

ENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS DE GRADO ALIMENTICIO EN AMBIENTES LIPÍDICOS

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología alimentaria, en concreto a un proceso de producción y encapsulación de microorganismos probióticos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped, incluida la inhibición del crecimiento de patógenos, el mantenimiento de la microflora intestinal promotora de la salud, la estimulación del sistema inmunológico, la absorción de calcio, la síntesis de vitaminas y agentes antimicrobianos, y la predigestión de proteínas.

El término probiótico incluye una amplia gama de microorganismos, principalmente bacterias, pero también levaduras. Debido a que pueden permanecer vivas hasta el intestino y proporcionar efectos beneficiosos sobre la salud del huésped, las bacterias del ácido láctico, las bacterias no lácticas y las levaduras pueden considerarse probióticos.

La mayoría de las cepas de bacterias probióticas comerciales pertenecen a las bifidobacterias y los lactobacilos. Sin embargo, las bacterias de otros géneros se utilizan en algunas partes del mundo. Por ejemplo, China utiliza otros géneros como *Bacillus* y *Clostridium*. *Enterococcus faecium* se ha utilizado en todo el mundo, sin embargo, este género está implicado en la transferencia de resistencia a los antibióticos.

Existen múltiples documentos que describen los beneficios de los probióticos para la salud en infecciones gastrointestinales, actividad antimicrobiana, mejora en el metabolismo de la lactosa, reducción del colesterol sérico, estimulación del sistema

inmunológico, propiedades antimutagénicas, propiedades anticancerígenas, propiedades antidiarreicas, mejora de la enfermedad inflamatoria intestinal y supresión de *Helicobacter pylori* por adición de cepas seleccionadas a productos alimenticios.

Las bacterias probióticas son sensibles a diversas condiciones ambientales como el pH (muchos probióticos crecen mejor a valores de pH alrededor de 7.0), la humedad, las temperaturas elevadas, altas concentraciones de sales biliares (por ejemplo, 0.3% o superior para ciertas cepas de bacterias probióticas), el aire y la luz, particularmente la luz UV. Cuando estas condiciones no se controlan adecuadamente, la viabilidad, y por lo tanto, la eficacia de las bacterias probióticas puede reducirse sustancialmente.

Como consecuencia de lo anterior, muchas bacterias probióticas se pierden durante el proceso de fabricación, liofilización, almacenaje o durante la vida útil. Sin embargo, otras pérdidas ocurren durante el tránsito a través de la zona gastrointestinal. Los cultivos probióticos se encuentran con jugos gástricos en el estómago que van desde pH 1.2 hasta pH 5.0. También hay sales biliares, enzimas lipolíticas, hidrolíticas y proteolíticas en el estómago y en el intestino delgado que son capaces de matar las bacterias. No es hasta que las bacterias probióticas alcanzan regiones de pH más altas del gastro-intestino cuando son capaces de crecer o sobrevivir. Las bacterias tienen sus condiciones de crecimiento más favorables en el primer tercio del intestino grueso (el intestino proximal). Por estos motivos, la protección de los microorganismos probióticos durante su almacenamiento y durante el tránsito al sitio de destino es generalmente necesaria.

La tecnología de la encapsulación se ha utilizado para prevenir el daño o la degradación de las bacterias probióticas durante el almacenamiento, la exposición a temperaturas elevadas, a ambientes ácidos (como cuando pasan a través del tracto gastrointestinal) y para aumentar su estabilidad y viabilidad. La encapsulación es el proceso de creación de una matriz que envuelve totalmente un núcleo de material encapsulado. Como resultado, la matriz proporciona a las bacterias probióticas encapsuladas protección frente al medio ambiente circundante. La matriz generalmente comprende uno o más biopolímeros. La matriz puede ser degradada posteriormente para liberar las bacterias en un sitio concreto, por ejemplo, en el

intestino delgado o el colon. El tamaño de las microcápsulas puede variar, llegando hasta las 1000 micras.

La protección se puede lograr de varias maneras: encapsulación en un compuesto de liberación lenta; encapsulación en alginato; en almidón resistente o en inulina en combinación con una goma, o mediante la incorporación en un alimento lácteo.

Varios biopolímeros, como alginato, almidón, goma xantana, goma guar, goma de algarroba, y goma carragenina, pueden utilizarse como materiales de matriz para proteger las bacterias probióticas. La encapsulación de alginato se utiliza debido a su preparación simple, de bajo coste, y buena biocompatibilidad, ya que el alginato no afecta a la viabilidad de la mayoría de los tipos de bacterias probióticas encapsuladas. Aunque la encapsulación del alginato ha mostrado un efecto protector sobre la viabilidad de diferentes bacterias probióticas sometidas a diferentes factores de estrés, incluyendo pH bajo, sales biliares, y el almacenamiento (cuando se incorpora en los alimentos), el efecto protector es en su mayoría parcial e inadecuado.

La selección de la mejor tecnología de encapsulación de probióticos debe tener en cuenta numerosos aspectos con el fin de garantizar la supervivencia de las bacterias durante el proceso de encapsulación, almacenamiento y consumo, así como la liberación controlada en el área específica deseada.

En el estado de la técnica existen divulgaciones relacionadas con diferentes métodos y tecnologías para la encapsulación de probióticos.

El documento de patente US6060050A divulga una combinación de una bacteria probiótica como *Bifidobacterium* con almidón rico en amilosa. El almidón actúa como portador y como un medio de crecimiento o mantenimiento en el intestino grueso u otras regiones del tracto gastrointestinal.

La patente US8007777B2 divulga una matriz para su uso en la liberación controlada de microorganismos. La matriz está formada por una cera hidrofóbica y un agente de liberación seleccionado entre polisacáridos, almidón, un derivado de algas o un polímero.

CA2549115AA describe una composición probiótica derivada de *Lactobacillus casei*. El probiótico se encapsula de forma anaeróbica para mantener una alta viabilidad durante períodos prolongados. Por otra parte, US2017216374AA describe una composición probiótica de *Lactobacillus plantarum* en la que se utiliza alginato para su encapsulación.

CN102228235A describe un método de preparación de microcápsulas de probióticos basado en la utilización de alginato y de almidón modificado. Estas microcápsulas son resistentes a las condiciones extremas del tracto gastrointestinal. US2012263826AA también describe un método de encapsulación basado en alginato.

No solo existen divulgaciones en las que se utiliza el alginato como matriz. Por ejemplo, US2015335577AA describe un método de encapsulación basado en quitosano y caseína, y WO09070012A1 divulga un encapsulado que comprende una matriz compuesta a base de proteínas que puede contener una o más bacterias probióticas, preferiblemente bacterias probióticas Gram positivas.

Algunos probióticos necesitan protección durante el procesamiento, ya que pueden ser sensibles al agua y al oxígeno. Por ejemplo, EP1213347A1 divulga un método de secado y preservación de levaduras y microorganismos mezclándolos con un material de matriz que absorbe el agua. CO20170008058A1 describe un proceso de encapsulación de microorganismos probióticos que comprende una etapa de secado. Este secado permite obtener un polvo de grado alimenticio con una estabilidad de hasta 2 meses.

Sin embargo, tanto la temperatura como la presión utilizadas en los procesos de secado pueden causar daños a las células microbianas. Por ello, la viabilidad de los microorganismos se convierte en uno de los parámetros más importantes a evaluar.

Para aumentar la viabilidad y la vida útil de los probióticos, también se han utilizado suspensiones aceitosas. Por ejemplo, la patente US7214370B2 describe una composición que comprende bacterias probióticas suspendidas en aceite

comestible y opcionalmente encapsuladas. US20210113629A1 describe un probiótico del género *Bacillus* encapsulado en una esfera lipídica y recubierto con una película proteica, evitando así que el microorganismo migre al exterior y evitando la generación de cambios indeseables en la matriz donde se incorpora.

A pesar de que hay una pluralidad de documentos que describen distintas formas de encapsulación y protección de probióticos, existe la necesidad de mejorar la viabilidad y estabilidad de los microorganismos probióticos durante el almacenamiento prolongado, y durante su vida útil, ya que esto sigue siendo un problema para la industria.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la producción de microorganismos probióticos y su posterior encapsulación en macroemulsiones de aceite de palma alto oleico.

Es objeto de esta invención, por tanto, proporcionar un método de encapsulación de probióticos para protegerlos del deterioro durante el procesamiento y almacenamiento y durante su paso por el tracto gastrointestinal.

El método al que se refiere la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a. cultivar microorganismos probióticos en un medio de cultivo que, preferiblemente, comprende suero de leche y extracto de levadura,
- b. preparar macroemulsiones de aceite de palma alto oleico mezclando los microorganismos probióticos producidos en (a) con aceite de palma alto oleico donde el aceite de palma alto oleico se encuentra a una concentración entre 1 y 10% p/p, y
- c. homogeneizar la mezcla del paso (b) en un Rotor-Stator.

Con este método de producción y encapsulación de microorganismos probióticos, se aumenta la vida útil de los microorganismos y su resistencia a las condiciones de almacenamiento y al jugo gástrico y ácido biliar al que se enfrentan al atravesar el sistema digestivo.

La invención también se refiere a los probióticos obtenidos mediante el método descrito, los cuales son preferiblemente bacterias del género *Lactobacillus*. Sin embargo, el alcance de esta invención no se limita a este tipo de microorganismos y podrían producirse y encapsularse otros microorganismos, preferiblemente bacterias, mediante el método aquí descrito. Además, los componentes empleados en el método podrían variarse, empleando componentes similares, y para cada variación elegida, podrían usarse diferentes proporciones de cada uno de los componentes. Las variaciones utilizadas de esta manera podrían ser específicas para la producción y encapsulación de cada microorganismo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a resolver la necesidad de mejorar la viabilidad y estabilidad de los microorganismos probióticos durante su procesado, almacenamiento y su exposición a los pHs ácidos presentes en el tracto digestivo.

Este problema se resuelve actualmente por ejemplo con la adición de los microorganismos probióticos a productos lácteos, ya que presentan un entorno favorable para su supervivencia y no tienen procesos en su preparación que puedan afectar a la viabilidad de los microorganismos.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la producción y encapsulación de microorganismos probióticos que permita mejorar su viabilidad y estabilidad, así como disminuir su susceptibilidad a las condiciones de almacenamiento y del aparato digestivo.

En particular, la presente invención propone la encapsulación de los microorganismos probióticos en macroemulsiones de aceite de palma alto oleico (HOPO) preparadas en Rotor-Stator, ya que los inventores han demostrado que el proceso aquí descrito no afecta a la viabilidad de los microorganismos y por tanto se propone como una tecnología alternativa y mejorada para la producción de

alimentos probióticos que garanticen la acción de las bacterias a concentraciones apropiadas.

Los resultados mostrados en los ejemplos más adelante sugieren que la homogeneización en Rotor-Stator para formar las macroemulsiones de HOPO con los microorganismos, bajo las condiciones aquí indicadas, no afecta significativamente a la viabilidad de las células encapsuladas.

La supervivencia de los microorganismos probióticos mostrada en los ejemplos de la presente invención se vio afectada principalmente por la concentración de HOPO empleada, obteniéndose valores entre el 78-99 % para las mediciones después de la preparación de las macroemulsiones, y entre el 83-107 % a los 7 días de cultivo. La variabilidad en los porcentajes de supervivencia celular asociada a las diferentes concentraciones de HOPO empleadas sugiere que el aceite juega un papel clave en la protección de los microorganismos probióticos durante su procesado, o bien que dichos microorganismos podrían estar empleando el aceite como fuente de carbono durante su incubación.

La concentración final de probiótico presente en las macroemulsiones producidas según el procedimiento de la presente invención es adecuada ($>10^6$ UFC mL⁻¹ o g⁻¹).

Así, un aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de microorganismos probióticos encapsulados, de ahora en adelante "el primer método de la invención", que comprende una primera etapa (a) donde se producen, cultivan o crecen microorganismos probióticos en un medio de cultivo que, preferiblemente, comprende suero de leche y extracto de levadura, una segunda etapa (b) en la que se preparan macroemulsiones de aceite de palma alto oleico (HOPO) mezclando los microorganismos probióticos producidos en (a) con aceite de palma alto oleico donde el aceite de palma alto oleico se encuentra a una concentración entre 1 y 10% p/p, y una tercera etapa (c) donde se homogeiniza la mezcla usando un Rotor-Stator.

El experto en la materia sabrá determinar cuáles son las condiciones adecuadas y el medio de cultivo más apropiado para llevar a cabo el cultivo de los microorganismos probióticos en el paso (a) dependiendo del microorganismo del que se trate.

En una realización preferida del primer método de la invención el suero de leche se encuentra en una concentración de entre 5-10 % y más preferiblemente el extracto de levadura se encuentra en una concentración de entre 0.1 – 0.5 %.

En otra realización preferida, la mezcla del paso (b) además comprende suero de leche, gelatina de grado alimenticio y lecitina, preferiblemente de soja, en agua destilada.

En una realización más preferida, el suero de leche en el paso (b) se encuentra a una concentración del 20 %, p/p, la gelatina a una concentración del 1 %, p/p, y la lecitina en una concentración del 10%, p/p con respecto a la concentración de HOPO.

El aceite de palma alto oleico ofrece una protección adicional a los microorganismos gracias a sus altas concentraciones de β -carotenos y vitamina E. Preferiblemente, el aceite de palma alto oleico se encuentra a una concentración menor o igual al 5.5% p/p.

En otra realización preferida, la concentración de microorganismos probióticos en el paso (b) es de entre 10 y 50% v/v, más preferiblemente del 30% v/v.

Una vez producidos los microorganismos probióticos y preparada la mezcla del paso (b), se realiza un tercer paso (c) en el que las macroemulsiones se homogenizan junto con los microorganismos en un rotor-estator. La homogeneización se realiza, preferiblemente, a 6.000 a 6000-26000 rpm durante 1 a 5 minutos.

Los homogeneizadores rotor-estator consiguen homogeneizar las muestras a través del desgarramiento mecánico, las fuerzas del fluido de cizallamiento y / o cavitación (la rápida formación y colapso de burbujas).

Algunos parámetros para evaluar la estabilidad de las emulsiones son:

El potencial Z (ζ) que controla las interacciones entre las partículas en suspensión cuando las partículas cargadas se acercan entre sí. Cuanto más fuerte sea esta fuerza de dispersión, mayor será la estabilidad de la solución y su capacidad de carga.

La distribución del tamaño de partícula (ADS) se utiliza para determinar la vida útil, apariencia, textura y color de las emulsiones.

El índice de polidispersidad (Pdl) es una medida adimensional de la distribución de las gotas a lo largo de la fase, valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa mientras que valores cercanos a 1 indican que la muestra tiene una variedad de tamaños de gota.

El índice de cremado (IC) describe el movimiento de las partículas hacia la superficie de la emulsión, lo que provoca la separación de las fases debido a la diferencia de densidades entre ellas. Por tanto, cambios en la densidad de la fase oleosa pueden generar cambios en la estabilidad de las emulsiones.

En esta invención se han caracterizado diferentes macroemulsiones de aceite de palma alto oleico utilizando los parámetros mencionados anteriormente y se ha evaluado el efecto de la velocidad de rotación del estator del rotor sobre la viabilidad de las bacterias.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende un paso adicional (d) de secado por aspersión, el cual preferiblemente se realiza a una temperatura de entre 120 y 175°C y a una humedad final entre 2.4 y 3.7%, más preferiblemente a 147.5°C y aún más preferiblemente al 3.2% de humedad.

En otra realización preferida del primer método de la invención el microorganismo probiótico es *Lactobacillus fermentum*.

Otro aspecto de la invención se refiere a los microorganismos probióticos encapsulados obtenidos mediante el primer método de la invención, de ahora en adelante "probióticos de la invención".

En una realización preferida, los microorganismos a los que se refiere la invención pertenecen a bacterias del género *Lactobacillus*, más preferiblemente a la especie *Lactobacillus fermentum*.

Lactobacillus fermentum es un tipo de bacteria Gram positiva. Algunas cepas de esta especie son usadas como probióticos. Los usos de *Lactobacillus fermentum* como

probiótico son para: reducir la incidencia de alergias, controlar el crecimiento neoplásico, controlar la infección urogenital y aumentar la flora intestinal. También se usa como terapia complementaria para la enfermedad inflamatoria intestinal.

Lactobacillus fermentum tiene una fuerte resistencia a los cambios de pH, haciendo que su crecimiento y supervivencia sea excelente a distintos grados de acidez. Así, *L. fermentum* es capaz de sobrevivir a los jugos gástricos y a los procesos del sistema digestivo y soporta con facilidad la variación del pH del estómago (pH 1.5 a 3) y el aumento de la bilis del intestino superior (de 3 a 5 g/L).

Cualquier microorganismo, distinto a *Lactobacillus fermentum*, con características y efectos probióticos podría producirse y encapsularse siguiendo el primer método de la invención como alternativa a las bacterias de esta especie. Ejemplos de otros microorganismos que podrían emplearse en la presente invención son, pero sin limitarnos, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, o cualquier combinación de los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante “segundo método de la invención” para la administración de los probióticos de la invención al usuario final. Los probióticos de la invención pueden ser administrados por cualquiera de los métodos de administración conocidos, por ejemplo, suplementos dietéticos suministrados por vía oral. Además, los probióticos de la invención también podrían adicionarse a productos alimenticios fermentados.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los probióticos de la invención para la elaboración de una composición, preferiblemente farmacéutica o alimentaria.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende los probióticos de la invención. Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica o nutricional, más preferiblemente es una composición nutricional seleccionada de la lista que comprende: alimento funcional, suplemento nutricional, suplemento dietético, pienso para animales, etc. Dicha composición puede comprender otros aditivos, vehículos o excipientes, artificiales o naturales.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 muestra las gráficas de contorno para las variables ajustadas al diseño experimental: ADS (A), Pdl (B), ζ (C), CI (D).

FIG. 2 muestra las gráficas de contorno para variables ajustadas al diseño experimental: supervivencia bacteriana (a), humedad (b), actividad del agua (c) y tasa de disolución (d).

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de la invención.

EJEMPLO 1

Producción y caracterización de diferentes macroemulsiones de aceite de palma alto oleico y evaluación del efecto de la velocidad de rotación del estator del rotor sobre la viabilidad de las bacterias encapsuladas en ellas.

Diseño experimental

Utilizando el software Design Expert Versión 10.1.0 (Stat-Ease Inc., MN, USA) se realizó un diseño experimental Box-Behnken variando tres factores numéricos: concentración de aceite de palma alto oleico (HOPO) (1-10%, p / p), velocidad de rotación (6000-26000 rpm) y tiempo (1-5 min). La concentración de suero (20%, p / p), la concentración de gelatina (1%, p / p) y la concentración de lecitina se mantuvieron constantes al 10% (p / p) con respecto a la concentración de HOPO. Además, se agregó *L. fermentum*, 10% (v / v), aproximadamente $10 \log_{10}$ UFC/mL (Tabla 1).

Tabla 1. Optimización de respuesta para la preparación de macroemulsiones y variables ajustadas al modelo: ADS, Pdl, ζ , índice de cremado y supervivencia bacteriana.

Corrida	APA0 (% p/p) [A]	Velocidad (rpm) [B]	Tiempo (min) [C]	Distribución tamaño partícula (nm)	IdP	ζ (mV)	IC amb (%)	IC refri (%)	Supervivencia de bacterias 0*	Supervivencia de bacterias 7*
1	5.5	260 00	1	517.75	0.50	-33.2	43	54	99	99
2	5.5	260 00	5	469.2	0.35	-32.5	32	13	96	85
3	5.5	6000	5	610.9	0.59	-21.5	71	0	83	99
4	5.5	160 00	3	602.85	0.53	-29	21	0	95	89
5	5.5	6000	1	412.5	0.48	-21.3	79	14	97	84
6	1	160 00	5	269.1	0.32	-30.8	0	0	91	86
7	1	260 00	3	295.3	0.42	-31	0	0	94	83
8	5.5	160 00	3	690.85	0.60	-29	36	0	97	84
9	1	160 00	1	287.15	0.38	-27.6	57	0	98	92
10	5.5	160 00	3	850.05	0.71	-28.3	21	0	88	92
11	5.5	160 00	3	691.2	0.75	-30	21	0	89	88
12	1	6000	3	279	0.38	-23.5	79	0	99	89
13	10	6000	3	733.6	0.66	-21.3	57	0	80	107
14	10	260 00	3	899.05	0.59	-34.3	21	0	81	80
15	10	160 00	5	1143.5	0.72	-21.3	29	14	86	94
16	5.5	160 00	3	745	0.87	-24.4	21	0	89	90
17	10	160 00	1	668.65	0.54	-23.5	57	7	78	101

Preparación del cultivo celular

Para la preparación del cultivo celular *L. fermentum* se activó en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS; 1%, p / v) durante 12 horas a 37 ± 2 ° C. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,5 y el proceso de fermentación se mantuvo constante a 37 ° C y 100 rpm en un biorreactor de 1 L. La composición del medio de cultivo fue suero dulce (8% p / v) y extracto de levadura (0,2% p / v). Se complementó el suero dulce en polvo con la siguiente composición: proteína 11.67% (p / p), lípidos 2.0% (p / p), lactosa 51.64% (p / p) (AOAC 984.1) y extracto de levadura. El reactor se inoculó con *L. fermentum*, 10% (v / v), crecido en caldo MRS con una concentración final de aproximadamente $6,27 \pm 0,34 \log_{10}$ UFC/mL.

Preparación de las emulsiones gruesas

Las emulsiones gruesas se homogeneizaron en un mezclador, incorporando suero en polvo y gelatina seguido de la adición de HOPO y lecitina al agua destilada durante 1 min. Posteriormente, se procesaron dichas emulsiones para obtener las macroemulsiones.

Preparación de las macroemulsiones

Las emulsiones gruesas y el 10% (v / v) de cultivo de *L. fermentum* se añadieron al homogeneizador Rotor-estator (IKA®, Magic LAB®, EE. UU.). La temperatura de procesamiento y la pureza se tuvieron en cuenta como criterios de control. Una vez finalizado el tiempo de recirculación, se ajustó el pH a 5,5 con un pH / mV Meter, UltraBASIC y ácido clorhídrico (HCl) 1 N. Finalmente, las emulsiones se distribuyeron en tubos Falcon estériles de 50 mL.

Caracterización de las macroemulsiones

Las macroemulsiones de HOPO se caracterizaron con respecto a sus características físicas como el tamaño medio de gota (ADS), índice de polidispersidad (Pdl), potencial zeta (ζ) e índice de cremado (IC). Además, se evaluó la supervivencia de *Lactobacillus fermentum* como se describe a continuación.

Tamaño de gota, índice de polidispersión y potencial zeta: el tamaño medio de gota (ADS), el índice de polidispersión (Pdl) y el potencial zeta (ζ) se determinaron utilizando un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) con un difractor láser Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Inglaterra) utilizando una dilución de agua de 1: 100 (v / v). Las medidas se realizaron por duplicado con un ángulo de dispersión de 173 °.

Índice de cremado: las macroemulsiones se transfirieron a tubos plásticos graduados (50 mL), se sellaron herméticamente y las muestras se almacenaron durante 7 días en dos condiciones diferentes: temperatura ambiente (19 ± 2 ° C) y temperatura de refrigeración (4 ± 2 ° C). El día 7, el índice de cremado se determinó como:

$$CI = \frac{H_S}{H_E} \cdot 100 (1)$$

Donde H_S es la altura del suero y H_E es la altura inicial de la macroemulsión.

Supervivencia bacteriana

El recuento celular de *L. fermentum* después de la preparación de la emulsión se realizó mediante recuento en placa en agar MRS después del cultivo a 37 ± 2 ° C durante 24 h en condiciones aeróbicas. Se añadieron 0,1 g de macroemulsión a 9,9 ml de agua de peptona (0,2% p / v). Luego, se realizaron las diluciones seriadas, se sembraron en agar MRS y se incubaron a 37 ± 2 ° C durante 24 h. El recuento de células se expresó como $\log_{10}$ UFC/mL. El porcentaje de supervivencia se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$(\%) = \frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \cdot 100 \quad (2)$$

Donde N_1 representa el número total de células viables después del tratamiento y N_0 el número inicial de microorganismos inoculados.

Resultados

Tamaño de gota (ADS): el análisis de varianza resultó en un modelo cuadrático que se ajustó con un R^2 de 0.94 y una falta de ajuste no significativa (Tabla 2). La distribución del tamaño de partícula se vio afectada ($p < 0.05$) por la concentración de HOPO, el tiempo y algunas interacciones como la concentración y el tiempo de HOPO (AC) y el tiempo al cuadrado (B^2). La relación entre la concentración de HOPO y el tamaño es directamente proporcional, mientras que la velocidad no tiene una iniciación significativa sobre el tamaño de las partículas (Figura 1).

Índice de polidispersidad (Pdl): a partir del análisis de varianza (ANOVA) se obtuvo un modelo cuadrático modificado que se ajustó con un R^2 de 0,77. Los factores que afectaron significativamente ($p < 0.05$) a esta variable fueron: concentración de HOPO y tiempo al cuadrado (C^2) (Tabla 2). En cuanto a la distribución del tamaño de partícula, a menores concentraciones de HOPO se obtienen emulsiones con menores índices de polidispersidad, y a medida que esta concentración se incrementa proporcionalmente, aumenta el Pdl.

ζ -potencial: para esta variable se obtuvo un modelo lineal ajustado con un R^2 de 0,77. Los resultados muestran que la velocidad tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en los valores de potencial ζ . La concentración de HOPO y el tiempo de homogeneización

no tuvieron un efecto significativo sobre ella (Tabla 2). A velocidades más altas se obtienen valores de potencial ζ más negativos; lo que se traduce en una mayor estabilidad de las emulsiones (Figura 1).

Índice de cremado: Para esta variable se obtuvo un modelo cuadrático con un R^2 de 0.90 y una falta de ajuste no significativa. La velocidad, el tiempo, la velocidad al cuadrado (B^2) y las interacciones de tiempo al cuadrado (C^2) fueron significativas para el modelo ($p < 0,05$). El aumento de la velocidad y el tiempo de homogeneización produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el índice de cremado.

Supervivencia bacteriana: tanto para la supervivencia bacteriana en el tiempo 0 justo después de la preparación de la emulsión, como al séptimo día, el análisis de varianza (ANOVA) obtuvo un modelo con un R^2 de 0.8 y una falta de ajuste no significativa. Los factores que influyeron significativamente ($p < 0,05$) en la supervivencia bacteriana fueron la concentración de HOPO y la interacción de la concentración de HOPO y el tiempo (AC) para el día 0, y el tiempo de velocidad (BC) para el día 7. Para el día 0 la mayor viabilidad se obtuvo con baja concentración de aceite, mientras que a los 7 días se observó un comportamiento opuesto ya que la mayor concentración de HOPO aumentó la viabilidad.

Tabla 2. ANOVA para las variables ajustadas al diseño experimental: ADS, Pdl, índice de cremado y supervivencia bacteriana.

	Distribución de tamaño de partícula (nm)			IdP			ζ (mV)			Índice de cremado amb (%)			Supervivencia 0 d (%)			Supervivencia 7 d (%)		
	SC	gl	Valor-p	SC	gl	Valor-p	SC	gl	Valor-p	SC	gl	Valor-p	SC	gl	Valor-p	SC	gl	Valor-p
Modelo	9,14E+08	9	0.0014	4.64	9	0.0107	255.56	3	0.0002	8975.94	9	0.0099	496.00	6	0.0306	594.75	6	0.0309
A-APAO	6,70E+08	1	<0.0001	2.26	1	0.0010	19.53	1	0.0890	98.00	1	0.4428	136.13	1	0.0312	128.00	1	0.0511
B-	2639.01	1	0.5819	0.11	1	0.2697	235.99	1	<0.0001	4512.50	1	0.0009	0.50	1	0.8824	128.00	1	0.0511
Velocidad																		
C-Tiempo	46003.03	1	0.0468	0.023	1	0.6028	0.038	1	0.9368	1352.00	1	0.0194	78.13	1	0.0870	18.00	1	0.4255
AB	5561.43	1	0.4298	0.046	1	0.4670				462.25	1	0.1207	100.00	1	0.0574	110.25	1	0.0668
AC	60737.60	1	0.0278	0.21	1	0.1439				210.25	1	0.2724	156.25	1	0.0229	0.25	1	0.9239
BC	15246.08	1	0.2080	0.39	1	0.0621				2.25	1	0.9054	25.00	1	0.3083	210.25	1	0.0179
A2	5880.07	1	0.4175	0.45	1	0.0485				29.01	1	0.6714						
B2	67785.97	1	0.0222	0.23	1	0.1301				1345.33	1	0.0196						
C2	31518.78	1	0.0863	0.76	1	0.0170				870.07	1	0.0459						
Falta de ajuste	22606.94	3	0.5086	0.24	3	0.4601	56.48	9	0.4141	857.00	3	0.0531	190.14	6	0.0772			0.0906
Error	32860.89	4		0.31	4		18.67	4		180.00	4		26.80	4				

R2	0.94	0.89	0.77	0.89	0.80	0.80
R2 - Ajustado	0.86	0.75	0.72	0.76	0.61	0.61

A mayor concentración de HOPO, las cantidades totales de gotas de aceite aumentan en la emulsión, lo que afecta directamente la tasa de coalescencia. La concentración de HOPO y su interacción con el tiempo también tuvo un efecto en ADS. Esto puede deberse a los mecanismos de ruptura. Las partículas más pequeñas se separan de las más grandes y los aglomerados y agregados disminuyen, y con ello disminuye el tamaño de partícula.

Las ecuaciones para la predicción de ADS, Pdl, ζ , índice de cremado y supervivencia bacteriana se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Ecuaciones para la predicción de ADS, Pdl, ζ , índice de cremado y supervivencia bacteria (día 0 y día 7)

Ecuaciones para	
ADS (nm) =	$-205.03609 + 30.25170*A + 0.047122*B + 141.78146*C + 8.28611E-004*A*B + 13.69167*A*C - 3.08687E-003*B*C - 1.84543*A^2 - 1.26883E-006*B^2 - 21.63000*C^2$
1/Pdl =	$+ 4.42968 - 0.25659*A - 1.22762E-004*B - 0.71806*C + 2.39322E-006*A*B - 0.025602*A*C + 1.55251E-005*B*C + 0.016082*A^2 + 2.34043E-009*B^2 + 0.10624*C^2$
ζ (mV) =	$- 20.33424 + 0.34722*A - 5.43125E-004*B - 0.034375*C$
CI amb (%) =	$+ 183.91856 - 4.03519*A - 9.29639E-003*B - 31.89306*C + 2.38889E-004*A*B + 0.80556*A*C - 3.75000E-005*B*C - 0.12963*A^2 + 1.78750E-007*B^2 + 3.59375*C^2$
Supervivencia bacteriana 0 (%) =	$+ 112.30645 - 4.77778*A - 2.61111E-004*B - 3.38194*C + 1.11111E-004*A*B + 0.69444*A*C - 1.25000E-004*B*C$
Supervivencia bacteriana 7 (%) =	$+ 66.34199 + 2.83889*A + 1.32917E-003*B + 5.20278*C - 1.16667E-004*A*B - 0.027778*A*C - 3.62500E-004*B^2$

EJEMPLO 2

Efecto del secado por aspersión sobre la supervivencia bacteriana en emulsiones de aceite de palma alto oleico.

Diseño experimental

Utilizando el software Design Expert Versión 11.1.0 (Stat-Ease Inc., MN, EE. UU.) se realizó un diseño experimental de Box-Behnken variando tres factores numéricos: concentración de aceite de palma alto oleico HOPO (1-10%, p / p), concentración bacteriana (10-50%, p / p) y temperatura de entrada (120-175°C). Se mantuvo constante la concentración de suero (10%, p / p) y la concentración de lecitina (10%, p / p) con respecto a la concentración de HOPO (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño experimental para variables ajustadas al modelo: humedad, actividad del agua (a_w), tasa de disolución y supervivencia bacteriana.

Carrera	HOPO (% w/w) [A]	Inóculo (% w/w) [B]	T ^a entrada (° C) [C]	Humedad (%)	a_w	Tasa disolución (s)	Supervivencia bacteriana (%)
1	1	30	175	3.1	0.13	62.4	75
2	1	30	120	3.3	0.18	139.1	77
3	1	50	147.5	3.3	0.27	108.4	87
4	10	30	175	3.4	0.18	151.8	68
5	5.5	50	175	3.7	0.27	106.8	86
6	5.5	30	147.5	3.5	0.28	107.4	86
7	10	30	120	3.3	0.27	107.9	87
8	5.5	30	147.5	3.4	0.16	120.4	90
9	5.5	30	147.5	3.2	0.15	60.33	94
10	5.5	10	175	2.8	0.16	156.1	72
11	10	10	147.5	3.4	0.18	108.4	83
12	10	50	147.5	3.3	0.12	41.5	80
13	5.5	30	147.5	3.5	0.12	85.6	91
14	5.5	30	147.5	2.8	0.12	74.7	81
15	1	10	147.5	2.6	0.18	109.5	73
16	5.5	50	120	2.8	0.15	132.5	77
17	5.5	10	120	2.4	0.12	84.2	80

Fermentación

Lactobacillus fermentum se activó en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS; 1%, p / v) (Scharlau Microbiology, Barcelona, España) durante 12 h a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ (Incubadora BD 115L - Binder, EE. UU.) con concentración final de aproximadamente $6.27 \pm 0.34 \log_{10}$ UFC/mL.

El medio de cultivo estaba compuesto por suero dulce y extracto de levadura y su pH se ajustó a 5,5. El proceso de fermentación se mantuvo constante a 37°C y 100 rpm en un biorreactor de 1 L (Bioflo 110, New Brunswick Scientific Co. Inc., NJ, EE. UU.),

El reactor se inoculó con *L. fermentum*, 10% (v / v), cultivado en caldo MRS con una concentración final de aproximadamente $6.27 \pm 0.34 \log_{10}$ UFC/mL.

Preparación de las emulsiones

Las emulsiones se prepararon mediante una homogeneización en dos pasos utilizando un mezclador, incorporando HOPO, lecitina y la bacteria en el medio de cultivo anteriormente mencionado (Mezcla A), y suero en polvo y agua (Mezcla B) durante 1 min cada una. Posteriormente, se homogeneizó la Mezcla A utilizando un Rotor estator (IKA®, Magic LAB®, EE. UU.) a 2.2×10^4 rpm durante 2 min y luego se añadió la Mezcla B a 1.0×10^4 rpm durante 1 min para obtener las emulsiones. La pureza se tuvo en cuenta como criterio de control.

Secado

Las emulsiones se introdujeron en un secador por pulverización a escala piloto.

Supervivencia bacteriana

El recuento celular de *L. fermentum* se realizó mediante la técnica de recuento en placa. Se prepararon diluciones seriadas de los polvos hasta 10^{-10} en agua de peptona al 0,1% v / v y se mezcló con vórtice durante 15 min. A partir de estas diluciones, se sembraron 100 μ L en agar MRS y se incubaron a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 h en condiciones aeróbicas. El recuento de células se expresó como UFC/g y luego como porcentaje de supervivencia.

Resultados

Supervivencia bacteriana: la Tabla 5 muestra que el modelo fue significativo ($p < 0.05$) y tuvo una falta de ajuste de 0.1794, lo que indica que el modelo propuesto proporcionó un ajuste adecuado y, por lo tanto, podría ajustarse y predecir la supervivencia bacteriana de las emulsiones de aceite de palma con alto contenido de oleico secadas por aspersión. Los factores estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) fueron la concentración de HOPO, la temperatura del aire de entrada, la interacción entre ellos y el efecto cuadrático de HOPO.

A una baja concentración de HOPO y de temperatura de aire de entrada se obtiene la mejor viabilidad bacteriana (94%) tras la emulsión y secado por aspersión.

Tabla 5. ANOVA para las variables ajustadas al diseño experimental: supervivencia bacteriana, humedad, a_w y tasa de disolución

	Supervivencia bacteriana			Humedad			Actividad del agua			Tasa de disolución		
	SS	df	p-Value	SS	df	p-Value	SS	df	p-Value	SS	df	p-Value
Modelo	821,3	9	0,0004	1,77	9	0,0260	0,0616	9	0,0099	16536,3	9	< 0.0001
A-HOPO	162,0	1	0,0006	0,001	1	0,8669	0,0028	1	0,1397	14498,5	1	< 0.0001
B-Recuento inicial células	18,00	1	0,0908	0,020	1	0,502	0,0003	1	0,5960	1708,20	1	< 0.0001
C-Tª entrada	32,00	1	0,0347	0,001	1	0,8669	0,0004	1	0,5266	50,65	1	< 0.0001
AB	9,00	1	0,2083	0,062	1	0,2587	0,0000	1	0,8796	23,04	1	0,0011
AC	196,0	1	0,0003	0,000	1	1,0000	0,0001	1	0,7626	54,54	1	< 0.0001
BC	196,0	1	0,0003	0,902	1	0,0023	0,0036	1	0,1015	37,82	1	0,0002
A²	186,2	1	0,0004	0,060	1	0,2653	0,0047	1	0,0693	10,10	1	0,0095
B²	11,46	1	0,1618	0,656	1	0,0053	0,0292	1	0,0010	106,58	1	< 0.0001
C²	1,78	1	0,5573	0,020	1	0,5028	0,0155	1	0,0058	33,57	1	0,0003
Falta de ajuste	22,00	3	0,1794	0,177	3	0,2413	0,0002	3	0,9905	3,76	3	0,1846
Error puro	10,80	4		0,112	4		0,0069	4		1,89	4	
R²	0,961			0,859			0,896			0,999		
R² - Ajustado	0,912			0,678			0,763			00,999		

La ecuación obtenida para la predicción de la supervivencia bacteriana se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Ecuaciones para la predicción de la supervivencia bacteriana, humedad, actividad del agua y tasa de disolución.

Ecuaciones para	
Supervivencia bacteriana (%)=	+57,27295-5,31552*A+2,13222*B+0,257444*C-0,016029*A*B+0,055544*A*C-0,012744*B*C-0,307500*A²-0,004108*B²-0,000812*C²
Humedad (%)=	-3,25651+0,029759*A+0,176768*B+0,053889*C+0,001283*A*B-0,000039*A*C-0,000861*B*C-0,005931*A²-0,000988*B²-0,000093*C²
Actividad del agua=	-1,32034+0,034325*A+0,010850*B+0,017657*C-0,002742*A²-0,000169*B²-0,000060*C²
Tasa de disolución=	-96,20644+17,80039*A+2,41291*B+1,26607*C-0,025340*A*B-0,028196*A*C-0,005445*B*C-0,310556*A²-0,012446*B²-0,003544*C²

Como resultado se muestra que HOPO protegió al microorganismo durante la emulsificación y secado por aspersión obteniendo una alta supervivencia.