

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
Máster Universitario en Tecnología y Calidad Agroalimentaria



Microencapsulación de *L. Plantarum* en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y de la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Septiembre – 2021

AUTOR: Evelin López Martínez

DIRECTOR/ES: Estefanía Valero Cases

María José Frutos Fernández



MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2020 /2021

Director/es del trabajo
Estefanía Valero Cases María José Frutos Fernández

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
Microencapsulación de <i>L. Plantarum</i> en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y de la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica
Alumno
Evelin López Martínez

Orihuela, a 9 de Septiembre de 2021

Firma/s tutores trabajo



MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: Microencapsulación de *L. Plantarum* en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y de la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica

Title: Microencapsulation of *L. plantarum* in single and double-layer capsules: effect of thermal conditions and gastrointestinal digestion on probiotic viability

Modalidad (proyecto/experimental): experimental

Type (project/research): research

Autor/Author: Evelin López Martínez

Director/es/Advisor: Estefanía Valero Cases, María José Frutos Fernández

Convocatoria: Septiembre 2021

Month and year: September 2021

Número de referencias bibliográficas/number of references: 25

Número de tablas/Number of tables: 2

Número de figuras/Number of figures: 3

Número de planos/Number of maps: 0

Palabras clave (5 palabras): alginato, probiótico, supervivencia, digestión in vitro, extrusión.

Key words (5 words): alginate, probiotic, survival, in vitro digestion, extrusion.



MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

RESUMEN (mínimo 10 líneas):

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del huésped. Las técnicas de microencapsulación, permiten la introducción de probióticos en los alimentos mejorando su supervivencia. El objetivo de este trabajo fue la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* en cápsulas sin recubrimiento y con recubrimiento para evaluar el efecto de protección sobre la viabilidad de *L. plantarum* frente al proceso de producción, al estrés secuencial durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y a condiciones de alta temperatura (50-80 °C). La encapsulación simple se realizó usando la técnica de extrusión en matriz de alginato de sodio al 2 %, goma xantana y glicerol. Para crear una doble capa como cubierta protectora se usó agar-agar e inulina. También se analizaron las propiedades fisicoquímicas como el diámetro, la actividad de agua y la eficacia de encapsulación. Los resultados mostraron que la encapsulación con doble capa, mejoró la supervivencia y liberación del probiótico al finalizar el periodo de digestión gastrointestinal. A su vez, la capsulas con doble capa mostraron mejores propiedades termoprotectoras del microorganismo frente a las condiciones de tratamiento térmico, obteniendo mayor tasa de supervivencia que en las cápsulas sin recubrimiento, pudiendo ser de interés su inclusión en el desarrollo de alimentos funcionales

ABSTRACT (10 lines or more):

Probiotics are living microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host. Microencapsulation techniques allow the introduction of probiotics into foods, improving their survival. The aim of this work has been the microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* in uncoated and coated capsules to evaluate the protective effect on the viability of *L. plantarum* against the production process, the sequential stress during the *in vitro* gastrointestinal digestion process and at high temperature conditions (50-80 °C). Simple encapsulation was performed using the 2% sodium alginate, xanthan gum and glycerol matrix extrusion technique. Agar-agar and inulin were used to create a double layer as a protective cover. Physicochemical properties such as diameter, water activity and encapsulation efficiency were also analysed. The results showed that double layer encapsulation improved the survival and release of the probiotic at the end of the gastrointestinal digestion period. In turn, the double-layer capsules showed better thermal protective properties of the microorganism against heat treatment conditions, obtaining a higher survival rate than the capsules without coating, and their inclusion in the development of functional foods may be of interest.



II Congreso Universitario en Innovación y Sostenibilidad Agroalimentaria(CUISA)

Programa Científico

Fecha	16 de septiembre de 2021
8:45-9:00	Ceremonia de Apertura
9:00-9:45	Conferencia Inaugural: "Impacto de la fisiología de la poscosecha en la Innovación agroalimentaria". Dr. Juan Luis Valenzuela (Departamento de Biología y Geología, Universidad de Almería)
Sesión 1	Recursos Fitogenéticos, Mejora y Biotecnología en Producción Vegetal. Moderador: Dra. Nuria Albuquerque Ferrando (CEBAS-CSIC, Murcia)
	Presentaciones Orales
S1-O1 9:45-10:00	Mejora de la micropropagación en variedades de albaricoquero (<i>Prunus armeniaca</i> L.) mediante Sistemas de Inmersión Temporal. <i>C. Pérez-Caselles, L. Burgos, V. Origüela y N. Albuquerque.</i>
S1-O2 10:00-10:15	Efecto de la aplicación de ácido salicílico en precosecha sobre la calidad de pimiento verde en la recolección y conservación. <i>A. Rodríguez, A. Dobón-Suarez, M.E. García-Pastor, P.J. Zapata y M. Giménez.</i>
S1-O3 10:15-10:30	Cultivo a media escala de líneas de tomate Muchamiel con resistencia a virus para su comercialización en Alicante. <i>P. Carbonell, J.A. Cabrera, J.F. Salinas, A. Grau, A. Alonso, J.J. Ruiz, S. García-Martínez.</i>
S1-O4 10:30-10:45	Introducción del gen <i>Ty-2</i> en el Programa de Mejora Genética de Variedades Tradicionales de Tomate del CIAGRO-UMH. <i>J.A. Cabrera, P. Carbonell, J.F. Salinas, A. Grau, A. Alonso, S. García-Martínez y J.J. Ruiz.</i>
S1-O5 10:45-11:00	Seguimiento de tres ensayos de tomate Muchamiel con resistencia a virus en el término municipal de Mutxamel durante el ciclo de primavera-verano 2021. <i>S. García-Martínez, J.M. Sánchez, A. Gómez, F. Hernández, M. Juárez, P. Guirao, A.M. Ortega, L. Noguera, A. Alonso, J.J. Ruiz.</i>

S1-O6 11:00-11:15	Efecto de nanotubos de carbono sobre diferentes combinaciones de citoquininas en la proliferación in vitro del portainjertos Garnem. <i>J. A. Medina, F. Hernández y A. Galindo.</i>
Presentaciones en Póster	
S1-P1	Diferencias en fenoles, flavonoides, flavonoles y actividad antioxidante totales entre 24 cultivares de tápenas de dos subespecies, <i>spinosa</i> y <i>rupestris</i> . <i>M. Grimalt, M.S. Almansa, S. García, F. Hernández, P. Legua y A. Amorós.</i>
11:15-11:30	Pausa Café
Sesión 2	Horticultura, Citricultura, Fruticultura, Viticultura y Protección de Cultivos. Moderador: Dr. Jesús García Brunton (IMIDA, Murcia)
Presentaciones Orales	
S2-O1 11:30-11:45	Influencia del envejecimiento sobre la composición volátil y sensorial del vino tinto. <i>J. González-Sánchez, F. Burló y L. Noguera-Artiaga.</i>
S2-O2 11:45-12:00	Estudio sobre calidad sensorial y aromática de vino tinto. <i>A. Grao-Ruiz, P. J. Zapata y L. Noguera-Artiaga.</i>
S2-O3 12:00-12:15	Influencia de las propiedades del suelo en mostos de la variedad Monastrell en la Comarca del Noroeste-Región de Murcia. <i>M.A. Martínez, N. Martí, E. Martínez-Sabater y C. Paredes.</i>
S2-O4 12:15-12:30	Efecto del tratamiento de limoneros con melatonina sobre la producción y calidad del fruto. <i>F. Badiche, M. Serrano, J.M. Valverde, A. Carrión-Antolí, D. Martínez-Romero, D. Valero, S. Castillo.</i>
S2-O5 12:30-12:45	Los tratamientos con melatonina de cerezos 'Sweet Heart' aumentan el rendimiento del cultivo y la calidad del fruto en la recolección y durante la conservación. <i>M.V. Arias A. Carrión, F. Garrido, J.M. Lorente, P.J. Zapata, D. Valero, M. Serrano.</i>
S2-O6 12:45-13:00	La aplicación precosecha de jasmonato de metilo incrementa el rendimiento y la calidad del cultivo de pimiento verde. <i>A. Dobón-Suárez, M.J. Giménez, M.E. García-Pastor y P.J. Zapata.</i>
S2-O7 13:00-13:15	Caracterización temporal del limón mediterráneo para su aprovechamiento en la industria del zumo. <i>M.J. Rubio-Martínez, M.J. Giménez, M.E. García-Pastor, V. Serna-Escolano y P.J. Zapata.</i>

Sesión 3	Economía Agraria y Gestión de Empresas. Moderador: Dra. Margarita M. Brugarolas (UMH, Orihuela)
	Presentaciones Orales
S3-O1 13:15-13:30	Estudio a consumidores sobre la aceptación de carne de cordero trashumante. <i>A. Ros Almela, N. Godoy Morales y L. Martínez-Carrasco Martínez.</i>
S3-O2 13:30-13:45	Black soldier fly (<i>Hermetia illucens</i>) breeding and processing company in Aranda de Duero (Burgos). <i>P. Saiz Valle, I. Blanco-Gutiérrez, L. Luna.</i>
S3-O3 13:45-14:00	Aspectos valorados por los consumidores a la hora de comprar o consumir ensaladas de IV gama. <i>J.M. Lorente, M. Serrano y M.T. Pretel.</i>
14:00-15:00	Pausa Comida
Sesión 4	Producción, Bienestar, Genética y Calidad en la Producción Animal. Moderador: Dr. Alberto Atzori (UNISS, Sassari, Italia)
	Presentaciones Orales
S4-O1 15:00-15:15	Crioconservación de dos líneas de conejos seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada. <i>B. Ruiz, M.L. García y M.J. Argente.</i>
S4-O2 15:15-15:30	Conductas individuales y expresiones faciales en ovinos estabulados criados libres de parásitos gastrointestinales. <i>A.A. Luna Bojórquez, P.G. González Pech, F.A. Méndez Ortiz, C.A. Sandoval Castro, J.F.J. y Torres Acosta.</i>
S4-O3 15:30-15:45	Estudio del porcentaje de inclusión de subproducto de alcachofa (brácteas) en dietas de cabras lecheras para una producción sostenible y circular. <i>P. Monllor, R. Muelas, A. Roca, E. Sendra, J.R. Díaz y G. Romero</i>
	Presentaciones en Póster
S4-P1	Las actividades formativas del IFAPA en el sector ganadero, en la provincia de Almería. <i>S. Aparicio, A. González, V. Navarro, L. Lara, S. Parra, y M.C. García-García.</i>

Sesión 5	Agricultura Sostenible. Cambio Climático y Estrés Ambientales. Moderador: Dr. José Antonio Sánchez Zapata (UMH, Elche)
	Presentaciones Orales
S5-O1 15:45-16:00	Optimización de un método para evaluar la capacidad antifúngica de extractos de cianobacterias. <i>M.P. Marí, A.D. Asencio, M.T. Pretel y G. Díaz</i>
S5-O2 16:00-16:15	Mejora de la sostenibilidad del cultivo de fresa: mecanismos fisiológicos desencadenados por bacterias PGP bajo condiciones subóptimas de fertilización. <i>E. Romano, J.V. García López, N.J. Flores-Duarte, S. Merino, J. Mesa-Marín, I.D. Rodríguez-Llorente, S. Redondo-Gómez, E. Pajuelo y E. Mateos-Naranjo.</i>
S5-O3 16:15-16:30	Estudio de caracterización de suelos contaminados con ceniza volcánica y forraje destinado a consumo animal en la zona de Bilbao-Ecuador. <i>L. Carrera-Beltrán, I. Gavilanes-Terán, J. Idrovo-Novillo, V. H. Valverde, T. Albán-Guerrero, S. Ruiz- Illapa, C. Paredes y A.A. Carbonell-Barrachina.</i>
S5-O4 16:30-16:45	Influencia de la micorrización con <i>Glomus sp.</i> sobre sustancias farmacológicamente activas en el cultivo de <i>Cistus albidus</i> L. <i>D. Raus de Baviera, E. M. Losada-Echeberría, F. J. Álvarez-Martínez, F. Borrás-Rocher, E. Barrajon-Catalán y A. Ruiz Canales.</i>
S5-O5 16:45-17:00	Especies de <i>Variovorax</i> asociadas al nódulo que mejoran el crecimiento y la nodulación de <i>Medicago sativa</i> en situaciones de estrés. <i>N.J. Flores-Duarte, J. Pérez-Pérez, E. Mateos-Naranjo, S. Redondo-Gómez, E. Pajuelo, I.D. Rodríguez-Llorente y S. Navarro-Torre.</i>
S5-O6 17:00-17:15	Aplicaciones con poliaminas en floración y durante el desarrollo en el árbol reducen fisiopatías e incrementan la calidad de cereza (<i>Prunus avium</i> L.) de la IGP montaña de Alicante <i>M. Nicolás, M.C. Ruiz-Aracil, A. Carrión-Antolí, J.M. Lorente-Mento, J.M. Valverde y F. Guillén.</i>
S5-O7 17:15-17:30	Climate change, food crisis, Covid-19 in Mozambique. <i>Jérôme Etsong Mbang.</i>
	Presentaciones en Póster
S5-P1	Biofertilizantes: herramientas para optimizar la producción de fresa con reducciones de riego y fertilización química. <i>J.V. García López, N.J. Flores-Duarte, E. Romano, J. Mesa-Marín, I.D. Rodríguez-Llorente, S. Redondo-Gómez, E. Pajuelo y E. Mateos-Naranjo.</i>
S5-P2	Efecto de la aplicación de biofertilizantes basados en hongos micorrícicos y <i>Trichoderma harzianum</i> en el desarrollo de plantas de puerro. <i>G. Díaz, V. Fernández y P. Torres</i>

17:30-17:45	Pausa Café
Sesión 6	Gestión y Valorización de Residuos Orgánicos en la Agricultura. Moderador: Dr. Antonio Rosal Raya (UPO, Sevilla)
	Presentaciones Orales
S6-O1 17:45-18:00	Efectos del tipo de estiércol en la evolución de su co-compostaje con residuos vegetales y en la calidad agronómica del compost obtenido. <i>C. Santiago-Cubas y C. Paredes.</i>
S6-O2 18:00-18:15	Aplicación agronómica de los digeridos procedentes de residuos de frutas y verduras. <i>C. Álvarez, M.P. Bernal y R. Clemente.</i>
S6-O3 18:15-18:30	Importancia del manejo de pilas de compostaje en la evolución y calidad del compost en Liria (Valencia) <i>I.O. Medina Benavides, M.T. Fernández Suarez, A. Pérez Espinosa, M.D. Pérez Murcia y R. Moral.</i>
S6-O4 18:30-18:45	Caracterización de residuos orgánicos agrícolas y ganaderos generados en la provincia de Chimborazo (Ecuador) para el estudio de alternativas a su gestión actual. <i>V.H. Valverde, I. Gavilanes-Terán, J. Idrovo-Novillo, L. Carrera-Beltrán, S. Buri Tanguila, K. Salazar García y C. Paredes.</i>
S6-O5 18:45-19:00	Combined effect on substrate, plastic biofilm and earthworms (<i>Eisenia fetida</i>) in presence of different type of plastic material under vermicomposting. <i>Z. Emil Blesa, Marcela Pedraza-Torres, J.A. Sáez, J.C. Sánchez-Hernández y R. Moral.</i>
S6-O6 19:00-19:15	Efecto sobre la calidad del fruto del naranjo Navel v. Chislett Summer empleando varias opciones de manejo agronómico en una finca del sureste español. <i>S. Sánchez Méndez, E. Martínez Sabater, A. Pérez Espinosa, J. Sáez Tovar y R. Moral.</i>
S6-O7 19:15-19:30	Presencia de plaguicidas en mezclas iniciales y compost maduros de productores agroecológicos. El rol del compostaje en su eliminación. <i>A. García-Rández, M.T. Fernández-Suárez, M.D. Pérez-Murcia y R. Moral.</i>
	Presentaciones en Póster
S6-P1	Valorización de residuos de la industria agroalimentaria mediante compostaje. <i>C. Álvarez, M.D. Pérez-Murcia, R. Moral, J.A. Pascual, M. Ros, C. Egea-Gilabert, J.A. Fernández y M.A. Bustamante.</i>

Sesión 7	Instalaciones Industriales y Agrícolas. Moderador: Dr. Andrés Fernando Jiménez López (Universidad de los Llanos, Colombia)
	Presentaciones Orales
S7-O1 19:30-19:45	Diseño de un velocímetro de banda de rodadura para ensayo de velocidad máxima en ciclomotor de 2 ruedas (L1/L1e) en condiciones estáticas. <i>M.M. Paricio-Caño y M. Ferrández-Villena.</i>
	Presentaciones en Póster
S7-P1	Empleo de nariz, lengua y ojo electrónicos de bajo coste para el monitoreo de procesos agroalimentarios. <i>M. Fernández, M. Ferrández-Villena, M. Oates, C. Molina, A. Conesa, J. Ramos, N. Abu Khalaf y A. Ruiz Canales.</i>
S7-P2	Empleo de nariz electrónica de bajo coste en el monitoreo de colmenas de abejas. <i>E. González, M.A. Madueño y A. Ruiz Canales.</i>
19:45-20:15	Presentaciones de los Pósteres del día 1 (Sesiones 1-7)

Fecha	17 de septiembre de 2021
Sesión 8	Gestión del Agua, Nutrición y Energía en Horticultura. Moderador: Dr. Alejandro Galindo Egea (Departamento de Agronomía, Universidad de Sevilla)
	Presentaciones Orales
S8-O1 9:00-9:15	Estimación de la huella de carbono: caso práctico en diez Comunidades de Regantes. Estrategias para su reducción. <i>S. Colino Jiménez, A. Melián Navarro y A. Ruiz Canales.</i>
S8-O2 9:15-9:30	Obtención automática del punto de capacidad de campo a través de sensores de humedad de suelo. <i>M. Soler-Méndez, D. Parras-Burgos, A. Cisterne-López, E. Mas-Espinosa, J.M. Molina-Martínez y D. Intrigliolo.</i>
S8-O3 9:30-9:45	Aplicaciones de teledetección para la mejora del riego de granado en la Vega Baja del Segura (Alicante, España). <i>J. Solano-Jimenez, S. Rodriguez-Cámara, H. Puerto-Molina y J.M. Cámara-Zapata.</i>
	Presentaciones en Póster

S8-P1	Determinación de la variación de la huella hídrica y la huella de carbono en una comunidad de regantes como medida de la mejora medioambiental de las instalaciones. Aplicación a un caso de estudio. <i>F. López Peñalver, J. Chazarra Zapata, A. Melián Navarro y A. Ruiz Canales.</i>
Sesión 9	Usos del Territorio. Valoración de Recursos Agrarios. Desarrollo Rural. Moderador: Dra. María Dolores de Miguel (UPCT, Cartagena)
	Presentaciones Orales
S9-O1 9:45-10:00	Diversidad social y agroambiental en los paisajes mediterráneos costeros: el ENP La Muela y Cabo Tiñoso (Cartagena – Murcia). <i>J. Martínez Sánchez y L. Martínez-Carrasco Martínez.</i>
S9-O2 10:00-10:15	Gotas de tierra: Mejora de las parcelas de cultivo, la equidad y seguridad alimentaria de mujeres rurales en Colombia desde la perspectiva de los ODS. <i>P. Espitia-Zambrano y J.A. Pérez-Álvarez.</i>
	Presentaciones en Póster
S9-P1	Peligrosidad del combustible en la Región de Murcia. El abandono de los cultivos agrícolas incrementa el riesgo de incendio en la interfaz urbano-forestal <i>J.F. Sarabia y M.T. Pretel.</i>
S9-P2	Desarrollo territorial en las marismas de la margen izquierda del Guadalquivir. <i>M.A. Falcón Sánchez</i>
Sesión 10	Procesado e Innovación en Productos de Origen Animal. Moderador: Dr. José Manuel Lorenzo Rodríguez (Centro Tecnológico de la Carne, CTC, Galicia)
	Presentaciones Orales
S10-O1 10:15-10:30	Reformulación de hamburguesas de ternera con geles de emulsiones de agua y aceites vegetales. <i>A. Gea-Quesada, E. Sayas-Barberá, C. Botella-Martínez y M. Viuda-Martos.</i>
S10-O2 10:30-10:45	Aplicación de un subproducto de mango como antioxidante en un producto cárnico. <i>L. Morocho, F. Reyes, M.C. Guamán-Balcázar</i>
10:45-11:00	Pausa Café

S10-O3 11:00-11:15	Caracterización de queso curado de oveja con y sin DOP Manchego basado en el perfil de compuestos volátiles, pH, humedad y ATR-FTIR.
-----------------------	--

	<i>R. Pesci de Almeida, K. A. Iglar, M. Cano-Lamadrid, E. Sendra, A. Beltrán y A. Valdés.</i>
S10-O4 11:15-11:30	Reducción parcial de sal y grasa en salchichas tipo Frankfurt con adición de harinas de <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> . <i>M.I. Cerón-Guevara, E. Rangel-Vargas, J.M. Lorenzo, R. Bermúdez, M. Pateiro, J.A. Rodríguez, I. Sánchez-Ortega y E.M. Santos.</i>
S10-O5 11:30-11:45	Efecto de la incorporación un coproducto de semillas de chía a un embutido sobre las propiedades fisicoquímicas durante la etapa secado-maduración. <i>J. García-Martín, A. Roldán-Verdú y J.A. Pérez-Álvarez.</i>
Presentaciones en Póster	
S10-P1	Modificación del perfil lipídico en salchichas tipo Frankfurt mediante una emulsión gelificada a base de trigo sarraceno y aceite de cáñamo. <i>C. Botella-Martínez, J. Fernández-López, J.A. Pérez-Álvarez y M. Viuda-Martos.</i>
S10-P2	Aplicación de agentes de carga de aceite de oliva para desarrollar salchichas Frankfurt saludables y sostenibles. <i>T. Pintado, A.M. Herrero y C. Ruiz-Capillas.</i>
Sesión 11	Postcosecha y procesado de productos vegetales. Moderador: Dr. Lorenzo Ángel Zacarías (IATA, Valencia)
Presentaciones Orales	
S11-O1 11:45-12:00	Efectos del tratamiento en precosecha con melatonina sobre los parámetros de calidad en granada ‘Mollar de Elche’. <i>F. Garrido, J.M. Lorente-Mento, D. Valero y M. Serrano.</i>
S11-O2 12:00-12:15	Proteína PeAfpA: optimización de su producción biotecnológica y aplicación en patosistemas postcosecha. <i>C. Roperó, J.F. Marcos y P. Manzanares.</i>
S11-O3 12:15-12:30	Sustancias de origen natural frente a compuestos comerciales de origen artificial: efecto sobre la prolongación del almacenamiento refrigerado de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) y el mantenimiento de compuestos bioactivos. <i>E. Bernabé-García, M.C. Ruiz-Aracil, F. Guillén y J.M. Valverde.</i>

S11-04 12:30-12:45	Aplicación de tratamientos post-cosecha para incrementar la calidad durante el almacenamiento de aguacate (<i>Persea americana</i> M.). <i>M.I. Madalina-Ilea, M.C. Ruiz-Aracil, J.M. Valverde, M. Nicolás y F. Guillén.</i>
S11-05 12:45-13:00	Aprovechamiento de un subproducto de la industria de aceituna para el desarrollo de alimentos con un valor añadido. <i>M. Ródenas, M.J. Giménez, M.E. García-Pastor y P.J. Zapata.</i>
S11-06 13:00-13:15	Mejora de la conservación de la granada “Mollar de Elche” mediante tratamientos precosecha con Jasmonato de Metilo. <i>A.M. Codes-Alcaraz, A. Dobón-Suárez, M.E. García-Pastor y S. Castillo.</i>
S11-07 13:15-13:30	Efecto de la aplicación postcosecha de nitroprusiato de sodio sobre la calidad de limón ecológico. <i>A. Del Cerro, A. Dobón-Suarez, M.E. García-Pastor, M. Giménez y P.J. Zapata.</i>
S11-08 13:30-13:45	Melatonina aplicada como tratamiento en campo incrementa los sistemas antioxidantes en las cerezas ‘Prime Giant’. <i>A. Carrión-Antolí, F. Badiche, J.M. Lorente-Mento, F. Guillén, S. Castillo, M. Serrano y D. Valero.</i>
13:45-15:00	Pausa comida
Sesión 11- Continuación	Postcosecha y procesado de productos vegetales. Moderador: Dr. Salvador Castillo (UMH, Orihuela)
S11-09 15:00-15:15	Eliminación de etileno con un reactor de luz ultravioleta con titanio y su efecto sobre brócoli en condiciones de conservación. <i>A. Guirao, P. García-Ponsoda, S. Castillo, F. Guillén, M. Serrano y D. Martínez-Romero.</i>
S11-010 15:15-15:30	Efecto de una trampa de ozono acoplada a un eliminador de etileno fotocatalítico: caso práctico en tomate Raf. <i>P. García-Ponsoda, A. Guirao, J.M. Valverde, D. Valero y D. Martínez-Romero.</i>
S11-011 15:30-15:45	Evaluación de las condiciones de almacenamiento de hojas de <i>Aloe vera</i> para su comercialización en fresco. <i>A. Campaña, P. García-Ponsoda, A. Guirao y D. Martínez-Romero.</i>
S11-012 15:45-16:00	Estudio del contenido en polifenoles de cuatro variedades de alcachofa (<i>Cynara scolymus</i> L.): aptitud para cuarta gama. <i>M. Giménez-Berenquer, M. J. Giménez, P. Carbonell, J. A. Cabrera y P. J. Zapata.</i>

Sesión 12	Alimentación Funcional, Calidad Sensorial y Salud. Moderador: Dra. María José Frutos Fernández (UMH, Orihuela)
	Presentaciones Orales
S12-O1 16:00-16:15	Esteroles vegetales en matrices líquidas: obtención e incorporación en una bebida de frutas. <i>M. Álvarez-Henao, J. Londoño-Londoño y C. Jiménez-Cartagena.</i>
S12-O2 16:15-16:30	Efecto de endulzantes alternativos sobre la biodisponibilidad y bioactividad de antocianos y flavanonas de una bebida de maqui-limón. <i>V. Agulló, R. Domínguez-Perles y C. García-Viguera.</i>
S12-O3 16:30-16:45	Influencia de edulcorantes sobre compuestos bioactivos en un sistema modelo. <i>A. Bica, V. Agulló y C. García-Viguera.</i>
S12-O4 16:45-17:00	Microencapsulación de <i>L. Plantarum</i> en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica. <i>E. López-Martínez, M.J. Frutos y E. Valero-Cases.</i>
17:00-17:15	Pausa Café
S12-O5 17:15-17:30	Variabilidad de los parámetros de calidad funcional y sensorial de la canela molida. <i>C. Muñoz-Ezcurra, M. Cano-Lamadrid, E. Sendra, F. Hernández y L. Lipan.</i>
S12-O6 17:30-17:45	Comparación de distintos parámetros de quesos curados de oveja DOP Manchego (Denominación de Origen Protegida) vs no-DOP. <i>K. A. Iglar Marí, E. Sendra, A. Valdés García, A. Beltrán Sanahuja, R. Pesci De Almeida y M. Cano Lamadrid.</i>
S12-O7 17:45-18:00	Leche fermentada enriquecida con <i>Cinnamomum cassia</i> y <i>Cinnamomum verum</i> molida: efecto de la canela en la fermentación y calidad del yogur. <i>A. E. Vargas, M. Cano y E. Sendra.</i>
S12-O8 18:00-18:15	Caracterización de las flores y estigmas de <i>Crocus sativus</i> L. argelino y su valor como alimento. <i>R. Vicente, D. Cerdá, E. Valero y M.J. Frutos.</i>
S12-O9 18:15-18:30	Estudio del grado de implementación de Clean Label en alimentos de gran consumo en España: propuestas de mejora. <i>N. Jiménez-Redondo, M. Cano-Lamadrid y J. M. Valverde.</i>
S12-O10 18:30-18:45	Elaboración de cerveza artesana sin alcohol enriquecida funcionalmente con brotes de brócoli ecológico. <i>J. Gerth, A. Dobón-Suarez, M.E. García-Pastor, M. Giménez y P.J. Zapata.</i>
S12-O11	Revisión científica y visión del sistema de alertas RASFF del contenido de metales pesados en alimentos.

18:45-19:00	<i>R.M. Franco-Calderón, E. Sendra y M. Cano-Lamadrid.</i>
Presentaciones en Póster	
S12-P1	Composición nutricional y actividad antioxidante del azafrán (<i>Crocus sativus</i> , L.) y sus subproductos florales para el desarrollo de nuevos ingredientes funcionales. <i>D. Cerdá-Bernad, E. Valero-Cases y M.J. Frutos .</i>
S12-P2	Alteración de la microbiota intestinal en pacientes con COVID-19. <i>P. Bersano-Reyes y G. Nieto-Martínez.</i>
S12-P3	Aplicación de subproducto de mango como antioxidante en un producto de panadería. <i>J. Rueda, N. Ortega y M. Guamán.</i>
S12-P4	Caracterización de compuestos bioactivos de las semillas de dos cultivares de <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill. en condiciones homogéneas de cultivo. <i>L. Andreu-Coll, J. Kolniak-Ostek, A. Kita, J. Miedzianka, P. Legua y F. Hernández.</i>
S12-P5	Desarrollo de galletas funcionales sin gluten adaptadas a los requerimientos nutricionales de celíacos. <i>C. Campuzano y G. Nieto.</i>
19:00-20:00	Presentaciones de los Pósteres del día 2 (Sesiones 8-12)
20:00-20:30	Ceremonia de Clausura

Dr. Santiago García-Martínez (Presidente del Comité Organizador) Dra. María Serrano (Presidenta del Comité Científico)

Microencapsulación de *L. Plantarum* en cápsulas simples y de doble capa: efecto de las condiciones térmicas y de la digestión gastrointestinal sobre la viabilidad probiótica

E. López-Martínez¹, MJ. Frutos² y E. Valero-Cases¹

¹ Universidad Miguel Hernández, Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Ctra. Beniel km 3,2 03312 Orihuela, Alicante. e-mail: evelin.lopez@goumh.umh.es; e.valero@umh.es

² mj.frutos@umh.es

Resumen

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del huésped. Las técnicas de microencapsulación, permiten la introducción de probióticos en los alimentos mejorando su supervivencia. El objetivo de este trabajo fue la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* en cápsulas sin recubrimiento y con recubrimiento para evaluar el efecto de protección sobre la viabilidad de *L. plantarum* frente al proceso de producción, al estrés secuencial durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y a condiciones de alta temperatura (50-80 °C). La encapsulación simple se realizó usando la técnica de extrusión en matriz de alginato de sodio al 2 %, goma xantana y glicerol. Para crear una doble capa como cubierta protectora se usó agar-agar e inulina. También se analizaron las propiedades fisicoquímicas como el diámetro, la actividad de agua y la eficacia de encapsulación. Los resultados mostraron que la encapsulación con doble capa, mejoró la supervivencia y liberación del probiótico al finalizar el periodo de digestión gastrointestinal. A su vez, la capsulas con doble capa mostraron mejores propiedades termoprotectoras del microorganismo frente a las condiciones de tratamiento térmico, obteniendo mayor tasa de supervivencia que en las cápsulas sin recubrimiento, pudiendo ser de interés su inclusión en el desarrollo de alimentos funcionales.

Palabras clave: alginato, probiótico, supervivencia, digestión *in vitro*, extrusión.

Microencapsulation of *L. plantarum* in single and double-layer capsules: effect of thermal conditions and gastrointestinal digestion on probiotic viability

Abstract

Probiotics are living microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host. Microencapsulation techniques allow the introduction of probiotics into foods, improving their survival. The aim of this work has been the microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* in uncoated and coated capsules to evaluate the protective effect on the viability of *L. plantarum* against the production process, the sequential stress during the *in vitro* gastrointestinal digestion process and at high temperature conditions (50-80 °C). Simple encapsulation was performed using the 2% sodium alginate, xanthan gum and glycerol matrix extrusion technique. Agar-agar and inulin were used to create a double layer as a protective cover. Physicochemical properties such as diameter, water activity and encapsulation efficiency were also analyzed. The results showed that double layer encapsulation improved the survival and release of the probiotic at the end of the gastrointestinal digestion period. In turn, the double-layer capsules showed better thermoprotective properties of the microorganism against heat treatment conditions, obtaining a higher survival rate than the capsules without coating, and their inclusion in the development of functional foods may be of interest.

Keywords: alginate, probiotic, survival, *in vitro* digestion, extrusion.

1. Introducción

Actualmente, los consumidores muestran una creciente preocupación por la seguridad y calidad de los alimentos, ya que son conscientes de la relación entre la alimentación y la prevención de enfermedades (Reque y Brandelli, 2021). Por lo tanto, la industria alimentaria presenta un gran interés en el desarrollo de nuevos alimentos que contribuyan al bienestar y mejora de la salud de los consumidores (Yao et al., 2020). Estos alimentos reciben el nombre de “alimentos funcionales” donde uno o varios de sus componentes aportan propiedades nutricionales que generan un efecto beneficioso en el organismo, mejorando la salud y disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades (cardiovasculares, diabetes y obesidad entre otras) (Santini et al., 2018). Dentro de los alimentos funcionales, destacan los alimentos probióticos, siendo “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped” (FAO/OMS, 2001). Estos microorganismos deben estar identificados a nivel de género, especie y cepa, ya que los efectos beneficiosos pueden diferir entre diferentes cepas de la misma especie. Además, no deben presentar virulencia alguna para el consumidor. Por lo tanto, los probióticos son organismos reconocidos como seguros (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) y con presunción cualificada de seguridad (QPS), por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es decir, tras su evaluación mediante pruebas, concluyen que la cepa microbiana en estudio, no genera problemas de seguridad y pueden estar destinados para el consumo.

Entre los más relevantes, se encuentran las bifidobacterias y las bacterias del ácido láctico (BAL), siendo los lactobacilos los más destacados. Entre los efectos beneficiosos de estos probióticos se incluye la inhibición de microorganismos patógenos en el intestino, producción de ácidos grasos de cadena corta, degradación de toxinas, y la modulación de la respuesta inmune (Rodrigues et al. 2020). Además de obtener resultados prometedores en la prevención del cáncer de colon, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple y Parkinson (Leta et al., 2021).

Sin embargo, para asegurar su viabilidad y que se cumplan sus efectos beneficiosos, su concentración en el momento del consumo, debe estar entre 10^6 - 10^7 UFC/g o mL (FAO/OMS, 2001). No obstante, la introducción y supervivencia de probióticos en alimentos está limitada por la matriz alimentaria: pH, concentración de oxígeno, aw, sólidos solubles, así como el tratamiento térmico y agitación durante la elaboración del alimento. A nivel fisiológico, son susceptibles al pH ácido del estómago y a la exposición de las sales biliares intestinales (Frakolaki et al., 2021). Por lo tanto, para asegurar la viabilidad y la correcta liberación de microorganismos en el intestino, se han desarrollado diferentes tecnologías de microencapsulación microbiana en matrices poliméricas. Las técnicas más utilizadas son: extrusión, emulsión, secado por aspersión, secado por aspersión a vacío ultrasónico, liofilización y gelificación enzimática entre otras (Liu et al. 2019). Consisten en aislar o recubrir a los microorganismos mediante procesos mecánicos o fisicoquímicos para que lleguen viables al final del tracto digestivo. El uso de una determinada técnica dependerá del compuesto que se desea encapsular, de las características físico-químicas del material utilizado como agente encapsulante y que la matriz polimérica utilizada presente propiedades protectoras contra pH ácidos y no sea citotóxica para que la integridad del microorganismo no pueda verse afectada (Wu y Zhang, 2018). Entre las matrices de microencapsulación más utilizadas de probióticos se encuentra el alginato, por sus propiedades estabilizantes, espesantes y gelificantes. Es un heteropolisacárido lineal e hidrofílico procedente de algas marinas. Está formado por los monómeros del ácido α -L-gulurónico y el ácido β -D-manurónico responsables de la resistencia del gel. Es un material económico, no es tóxico, termoestable, de fácil uso y está aprobado como aditivo alimenticio (Haghshenas et al., 2015).

Entre las diferentes técnicas, destaca la encapsulación de extrusión por ser una técnica sencilla y viable económicamente (Rodrigues et al., 2020). La extrusión se basa en formar una solución hidrocoloide con alginato de sodio y el microorganismo a encapsular, extrusionando la solución formada con una jeringuilla y aguja mediante una presión constante sobre una solución de CaCl_2 , donde se forma la cápsula de manera instantánea e irreversible en contacto con el ion de calcio por desplazamiento de los iones de sodio del alginato (Chen et al., 2017). Según la concentración de alginato de sodio empleada se obtiene diferentes variaciones en la viscosidad del gel que pueden influir en el tamaño de las cápsulas (Martín et al., 2014).

No obstante, la técnica por extrusión con alginato de sodio utilizada para la microencapsulación de probióticos, presenta ciertas desventajas, ya que las cápsulas presentan una pared porosa, dando lugar a una baja retención de bacterias, así como la degradación del polímero tras una exposición prolongada a altas temperaturas y pH ácido. Para prevenir estos inconvenientes, se ofrecen alternativas como la creación de una capa múltiple que rodee la cápsula ayudando a preservar la viabilidad y retención del probiótico. En la formación de cápsulas con multi-polisacáridos, la inulina y el agar-agar pueden ser una alternativa en la monitorización de la supervivencia de probióticos (Zaeim et al. 2020). La inulina, es un prebiótico, que mejora la supervivencia del microorganismo durante el proceso de elaboración y digestión gastrointestinal (Valero y Frutos, 2015). El agar-agar es un polisacárido compuesto por unidades monoméricas repetidas de agarobiosa, con gran capacidad gelificante, capacidad de unión con otras moléculas y tolerante a condiciones ácidas, y, por lo tanto, idóneo frente a la acidez estomacal (Bilal et al., 2016).

Aunque diferentes estudios han demostrado que la encapsulación con alginato favorece la viabilidad celular de *Lactobacillus* durante el procesado y tras someterse a condiciones gástricas (Dimitrellou et al., 2019), existen escasas investigaciones sobre la supervivencia de los probióticos sometidos a digestión *in vitro* utilizando diferentes matrices protectoras en su encapsulación.

De este modo, el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar cápsulas con alginato de sodio simples sin recubrimiento (CN) y cápsulas con recubrimiento doble capa (CM) para evaluar su efecto protector sobre la viabilidad de *L. plantarum* encapsulado frente al estrés secuencial del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y a condiciones de alta temperatura (50-80 °C). Además de analizar propiedades fisico-químicas como actividad de agua, diámetro de la cápsula y capacidad de hinchamiento.

2. Material y Métodos

2.1. Probiótico y condiciones de cultivo

Lactobacillus plantarum (LP) CECT 220 se adquirió de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Para obtener un recuento microbiano inicial en torno a 10^8 UFC/mL, se siguió el método según Valero y Frutos (2015). El microorganismo se resuspendió en 10 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid; Madrid, España) se incubó durante 24 h a 37 °C obteniendo así el preinóculo microbiano. Posteriormente, un 1% (v/v) de este preinóculo, se inoculó en 100 mL de caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 24 h. Mediante centrifugación se separó la biomasa a 2000 x g durante 10 minutos a 4 °C (Centrigue C30P, B Braum Biotech International). Para eliminar el MRS residual, se lavó el sedimento obtenido en la centrifugación con tampón fosfato salino estéril (PBS) (Sigma, España) y se almacenó -80 °C en crioviales con 10% (v/v) de glicerol como crioprotector.

2.2. Método de encapsulación por extrusión

La solución de alginato se preparó con glicerol al 5% (p/v), alginato de sodio al 2% (p/v) y goma xantana al 0,15% (p/v) en agua. A continuación, la mezcla se homogeneizó en un ULTRA-TURRAX™ (modelo T18 Basic) a 3000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió *L. plantarum*, a una concentración de 1:10 (cultivo microbiano: solución de alginato). La suspensión de alginato y el probiótico se cargó en una jeringa de 5 mL con una aguja de 25G x 16 mm. Posteriormente, la solución de alginato se dejó caer a una distancia de 5 cm sobre una solución 1 M de CaCl₂ (Scharlau; Barcelona, España). Las microcápsulas una vez formadas se dejaron reposar en la solución de CaCl₂ bajo agitación constante de 100 rpm durante 30 minutos para su endurecimiento.

2.3. Recubrimiento doble capa de las cápsulas

La preparación del hidrocólide protector se preparó con agar-agar e inulina al 1% (p/v), respectivamente. Posteriormente, el 50% de las cápsulas probióticas de alginato obtenidas con el método de extrusión, se sumergieron en dicha solución durante 30 minutos a 300 rpm. Una vez formada la matriz protectora, las cápsulas se lavaron con agua para retirar el exceso de la solución hidrocólide protectora.

2.4. Viabilidad de la cepa microbiana

La viabilidad de *L.plantarum* se obtuvo mediante recuento en placa, diluyendo en 9 mL de agua de peptona estéril (Oxoid; España), 1 mL de LP libre en la solución de alginato de sodio o 1 g de cápsulas probióticas. El probiótico, se liberó de las cápsulas con ayuda de un homogeneizador de paletas (modelo BagMixer 400 W) durante 5 minutos. A continuación, se realizaron diluciones seriadas sembrando 0,1 mL en placas de MRS agar (Scharlau; España) y se incubaron en condiciones aeróbicas a 38 °C durante 48 h. Los resultados se expresaron en Log UFC/mL ó g⁻¹ de microcápsulas.

2.5. Eficacia de la encapsulación

La eficiencia de encapsulación en los diferentes tipos de cápsulas (simple y doble capa), se calculó mediante la fórmula utilizada por Braber et al. (2020):

$$EE (\%) = [\text{Log } N / \text{Log } N_0] \times 100 \text{ (eq. 1)}$$

Siendo, Log N₀ el recuento obtenido del microorganismo sin encapsular (LP + alginato sódico) y Log N el microorganismo encapsulado. Los resultados se expresaron como Log UFC/mL.

2.6. Tolerancia de *L.plantarum* a la digestión gastrointestinal *in vitro*

Se estudió la supervivencia de LP durante la digestión gastrointestinal, siguiendo el método propuesto por Valero y Frutos (2017). La simulación de los jugos gástricos (SJG) se prepararon con una solución de PBS y 3 g/L de pepsina (Sigma; España) acidificando el medio con 1 M HCl (Panreac; España) hasta alcanzar un pH 2. Se agregaron 10 g de los diferentes tipos de cápsulas por separado, en dos vasos de precipitado con 250 mL de SJG incubándose durante 60 minutos a 37 °C y 150 rpm. Transcurrido este tiempo, se tomó 1 g de cada tipo de cápsulas y 1 mL de los respectivos medios de SJG para comprobar la viabilidad de LP siguiendo el punto 2.4. Para la simulación de la digestión intestinal (SJI), el pH de la solución SJG, se neutralizó con 1 M NaHCO₃ (Panreac; España) para detener la reacción enzimática. Posteriormente, se añadió 1 g/L de pancreatina y 4,5 g/L de sales biliares (Sigma; España). Esta solución se mantuvo a 37 °C durante 60 minutos. Pasado el tiempo de SJI, se recogió 1 gramo de los diferentes tipos de cápsulas y de los respectivos medios de SJI. A continuación, estas muestras se sembraron en placas en MRS agar, diluyendo 1 mL de cada muestra en PBS o 1 g en el caso de las cápsulas, siguiendo el protocolo del punto 2.4.

2.6. Tratamiento térmico

La tolerancia de LP al tratamiento térmico se evaluó sometiendo al microorganismo encapsulado y sin encapsular a diferentes temperaturas. Las diferentes cápsulas y el LP libre se introdujeron por separado en agua a 50 y 80 °C en una proporción 1:10 (p/v) bajo una agitación constante de 200 rpm durante 1 y 5 minutos. Inmediatamente después, las cápsulas se atemperaron con agua fría para detener la actividad térmica. Una vez enfriadas, se cogió 1 g de las diferentes muestras o 1 mL de agua para comprobar la viabilidad de LP siguiendo el protocolo del punto 2.4.

2.7. Actividad de agua

La actividad de agua (aw) de las diferentes cápsulas se determinó mediante un medidor de actividad de agua (Novasina aw-Sprint TH500: Pfaffikon, Zurich, Suiza).

2.8. Morfología y tamaño de las microcápsulas

Se midió el diámetro de 20 cápsulas de cada tipo, con ayuda de un micrómetro calibrador digital eléctrico (Insize IP65, España) expresando las medidas en mm. La morfología superficial de las cápsulas se observó con un estereoscopio Leica MZ95 (Leica, España) antes y después de las diferentes fases de digestión gastrointestinal.

2.9. Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados por triplicado. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación típica. La comparación de medias fue evaluada por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey determinando las diferencias significativas ($p < 0,05$). Se utilizó el paquete de software SPSS v 21.0 (Inc., Chicago-Illinois-USA).

3. Resultados y discusión

3.1. Supervivencia de *L. plantarum* en diferentes matrices protectoras durante la digestión *in vitro*

La supervivencia de *L. plantarum* antes de la exposición a condiciones gastrointestinales *in vitro*, no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes tipos de cápsulas siendo la concentración inicial de 8,31 y 8,34 Log UFC/g para CN y CM, respectivamente (figura 1). Tras el periodo de digestión gástrica, la viabilidad del probiótico en las CN disminuyó un 12,63 % con respecto a la concentración inicial. Al mismo tiempo, se observó la misma concentración de células viables dentro de las cápsulas y en el medio gástrico alcanzando una concentración de 7,26 y 7,17 Log UFC/g respectivamente. Esto pudo ser debido a la migración de LP hacia el medio gástrico causado por la elevada porosidad de las CN. Sin embargo, en cápsulas de doble capa, la viabilidad de *L. plantarum* no mostró diferencias significativas con respecto de la concentración inicial. Sin embargo, al comparar la presencia de LP en el medio gástrico, se observó que fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en las CN respecto de las CM, con una diferencia de 2,55 Log UFC/g entre ambos tipos de cápsulas. Por lo tanto, en condiciones de digestión gástrica, la supervivencia del probiótico en el interior de cápsulas con matriz protectora fue mayor respecto de las CN (8,21 y 7,26 Log UFC/g, respectivamente). Por lo que, se puede afirmar que la matriz protectora permitió mantener la integridad estructural de la cápsula, evitando la liberación del probiótico al medio gástrico, como si ocurrió en cápsulas sin recubrimiento (CN). Del mismo modo, se observaron resultados similares en investigaciones realizadas con *Bifidobacterium BB-12* donde tras la simulación gástrica, la tasa de supervivencia más alta de bifidobacterias se dio en aquellas microcápsulas cuya cubierta estaba enriquecida con prebióticos como inulina y oligofructosa en comparación con las células libres (Fritzen-Freire et al., 2013). En comparación con otros estudios, se confirmó que en cápsulas con solo alginato a pH 2 (condición estomacal) se produce un hinchamiento de las cápsulas, ya que bajo estas condiciones aumenta la hidrofobicidad y la porosidad del alginato de sodio, lo que conlleva a una disociación prematura de la cápsula y la liberación de la carga probiótica (Liu et al., 2019).

Después de la digestión intestinal, la viabilidad del probiótico en cápsulas normales disminuyó un 28 % ($p \leq 0,05$) con respecto a la viabilidad gástrica y 13 % respecto a la viabilidad obtenida en las cápsulas con recubrimiento. La pérdida de viabilidad total tras las condiciones intestinales fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en el interior de cápsulas normales con un 37,06 % mientras en cápsulas de doble capa se mantuvo el valor de pérdida de viabilidad del 13 %. Por lo tanto, la viabilidad en estas últimas fue mayor consiguiendo una liberación mayor y más controlada del probiótico al medio intestinal, alcanzando concentraciones igualitarias tanto en los jugos intestinales simulados como en el interior de las cápsulas. Por lo tanto, se podría afirmar que la migración de LP al medio intestinal, ocurre al aumentar el pH (6,5- 7) provocando mayor difusión a través de los poros en la red del polímero tras condiciones intestinales (Muhammad et al., 2021), de manera que el probiótico llegaría al órgano diana pudiendo llegar a generar efectos beneficios en el hospedador. Por tanto, la supervivencia de LP en CM fue mayor que en CN, mostrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

entre ambos tipos de cápsulas. Por lo tanto, el recubrimiento con agar-agar e inulina como matriz protectora consigue una alta supervivencia de *L. plantarum* tras la digestión *in vitro*. No obstante, en futuras investigaciones, se podría estudiar aumentar el tiempo de la digestión intestinal para comprobar el tiempo necesario en alcanzar la completa migración en el medio intestinal.

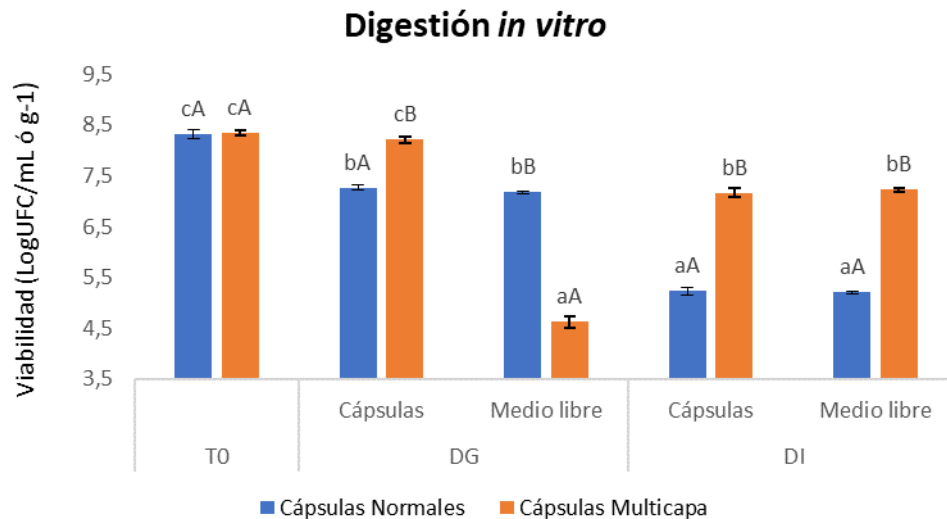


Figura 1. Viabilidad de *L. plantarum* en distintas matrices protectoras durante las diferentes fases de digestión *in vitro*. La desviación estándar se indica con las barras de error. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para el mismo tipo de cápsulas durante las diferentes fases de digestión gastrointestinal. Las letras mayúsculas manifiestan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos tipos de cápsulas para la misma fase de digestión gastrointestinal.

3.2. Tamaño y estructura de las cápsulas

En cuanto al tamaño de las cápsulas se observaron diferencias significativas en las cápsulas con recubrimiento donde se presentó inicialmente un tamaño significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en comparación con cápsulas sin envoltura (1,96 mm y 1,80 mm, respectivamente) (tabla 1). En estudios similares, con una concentración de alginato de sodio al 2% usando la técnica de extrusión, el tamaño promedio de las cápsulas con recubrimiento prebiótico (inulina o galactooligosacárido) fue mayor que las microcápsulas simples (Krasaekoopt y Watcharapoka, 2014). Por lo tanto, se puede afirmar que la adición de inulina y agar-agar aumentó el diámetro en las cápsulas de doble capa. Al comparar el tamaño de las cápsulas durante las diferentes fases de la digestión *in vitro*, se observó un aumento de diámetro en las diferentes cápsulas durante la digestión gástrica, donde las CN aumentaron significativamente su tamaño, pasando de 1,80 mm a 1,94 mm, mientras que en CM el aumento fue más significativo, pasando de 1,96 a 2,22 mm. De igual forma, ocurrió tras la digestión intestinal donde cápsulas normales y doble capa aumentaron significativamente ($p \leq 0,05$) su tamaño en un 22,6 % y 57 %, respectivamente al final del periodo de digestión. De manera general, conforme avanzaban las fases de la digestión, se produjo un aumento significativo ($p \leq 0,05$) del diámetro en ambos tipos de cápsulas, alcanzando el mayor tamaño al finalizar la digestión intestinal. Este incremento de tamaño en las CM puede deberse a que la presencia de polisacáridos como la inulina y el agar-agar provoca una mayor absorción de agua, lo que provoca un mayor hinchamiento de la cápsula. En el caso de cápsulas sin recubrimiento, durante la exposición gástrica, se pierde parte de la integridad de la cápsula de tal forma, que se produce un aumento de solutos hacia el interior de la cápsula, aumentando así su tamaño (Amorós López, 2013). En estudios previos con *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2409 encapsulado con un 2% de alginato, afirman que la viabilidad de las células en las microcápsulas, es mayor a mayor tamaño de cápsulas, debido a que el aumento de la viscosidad forma un gel más denso y reticulado (Rather et al., 2017). No obstante, el tamaño y la estructura de las cápsulas está determinada en gran medida por la eficacia de encapsulación: el tamaño de la aguja, la

concentración de alginato de sodio, la concentración de CaCl_2 y el método de microencapsulación utilizado (Valero y Frutos, 2015).

Tabla 1. *Tamaño de los diferentes tipos de cápsulas en cada etapa de digestión in vitro^a.*

	Diámetro (mm)		
	T0	DG	DI
CN	1,80 ± 0,14 aA	1,94 ± 0,11 bA	2,23 ± 0,14 cA
CM	1,96 ± 0,11 aB	2,22 ± 0,22 bB	2,79 ± 0,22 cB

^aLos resultados se expresaron con la media ± desviación estándar. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para el mismo tipo de cápsula antes y después de la digestión y las letras mayúsculas diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre distintos tipos de cápsulas.

Respecto a la apariencia de la superficie de las cápsulas (Figura 2), se pueden observar diferentes cambios. Tras la simulación gástrica, las cápsulas normales presentan una superficie irregular, rugosa, agrietada y con hendiduras. Esto puede ser debido a la pérdida de permeabilidad de la pared de las cápsulas y el aumento de la porosidad, a causa de los cambios de pH de las condiciones gastrointestinales (Amorós López, 2013). Sin embargo, en cápsulas con doble revestimiento se observó una superficie más compacta, continua y firme. Por este motivo, las cápsulas de doble capa protegen de manera más eficaz la viabilidad de las células probióticas dentro de la matriz durante el procesamiento (Rather et al., 2017).

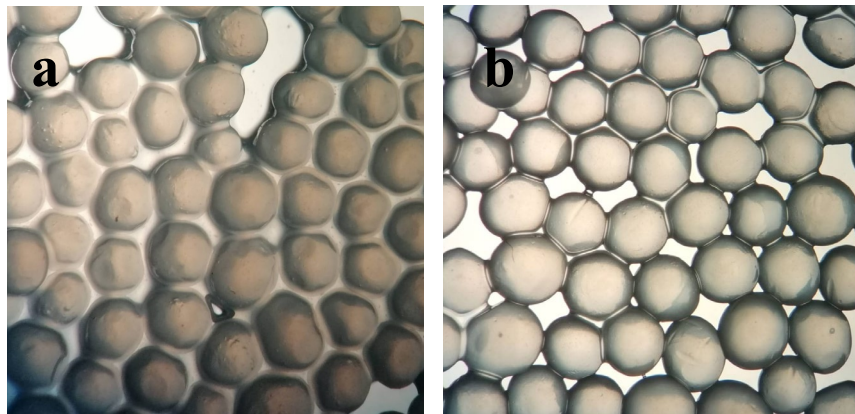


Figura 2. (a) Cápsulas simples y (b) cápsulas de doble capa después de la digestión in vitro

3.3. Viabilidad de *L.plantarum* libre y encapsulado a diferentes intervalos de tiempo y temperatura

Al someter a LP a diferentes intervalos de tiempo y temperatura tanto libre como encapsulado en CN y CM (Figura 3), se observó una disminución de la viabilidad celular significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en LP libre. Conforme aumenta el tiempo y la temperatura de exposición, la viabilidad de LP fue disminuyendo desde concentraciones iniciales de 8,31 Log UFC g^{-1} en CN y 8,34 Log UFC/g en CM hasta 7,27 Log UFC/g y 8,27 Log UFC/g respectivamente al minuto y 50 °C llegando a no presentar viabilidad en las condiciones más extremas de tiempo y temperatura (80 °C y 5 minutos) en LP libre. Sin embargo, en cápsulas normales a los 5 minutos y 50 °C, se observó una supervivencia de 7,22 Log UFC/g y 8,21 Log UFC/g en cápsulas de doble capa manteniendo la viabilidad sin diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al primer minuto de exposición térmica. De esta manera, durante 1 minuto a 80 °C, el mayor recuento de células vivas se observó en CM (8,03 Log UFC/g) seguido de CN (6,51 Log UFC/g) y por LP libre en el medio (4,87 Log UFC/mL). Sin embargo, cuando las cápsulas y el LP libre, se sometieron a una temperatura de 80 °C durante 5 minutos, no se observó viabilidad en el microorganismo libre, aunque en ambos tipos de cápsulas se observó supervivencia

probiótica. Sin embargo, fue significativamente menor en CN (5,06 Log UFC/g) respecto a CM (6,05 Log UFC/g). De este modo, se puede demostrar que las cápsulas con matriz protectora (inulina y agar-agar) ofrecen un efecto termoprotector significativamente mayor en comparación con cápsulas normales, ya que, al final del tratamiento térmico la mayor pérdida de viabilidad se dio en cápsulas normales con un 39,11 % respecto del 27,46 % en las cápsulas con envoltura protectora. Otros estudios, presentaron resultados similares, donde cepas de *L. plantarum* microencapsuladas mediante secado por aspersión y recubiertas por polisacáridos de almidón resistente de patata obtuvieron mejores resultados en la capacidad de supervivencia durante el tratamiento térmico que cápsulas sin recubrimiento (Muhammad et al., 2017). Por lo tanto, la resistencia de LP a temperaturas elevadas podría hacer viable la introducción de este probiótico en bebidas o alimentos que deban someterse a procesos de tratamiento térmico.

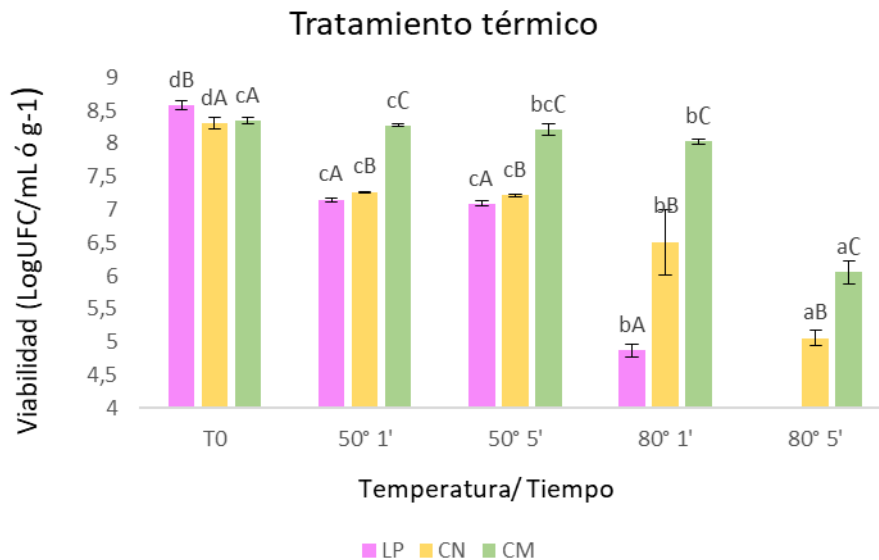


Figura 3. Supervivencia de *L. plantarum* durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas y tiempo. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para el mismo tipo de cápsula antes y después del tratamiento térmico y las letras mayúsculas diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre distintos tipos de cápsulas.

3.4. Eficacia de encapsulación y actividad de agua

La actividad de agua (a_w) está estrechamente ligada con la viabilidad de los probióticos, porque el contenido de humedad dentro de la cápsula es clave para conseguir buen rendimiento de encapsulación y, por lo tanto, una mejor supervivencia del microorganismo (Rather et al. 2017). Como se observa en la tabla 2, la a_w no presenta diferencias significativas entre ambos tipos de cápsulas. Sin embargo, diversos estudios afirman que los recubrimientos de cápsulas con formulaciones que hacen uso de polisacáridos, influyen en la retención de humedad, debido a la composición de la matriz protectora aportando mayor actividad de agua en cápsulas de doble capa (Muhammad et al., 2017).

Respecto a la eficacia de encapsulación, se observó como la adición de inulina y agar-agar mejoró el rendimiento de encapsulación respecto de las cápsulas normales, siendo del 98% en CM frente al 85% en CN (Tabla 2). El recuento de LP antes de la encapsulación en las soluciones de alginato de sonido fue de 8,33 Log UFC/mL. Sin embargo, después de la encapsulación en CN, se observaron diferencias significativamente menores ($p \leq 0,05$) de 7,10 Log UFC/g con respecto a las obtenida en la solución de alginato antes de iniciar el proceso de encapsulación. Sin embargo, en CM no se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) en la viabilidad celular antes y después de la encapsulación. Por lo tanto, se podría afirmar que las cápsulas recubiertas con polisacáridos, ofrecen una mejor retención del microorganismo en el interior de las cápsulas. De la misma manera, en *Lactobacillus acidophilus* KLDS la eficacia de encapsulación más alta se dio en aquellas cápsulas recubiertas con polisacáridos

de almidón resistente de maíz (95,80%) seguido de almidón de patata (94,30%), relacionando a su vez que a mayor eficacia de encapsulación mayor es la capacidad de resistencia celular frente a cambios de pH y temperatura (Muhammad et al., 2021).

Tabla 2. Parámetros físico-químicos de los diferentes tipos de cápsulas^a

	Viabilidad*	EE (%)	Aw
T₀	8,33 ± 0,02 b	-	-
CN	7,10 ± 0,01 a	85% a	0,87 ± 0,01 a
CM	8,20 ± 0,03 b	98% b	0,88 ± 0,01 a

^a Media y desviación estándar. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las diferentes cápsulas. * Log UFC/mL ó g.

4. Conclusión

La eficacia de encapsulación estuvo influenciada por las diferentes matrices de protección utilizadas para encapsular a *L.plantarum*, mostrando mejores resultados las cápsulas de doble capa. Al final de la digestión gastrointestinal la supervivencia del probiótico en cápsulas con agar-agar e inulina fue mayor al mínimo recomendado en el momento del consumo (10^6 UFC/g). Sin embargo, en cápsulas sin recubrimiento la viabilidad del probiótico disminuyó significativamente tras la digestión gástrica al producirse la liberación probiótica al medio gástrico de manera prematura. El tamaño de las cápsulas aumentó al final de la simulación gastrointestinal, observando el mayor diámetro en cápsulas con recubrimiento. Al final del tratamiento térmico (50 y 80 °C), las cápsulas recubiertas de inulina y agar-agar mostraron efecto termoprotector al obtener el mayor recuento celular frente a cápsulas sin recubrimiento. Por lo tanto, el recubrimiento con agar-agar e inulina mostró ser un buen método para mejorar la supervivencia de *L.plantarum* tras condiciones gástricas y térmicas. Se espera que la encapsulación de probióticos con matriz multi-polisacárida pueda ofrecer propiedades estabilizantes y termoprotectoras en el desarrollo de alimentos funcionales.

5. Bibliografía

- Amorós López, D., 2013. Efecto del almidón en la viabilidad gastrointestinal de *Lactobacillus Acidophilus* en biosoportes de alginato/almidón. <http://doi.org/10651/19091>
- Bilal, M., Asgher, M., Shahid, M., & Bhatti, H. N., 2016. Characteristic features and dye degrading capability of agar-agar gel immobilized manganese peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 728-740. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.014>.
- Braber, N. V., Vergara, L. D., Rossi, Y. E., Aminahuel, C. A., Mauri, A. N., Cavaglieri, L. R., & Montenegro, M. A., 2020. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 118, 108844. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108844>
- Chen, J., Wang, Q., Liu, C. M., & Gong, J., 2017. Issues deserve attention in encapsulating probiotics: Critical review of existing literature. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1228-1238. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977991>
- Dimitrellou, D., Kandyliis, P., Lević, S., Petrović, T., Ivanović, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y., 2019. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *LWT*, 116, 108501. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108501>.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA journal*, 3(6), 226. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.226>.

FAO/WHO., 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.

Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D., & Tzia, C., 2021. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(9), 1515-1536. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761773>

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B., & Amboni, R. D., 2013. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037>

Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., & Yari Khosroushahi, A., 2015. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15 HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. *Journal of applied microbiology*, 118(4), 1048-1057. <https://doi.org/10.1111/jam.12762>.

Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S., 2014. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 761-766. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037>

Leta, V., Chaudhuri, K. R., Milner, O., Chung-Faye, G., Metta, V., Pariante, C. M., & Borsini, A., 2021. Neurogenic and anti-inflammatory effects of probiotics in Parkinson's disease: a systematic review of preclinical and clinical evidence. *Brain, Behavior, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.07.026>.

Liu, H., Cui, S. W., Chen, M., Li, Y., Liang, R., Xu, F., & Zhong, F., 2019. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(17), 2863-2878. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1377684>

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>

Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G. C., Tian, H., & Bian, X., 2017. Integration of polysaccharide-thermoprotectant formulations for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. *Food hydrocolloids*, 66, 286-295. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.040>

Muhammad, Z., Ramzan, R., Zhang, R., & Zhang, M., 2021. Resistant Starch-Based Edible Coating Composites for Spray-Dried Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*, Comparative Assessment of Thermal Protection, In Vitro Digestion and Physicochemical Characteristics. *Coatings*, 11(5), 587. <https://doi.org/10.3390/coatings11050587>

Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M., 2017. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.036>

Reque, P. M., & Brandelli, A., 2021. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022>

Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H., 2020. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications-a narrative review. *Food Res. Int*, 137(109682.10), 1016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>.

Santini, A., Cammarata, S. M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore, G. C., Pani, L., & Novellino, E., 2018. Nutraceuticals: Opening the debate for a regulatory framework. *British journal of clinical pharmacology*, 84(4), 659-672. <https://doi.org/10.1111/bcp.13496>

Valero-Cases, E., & Frutos, M. J., 2015. Effect of different types of encapsulations on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. *LWT-Food science and technology*, 64(2), 824-828. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.049>

Valero-Cases, E., & Frutos, M. J., 2017. Development of prebiotic nectars and juices as potential substrates for *Lactobacillus acidophilus*: Special reference to physicochemical characterization and consumer acceptability during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 81, 136-143. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.047>

Wu, Y., & Zhang, G., 2018. Synbiotic encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* by alginate-arabinoxylan composite microspheres. *LWT*, 93, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.034>

Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., & Li, L., 2020. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 857-874. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12532>

Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., Kadkhodae, R., Liu, W., & Tromp, R. H., 2020. Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electro-hydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation. *Food Structure*, 25, 100147. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100147>