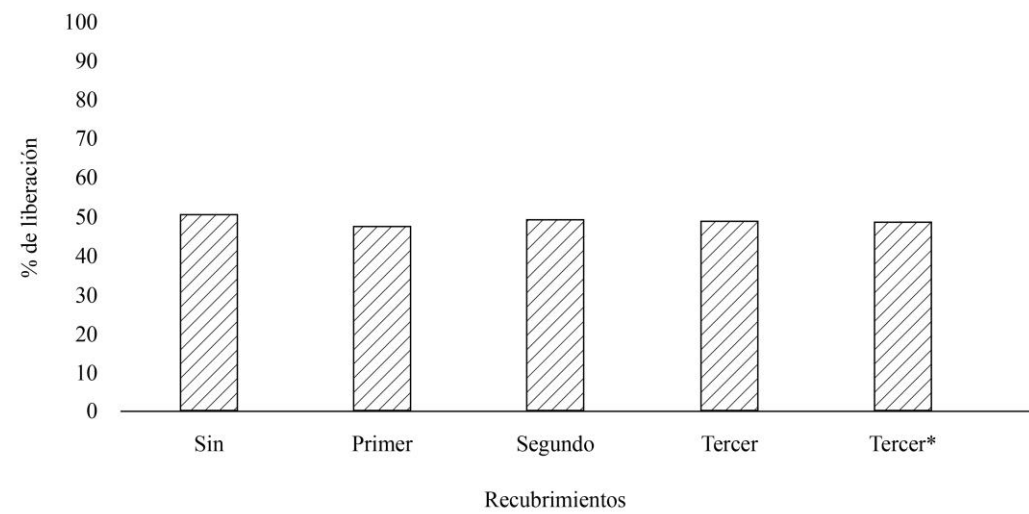


FIG. 22