



**Secretaría de Educación Pública**

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**

Instituto Tecnológico de Veracruz

**“ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE *Lactobacillus reuteri*  
EN JUGO DE TUNA ROJA DESHIDRATADO POR ASPERSIÓN  
USANDO MUCÍLAGO DE NOPAL (*Opuntia ficus indica*) COMO  
SOPORTE”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**P R E S E N T A:**

**L.N. CLAUDIA RODRÍGUEZ BURGUETTE**

**ASESORES:**

**DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES  
DRA. GUADALUPE DEL CARMEN RODRÍGUEZ JIMENES  
DR. VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA**

H. VERACRUZ, VER. MÉXICO.

FEBRERO, 2019



**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
Instituto Tecnológico de Veracruz

El presente trabajo de tesis titulado "Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus reuteri* en jugo de tuna roja deshidratado por aspersión usando mucilago de nopal (*Opuntia ficus indica*) como soporte" presentado por la C. CLAUDIA RODRIGUEZ BURGUETTE, ha sido aprobado por su comité

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Director

Dra. Madeleine Hidalgo Morales

Co-Directora

Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes

Revisor

Dra. Patricia Guillermina Mendoza García

Co-Director

Dr. Víctor José Robles Olvera

Revisor

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz

BTS.maribel



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar  
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500  
[www.itver.edu.mx](http://www.itver.edu.mx)





**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

H. Veracruz, ver, a 22 de febrero del 2019  
OFICIO 108/2019

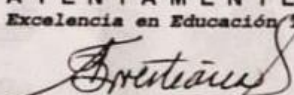
**C. CLAUDIA RODRIGUEZ BURGUETTE  
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica Titulada:

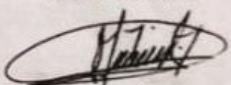
**"Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus reuteri* en jugo de tuna roja deshidratado por aspersion usando mucilago de nopal (*Opuntia ficus indica*) como soporte"**


Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

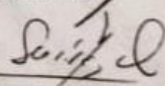
**A T E N T A M E N T E**  
Excelencia en Educación Tecnológica®


  
**DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ  
JEFA DE LA UNIDA**

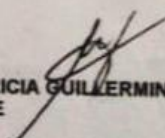
**EL H. JURADO**

  
**DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES  
PRESIDENTE**

  
**DRA. GUADALUPE DEL CARMEN RODRIGUEZ JIMENES  
SECRETARIO**

  
**DRA. MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ  
VOCAL 1**

  
**DR. VICTOR JOSÉ ROBLES OLVERA  
VOCAL 2**

  
**DRA. PATRICIA GUILLERMINA MENDOZA GARÍA  
SUPLENTE**



SRIA. DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE VERACRUZ  
Unidad de Investigación  
y Desarrollo en Alimentos



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar  
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500  
[www.itver.edu.mx](http://www.itver.edu.mx)



## DEDICATORIA

*Al arquitecto que diseñó este universo y que por firme determinación o simple casualidad otorgó el polvo de estrellas necesario para que fuera posible mi existencia en este lugar .:*

*A mamá, papá y mi hermano.*

*A todos quienes de una forma u otra ayudaron en el camino.*

*A los pequeños seres que me acompañaron aunque breve su tiempo en este plano, su cariño es infinito. Y ahora seguramente reposan entre nubes esponjosas.*



*No llores porque terminó; sonríe porque sucedió.*

*Gabo G. M.*

## RECONOCIMIENTOS

A la Dra. Madeleine Hidalgo Morales, a la Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes, al Dr. Víctor José Robles Olvera, al Dr. Marco Antonio Salgado Cervantes y al Dr. Miguel Ángel García Alvarado, por todo el apoyo que me brindaron, por ser excelentes profesores, por aceptarme dentro de la familia del cuerpo académico de ingeniería.

A mis revisoras la Dra. Patricia G. Mendoza García y la Dra. Mirna Leonor Suarez Quiroz, por sus acertadas observaciones y valiosos consejos.

A mi familia por darme el mejor regalo que se le puede obsequiar a una persona, que es amor y educación, gracias por su apoyo incondicional.

A mis compañeras y amigas de generación por la diversión y apoyo: Elena, Aracely, Laura, Dra. La Fany, La Vero, Alma, Reyna, Jaz, Yuli, Monse, Lucia y Viviana. Todas chicas con poder.

A la Orden del Fénix por el apoyo y guía que siempre brindaron: Pau Pau (muchas gracias Pau), Diego Go, Luciérnaga y Pez.

Al laboratorio de enzimología: Pau, Fa, Verito, Ale, Karla, Carmen, Manuel y Omar por su ayuda, por los buenos convivios y su apoyo cuando se necesitó.

A los niños de servicio que me acompañaron y me brindaron su divertida amistad: Karla, Dinhora, Erick, Tito, Julio y Ray.

A las niñas enzimo: Elena y Fany, compartimos el mismo camino durante este tiempo, nos unieron muchas situaciones y estamos juntas al final, sin su apoyo me hubiera quedado a mitad del recorrido, gracias.

*A la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA) por darme la oportunidad de superarme académicamente.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico aportado para llevar a cabo esta investigación*

## RESUMEN

**Rodríguez Burquette Claudia. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Febrero 2019. “Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus reuteri* en jugo de tuna rojo deshidratado por aspersion usando mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*)”. Asesores: Dra. Madeleine Hidalgo Morales, Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes, Dr. Víctor José Robles Olvera.**

Los probióticos son microorganismos vivos que en cantidades adecuadas ( $> 10^7$  UFC/g o UFC/mL) ejercen beneficios a la salud. *L. reuteri*, un microorganismo probiótico, fue incorporado a jugo de tuna roja (*Opuntia ficus indica*), el cual posee compuestos bioactivos. La disponibilidad de probióticos se ve limitada por su corta vida de anaquel, una estrategia para solucionar este problema es el empleo del secado por aspersion. Por otra parte, el mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*) no ha sido usado para el secado de BAL, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del mucílago de nopal incorporado al soporte, sobre la viabilidad de *L. reuteri* en jugo de tuna roja deshidratado por aspersion. Al jugo de tuna se le adicionaron células ( $1 \times 10^9$  UFC/mL) de *L. reuteri* NRRL B-14171 y maltodextrina como material de soporte (2:1 p/p), se secó a las condiciones de un diseño factorial completo ( $T_{in}=180$  y  $170$  °C y  $T_{out}= 70$  y  $80$  °C) y el polvo con mayor viabilidad fue almacenado a  $4$  y  $31$  °C . El efecto del extracto acuoso de mucílago de nopal se estudió a  $170$  y  $70$  °C. Las variables dependientes fueron viabilidad celular (cuenta en agar MRS),  $A_w$ , humedad, rendimiento, contenido de fenoles (Folin Ciocalteu) y actividad antirradical (DPPH). La mejor viabilidad celular (90 %) se observó a  $170$  y  $70$  °C. El rendimiento (5%) y la viabilidad (50%) con extracto acuoso de mucílago de nopal fueron significativamente menores a los obtenidos sin mucílago. La cuenta viable del jugo deshidratado a  $170$  y  $70$  °C permaneció estable durante 3 meses de almacenamiento a  $4$  °C, con características físicas, químicas y microbiológicas ( $10^8$  UFC), apropiadas para ser considerado un alimento probiótico.

## ABSTRACT

**Rodríguez Burquette Claudia. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Febrero 2019. "Study of the viability of *Lactobacillus reuteri* in spray-dried red prickly pear juice using cactus mucilage (*Opuntia ficus indica*)". Asesores: Dra. Madeleine Hidalgo Morales, Dra. Guadalupe del Carmen Rodríguez Jimenes, Dr. Víctor José Robles Olvera.**

Probiotics are live microorganisms that exert health benefits in adequate quantities ( $> 10^7$  CFU / g or CFU / mL). *L. reuteri*, a probiotic, was incorporated into red prickly pear juice (*Opuntia ficus indica*) which possesses bioactive compounds. The availability of probiotics is limited by its short shelf life, a strategy to solve this problem is the use of spray drying. On the other hand, the cactus mucilage (*Opuntia ficus indica*) has not been used for the drying of BAL, so the objective of this work was to evaluate the effect of the nopal mucilage incorporated to the support, on the viability of *L. reuteri* in red tuna juice dehydrated by spray drying. To the juice of prickly pear, cells ( $1 \times 10^9$  CFU / mL) of *L. reuteri* NRRL B-14171 and maltodextrin were added as support material (2: 1 w / w), dried under the conditions of a complete factorial design ( $T_{in} = 180$  and  $170$  °C and  $T_{out} = 70$  and  $80$  °C) and the powder with the highest viability was stored at  $4$  and  $31$  °C. The effect of the aqueous extract of cactus mucilage was studied at  $170$  and  $70$  °C. The dependent variables were cell viability (MRS agar count),  $A_w$ , humidity, yield, phenol content (Folin Ciocalteu) and antiradical activity (DPPH). The best cell viability (90%) was observed at  $170$  and  $70$  °C. The yield (5%) and the viability (50%) with aqueous extract of cactus mucilage were significantly lower than those obtained without mucilage. The viable dehydrated juice count at  $170$  and  $70$  °C remained stable during 3 months of storage at  $4$  °C, with physical, chemical and microbiological characteristics ( $10^8$  CFU), suitable to be considered a probiotic food.

## CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
RECONOCIMIENTOS.....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
CONTENIDO .....	viii
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xv
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Alimentos funcionales.....	3
2.1.1 Probióticos como alimentos funcionales .....	5
2.1.2 Criterios para seleccionar un probiótico .....	6
2.2 Bacterias ácido lácticas .....	6
2.2.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas por su metabolismo .....	8
2.2.2 Efectos probióticos de <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	11
2.2.3 Aplicación de bacterias ácido lácticas en jugos de fruta .....	12
2.3 Tuna roja ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) .....	13
2.3.1 Clasificación taxonómica .....	13
2.3.2 Desarrollo del fruto de acuerdo a su fenología .....	13
2.3.3 Madurez de la tuna .....	15
2.3.4 Composición nutricional de la tuna .....	16
2.4 Nopal ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) .....	18
2.4.1 Mucílago de nopal.....	19
2.5 Secado por aspersion.....	20
2.5.1 Principio de la tecnología de secado por aspersion.....	21
2.5.2 Secado por aspersion y su importancia en la industria .....	22
2.5.3 Materiales de soporte para el secado por aspersion .....	23
2.6 Secado por aspersion de jugo de frutos naturales .....	25
2.6.1 Problemas del secado de jugos de frutas naturales .....	26
2.6.2 Secado por aspersion de jugo con probióticos añadidos .....	27



2.6.3	Efecto de los parámetros de secado sobre la viabilidad celular .....	28
<b>2.7</b>	<b>Síntesis de antecedentes</b> .....	<b>31</b>
<b>2.8</b>	<b>Justificación</b> .....	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	Objetivo general .....	33
3.2	Objetivos específicos .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1	Cepa de <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	34
4.2	Medio de cultivo .....	34
4.3	Materia prima .....	34
4.4	Material de soporte .....	34
4.5	Cladodios de nopal .....	35
4.6	Metodología.....	35
4.6.1	Estandarización del inóculo .....	35
4.6.2	Determinación de la fase estacionaria de las bacterias .....	36
4.6.3	Recolección de células .....	37
4.6.4	Obtención del jugo de tuna roja.....	37
4.6.5	Obtención del extracto acuoso de mucílago de nopal .....	38
4.6.6	Preparación de la mezcla de alimentación (pellet celular, jugo y material de soporte) .....	40
4.6.7	Secado por aspersión de jugo de tuna adicionado con <i>L reuteri</i> .....	40
4.6.8	Análisis físicos, químicos y microbiológicos .....	41
4.6.9	Pruebas de almacenamiento .....	44
4.6.10	Análisis estadístico .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
5.1	Caracterización del crecimiento de <i>Lactobacillus reuteri</i> NRRL B-14171 en caldo MRS .....	45
5.2	Características del jugo de tuna roja ( <i>Opuntia ficus indica</i> ) fresco y tratado térmicamente .....	46
5.3	Extracción acuosa de mucílago de nopal .....	46
5.4	Estandarización de la concentración celular en el jugo previo al secado .....	48

<b>5.5</b>	<b>Efecto de las temperaturas de secado por aspersión sobre la viabilidad de <i>L. reuteri</i> y las características químicas y físicas del jugo de tuna roja deshidratado</b>	<b>49</b>
5.5.1	Efecto de las temperaturas de secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> sobre la viabilidad celular	50
5.5.2	Efecto de las temperaturas de secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> sobre el pH	53
5.5.3	Efecto de las temperaturas de secado por aspersión de jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> sobre la actividad de agua y el contenido de humedad	56
5.5.4	Efecto de las temperaturas de secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> sobre el rendimiento	59
5.5.5	Efecto de las temperaturas de secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical	62
<b>5.6</b>	<b>Efecto del tipo de soporte utilizado para el secado por aspersión de jugo de tuna roja sobre la viabilidad de <i>L. reuteri</i> y sobre el rendimiento</b>	<b>66</b>
<b>5.7</b>	<b>Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad de <i>L. reuteri</i> en jugo de tuna deshidratado</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>82</b>
9.1	Composición y preparación del medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe (MRS)	82
9.2	Curvas de calibración	83

## LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1 Tipos de alimentos funcionales. ....	4
TABLA 2.2 Criterios de selección para microorganismos probióticos. ....	7
TABLA 2.3 Microorganismos reconocidos como probióticos. ....	10
TABLA 2.4 Clasificación taxonómica de la tuna. ....	14
TABLA 2.5 Contenido nutricional de la tuna. ....	17
TABLA 2.6 Contenido de vitaminas y minerales en pulpa de tuna. ....	17
TABLA 2.7 Compuestos de interés de la tuna roja. ....	17
TABLA 2.8 Clasificación taxonómica del nopal. ....	18
TABLA 2.9 Composición química del nopal fresco. ....	19
TABLA 2.10 Ventajas de los soportes en secado por aspersión. ....	24
TABLA 5.1 Efecto del tratamiento térmico de jugo de tuna roja sobre el pH, el contenido de sólidos, la actividad antirradical y el contenido de fenoles. ....	46
TABLA 5.2 pH y contenido de sólidos del mucilago de nopal obtenido con diferentes tratamientos. ....	47
TABLA 5.3 Concentración celular (UFC/mL) de 1 g de pellet de <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 en 100 g de agua peptonada o jugo de tuna roja tratado térmicamente. ....	48
TABLA 5.4 Concentración celular de <i>L. reuteri</i> en la mezcla de alimentación previo al secado por aspersión. ....	49
TABLA 5.5 Viabilidad de <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado por aspersión. ....	50
TABLA 5.6 Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersión sobre la viabilidad de <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado. ....	51
TABLA 5.7 Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión sobre la viabilidad de <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado. ....	51
TABLA 5.8 Efecto de las temperaturas de secado sobre el pH del jugo de tuna roja deshidratado adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171. ....	54
TABLA 5.9 Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersión sobre el pH del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 deshidratado y reconstituido. ....	54

TABLA 5.10	Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión sobre el pH del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 deshidratado y reconstituido. ....	54
TABLA 5.11	Efecto de las temperaturas de secado sobre la actividad de agua y el contenido de humedad del jugo de tuna roja deshidratado adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171. ....	57
TABLA 5.12	Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersión sobre el contenido de humedad y actividad de agua del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 deshidratado. ....	57
TABLA 5.13	Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión sobre el contenido de humedad y la Aw del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 deshidratado por aspersión. ....	57
TABLA 5.14	Efecto de las temperaturas de secado sobre el rendimiento del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 y deshidratado. ....	60
TABLA 5.15	Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersión sobre el rendimiento del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 y deshidratado. ....	60
TABLA 5.16	Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión sobre el rendimiento del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 y deshidratado por aspersión. ....	60
TABLA 5.17	Efecto de las temperaturas de secado sobre el contenido de fenoles totales y su porcentaje de retención en jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 y deshidratado. ....	62
TABLA 5.18	Efecto de las temperaturas de secado sobre la actividad antirradical y su porcentaje de retención en jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 y deshidratado. ....	63
TABLA 5.19	Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersión sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 y deshidratado. ....	63
TABLA 5.20	Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical del jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 deshidratado por aspersión. ....	64
TABLA 9.1	Composición del medio de cultivo MRS. ....	82

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Rutas metabólicas usadas por las bacterias ácido lácticas .....	9
FIGURA 2.2 Evolución del desarrollo y maduración de frutos de tuna .....	14
FIGURA 2.3 Escala de color para indicar la madurez de la tuna. ....	15
FIGURA 2.4 Esquema de funcionamiento de un secador por aspersion. ....	22
FIGURA 4.1 Proceso de selección del método de extracción de mucílago de nopal.	39
FIGURA 5.1 Curva de crecimiento de <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 en caldo MRS a 37 °C .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
FIGURA 5.2 Efecto de la temperatura de secado por aspersion sobre la viabilidad de <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado. ....	52
FIGURA 5.3 Efecto de la temperatura de secado por aspersion sobre el pH de jugo de tuna roja deshidratado reconstituido adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171.....	55
FIGURA 5.4 Efecto de la temperatura de secado por aspersion sobre la actividad de agua de jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 deshidratado.....	58
FIGURA 5.5 Efecto de la temperatura de secado por aspersion sobre el contenido de humedad de jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 deshidratado.....	59
FIGURA 5.6 Efecto de la temperatura de secado por aspersion sobre el rendimiento de jugo de tuna roja deshidratado adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171. ....	61
FIGURA 5.7 Efecto de la temperatura de secado por aspersion de jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 sobre el contenido de fenoles totales.....	65
FIGURA 5.8 Efecto de la temperatura de secado por aspersion de jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 sobre la actividad antirradical.....	65
FIGURA 5.9 Efecto del tipo de soporte usado en el secado por aspersion de jugo de tuna roja adicionado con <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 sobre la viabilidad y el rendimiento. ....	67
FIGURA 5.10 Estabilidad de <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado, durante 3 meses de almacenamiento a 4 °C y 31 °C, T1 = 180 y 70 °C, T2 = 180 y 80 °C. ....	69
FIGURA 5.11 Estabilidad de <i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado, durante 3 meses de almacenamiento a 4 °C y 31 °C, T1 = 170 y 80 °C, T2 = 170 y 70 °C. ....	69

FIGURA 9.1 Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales, utilizando como disolvente agua destilada.....	83
FIGURA 9.2 Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación de actividad antirradical por DPPH, utilizando como disolvente etanol. ....	83

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>BAL</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>MDX</b>	Maltodextrina
<b>MRS</b>	Man-Rogosa-Sharpe
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>GRAS</b>	Generalmente reconocido como seguro
<b>T<sub>in</sub></b>	Temperatura de entrada
<b>T<sub>out</sub></b>	Temperatura de salida

# 1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas las demandas de los consumidores en el campo de la producción de alimentos han cambiado considerablemente. Hoy en día, los alimentos no pretenden satisfacer solamente el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios para los seres humanos, sino también prevenir las enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental de los consumidores (Ka y Lugasi., 2008).

Las expectativas y deseos de la población de mejorar su calidad de vida son precisamente los factores impulsores de la investigación y el desarrollo en el área de alimentos funcionales. Entre una serie de compuestos funcionales reconocidos hasta ahora, los componentes bioactivos de alimentos fermentados y probióticos ciertamente toman el centro del escenario debido a su larga tradición de uso seguro, y establecen y postulan efectos beneficiosos (Vasiljevic y Shah., 2008). De esta manera se plantea el desarrollo de alimentos funcionales que abarquen a un mayor número de consumidores y que brinden una solución a problemas como la intolerancia a la lactosa, siendo una opción el desarrollo de jugos de frutas naturales adicionado con bacterias probióticas, asimismo la técnica de secado por aspersión para la preservación de estos microorganismos en jugos de fruta ha sido estudiada, obteniendo buenos resultados de viabilidad después del proceso (Barbosa *et al.*, 2012; Fernández Pereira *et al.*, 2013; Jantzen *et al.*, 2013).

Muchos alimentos e ingredientes alimentarios se secan en forma de polvo para proporcionar vida útil y retener la actividad de los componentes específicos. Entre los métodos convectivos de secado al aire, el secado por aspersión es una técnica suave debido a sus tiempos de secado muy cortos y a las temperaturas relativamente bajas a las que se expone el producto (Schutyser y Boom, 2012).

Sin embargo, un reto importante asociado con la aplicación de cultivos probióticos en alimentos funcionales es la retención de viabilidad durante el



procesamiento, aunado a la búsqueda de alternativas probióticas para un mercado de consumo no tolerante a la lactosa se convierte en un campo nuevo de estudio.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la estabilidad de la cepa de *Lactobacillus reuteri* NRRL 14171b adicionada a jugo de fruta de tuna roja variedad San Martín al ser sometido al proceso de secado por aspersion usando mucílago de nopal adicionado al soporte para la protección de los componentes bioactivos del producto.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Alimentos funcionales

Podemos identificar a un alimento funcional como aquel que en su composición contenga ácidos grasos, vitaminas, minerales o microorganismos probióticos vivos que logren otorgar beneficios a la salud que se ven reflejados más allá de los relacionados con la nutrición inherente al alimento (Cortés *et al.*, 2005).

De acuerdo con la Comisión Europea: "un producto alimenticio sólo puede ser considerado funcional si junto con el impacto nutricional básico tiene efectos beneficiosos en una o más funciones del organismo humano, mejorando así las condiciones generales y físicas y/o disminuyendo el riesgo de evolución de las enfermedades. De igual manera se ha considerado que la cantidad de ingesta y forma del alimento funcional debe ser como se espera normalmente con fines dietéticos. Por lo tanto, no podría estar en forma de píldora o cápsula como forma de alimento normal" (Siró *et al.*, 2008).

A lo largo de los años se han tomado acuerdos sobre aspectos característicos de los alimentos funcionales; dos de los cuales son: su contenido nutricional y los efectos que tiene el producto hacia la salud de los consumidores. Para que un alimento sea considerado funcional debe conservar compuestos como vitaminas, minerales, ácidos grasos, microorganismos probióticos, etc., activos, es decir que después del proceso al que el alimento es sometido para su elaboración, así como después del almacenamiento, se mantengan viables (Vicentini *et al.*, 2016).

Los alimentos funcionales han sido clasificados en: alimentos fortificados, alimentos enriquecidos, alimentos alterados y alimentos mejorados (Tabla 2.1). Los primeros en desarrollarse fueron los alimentos fortificados con vitaminas y/o minerales (vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinc, hierro y calcio); posteriormente, la atención se centró en los alimentos fortificados con micronutrientes (omega-3,

otros ácidos grasos, fitoesteroles y fibra soluble) y actualmente las tendencias se centran en el desarrollo de alimentos que ofrezcan múltiples beneficios para la salud en un solo producto, como son los probióticos (Siró *et al.*, 2008).

**TABLA 2.1** Tipos de alimentos funcionales.

<b>Tipo de alimento funcional</b>	<b>Definición</b>	<b>Ejemplo</b>
<b>Alimentos fortificados</b>	Un alimento fortificado con adición de nutrientes.	Jugos de fruta fortificados con vitamina C.
<b>Alimentos enriquecidos</b>	Un alimento con adición de nutrientes nuevos o componentes que no se encuentran normalmente en el alimento.	Margarina con ésteres de esteroides, probióticos, prebióticos
<b>Alimentos alterados</b>	Un alimento en el que hay deterioro de sus componentes o estos han sido removidos, reducidos reemplazados por otras sustancias con efectos benéficos.	Fibras como liberadoras de grasa en helados o embutidos.
<b>Alimentos mejorados</b>	Alimentos en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante la manipulación genética o condiciones especiales.	Huevos con mayor contenido de omega-3 debido a la alimentación.

(Siró *et al.*, 2008)

Los alimentos probióticos son, tal vez, el ejemplo mejor caracterizado y estudiado de los alimentos funcionales y junto con los prebióticos representan el segmento más grande de los alimentos funcionales en el mercado de Europa, Japón

y Australia. El mercado de esta categoría de alimentos continúa expandiéndose en paralelo con el creciente interés de los consumidores sobre el papel de la dieta en la conservación y mantenimiento de la salud (Desmont *et al.*, 2001).

### **2.1.1 Probióticos como alimentos funcionales**

El término probiótico fue inicialmente utilizado como un antónimo de la palabra antibiótico, cuya raíz es de origen griego (para la vida). Luego de varias redefiniciones, el grupo de trabajo del Programa Conjunto de la Alimentación y la Organización para la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS por sus siglas en inglés), definió en el 2001 al término probiótico como “microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedero” (FAO/OMS, 2002).

La flora intestinal se adquiere rápidamente después del nacimiento, permaneciendo relativamente estable durante toda la vida y esencial para la homeostasis intestinal, debido a que juega un papel importante en el desarrollo anatómico, fisiológico e inmunológico del hospedero. Sin embargo, condiciones ambientales, interacciones fisiológicas y la dieta son factores que regulan la frecuencia y la concentración de la micro flora presente en el tracto gastrointestinal pudiendo causar alteraciones en la composición de la flora. Por lo tanto, la introducción de especies bacterianas beneficiosas en el tracto gastrointestinal puede ser una opción muy atractiva para reestablecer el equilibrio microbiano y prevenir enfermedades (Gupta y Garg, 2009; Sathyabama *et al.*, 2012).

Los cultivos BAL probióticos proporcionan una amplia variedad de efectos beneficiosos sobre la flora intestinal humana incluyendo efectos nutricionales, fisiológicos, antimicrobianos e inmunes, han sido propuestos como tratamiento en la disfunción de la barrera intestinal como: intolerancia a la lactosa, gastroenteritis aguda, alergia alimentaria, dermatitis atópica, intestino irritable, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y cáncer de colon (Begley *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009).

Una preparación probiótica debe tener una concentración sugerida de BAL en un rango de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC de producto (O'Shea *et al.*, 2012).

### **2.1.2 Criterios para seleccionar un probiótico**

Para que un organismo sea definido como probiótico debe reunir algunas características como son, no ser patógeno ni toxigénico, sobrevivir al medio ácido del estómago y al efecto de la bilis en el duodeno, tener la capacidad de adhesión a células epiteliales, adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente, producir sustancias antimicrobianas y tener capacidad para aumentar de modo positivo las funciones inmunes y las actividades metabólicas (Mishra y Prasad, 2005) más puntualmente, los criterios para la selección de una cepa probiótica se presentan en la Tabla 2.2. Luego de cumplir con todos los requisitos mencionados se puede decir que se tiene una bacteria con potencial probiótico.

Para la exclusión de patógenos y el control de microorganismos oportunistas; los probióticos, producen sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, que reducen el número de células viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas de otros microorganismos. Adicionalmente, los probióticos aumentan la resistencia a la colonización de patógenos, al competir por los sitios de adhesión en la superficie del epitelio intestinal (Reid, 2008).

## **2.2 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas se describen como Gram-positivas, con una morfología bacilar o esférica de longitud variable, no formadoras de esporas, inmóviles, no patógenas, anaerobias facultativas, oxidasa y catalasa negativas, no reducen el nitrato, ni producen indol, poseen un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 55 mol %, contienen un grupo hemina que les permite llevar a cabo

la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones y producen ácido láctico [L(+), D(-), o DL] como el único o principal producto de un metabolismo fermentativo de carbohidratos (Savadogo *et al.*, 2006)

**TABLA 2.2** Criterios de selección para microorganismos probióticos.

<b>Características de la cepa</b>	
<b>Estabilidad en ácidos y sales biliares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Importante para la administración oral, pero puede no ser relevante para otras aplicaciones.</li> <li>• Para la supervivencia de probióticos en el intestino es importante para mantener su integridad celular, adhesividad y actividad metabólica.</li> <li>• No es necesario para la microencapsulación.</li> </ul>
<b>Adhesión a la superficie de la mucosa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulación inmune, transitoria e interacción.</li> <li>• Exclusión competitiva, colonización</li> </ul>
<b>Seguridad para uso clínico y alimentario</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificación y caracterización de la cepa.</li> <li>• Documentación de seguridad.</li> <li>• No deben generar degradación de la mucosa intestinal, invasión ni transferencia de genes de virulencia, ni resistencia a antibióticos.</li> </ul>
<b>Efectos sobre la salud validados y documentados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosis mínima efectiva para cada cepa en particular.</li> <li>• Ensayos clínicos con doble ciego, controlados con placebo y aleatorizados.</li> </ul>
<b>Dosis y cantidades</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las dosis de probióticos ingeridos debe ser la necesaria para modular y estabilizar la composición de la microbiota, confiriendo efectos inmunomoduladores (Aureli <i>et al.</i>, 2011).</li> </ul>
<b>Propiedades tecnológicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilidad de la cepa, resistencia a los fagos, supervivencia en productos, producción a gran escala.</li> <li>• Actividad metabólica no debe afectar las propiedades fisicoquímicas del producto.</li> <li>• Buena interacción con prebióticos y otros probióticos (Saarela <i>et al.</i>, 2000).</li> </ul>
<b>Respuesta inmune</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación del sistema inmunológico.</li> </ul>

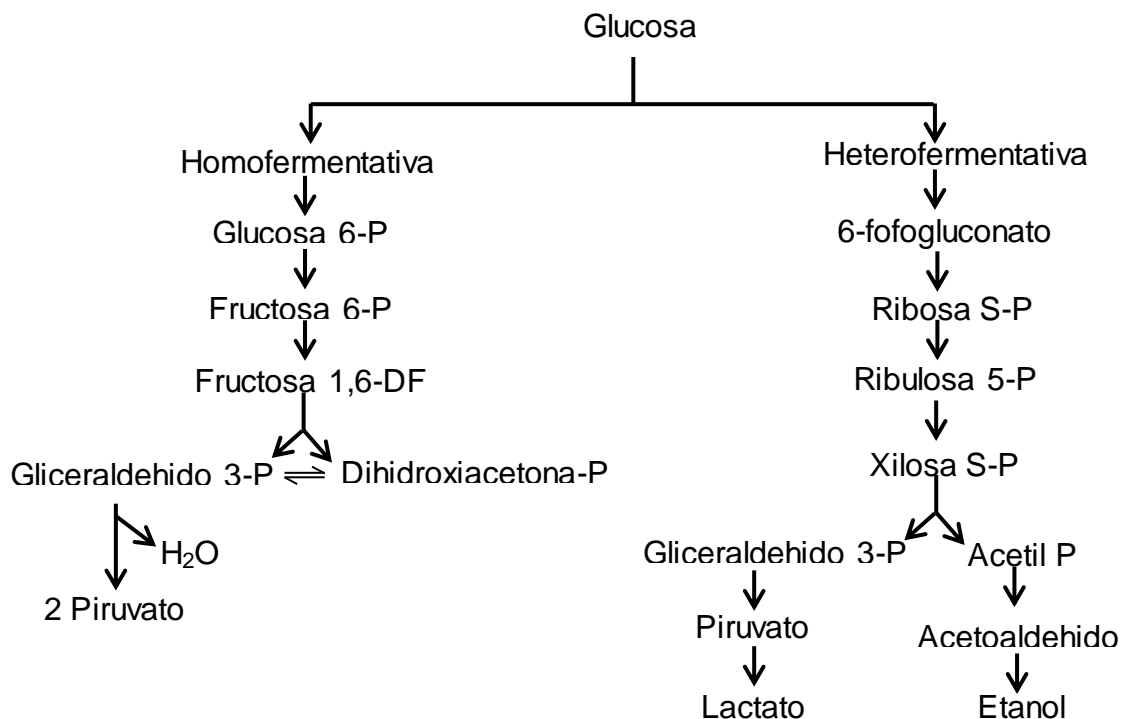
(Ouwehand *et al.*, 1999)

Igualmente, las bacterias ácido lácticas se reconocen generalmente como seguras (microorganismos GRAS) y juegan un papel importante en la fermentación y conservación de alimentos y piensos, ya sea como la microflora natural o como cultivos iniciadores añadidos bajo condiciones controladas. El efecto conservante ejercido por las BAL se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos (tales como ácido láctico) que resultan en pHs bajos (Daeschel, 1989). Las bacterias ácido lácticas también producen compuestos antimicrobianos que incluyen peróxido de hidrógeno, CO<sub>2</sub>, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos, reuterina y bacteriocinas (Cintas *et al.*, 2001).

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos ácido tolerantes, pueden crecer en un intervalo de pH de 3.2 hasta 9.6, aunque comúnmente crecen en un rango de pH de 4 - 4.5. La mayoría son mesofílicas, aunque ciertas bacterias son capaces de crecer a 5 °C y otras a 45 °C. Asimismo, son bacterias con débil actividad proteolítica y lipolítica (Carr *et al.*, 2002). Se localizan en hábitats con alto contenido de nutrientes, con presencia de carbohidratos solubles, productos de la degradación de proteínas y vitaminas; por ejemplo, productos lácteos, productos cárnicos, vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, pescado (Monroy *et al.*, 2009)

### **2.2.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas por su metabolismo**

De acuerdo a las rutas metabólicas utilizadas por las bacterias ácido lácticas, se clasifican en dos grupos, homofermentativas y heterofermentativas, como se esquematiza en la Figura 2.1. El grupo de homofermentativas como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunos *Lactobacillus* que utilizan la ruta Embden-Meyerhof para generar dos moles de lactato por uno de glucosa. Las heterofermentativas como *Weisella*, *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* que producen cantidades equimolares de lactato, CO<sub>2</sub> y etanol a partir de glucosa por la ruta de las pentosas (Caplice y Fitzgerald, 1999).



**FIGURA 2.1** Rutas metabólicas usadas por las bacterias ácido lácticas

Dentro del metabolismo de las bacterias ácido lácticas, está, la producción de sustancias con capacidad de biopreservación que incluye; la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetil y producción de bacteriocinas. (Caplice y Fitzgerald, 1999). La mayoría de los probióticos son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los microorganismos que actualmente son reconocidos como probióticos por la FAO y por la OMS se presentan en la Tabla 2.3. Dentro de esta clasificación se encuentra la bacteria *Lactobacillus reuteri*, reconocida como probiótica por estos organismos y que es localizada comúnmente en el tracto gastrointestinal, ya que es un microorganismo perteneciente a la microbiota predominante autóctona (Liu *et al.*, 2016).



TABLA 2.3 Microorganismos reconocidos como probióticos.

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>
<b>Aspergillus</b>	<i>oryzae</i>	<b>Lactobacillus</b>	<i>thermophilus</i>
	<i>niger</i>		<i>acidophilus</i>
<b>Bacillus</b>	<i>amyloliquefaciens</i> : CECT 5940 y H57		<i>brevis</i> : I 12, I 211, I 218, I 23, I 25
	<i>toyonensis</i> : BCT- 7112		<i>bulgaricus</i>
	<i>coagulans</i> : ATCC 7050, ZJU0616		<i>casei</i> : CETC 4043
	<i>coagulans</i>		<i>delbrueckii subs.</i> <i>bulgaricus</i>
	<i>lichenformis</i> : DSM 5749		<i>faracinis</i>
	<i>megaterium</i>		<i>fermentum</i> : JS
	<i>mesentericus</i>		<i>gallinarum</i> : I 16, I 26, LCB 12
	<i>polymyxa</i>		<i>jensenii</i>
	<i>subtilis</i> : 588, CA#20, DSM 17299, PB6, ATCC-PTA 6737.		<i>paracasei</i>
<b>Brevibacillus</b>	<i>laterosporus</i>		<i>plantarum</i>
<b>Bifidobacterium</b>	<i>animalis</i> : 503, DSM 16284		<i>reuteri</i> : 514, C1, C10, C16, DSM 16350, 14171
	<i>bifidum</i>		<i>rhamnosus</i>
	<i>bifidus</i>		<i>lactis</i>
	<i>thermophilus</i>		<i>salivarius</i> : DSM 16351, I 24
	<i>longum</i>		<i>sobrius</i>
	<i>pseudo-longum</i>		<b>Megasphaera</b> <i>elsdenii</i>
	<i>lactis</i>		<b>Pediococcus</b> <i>acidilactici</i> : DSM 16210
<b>Candida</b>	<i>pintolepesii</i>		<i>parvulus</i>
<b>Clostridium</b>	<i>butyricum</i>	<b>Prevotella</b> <i>bryantii</i>	
<b>Escherichia</b>	<i>coli</i> : Nissle 1917	<i>shermanii</i>	
<b>Enterococcus</b>	<i>faecium</i> : 589, NCIMB 11181, E1708, DSM 10663, NCIMB 10415, DSM 16211	<b>Propionibacterium</b> <i>freudenreichii</i>	
<b>Lactococcus</b>	<i>lactis</i> : CETC 539	<b>Saccharomyces</b> <i>acidipropionici</i>	
<b>Streptococcus</b>	<i>cerevisiae</i> : KCTC		<i>Jensenii</i>
	<i>servisia</i>		<i>bourlrdii</i>

	<i>faecalis</i>	
	<i>faecium</i>	
	<i>gallolyticus</i> : TDGB 406	
	<i>salivarius subs.</i> <i>thermophilus</i>	
	<i>bovis</i>	

(FAO, 2016)

### 2.2.2 Efectos probióticos de *Lactobacillus reuteri*

*Lactobacillus reuteri* es una bacteria ácido láctica del género *Lactobacillus* que ha sido reconocido como probiótico por la FAO (Tabla 2.3) y la OMS (FAO, 2016) ya que sus propiedades probióticas han sido validadas bajo los criterios establecidos por estos organismos. Ross y colaboradores en 2005, reportaron que los microorganismos del género *Lactobacillus sp.* son más resistentes que los del género *Bifidobacterium sp.* ya que sobreviven a valores de pH bajos (> 4) y se adaptan con mayor facilidad a la matriz alimentaria. *L. reuteri* es una bacteria ácido láctica heterofermentativa estricta, es decir, durante la oxidación de la glucosa se produce CO<sub>2</sub>, ácido láctico y etanol, es Gram positiva, catalasa negativa y anaerobia facultativa (De Angelis y Gobbetti, 2011). *L. reuteri* está localizada habitualmente en el tracto gastrointestinal, debido a que es un microorganismo perteneciente a la microflora predominante autóctona (Liu *et al.*, 2016) y es utilizada para tratar o prevenir diversos padecimientos por el ser humano.

Una de las características más destacadas de este microorganismo es su capacidad para producir reuterina, la cual se produce durante el crecimiento anaeróbico de *L. reuteri* por la acción de la enzima glicerol deshidratasa que cataliza la conversión de glicerol en reuterina. Se ha identificado químicamente como 3hidroxi propanol (propionaldehído β hidroxilo), encontrándose a pH neutro en equilibrio con sus formas diméricas cíclicas y monoméricas hidratadas. Exhibe un amplio espectro de actividad antimicrobiana afectando a bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras, mohos y protozoos (Carr *et al.*, 2002; Leroy y De Vuyst, 2004). Jantzen y

colaboradores en 2013, señalaron que es posible trabajar a este microorganismo a gran escala debido a que posee niveles elevados de viabilidad durante la producción y posterior almacenamiento. Aunado a esto Liu y colaboradores en 2016 indicaron que además *L. reuteri* es capaz de producir muchas de las vitaminas esenciales del complejo B, como la B9 y B12, asimismo de acuerdo a lo reportado por Jantzen y colaboradores en 2013, este microorganismo tiene capacidad para resistir el proceso de secado por aspersión con viabilidades altas, estas características convierten a este microorganismo en un objeto interesante de estudio y comercialización. Entre los alimentos comerciales adicionados con probióticos como *L. reuteri* encontramos fórmulas lácteas para infantiles y leches fermentadas saborizadas comercializadas por empresas extranjeras, esto plantea la opción de ampliar el mercado de alimentos probióticos que sean adecuados para consumidores intolerantes a la lactosa o alérgicos a la proteína de la leche.

### **2.2.3 Aplicación de bacterias ácido lácticas en jugos de fruta**

Los probióticos han sido ampliamente desarrollados e incorporados en matrices lácteas. Sin embargo, las personas con intolerancia y alergia a la lactosa o a la proteína de la leche, vegetarianos e hipercolesterolémicos, no pueden ingerir este tipo de productos, surgiendo así la necesidad de desarrollar nuevos productos como bebidas no lácteas y suplementos en comprimidos (Prado *et al.*, 2008). Algunas de las frutas que se han utilizado para el desarrollo de jugos con probióticos añadidos son manzana (Fernandes Pereira *et al.*, 2012), naranja (Barbosa *et al.*, 2015), mango (Liao *et al.*, 2016), piña (Jittanit *et al.*, 2010) y melón (Fontes *et al.*, 2014), entre otros. En este trabajo se propone utilizar jugo de tuna roja, que por sus características nutricionales beneficiosas para la salud lo hace un fruto atractivo para el desarrollo de nuevos productos, así mismo se propone el uso del mucílago de nopal para probar su habilidad para proteger a la bacteria y para el enriquecimiento nutricional del producto final.

### **2.3 Tuna roja (*Opuntia ficus indica*)**

El fruto del nopal conocido comúnmente como tuna, es una de las frutas más características y representativas de México, se caracteriza por una pulpa carnosa y jugosa entremezclada con un gran número de pequeñas semillas, y encerrada por una cáscara gruesa con espinas pequeñas (Jiménez-Aguilar *et al.*, 2015). Es muy apreciada por su sabor característico y por los múltiples atributos que posee, es un fruto que se consume en fresco, pero que debido a su disponibilidad estacional se dificulta su explotación. En México, los frutos se consumen generalmente frescos o para usos caseros e industriales (por ejemplo, queso de tuna, miel de tuna, mermeladas, bebidas alcohólicas, puré, pulpa, jugo, néctares, etc.) (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2005). La tuna tiene una composición similar a otras frutas, consistente en aproximadamente 85 % de agua, 14 % de azúcar y alrededor de 1 % de proteína, tiene un contenido de ácido ascórbico de hasta 85.6 mg por cada 100 g, es rica en fibra y aminoácidos.

#### **2.3.1 Clasificación taxonómica**

La tuna pertenece a la familia de las cactáceas del reino *Plantae*, a continuación, en la Tabla 2.4, se muestra su clasificación taxonómica.

#### **2.3.2 Desarrollo del fruto de acuerdo a su fenología**

El desarrollo de los frutos de tuna está relacionado al clima (temperatura, radiación y humedad) desde el inicio de floración en la planta hasta la completa maduración del fruto, el punto máximo de desarrollo y la madurez fisiológica de los frutos se obtiene 80 días después del periodo de floración (Agraria, 2009).

TABLA 2.4 Clasificación taxonómica de la tuna.

<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>División:</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase:</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden:</b>	<i>Caryophyllales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Cactaceae</i>
<b>Subfamilia:</b>	<i>Opuntioideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Opuntieae</i>
<b>Género:</b>	<i>Opuntia</i>
<b>Subgénero:</b>	<i>Opuntia</i>
<b>Especie:</b>	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill

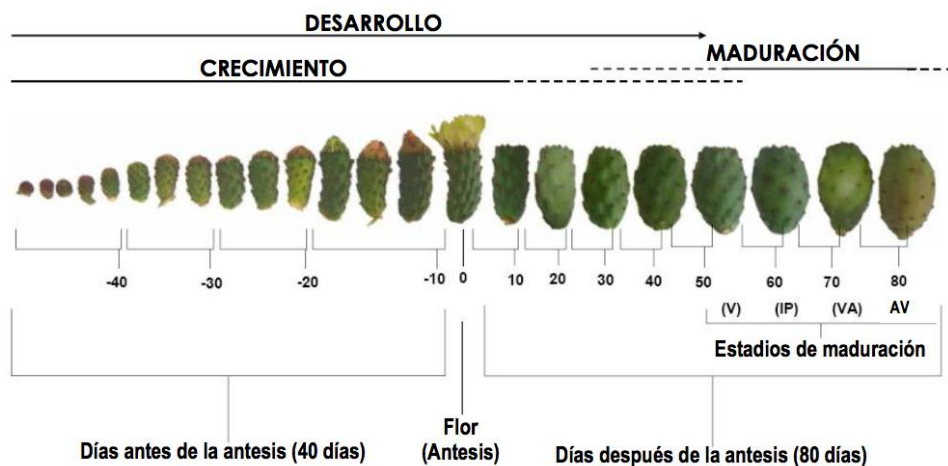
En la Figura 2.2 se aprecia la evolución del desarrollo de la tuna desde antes de la floración. Conforme a los estadios de la maduración donde:

V: fruto verde.

IP: inicio de la pigmentación amarilla.

VA: verde amarillado.

AV: amarillo verde



(Agraria, 2009)

**FIGURA 2.2** Evolución del desarrollo y maduración de frutos de tuna.

### 2.3.3 Madurez de la tuna

La madurez fisiológica corresponde al momento en que el fruto acumula la mayor parte de las reservas. El conocimiento de los estadios de madurez es importante para planificar la cosecha, ya que el contenido de azúcares un indicador de madurez, siendo el clima uno de los factores que más influyen en la acumulación de azúcares. Los índices de cosecha son determinados por medios visuales, físicos, químicos y fisiológicos. Los medios visuales incluyen el color y la forma; los métodos físicos a través de la medida de firmeza en la pulpa, del peso, diámetro y volumen; los métodos químicos por medio de la determinación del almidón por yodometría, determinación de sustancias insolubles en alcohol (almidón, celulosa, pectina y proteínas), acidez, etc. y los métodos fisiológicos a través de los niveles de respiración y de la producción de etileno (Mostacero *et al.*, 2002).

Los estadios más comunes para el desarrollo de la madurez de acuerdo a su color para los frutos de tuna, se describen en la Figura 2.3.



(Agraria, 2009)

**FIGURA 2.3** Escala de color para indicar la madurez de la tuna.

Los colores que indican el grado de madurez de la tuna roja se describen como el color 0, donde el fruto está completamente desarrollado con algunas depresiones entre las areolas pero que aún no se encuentra listo para su consumo, continuando con el color 1 donde el color de la cáscara se vuelve menos intenso y comienzan a aparecer leves tonalidades amarillentas y las depresiones de las areolas desaparecen, en el color 2 el amarillo de la pulpa se vuelve más intenso entre las areolas y éstas además se tornan leñosas, ya para el estadio de color 3 el amarillo ocupa una mayor área y casi ha desaparecido cualquier indicio de otro color, en el color 4 se mantienen algunas tonalidades verde oscuro en la zona que está cercana al pedúnculo pero comienzan a parecer finalmente coloraciones rojizas que se diseminan desde el centro hacia el ápice de la fruta, en el color 5 el fruto presenta una coloración amarilla rojiza para finalmente en el color 6 ser totalmente rojizo.

El fruto para el consumo humano es utilizado en la etapa donde toma su color 3, aunque en algunas ocasiones, con fines de exportación se utiliza el color 2. Las etapas de color 4 o color 5 se utilizan mayormente para el consumo local y también en la industria como medios de cultivo, debido a que entre mayor sea el estado de madurez del fruto, hay más cantidad de azúcares presentes en él, lo que favorece al medio de cultivo microbiano (Agraria, 2009).

#### **2.3.4 Composición nutricional de la tuna**

La pulpa de la tuna ha sido estudiada debido a la presencia de numerosos compuestos: fibra dietética (Tabla 2.5), vitamina C (Tabla 2.6) y compuestos fenólicos y betalainas (Tabla 2.7), entre otros, con el potencial de proporcionar importantes beneficios como la salud intestinal, cardiovascular y hepática, la actividad antioxidante y la prevención del cáncer (Jiménez-Aguilar *et al.*, 2015).

TABLA 2.5 Contenido nutricional de la tuna.

	Valor por cada 100 g
<b>Energía</b>	31 kcal
<b>Proteína</b>	0.80 g
<b>Lípidos</b>	0.7 g
<b>Carbohidratos</b>	8 g
<b>Fibra</b>	0.5 g

(Agraria, 2009)

TABLA 2.6 Contenido de vitaminas y minerales en pulpa de tuna.

	mg /100 pulpa
<b>Vitamina C</b>	85.60
<b>Vitamina A</b>	50 UI
<b>Calcio</b>	28 – 32
<b>Hierro</b>	1.60
<b>Tiamina</b>	0.03
<b>Riboflavina</b>	0.06

(Agraria, 2009)

TABLA 2.7 Compuestos de interés de la tuna roja.

	Cantidad
<b>Actividad antioxidante</b>	87.34 mmol ET/kg
<b>Compuestos fenólicos</b>	6.07 g EAG/kg
<b>Betalainas</b>	4017.51 mg/kg
<b>Sólidos solubles</b>	~15-17 °Brix
<b>Pectina (en pulpa)</b>	17 - 19 %

Los resultados se expresaron en peso seco. EAG: Equivalentes de ácido gálico; ET: equivalentes de trolox.

(Jiménez-Aguilar *et al.*, 2015)



## 2.4 Nopal (*Opuntia ficus indica*)

El nopal (*Opuntia ficus-indica*) pertenece a la familia *Cactaceae*, siendo las cactáceas especies endémicas del continente americano que se desarrollan principalmente en las regiones áridas y semiáridas (Flores *et al.*, 1995). En la Tabla 2.8 se presenta su clasificación taxonómica.

La taxonomía de los nopales es sumamente compleja, debido a múltiples razones, entre las que destaca el hecho de que los fenotipos presentan gran variabilidad según las condiciones ambientales. Además, es frecuente encontrar casos de poliploidía, ya que se reproducen en forma sexual o asexual y existen numerosos híbridos interespecíficos, lo que complica aún más su clasificación (Sáenz, 2006).

**TABLA 2.8** Clasificación taxonómica del nopal.

<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>División:</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase:</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden:</b>	<i>Caryophyllales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Cactaceae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Opuntieae</i>
<b>Género:</b>	<i>Opuntia</i>
<b>Especie:</b>	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill

(Jiménez-Aguilar *et al.*, 2015)

El género *Opuntia* comprende plantas xeromorfas, dicho de un vegetal, que presenta órganos adaptados a ambientes secos, que ha desarrollado un mecanismo de resistencia a la sequía con base en el mantenimiento de un alto potencial hídrico, durante los períodos de déficit de precipitación (Granados-Sánchez *et al.*, 1991). En la Tabla 2.9 se muestra la composición química del nopal.

Los cladodios tienen interés desde el punto de vista industrial ya que cuando los brotes son tiernos (10-15 cm) se usan para la producción de nopalitos y cuando están parcialmente lignificados (cladodios de 2-3 años), para la producción de harinas y otros productos (De la Rosa, 2001).

**TABLA 2.9** Composición química del nopal fresco.

<b>Componente</b>	<b>Contenido</b>
Porción comestible	78.00
Energía	27.00 kcal
Proteínas	1.70 g
Lípidos	0.30 g
Hidratos de carbono	5.60 g
Hierro	1.60 mg
Calcio	93.00 mg
Rivoflavina	0.06 mg
Niacina	0.03 mg
Ascórbico	8.00 mg

(De la Rosa, 2001)

#### **2.4.1 Mucílago de nopal**

La producción de mucílago, comúnmente referido como pectina de polisacáridos, es característica de los miembros de la familia de las Cactáceas. Este compuesto se presenta tanto en los cladodios como en la piel y pulpa de la fruta, aunque en muy diversas proporciones (Flores-Valdez, 1995).

De acuerdo a la bibliografía consultada podemos observar que los principales compuestos presentes en el mucílago de *Opuntia ficus indica* son; L-arabinosa (24.6 - 42 %), D-galactosa (21 - 40.1 %), L-ramnosa (7 - 13.1 %), D-xilosa (22 - 22.2 %) y ácido galacturónico (8 - 12.7 %). Con discordancia en su peso

molecular, encontrando valores de  $3 \times 10^6$  (Cárdenas *et al.*, 1997) a valores más pequeños como el indicado por Trachtenberg y Mayer (1981) de  $4.3 \times 10^6$  o aún más bajos como el determinado en el 2000 por Medina y colaboradores de  $2.3 \times 10^4$ .

Tanto la fruta como los cladodios del nopal son fuente interesante de compuestos funcionales, entre los que destacan la fibra, los hidrocoloides (mucílago), los pigmentos (betalainas, carotenoides), los minerales (calcio, potasio) y algunas vitaminas como la C (Sáenz *et al.*, 2004). Sin embargo debido a la disponibilidad estacional y lo delicado del fruto, se dificulta su explotación, por lo cual es de interés buscar alternativas que permitan prolongar la vida de anaquel de este producto, reduciendo costos en su transporte y almacenamiento. Por lo tanto para este trabajo se plantea el uso del proceso de secado por aspersion como método para preservar las características y viabilidad del jugo de tuna roja adicionado con bacterias probióticas.

## **2.5 Secado por aspersion**

El secado por aspersion es una tecnología ampliamente utilizada para la preservación de diversos productos alimenticios. Se entiende por deshidratación a la operación por la cual se elimina una cierta cantidad agua de una sustancia o matriz que la contenga hasta el punto donde el crecimiento microbiológico y las reacciones químicas son minimizados. Frente a otros procedimientos de conservación de alimentos, deshidratar presenta ventajas a nivel industrial, por ejemplo, los productos son de fácil embalaje, reducen espacio en el almacenamiento y se requiere un menor costo de transporte (Fito *et al.*, 2001).

El secado por aspersion se entiende como un proceso en el cual el líquido se fracciona en millones de gotas individuales formando un spray. El tamaño y la distribución de las gotas son las características más importantes de un secador por atomización. La selección del tipo de atomizador, rotatorio o de toberas, depende de la naturaleza de la alimentación y de las características deseadas para el producto

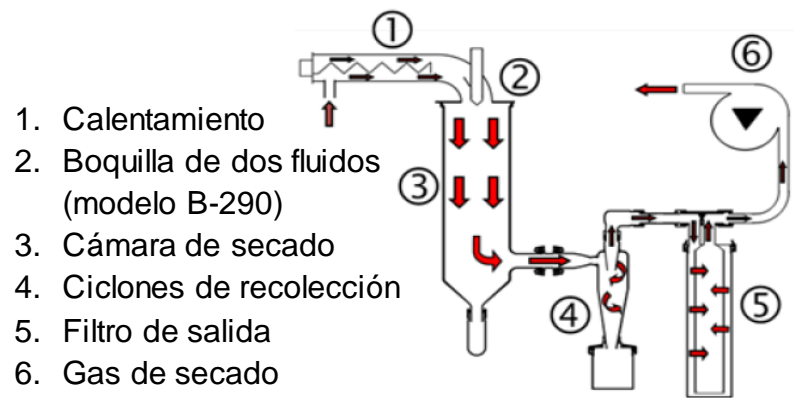
deshidratado (Cal y Sollohub, 2010). Para todos los tipos de atomizadores, el incremento de la cantidad de energía disponible para la atomización de líquido resulta en aerosoles con menores tamaños de las gotas. El tamaño de las gotas establece la transferencia de calor disponible y por lo tanto, la velocidad de secado (Langrish y Fletcher, 2001).

Gracias al bajo contenido de agua del producto obtenido, el secado por aspersion se emplea en la industria alimentaria en productos a partir de jugos de fruta gracias a una serie de ventajas como un funcionamiento continuo, representando porcentajes de rendimiento altos, la calidad del producto puede controlarse debido a las características del proceso, pueden utilizarse diferentes gases de secado en base al tipo de alimentación, esto causa un menor daño a productos termosensibles debido a que pueden manejarse temperaturas bajas de secado y a la rápida transferencia de calor, y se pueden obtener productos con características específicas es decir, partículas relativamente uniformes y esféricas con la misma proporción aproximadamente de compuestos no volátiles como en la alimentación líquida (Mujumdar, 1987; Souza y Oliveira, 2006).

### **2.5.1 Principio de la tecnología de secado por aspersion**

Para que se pueda llevar a cabo el correcto secado de las soluciones que se inyectan al secador se requiere que el aire de entrada se caliente a la temperatura deseada. el proceso inicia cuando la mezcla es alimentada y atomizada como spray en pequeñas gotas, este spray atomizado se pone en contacto con el gas caliente dentro de la cámara de secado, en este paso se pueden aplicar 3 diferentes patrones de flujo para la atomización dependiendo de la dirección en que el aire y el líquido entran en la cámara de secado, estos patrones son cocorriente, a contracorriente y flujo mixto. Posterior a la atomización ocurre el secado de las gotas y la formación de las partículas, las partículas sólidas son separadas del aire de secado y finalmente se procede a la recolección de partículas mediante el uso de ciclones pasando por

un filtro de salida para recolectar las partículas más finas. El esquema de funcionamiento se muestra en la Figura 2.4 (BUCHI, 2002).



**FIGURA 2.4** Esquema de funcionamiento de un secador por aspersión.

### **2.5.2 Secado por aspersión y su importancia en la industria**

El secado por aspersión es un método que permite la conservación de los alimentos por un periodo más prolongado, debido mayormente a que los microorganismos y enzimas que causan la descomposición del alimento no son capaces de actuar en un ambiente con bajo contenido de agua, entendiéndose de esta forma que la deshidratación es la eliminación de pequeñas cantidades de agua, en forma de vapor, del producto y que esto se logra generalmente con aire.

El secado por aspersión resulta altamente viable debido no solo a la brevedad del tiempo de secado, que generalmente son segundos, sino también por el hecho de que, debido a la rápida evaporación del agua, y como la evaporación causa enfriamiento, los sólidos no son calentados a altas temperaturas y la temperatura de las gotas permanece por debajo de la temperatura de bulbo húmedo del gas de secado. Esta característica es muy importante para los alimentos termolábiles, donde el tiempo o grado de calentamiento por otros procesos les causa deterioro.

En los alimentos, la retención de actividad enzimática, el contenido de vitaminas y los componentes volátiles, y la prevención de la desnaturalización de proteínas por calor son algunas de las razones para preferir el secado por aspersión a otros métodos de deshidratación.

Este tipo de secado produce partículas de talla y forma que no son obtenidas por otro método. El material no tiene contacto con superficies sólidas sino hasta que está seco, cuyo resultado es la conservación del sabor y color originales. El secado por aspersión es preferido a otros métodos de secado para líquidos y purés. La calidad del producto es muy alta debido a que se necesita menos calor y la oxidación puede ser minimizada.

Actualmente, el secado por aspersión se encuentra en un gran número de industrias como la de alimentos, farmacéutica, química, pesquera, de taninos y celulosa, así como en la aplicación al control ambiental (Masters, 1991).

El secado por aspersión es una alternativa para los métodos convencionales (congelación y liofilización) de conservación. Ofrece las mismas ventajas que el liofilizado, sin embargo, es mucho más económico, especialmente a una escala comercial.

### **2.5.3 Materiales de soporte para el secado por aspersión**

Se pueden utilizar diferentes materiales de soporte dentro del secado por aspersión, generalmente son polímeros con temperaturas de transición vítrea alta algunos de los que han sido utilizados son glúcidos entre ellos se encuentran la maltodextrina, goma arábiga, almidón, etc., proteínas como el caseinato de sodio, leche descremada reconstituida o el suero de leche o lípidos como el ácido esteárico, mono y di acilglícéridos (Sáenz *et al.*, 2009).

Los materiales de soporte deben de presentar características ideales tales como: tener buenas propiedades reológicas conforme su concentración que permitan

su manipulación durante el proceso, que logren la formación de una película uniforme al momento de llevar a cabo la aspersion, baja higroscopicidad, que no reaccionen en el proceso de secado, capacidad para liberar el solvente o el encapsulado y bajos costos. En el caso de los empleados en la industria alimentaria, los soportes deben ser grado alimenticio (Bhandari, 2009 B; Shahidi y Han, 1993-A). Existen materiales de soporte insolubles como por ejemplo ceras, ácidos grasos, etc., y solubles en agua como las gomas, carbohidratos, entre otros. Los más utilizados son los materiales con temperaturas de transición vítrea alta. Las ventajas principales en el uso de soportes durante el secado por aspersion se engloban en la Tabla 2.10

**TABLA 2.10** Ventajas de los soportes en secado por aspersion.

Protección a los factores externos (calor, aire, luz, humedad), evitando degradación del activo
Liberación controlada del compuesto encapsulado
Fácil manejo del activo si se encuentra en una cápsula modificando sus características físicas (reduciendo higroscopía, mejorando distribución del material, etc.
Enmascara sabor y olor del núcleo
Evita contacto del activo con otros componentes de la matriz
Estabiliza compuestos inestables
Aumenta el porcentaje de sólidos en la alimentación, permitiendo formar una red densa dando como resultado un secado óptimo transformando de forma satisfactoria muestras líquidas en sólidas

(Astray *et al.*, 2009; Gharsallaoui *et al.*, 2007)

La adición de glúcidos principalmente disacáridos es una de los métodos más aplicados para proteger a las células de microorganismos termolábiles como los probióticos (Broeckx *et al.*, 2016). El más usado es la maltodextrina, la cual es

obtenida a partir de la hidrólisis ácida del almidón (Saéñz *et al.*, 2009) y es una buena elección en cuanto a costo y efectividad, ya que tiene baja viscosidad a alta proporción de sólidos, es incolora, además de inodora y permite la formación de polvos sin enmascarar el sabor original (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2005), es un buen protector contra la oxidación, está disponible en diferentes pesos moleculares (Saikia *et al.*, 2015a) y es extensamente utilizada en la industria de alimentos (Saéñz *et al.*, 2009). Sin embargo la mayor desventaja que presenta es su baja capacidad emulsificante, por lo que puede ser combinada con otro material de soporte como goma arábica o proteínas (Saéñz *et al.*, 2009).

Otro material de soporte muy utilizado es la goma arábica, ya que posee buenas características, entre las que destacan alta solubilidad, baja viscosidad y buenas propiedades emulsificantes, sin embargo, debido a su alto costo suele ser utilizado en combinación con otros materiales como la maltodextrina (Carneiro *et al.*, 2013).

## **2.6 Secado por aspersion de jugo de frutos naturales**

De acuerdo al Juice Latin America Congress de 2010, el proceso de secado por aspersion ha sido el más empleado para obtener muchos de los productos en polvo provenientes de jugos de frutos de jugos naturales, como método de conservación para aumentar la vida útil de diversas frutas (Saikia *et al.*, 2015a) dañando al mínimo a las células, y ofrecer un polvo con la mayor cantidad de características nutricionales y sensoriales del alimento original (Jittanit *et al.*, 2010).

Son numeroso los trabajos de investigación realizados para el secado por aspersion de jugos de frutas naturales, en éstos se ha buscado utilizar los parámetros idóneos para poder evitar la pérdida de nutrientes que se dan por el mismo proceso, entre los jugos secados por aspersion que se han reportado se encuentran: jugo de manzana, frambuesa, melón, naranja, mango, chagalapoli, grosella, durazno, sandía, tuna roja y otros más.



Rodríguez-Hernández y colaboradores en 2005, secaron jugo de tuna roja Cardona con temperatura de entrada de 205 °C y temperatura de salida de 225 °C, usaron maltodextrina 10 y 20 DE como soporte a 18 y 23 % w/v, respectivamente, reportando que con maltodextrina de 10 DE se obtuvieron mejores rendimientos y preservó los agentes de interés del jugo, así como también en su color. Saikia y colaboradores en 2015a secaron jugo de piña, mandarina y carambola usando maltodextrina al 20 % con temperatura de entrada de 185 °C y de salida 88 °C, obteniendo rendimientos del 72 %, de igual manera, Cano-Chauca y colaboradores en 2004 secaron por aspersión jugo de mango, emplearon temperaturas de 70 - 75 °C de salida y 160 °C como temperatura de entrada, emplearon como soporte maltodextrina 20 DE, reportando bajo esta condiciones de secado rendimientos del 90 % de solubilidad usando ese material de soporte.

Saikia y colaboradores en 2015a secaron por aspersión diversos jugos de fruta y determinaron sus características fisicoquímicas y propiedades antioxidantes después del proceso de secado, utilizaron jugo de mandarina, sandía, carambola y piña, empleando como material de soporte maltodextrina en un 20 %, bajo condiciones de secado de 185 °C de temperatura de entrada y 88 °C de temperatura de salida, obtuvieron rendimientos del 72 % y con un contenido de fenoles totales de 149.32 mg EAG/100 g y de flavonoides de 34.16 mg EQ/100 g.

Estos resultados indican que es posible obtener jugos secados por aspersión que mantengan sus características y propiedades nutricionales luego del proceso, lo que lo hace una buena opción para alargar la vida útil del producto.

### **2.6.1 Problemas del secado de jugos de frutas naturales**

Aunque el secado por aspersión presenta grandes ventajas para la conservación de diferentes matrices alimentarias como los jugos de fruta, existen también problemas que se presentan durante y después del proceso de secado debido en su mayor parte a los valores de viscosidad, higroscopicidad a altas

temperaturas y termoelasticidad, todo esto debido a su elevado contenido de azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa ya que estos azúcares presentan bajo peso molecular y también a la presencia de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y málico (Jittanit *et al.*, 2010).

Para obtener jugo deshidratado de frutas naturales mediante secado por aspersion, deben considerarse tres aspectos principales: composición, variables de proceso y la utilización final del polvo obtenido. En su mayoría, la composición de los jugos de frutas encontrados en el mercado son a base de azúcares de bajo peso molecular: sacarosa, glucosa, maltosa y fructosa; la naturaleza de este tipo de compuestos es higroscópica y presentan valores de temperatura de transición vítrea bajos debido a la longitud de la cadena del carbohidrato, factor de importancia para la obtención de un producto deshidratado por aspersion, ya que afecta las propiedades termoplásticas del producto, generando adhesión a la cámara de secado por parte de las partículas formadas o apelmazamiento en la cámara por la formación de enlaces entre partículas con partículas adyacentes, logrando modificar la hidrodinámica del secado, evitando un proceso eficiente, afectando significativamente el rendimiento y el manejo del producto final (Bhandari *et al.*, 1993; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Souza y Oliveira, 2006).

### **2.6.2 Secado por aspersion de jugo con probióticos añadidos**

El secado por aspersion aplicado como método de encapsulación de bacterias probióticas, consiste en atomizar con aire caliente una suspensión o emulsión previamente homogeneizada de probióticos en la matriz del material elegido para encapsular, consiguiendo con ello una rápida evaporación del solvente (agua) y poder obtener finalmente los probióticos inmovilizados en forma de partículas de polvo (de Vos *et al.*, 2010). El secado por aspersion de jugos de fruta con microorganismos probióticos añadidos es una opción atractiva debido a las propiedades nutricionales de las frutas y los múltiples beneficios que brindan los

probióticos. Además, los polvos obtenidos conservan su vida útil por más tiempo que el jugo fresco y los probióticos su bioactividad (Jittanit *et al.*, 2010).

El proceso de secado causa daño a las células y disminución de la viabilidad debido al estrés mecánico y térmico, la presión osmótica, la exposición al oxígeno, y la eliminación de agua ligada (Meng *et al.*, 2008). Sin embargo, existen diversos trabajos de investigación sobre secado por aspersion de jugo de frutas con bacterias ácido lácticas añadidas, buscando conservar tanto las características del jugo como la viabilidad de las células, ejemplos de estos trabajos son el de Barbosa y colaboradores, quienes en 2016 secaron jugo de naranja adicionado con *Lactobacillus plantarum* 299v y *Pediococcus acidilactici* HA-6111-2, cosechadas en fase estacionaria con temperatura de entrada de 150 °C y temperatura de salida de 70 °C, con maltodextrina 10 DE como soporte. Bajo estas condiciones obtuvieron una viabilidad del 53.7 % y 53.8 % respectivamente. De igual manera, en 2012 Fernádes Pereira y colaboradores secaron jugo de manzana con *Lactobacillus casei* NRRL B-442, usando maltodextrina y goma arábica como soportes, obtuvieron tasas de supervivencia microbiana superiores al 90 % para el polvo almacenado a 4 °C durante 35 días (ambos soportes) y superior al 70 % hasta 21 días, para el polvo obtenido utilizando sólo maltodextrina a 25 °C.

Como puede observarse, son diversos las variables que afectan la viabilidad de las bacterias que son sometidas al secado por aspersion.

### **2.6.3 Efecto de los parámetros de secado sobre la viabilidad celular**

Las bajas tasas de supervivencia de cultivos deshidratados por atomización y durante el almacenamiento y las dificultades para rehidratar el producto han limitado el uso del secado por atomización en la preservación bacteriana. Durante estos procesos, las bacterias están sujetas a numerosos tipos de estrés, los cuales pueden ser debidos a uno o más eventos diferentes (Santivarangkna *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2005).

Los factores que más perjudican la viabilidad durante el secado por aspersión son: el estrés térmico (por las temperaturas elevadas), el estrés osmótico y las fuerzas capilares (por la eliminación de agua), el estrés oxidativo (por el contacto con el oxígeno del aire y el incremento del pH intracelular) y la concentración de sales (por la pérdida de agua) (Santivarangkna *et al.*, 2008; Selmer-Olsen *et al.*, 1999). El daño térmico y por deshidratación de las células son los factores de mayor relevancia.

La pérdida de la viabilidad debido a la deshidratación ocurre de manera simultánea con el estrés térmico. En la deshidratación, las moléculas de agua son eliminadas de las células limitando de esta manera reacciones químicas y la actividad metabólica de la célula (Ananta *et al.*, 2005; Broeckx *et al.*, 2016). Además, la eliminación de agua puede dañar la integridad de la célula causando daño en la bicapa lipídica de la membrana plasmática, ya que ésta se estabiliza mediante un equilibrio entre las atracciones de Van der Waals y la repulsión por hidratación, lo que conllevará a la muerte celular (Broeckx *et al.*, 2016).

Al comienzo del proceso de secado por aspersión, durante la atomización, ocurre el estrés de cizalla donde las células pueden sufrir daños. Una velocidad de cizalla mayor dañará en mayor escala a las células, por lo que se recomienda que la velocidad de atomización sea baja (Broeckx *et al.*, 2016). Debido a la eliminación del agua en la célula, ésta experimenta estrés osmótico, que ocurre cuando hay un incremento en la molaridad, lo que compromete la función de las células (Broeckx *et al.*, 2016). Debido a la pérdida de agua ocurre una disminución en el volumen del citoplasma, la turgencia celular se pierde provocando que las células se lisen, dando como resultado la muerte celular.

El estrés oxidativo es uno de los más importantes, ya que en ocurre la oxidación de los lípidos de la membrana, resultando en la pérdida de la viabilidad celular (Broeckx *et al.*, 2016), ocurre debido al oxígeno contenido en el medio de secado y al oxígeno disuelto en la solución (Ghandi *et al.*, 2012).

Actualmente la alimentación se ha enfocado hacia el consumo de productos accesibles y que tengan un valor agregado, como es el caso los alimentos funcionales probióticos, de igual manera los productos a base de polvos en la industria alimenticia tienen un gran mercado gracias a su estabilidad, menor costo durante el proceso, y también en su almacenaje y transporte.

Los probióticos generalmente se ven asociados con productos lácteos por lo que su incorporación en productos como jugos de frutas resulta ser una opción viable para diversificar y satisfacer a un sector de la población que sea intolerante a productos lácteos. Como se ha establecido anteriormente, el jugo de tuna roja contiene cantidades importantes de compuestos bioactivos, como ácidos fenólicos, taninos y antocianinas, estos atributos junto con los probióticos que confieren beneficios para la salud, son un alimento funcional de alto valor agregado.

Se han realizado estudios de secado por aspersión de bacterias ácido lácticas obteniendo buenos resultados de viabilidad. El secado por aspersión de jugos de frutas también ha sido ampliamente estudiado con buenos resultados en el rendimiento. En menor cantidad se han realizado estudios de secado por aspersión de jugos de frutas adicionados con microorganismos probióticos utilizando principalmente maltodextrina como material de soporte y reportan buena viabilidad después del secado, mencionando que este material brinda mayor protección a las células durante el proceso de secado por aspersión y obteniendo mayores rendimientos después del secado debido a su capacidad encapsulante (Barbosa *et al.*, 2015; Kingwatee *et al.*, 2015). Sin embargo, no hay estudios que evalúen la viabilidad de las bacterias usando mucílago de nopal incorporado al soporte.

Se concluye, por tanto, que se debe tener especial cuidado en la selección de las variables del secado por aspersión de jugos con bacterias probióticas añadidas, ya que dichas variables tienen efecto significativo sobre la viabilidad de las células después del proceso de secado. También es importante considerar que algunos compuestos añadidos a los soportes, incrementan la viabilidad.

## 2.7 Síntesis de antecedentes

La revisión de los antecedentes permitieron establecer que los probióticos son microorganismos vivos que en cantidades adecuadas ( $> 10^7$  UFC/g o UFC/mL) ejercen beneficios a la salud, estos pueden estar contenidos en alimentos funcionales. *L. reuteri* está catalogado como microorganismo GRAS (por sus siglas en inglés, Generalmente Reconocido como Seguro por la FDA) y con potencial probiótico (FAO, 2016). Por otro lado, la tuna roja es un fruto representativo de México, este posee atributos atractivos para la salud de los consumidores pues contiene compuestos bioactivos como vitamina C, compuestos fenólicos, betalaínas y es rica en fibra (Jiménez-Aguilar *et al.*, 2015), en nuestro país es apreciada también por su sabor característico, sin embargo debido a su disponibilidad estacional se dificulta su explotación. En los últimos años se han incrementado el estudio y desarrollo de alimentos funcionales usando jugos de frutas lo cual ha contribuido a satisfacer la necesidad de los consumidores que buscan diferentes alternativas en alimentos funcionales.

A manera de prolongar la vida útil de los jugos de fruta se ha realizado el secado por aspersión como método de conservación, reportándose que este proceso no afecta de manera significativa a las propiedades de interés de los jugos, esta técnica se ha empleado en jugo de piña, sandía, mandarina y carambola (Saikia *et al.*, 2015), mango (Cano-Chauca *et al.*, 2012) y jugo de tuna roja (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2005), demostrando la conservación de la mayor cantidad de sus nutrientes y mostrando características de Aw y humedad requeridas para garantizar su estabilidad después del proceso. El mucílago de nopal ha sido poco estudiado como material de soporte, el cual es obtenido de los cladodios del nopal (*Opuntia ficus indica*) y este es una fuente interesante de compuestos funcionales, entre los que destacan la fibra, los hidrocoloides (mucílago) y los minerales como calcio y potasio (Sáenz *et al.*, 2004).

Del mismo modo se han realizado estudios de secado por aspersión de microorganismos probióticos en jugos de fruta con buenos resultados de viabilidad

después del proceso (Barbosa *et al.*, 2012. Fernádes Pereira *et al.*, 2013, Jantzen *et al.*, 2013). Sin embargo son pocos los trabajos en lo que se estudie su estabilidad durante el almacenamiento, al igual que no existen reportes de un jugo probiótico de tuna roja usando como material de soporte mucílago de nopal. Por lo que se concluye que se deben seleccionar los parámetros de material encapsulante y temperaturas de entrada y salida óptimos para el secado por aspersión de jugos con bacterias probióticas incorporadas ya que estas variables tienen efecto sobre la viabilidad de las células después del secado por aspersión y durante su almacenamiento (Anekella, 2011).

## **2.8 Justificación**

El secado por aspersión ha sido utilizado con soportes tradicionales para el deshidratado de jugos con bacterias acidolácticas con buenos porcentajes de viabilidad celular, sin embargo, podrían utilizarse nuevos aditivos que proporcionen beneficios a la salud del consumidor sin que afecten la viabilidad celular. Se ha utilizado el mucílago de nopal como soporte para el deshidratado por aspersión de compuestos bioactivos pero no se han encontrado reportes de secado por aspersión de jugo de tuna con bacterias ácido lácticas usando mucílago de nopal añadido al material de soporte.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del mucílago de nopal como soporte y de las variables de secado por aspersión sobre la viabilidad de *L. reuteri* en jugo de tuna roja.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las condiciones de secado por aspersión sobre la viabilidad de *L. reuteri* y las propiedades físicas y químicas del jugo de tuna deshidratado.
- Evaluar la funcionalidad del mucílago de nopal como soporte durante el secado por aspersión de jugo de tuna adicionado con *L. reuteri*.
- Evaluar la viabilidad de *L. reuteri* en el jugo de tuna roja deshidratado durante el almacenamiento a 4 y 31 °C.



## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepa de *Lactobacillus reuteri*

La cepa probiótica de *L. reuteri* NRRL B14171 objeto de estudio en este trabajo, fue procedente de la colección de The Agricultural Research Service USDA (United States Department of Agriculture). Este microorganismo fue elegido en base a sus características como probiótico y por su capacidad para resistir el proceso de secado por aspersión (Jantzen *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016).

### 4.2 Medio de cultivo

Se utilizó como medio de cultivo caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) para el crecimiento de la bacteria (Anexo 9.1).

### 4.3 Materia prima

Se seleccionaron tunas rojas (*Opuntia ficus indica*) variedad San Martín con grado de madurez entre 4 y 6 (Figura 2.3) en buenas condiciones fisiológicas, adquiridas en un mercado local de la ciudad de Veracruz.

### 4.4 Material de soporte

Se seleccionó maltodextrina DE10 como material de soporte porque ha sido utilizada para el secado por aspersión de BAL y jugos de frutas (Barbosa *et al.*, 2015; Kingwatee *et al.*, 2015), su cantidad dependió del contenido de sólidos del jugo fresco.

#### **4.5 Cladodios de nopal**

Se seleccionaron cladodios de nopal (*Opuntia ficus indica*) de la variedad Atlixco criollo San Bernardín, originarios de Milpa Alta del valle de México (Tlaxcalancingo, Puebla). Los cladodios fueron seleccionados con una edad de entre 3 a 4 meses, cuyas características particulares morfológicas radican en que las puntas de los cladodios son más redondeados y su color es verde oscuro en comparación con otras variedades de nopal. Se utilizaron cladodios de  $764.82 \pm 13.95$  g con  $31.28 \pm 0.63$  cm de longitud y  $18.72 \pm 0.27$  cm de ancho.

#### **4.6 Metodología**

El trabajo se puede resumir en 3 etapas, la primera etapa consistió en la estandarización de la concentración celular, obtención del jugo de tuna roja y obtención del extracto acuoso de mucilago de nopal; en la segunda etapa se realizó el secado por aspersión y la condición de secado con las mejores viabilidades fue repetida con el extracto acuoso, en la tercera y última etapa se evaluó el efecto del almacenamiento del jugo de tuna roja deshidratado.

##### **4.6.1 Estandarización del inóculo**

La estandarización del inóculo inició con la reactivación de la cepa, para ello, se vertió el contenido de un vial (MRS y 40% (v/v) de glicerol) de la cepa en un tubo con 10 mL de caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 12 h, posteriormente se realizaron 2 resiembras en caldo MRS con un tamaño de inóculo de 1 %, se incubaron durante 6 h a 37 °C, se tomaron inóculos de 1 % y se dispusieron en viales con 40 % de glicerol para obtener el stock de cultivos. Los viales fueron almacenados en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

#### 4.6.2 Determinación de la fase estacionaria de las bacterias

Se realizaron cinéticas de crecimiento por densidad óptica (D.O.) para determinar el momento en que las células alcanzaban la fase estacionaria. De acuerdo a lo reportado en la literatura, las células recolectadas en fase estacionaria tienen mayores posibilidades de sobrevivir al proceso de secado por aspersion. La cepa almacenada en vial con glicerol se reactivó en un tubo con 10 mL de caldo MRS (1 % de inóculo) incubado a 37 °C durante 12 h. A partir de ese cultivo, se reinocularon al 1 % en 500 mL de caldo MRS y se incubó por 10 h a 37 °C. El crecimiento fue medido cada dos horas registrando la absorbencia del medio a 640 nm, se hicieron diluciones con caldo MRS estéril para mantener las lecturas dentro del rango de linealidad. Los resultados fueron graficados y se calcularon los parámetros cinéticos tiempo de latencia, velocidad específica de crecimiento y crecimiento máximo ( $x_{max}$ ) por ajuste de la ecuación modificada de Gompertz a los datos experimentales utilizando el software My CurveFit.

$$N(t) = N_0 + C \exp [- \exp (-B(t - M))]$$

Dónde:

N (t): Es la cantidad de microorganismos que varía con el tiempo;

No: Es la cantidad de microorganismos en un momento inicial;

C: Es el nivel máximo o concentración de incremento de microorganismos;

B: es la velocidad máxima específica

t: En un tiempo dado de análisis;

M: Es el tiempo en que la velocidad máxima específica se presenta

#### **4.6.3 Recolección de células**

La recolección de células se llevó a cabo en fase estacionaria por centrifugación, por triplicado, a 7000 xg durante 10 min a 7 °C (Gomez Zavaglia *et al.*, 2003), realizando el lavado de las células con solución salina entre cada proceso de centrifugado.

#### **4.6.4 Obtención del jugo de tuna roja**

Para la elaboración del jugo de tuna roja se procedió a la desinfección, acondicionamiento y pelado del fruto, se realizó la extracción del jugo con un extractor casero, se filtró al vacío para la eliminación de semillas y se aplicó un tratamiento térmico para inactivar la carga microbiana autóctona del jugo.

##### **4.6.4.1 Desinfección del fruto**

El fruto se lavó con una solución de hipoclorito de sodio (250 ppm) durante 5 min, este tratamiento asegura una reducción de por lo menos 7 ciclos log (Wu *et al.*, 2000).

##### **4.6.4.2 Extracción del jugo de tuna roja**

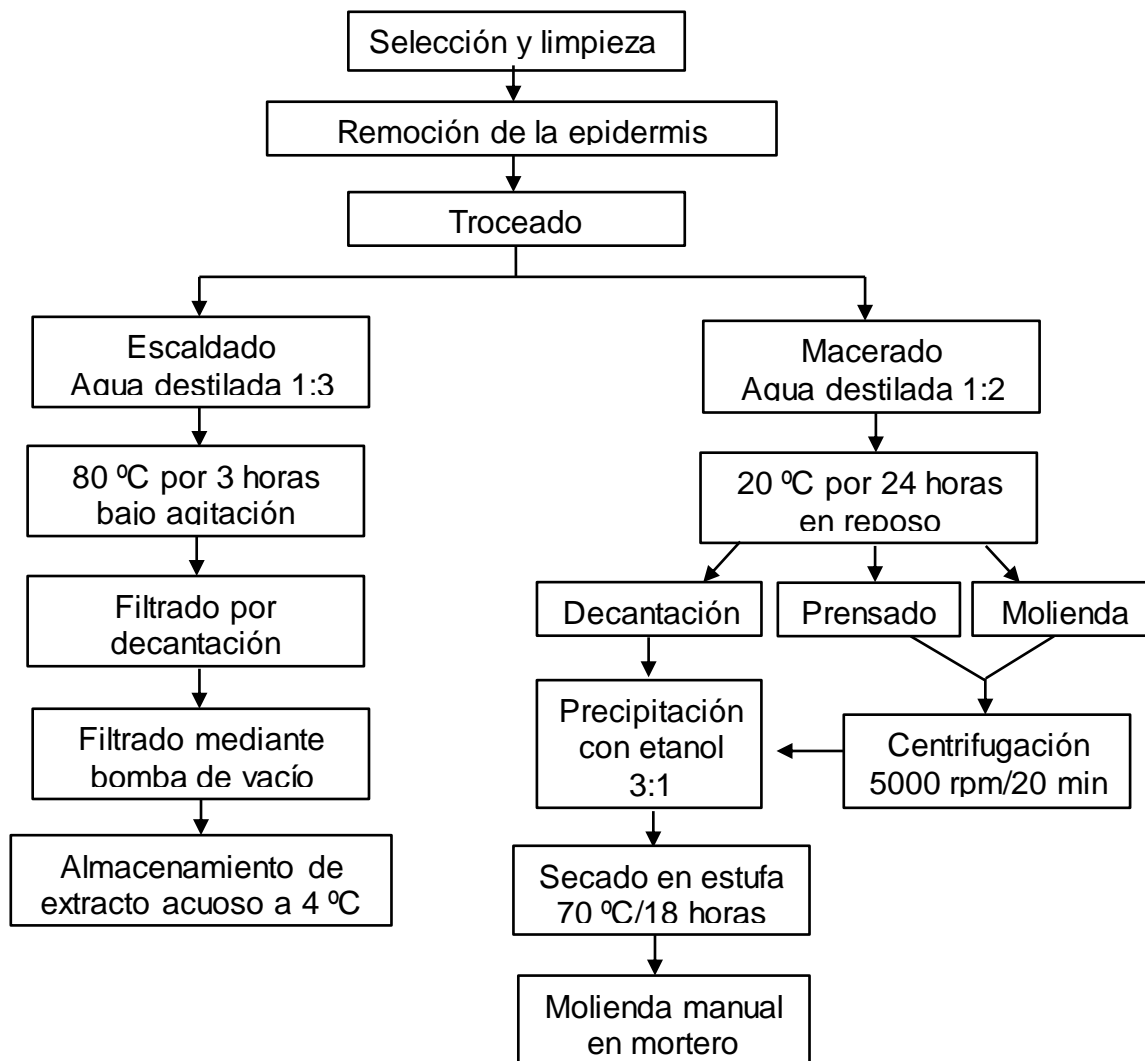
Al fruto desinfectado se le realizó un corte vertical para facilitar la separación de la pulpa de la cáscara y se cortó por la mitad. El jugo obtenido con un extractor casero (Jittanit *et al.*, 2010) fue filtrado al vacío con papel Whatman No. 3, lo que permitió la eliminación de las semillas. Posteriormente, al jugo filtrado se le realizaron análisis químicos, físicos y microbiológicos.

#### **4.6.4.3 Tratamiento térmico del jugo de tuna roja**

Para garantizar la inocuidad del jugo de tuna roja se le realizó un tratamiento térmico en base a lo reportado para el tratamiento térmico de jugos de fruta que garantiza la reducción de al menos 5 ciclos log, para lo cual se preparó un baño maría a 90 °C en el cual se sumergió el jugo contenido en frascos de vidrio con capacidad de 500 mL, durante 60 s (Santhirasegaram *et al.*, 2013). El frasco con el jugo fue enfriado mediante inmersión en baño de hielo y se verificó la eficiencia del tratamiento con análisis microbiológicos.

#### **4.6.5 Obtención del extracto acuoso de mucílago de nopal**

Se han reportado diversas metodologías para la obtención de mucílago de nopal, en la mayoría se trituran los cladodios, se realiza extracción acuosa y se utilizan solventes como etanol, acetona o éter, con posterior centrifugación o filtración. En el presente trabajo se probaron diferentes metodologías (Figura 4.1): extracción acuosa del nopal escaldado por maceración; extracción acuosa del nopal escaldado por maceración y posterior precipitación con etanol; extracción acuosa del nopal escaldado por maceración y posterior centrifugación y precipitación con etanol; y centrifugación y precipitación con etanol del jugo de nopal obtenido con un extractor de jugos casero. Todas las extracciones se realizaron con el mismo lote de cladodios. El mucílago fue precipitado con etanol en una relación 3:1 y colocado en estufa a 75 °C durante 18 h, el material seco fue triturado en mortero de porcelana. El rendimiento del mucílago así obtenido permitió establecer como más adecuado un método modificado del descrito por León Martínez y colaboradores. (2011).



**FIGURA 4.1** Proceso de selección del método de extracción de mucílago de nopal.

Los cladodios fueron pesados, medidos y desinfectados con NaClO al 5.5 %, 1:4 (v/v), se retiraron manualmente el epicarpio y las espinas, se escaldó en agua a 70 °C durante 30 s (para facilitar el tránsito del mucílago de la médula hacia el agua), se cortaron en cubos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> y se maceraron en una relación 1:4 (médula:agua destilada) a 20 °C durante 24 h. El producto resultante de la maceración fue almacenado a - 4 °C para su uso y análisis posteriores. Antes de realizar el secado por aspersion, 3772 mL de mucílago de nopal fueron concentrados por rotaevaporación y aforados a 250 mL.

#### **4.6.6 Preparación de la mezcla de alimentación (pellet celular, jugo y material de soporte)**

A 100 g de jugo tratado térmicamente se le adicionó maltodextrina y se agitó magnéticamente durante 10 min o hasta la disolución total, bajo condiciones de esterilidad. La cantidad de soporte a adicionar se calculó de acuerdo al contenido de sólidos totales en el jugo fresco en proporción de 2:1 (g de soporte:g de sólidos de jugo) (Montiel-Sánchez, 2015). Posteriormente se adicionó 1 g de pellet celular de *L. reuteri* NRRL B-14171 húmedo. A la mezcla de alimentación se le determinó la concentración de UFC/mL previo al secado, por el método de vertido en placa. De igual manera se prepararon y analizaron las mezclas de alimentación adicionadas con el extracto acuoso de mucílago, en una relación 1:1:1 (g de soporte: g de sólidos de jugo: g de sólidos de mucílago).

#### **4.6.7 Secado por aspersión de jugo de tuna adicionado con *L. reuteri***

El secado por aspersión se realizó en un secador marca BÜCHI modelo B-190 en ciclo abierto a cocorriente. Las condiciones de secado se seleccionaron de acuerdo a lo reportado por diversos autores para el secado por aspersión de BAL (Corcoran *et al.*, 2004; Reddy *et al.* 2009; Jantzen *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015), jugos de frutas (Jittanit *et al.*, 2010; Saikia *et al.*, 2015b) y jugos de frutas adicionados con BAL (Barbosa *et al.*, 2015; Barbosa *et al.*, 2016); aplicando un diseño factorial 2<sup>2</sup>, con 2 niveles de temperatura de entrada y 2 niveles de temperatura de salida:

$T_{in\ 1} = 170\ ^\circ\text{C}$  y  $T_{in\ 2} = 150\ ^\circ\text{C}$ .

$T_{out\ 1} = 60\ ^\circ\text{C}$  y  $T_{out\ 2} = 80\ ^\circ\text{C}$

El jugo de tuna roja deshidratado se empacó en bolsas de tricapa metalizadas y selladas y se realizaron los análisis físicos, químicos y microbiológicos al polvo deshidratado y rehidratado.

#### **4.6.7.1 Acondicionamiento del secador por aspersión**

Previo al secado por aspersión de jugo, el secador se acondicionó asperjando agua destilada estéril durante 20 min a  $T_{in} = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $T_{out} = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$  con la finalidad de disminuir la carga microbiana en el equipo, el recipiente colector de polvo fue tratado bajo luz UV por 15 min. El acondicionamiento se realizó de acuerdo a lo reportado por Páez (2013).

#### **4.6.7.2 Cuantificación de la viabilidad celular posterior al secado por aspersión**

La viabilidad (UFC/g) después del secado por aspersión se cuantificó resuspendiendo 1 g de polvo en 9 mL de agua peptonada, se realizaron diluciones seriadas, se sembraron mediante la técnica de vertido en placa en agar MRS y se incubaron durante 24-36 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El conteo de las colonias de las placas se realizó de acuerdo con la NOM-092-SSA1-1994.

#### **4.6.7.3 Rendimiento**

El cálculo del rendimiento del proceso se realizó en base a los sólidos alimentados (sólidos del jugo de tuna roja, sólidos del material de soporte y sólidos del extracto acuoso de mucílago de nopal, todos en base seca) y los sólidos recuperados al final del proceso en base seca, de acuerdo a lo reportado por Montiel-Sánchez (2015). El cálculo se realizó con la ecuación 1.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{sólidos recuperados}}{\text{sólidos alimentados}} \times 100 \quad (1)$$

#### **4.6.8 Análisis físicos, químicos y microbiológicos**

Se realizaron los análisis físicos, químicos y microbiológicos al jugo de tuna roja fresco y tratado térmicamente, al extracto acuoso de mucílago de nopal y al jugo deshidratado. Durante el almacenamiento únicamente se cuantificó viabilidad celular.



#### **4.6.8.1 Sólidos solubles**

La determinación de los sólidos solubles (°Brix) se realizó, por triplicado, mediante refractometría (Leica mark II) en base al método de AOAC 983.17. El refractómetro fue calibrado con agua destilada.

#### **4.6.8.2 Sólidos totales**

Los sólidos totales se determinaron en el jugo fresco, en el jugo tratado térmicamente y en el extracto acuoso de mucílago de nopal en base al método de la AOAC 920.151. La muestra ( $2 \pm 0.1$  g) se mantuvo a 60 °C y 600 mbar hasta llegar a peso constante. Las muestras se pesaron en balanza analítica (Velab modelo Ve-204) cada 2 h.

#### **4.6.8.3 Determinación del contenido de humedad**

El contenido de humedad en el jugo de tuna deshidratado con BAL se determinó mediante el método de la AOAC 925.10. La muestra ( $1 \pm 0.1$  g de jugo deshidratado) se mantuvo a 60 °C y 600 mbar hasta llegar a peso constante. Se registró el cambio de peso cada hora.

#### **4.6.8.4 Determinación de la actividad de agua**

La actividad de agua se determinó en las muestras deshidratadas empleando un higrómetro Aqualab, Decagon, Devices, modelo Serie 3. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada tratamiento. La calibración del equipo se llevó a cabo con agua destilada.

#### **4.6.8.5 Rehidratación**

La rehidratación del jugo en polvo se realizó tomando en cuenta la cantidad de sólidos de la mezcla de alimentación, de acuerdo con la metodología descrita en 2010 por Jittanit y colaboradores, que establece que se debe hidratar con agua destilada hasta su concentración de sólidos originales, posteriormente se sometió a agitación en una parrilla de agitación magnética hasta su disolución.

#### **4.6.8.6 Cuantificación de pH**

El pH se determinó en las muestras de jugo fresco, jugo tratado térmicamente, extracto acuoso de mucílago de nopal y jugo deshidrato con BAL rehidratado, de acuerdo con el método EN 1132 (1994) con un potenciómetro marca Science Med, modelo PHS-W.

#### **4.6.8.7 Contenido de fenoles totales**

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Saikia *et al.*, 2015b), el cual consistió en agregar 100  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu 2 M a 20  $\mu$ L de muestra con 1580  $\mu$ L de agua destilada, agitar en vortex durante 10 s, incubar durante 5 min, adicionar 300  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % e incubar a 40 °C durante 30 min. Finalmente se midió la absorbencia a 765 nm.

Se realizó la curva de calibración con soluciones de ácido gálico a 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.01 mg/mL. Los resultados fueron expresados en mg equivalente de ácido gálico por gramo de base seca (mg EAG/g b.s.). El porcentaje de retención se calculó con la ecuación 2.

$$\% \text{ retención de FT} = \frac{\text{contenido de fenoles totales en el polvo (mg } \frac{\text{EAG}}{100 \text{ g bs}})}{\text{contenido de fenoles totales en el jugo fresco (mg } \frac{\text{EAG}}{100 \text{ g bs}})} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.6.8.8 Actividad antirradical DPPH

Se determinó la actividad antirradical mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-picil-hidracilo) a una concentración de 25 mg/L de MetOH. Se agregaron 3.9 mL de DPPH preparado a 100 µL de la muestra del jugo fresco y rehidratado, se dejó en reposo durante 5 min a 25 °C bajo condiciones de oscuridad y se midió la absorbencia de las muestras a 517 nm, esto de acuerdo a lo propuesto por Montiel-Sánchez (2015) y Saikia y colaboradores en 2015b.

Posteriormente el porcentaje de retención de la actividad antirradical se definió como la actividad reportada en el producto final comparada con la actividad reportada en la solución inicial alimentada al secador y se calculó con la ecuación 3.

$$\% \text{ Retención de AAR} = \frac{\text{contenido de AAR en el polvo } (mg \frac{EAA}{100 g bs})}{\text{contenido de AAR en el jugo fresco } (mg \frac{EAA}{100 g bs})} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.6.9 Pruebas de almacenamiento

El jugo de tuna adicionado con BAL deshidratado por aspersion fue empacado en bolsas de tricapa metalizadas selladas y almacenado a 4 °C y a temperatura ambiente promedio de 31 °C durante 3 meses. Los microorganismos viables fueron cuantificados cada mes de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 4.3.7.2.

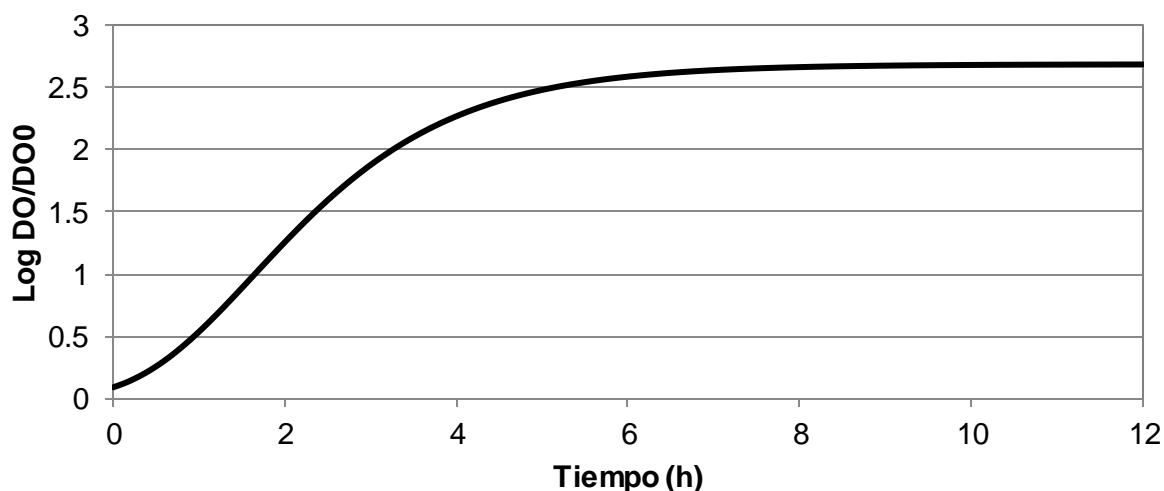
#### 4.6.10 Análisis estadístico

La interpretación de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ , para esto se empleó el software Minitab 17. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización del crecimiento de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 en caldo MRS

La Figura 5.1 presenta la curva de crecimiento de *L. reuteri* NRRL B-14171 en caldo MRS a 37 °C determinada por densidad óptica (D.O.), en ella se puede observar que la fase estacionaria es alcanzada a las 6 h, se observó un crecimiento de  $Y_{\max} = 2.688 \pm 0.099$  ciclos logarítmicos y una tasa máxima de crecimiento de  $0.744 \pm 0.479 \text{ h}^{-1}$ . Estos resultados coinciden con lo reportado por Zamudio-Jaramillo (2007). Con un inóculo del 1 % de *L. reuteri* NRRL B-14171 se obtuvieron  $1.117 \pm 0.201 \text{ g}$  de pellet húmedo. En diversos reportes se menciona que las células bacterianas que se encuentran en fase estacionaria logran ser más resistentes al estrés (Teixeira *et al.*, 1995; Corcoran *et al.*, 2004). Esta mayor tolerancia al estrés se ha atribuido a una respuesta natural ocasionada por la carencia de nutrientes y por la acumulación de metabolitos tóxicos durante la fase estacionaria (Páez, 2013).



**FIGURA 5.1** Curva de crecimiento de *L. reuteri* NRRL B-14171 en caldo MRS a 37 °C

## 5.2 Características del jugo de tuna roja (*Opuntia ficus indica*) fresco y tratado térmicamente

Los resultados de pH, sólidos solubles y sólidos totales, actividad antirradical y de fenoles totales, del jugo fresco y del tratado térmicamente se muestran en la Tabla 5.1. La aplicación del tratamiento térmico no afectó la calidad del jugo, bajo estas variables no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$  ANOVA y prueba de rango múltiple Tukey) entre las características químicas y físicas evaluadas para el jugo fresco y el tratado térmicamente.

El tratamiento térmico de los jugos debe lograr inactivar la población microbiana total para garantizar y prolongar su vida útil, sin afectar la calidad del jugo fresco (pH, contenido de vitaminas y compuestos fenólicos, etc.) (Santhirasegaram *et al.*, 2013).

**TABLA 5.1** Efecto del tratamiento térmico de jugo de tuna roja sobre el pH, el contenido de sólidos, la actividad antirradical y el contenido de fenoles.

Variable	Jugo fresco	Jugo tratado térmicamente
pH	5.911 ± 0.021 <sup>a</sup>	6.031 ± 0.033 <sup>a</sup>
Sólidos solubles (°Brix)	13.240 ± 0.032 <sup>a</sup>	13.612 ± 0.082 <sup>a</sup>
Sólidos totales (g/g)	0.133 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.139 ± 0.003 <sup>a</sup>
Act. antirradical (mg EAA/g b.s.)	3.351 ± 0.097 <sup>a</sup>	3.645 ± 0.087 <sup>a</sup>
Fenoles totales (mg EAG/g b.s.)	4.703 ± 0.090 <sup>a</sup>	4.392 ± 0.007 <sup>a</sup>

Diferencia significativa determinada mediante ANOVA y prueba de rango múltiple de Tukey. Letras diferentes en las filas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Media ± desviación estándar. EAA: Equivalentes de ácido ascórbico. EAG: Equivalentes de ácido gálico.

## 5.3 Extracción acuosa de mucílago de nopal

Para seleccionar el método de extracción de mucílago de nopal para ser probado como material de soporte durante el secado y aumentar así la calidad

nutricional del jugo probiótico, se evaluó el contenido de sólidos totales, sólidos solubles y el pH del mucílago (Tabla 5.2) obtenido por los cuatro procedimientos.

**TABLA 5.2** pH y contenido de sólidos del mucílago de nopal obtenido con diferentes tratamientos.

	<b>Cladiodos escaldados, solución acuosa</b>	<b>Cladiodos macerados y precipitación con etanol</b>	<b>Cladiodos macerados, centrifugación y precipitación con etanol</b>	<b>Jugo de cladiodos, centrifugación y precipitación con etanol</b>
pH	4.373 ± 0.058 <sup>a</sup>	4.318 ± 0.006 <sup>a</sup>	4.373 ± 0.012 <sup>a</sup>	4.363 ± 0.004 <sup>a</sup>
Sólidos solubles (°Brix)	0.433 ± 0.057 <sup>a</sup>	0.516 ± 0.023 <sup>a</sup>	0.466 ± 0.094 <sup>a</sup>	0.566 ± 0.047 <sup>a</sup>
Sólidos totales (g/g)	0.004 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.004 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.003 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.004 ± 0.001 <sup>a</sup>

Media ± desviación estándar. Diferencia significativa determinada mediante ANOVA y prueba de rango múltiple de Tukey. Letras diferentes en las filas indican diferencia significativa ( $p < 0.005$ ).

Los resultados de este estudio no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos. El mucílago obtenido por maceración contenía restos de médula, lo que dificultaría el proceso de secado por aspersion; problema similar se presentó con el jugo de cladodios, el cual fue centrifugado a 7000 g por 20 min para eliminar clorofila e impurezas. Los mucílagos deshidratados y pulverizados presentaron baja solubilidad en agua lo cual representaría un problema al ser incorporados a la mezcla de alimentación para el secado por aspersion.

El bajo rendimiento de la extracción de mucílago de nopal puede atribuirse al procesamiento de las muestras, pues durante el paso de pelado del nopal también se elimina una parte de la pulpa que contiene mucílago. Valores similares fueron publicados por Cárdenas y colaboradores (1997), quienes reportan un rendimiento de 0.07 g/100 g en nopal fresco, por Sepúlveda y colaboradores (2007), quienes obtuvieron rendimientos entre 1.3 y 1.6 g/100 g de nopal fresco, esto en función del

volumen de agua utilizado, de la temperatura y del tiempo de extracción; y por Majdoub y colaboradores (2001) que reportaron rendimientos de 0.085 g de mucílago purificado/100 g de pulpa fresco de nopal.

Para el presente trabajo, al presentar características similares entre los distintos métodos de extracción, se optó por seleccionar el método que presentara menor tiempo de extracción, así, el extracto acuoso del escaldado de los nopales por 3 h fue seleccionado, el cual fue filtrado con ayuda de una bomba de vacío para eliminar las impurezas de la médula y concentrado por rotaevaporación.

#### **5.4 Estandarización de la concentración celular en el jugo previo al secado**

Para poder determinar la concentración celular (UFC/mL) en el jugo de tuna roja, se resuspendieron distintas cantidades de pellet en agua peptonada y posteriormente en el jugo de tuna, se contaron las UFC en agar MRS. La cantidad de pellet con la que se obtuvo la concentración recomendada ( $>10^8$  UFC/mL) para el proceso de secado por aspersion fue de 1 g en 100 g de líquido, con lo que fue posible alcanzar la concentración de  $10^9$  UFC/mL. En la Tabla 5.3 se muestra que no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las concentraciones.

**TABLA 5.3** Concentración celular (UFC/mL) de 1 g de pellet de *L. reuteri* NRRL B-14171 en 100 g de agua peptonada o jugo de tuna roja tratado térmicamente.

	<b>Agua peptonada</b>	<b>Jugo de tuna tratado térmicamente</b>
UFC/mL	$1.70 \times 10^9$	$4.83 \times 10^9$
Log UFC/mL	$9.231 \pm 0.008$	$9.680 \pm 0.047$

Media  $\pm$  desviación estándar

La cuenta viable de todas las mezclas de alimentación realizada previo al secado por aspersion se muestra en la Tabla 5.4, en la que se observa que se logró

la estandarización de la cuenta de *L. reuteri* NRRL B-14171 ya que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones celulares ( $10^9$  UFC/mL).

**TABLA 5.4** Concentración celular de *L. reuteri* en la mezcla de alimentación previo al secado por aspersión.

Tratamiento	<i>L. reuteri</i> NRRL B-14171 Log (UFC/mL)
Jugo de tuna t.t. y EAMN	9.713 ± 0.020
T1 (180 y 70)	9.659 ± 0.061
T2 (180 y 80)	9.668 ± 0.059
T3 (170 y 80)	9.683 ± 0.012
T4 (170 y 70)	9.670 ± 0.045

EAMN: extracto acuoso de mucílago de nopal. Las mezclas de alimentación T1 a T4 contenían MDX 2:1 (p/p). En el caso del jugo de tuna tratado térmicamente y del EAMN la relación fue 1:1:1 (g de soporte:g de sólidos de jugo:g de sólidos de mucílago). Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar.

### 5.5 Efecto de las temperaturas de secado por aspersión sobre la viabilidad de *L. reuteri* y las características químicas y físicas del jugo de tuna roja deshidratado

En el proceso de secado por aspersión se esperaba una disminución de entre 1 o 2 ciclos logarítmicos de *L. reuteri*, debido al estrés térmico al cual son sometidas las bacterias al exponerse a altas temperaturas (Peighambardoust *et al.*, 2011), recordando que para un alimento sea denominado como probiótico debe de contener al menos  $10^7$  UFC/mL o g al momento de su consumo (Pop *et al.*, 2015). Se han desarrollado trabajos de secado por aspersión de *L. reuteri* en los que han alcanzado concentraciones de  $10^{10}$  UFC/mL (Liu *et al.*, 2015) y  $10^8$  UFC/mL (Jantzen *et al.*, 2013) en la mezcla de alimentación previo al secado por aspersión, obteniendo viabilidades de 95 y 80.37%, respectivamente.



### 5.5.1 Efecto de las temperaturas de secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* sobre la viabilidad celular

Como se observa en la Tabla 5.5 la viabilidad más alta se alcanzó con el secado a 170 - 70 °C en el cual la viabilidad solo disminuyó 1 ciclo log (viabilidad de 90 %), seguido del tratamiento 180 - 70 °C, que disminuyó 2 ciclos log (viabilidad de 79 %), con respecto a la cuenta viable antes del secado que fue de  $9.67 \pm 0.01$  Log UFC/mL. Sin embargo, se observó que a  $T_{out} = 80$  °C se provocó una disminución de 3 ciclos log con viabilidades de 66 y 67 %, la temperatura de entrada también ejerció un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la viabilidad ya que con la  $T_{in} = 180$  °C se redujeron 2 ciclos log y con la  $T_{in} = 170$  °C la disminución fue de 1 ciclo log.

**TABLA 5.5** Viabilidad de *L. reuteri* NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado por aspersión con maltodextrina (1:2).

Tratamiento	Viabilidad	
	%	Log UFC/mL
<b>180 Y 70 °C</b>	$79.671 \pm 0.754^b$	$7.695 \pm 0.023^{bc}$
<b>180 Y 80 °C</b>	$66.339 \pm 0.105^c$	$6.440 \pm 0.029^c$
<b>170 Y 80 °C</b>	$67.737 \pm 4.045^c$	$6.559 \pm 0.383^c$
<b>170 Y 70 °C</b>	$90.060 \pm 2.003^a$	$8.708 \pm 0.153^{ab}$

Media  $\pm$  desviación estándar. Diferencia significativa determinada mediante ANOVA y prueba de rango múltiple Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Los valores de los estimadores de los parámetros ( $\beta_i$ ) del secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 calculados por regresión lineal, se presentan en la Tabla 5.6. A los estimadores de los parámetros se les realizó análisis de varianza, valores de ( $p < 0.05$ ) indicaron diferencia significativa (Tabla 5.7).

**TABLA 5.6** Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersión sobre la viabilidad de *L. reuteri* NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado con maltodextrina (1:2).

$\beta_i$	Valor del estimador
$\beta_0$	1492.78
$\beta_1$	-7.33
$\beta_2$	-17.52
$\beta_{12}$	0.09

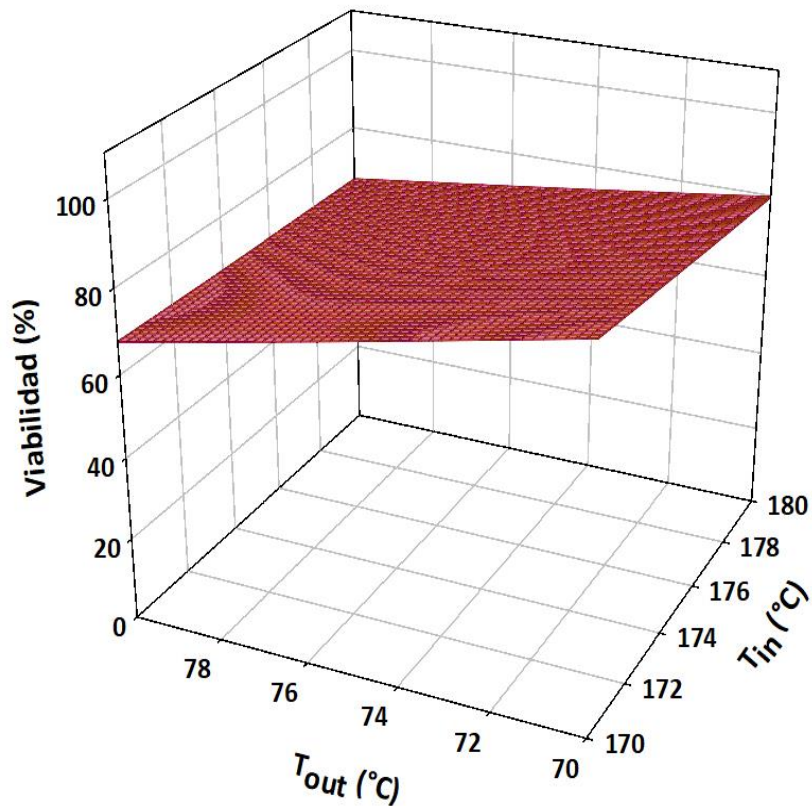
**TABLA 5.7** Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión con maltodextrina (1:2) sobre la viabilidad de *L. reuteri* NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado.

Variable	$T_{in}$	$T_{out}$
Viabilidad (%)	0.039	0.037

Valores de  $p < 0.05$  indicaron diferencia significativa.

El efecto de las variables independientes sobre la viabilidad de *L. reuteri* en jugo de tuna roja deshidratado también puede observarse en la Figura 5.2.

De acuerdo a lo reportado por Liu y colaboradores en 2015, se sabe que durante el proceso de secado las células experimentan estrés debido al calor, deshidratación, exposición al oxígeno y estrés osmótico, lo cual puede llevar a la pérdida de la actividad metabólica, provocar daño celular y posteriormente la muerte. Igualmente Teixeira y colaboradores en 1996, reportaron que otro probable factor de la muerte celular durante el secado es que las células al entrar en contacto con grandes volúmenes de aire pueden causar la oxidación de los lípidos presentes en la membrana celular lo que provoca cambios físicos en la célula.



**FIGURA 5.2** Efecto de la temperatura de secado por aspersión sobre la viabilidad de *L. reuteri* NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado.

*L. reuteri* en este estudio mostró capacidad para soportar el estrés del proceso de secado por aspersión, usando las temperaturas más bajas en el proceso, pues si bien queda demostrado por Teixeira y colaboradores (1995), que cada cepa tiene una temperatura crítica específica por encima de la cual la supervivencia celular disminuye drásticamente, también es sabido que otro factor que puede afectar en la viabilidad celular es el tipo de matriz de secado o el tipo de material de soporte usado durante el proceso. En medios más ácidos como el jugo de piña con pH 3.49, la viabilidad de *L. reuteri* se vio afectada por el proceso de secado perdiendo hasta 6 ciclos log (Torres *et al.*, 2018), así mismo en medios que contenían proteínas ( $\beta$  y  $\alpha$ -

lactoalbúmina) y carbohidratos (Jantzen *et al.*, 2013) la supervivencia celular fue alta. Es posible que en este caso la viabilidad se encontró favorecida por la matriz alimentaria y el material de soporte (maltodextrina) empleados, la pérdida de la viabilidad en este trabajo se puede atribuir a las temperaturas de salida empleadas, pues como se mencionó anteriormente los estudios de Teixeira y colaboradores en 1995, demostraron que cada cepa tiene una temperatura específica por encima de la cual la supervivencia celular puede disminuir drásticamente. De acuerdo a lo reportado por Teixeira y colaboradores (1997), cuando las células son expuestas a temperaturas superiores a la crítica puede ocurrir la desnaturalización de los ribosomas y de las proteínas, así como daño a la pared celular ocasionando la muerte celular. De acuerdo con los resultados de este trabajo, *L. reuteri* presentó una baja resistencia térmica a temperaturas superiores a 70 °C ya que a 80 °C presentó menor viabilidad (64 y 65 %).

Los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a viabilidad después del proceso de secado por aspersión ( $10^8$  UFC/g o mL) pueden ser comparables con los trabajos realizados en 2018 por Torres y colaboradores, Kingwater y colaboradores en 2015, por Barbosa y colaboradores en 2015 y Pereira y colaboradores en 2013, para jugo de piña, naranja, manzana y lichi respectivamente, quienes reportaron viabilidades superiores a  $10^7$  UFC/g de jugo deshidratado. El jugo de tuna roja deshidratado por aspersión usando maltodextrina como soporte en relación 2:1 adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171, puede ser considerado para ser clasificado como un alimento funcional probiótico.

### **5.5.2 Efecto de las temperaturas de secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* sobre el pH**

El pH del jugo de tuna roja deshidratado varió entre 6.2 y 6.4 (Tabla 5.8), sin diferencia significativa entre ellos ( $p > 0.05$ ). La Tabla 5.9 muestra los valores de los estimadores de los parámetros. Los valores de probabilidad de la Tabla 5.10 indican

que las temperaturas de secado no ejercieron efecto significativo sobre esta variable de respuesta.

**TABLA 5.8** Efecto de las temperaturas de secado sobre el pH del jugo de tuna roja deshidratado con maltodextrina (1:2) y adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171.

$T_{in}/T_{out}$	pH
180 - 80 °C	6.23 ± 0.01
180 - 70 °C	6.29 ± 0.02
170 - 80 °C	6.37 ± 0.20
170 - 70 °C	6.42 ± 0.00

Media ± desviación estándar. El ANOVA y las pruebas de rango múltiple de Tukey ( $p \geq 0.05$ ) demostraron que no hay diferencia significativa entre tratamientos.

**TABLA 5.9** Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersion con maltodextrina (1:2) sobre el pH del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 deshidratado y reconstituido.

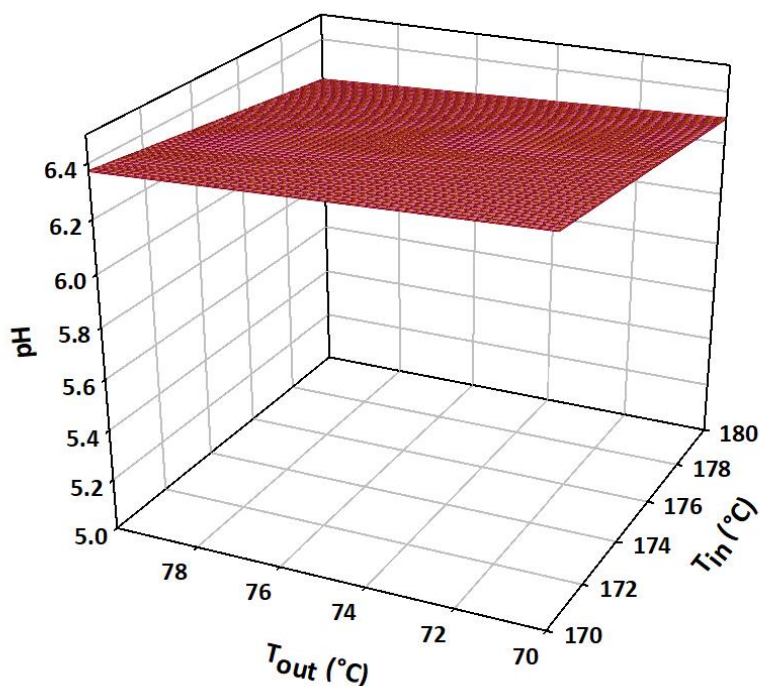
$\beta_i$	Valor del estimador
$\beta_0$	8.11633
$\beta_1$	-0.06765
$\beta_2$	0.00778
$\beta_{12}$	-0.00008

**TABLA 5.10** Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersion con maltodextrina (1:2) sobre el pH del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 deshidratado y reconstituido.

Variable	$T_{in}$	$T_{out}$
pH	0.824	0.615

Valores de  $p < 0.05$  indicaron diferencia significativa

En la Figura 5.3 se presenta la gráfica de superficie de respuesta del efecto de las temperaturas de secado sobre el pH, en ella se puede observar que la superficie de respuesta es prácticamente paralela al plano, esto indica la ausencia de efecto de las variables independientes en los intervalos de temperaturas estudiadas. Estos datos indican que el secado no afectó a los compuestos que pueden generar o aceptar iones hidrógeno.



**FIGURA 5.3** Efecto de la temperatura de secado por aspersion sobre el pH de jugo de tuna roja deshidratado adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 y reconstituido.

Estos resultados son similares con lo obtenido por Torres y colaboradores en 2018, con jugo de piña deshidratado por aspersion y lo obtenido por Rodriguez-Hernandez y colaboradores en 2005 para jugo de tuna roja deshidratado por aspersion, quienes reportaron la estabilidad de esta variable. Así mismo Fernandes Pereira y colaboradores en 2013, reportaron que el pH en jugo de manzana

probiótico deshidratado por aspersión se mantuvo estable en el polvo reconstituido así como también durante el almacenamiento de 35 días, siendo este un factor importante en la conservación de la viabilidad celular.

### **5.5.3 Efecto de las temperaturas de secado por aspersión de jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* sobre la actividad de agua y el contenido de humedad**

La actividad de agua ( $A_w$ ) del jugo deshidratado se encontró entre 0.36 y 0.39 y el contenido de humedad varió entre 3.1 y 4.1 %, los resultados se presentan en la Tabla 5.11. El agua es indispensable en el desarrollo de microorganismos y la mayoría de ellos necesitan de valores elevados de actividad de agua para su crecimiento, las bacterias requieren valores de  $A_w$  mayores a 0.9, los hongos filamentosos a 0.8 y las levaduras a 0.85. El agua es un factor importante, debido a que afecta las propiedades físicas de los productos, de esta manera, se establece una relación entre el agua disponible en el alimento y su conservación mediante la actividad de agua (LeBail *et al.*, 2003). La  $A_w$  se define como la humedad relativa en equilibrio con el producto a la misma temperatura, por tanto ésta afecta el peso del alimento y por tanto su valor comercial al mismo tiempo que es responsable del estado físico de alimento (Figueira *et al.*, 2004).

El jugo deshidratado adicionado con *L. reuteri* bajo las condiciones empleadas en este trabajo, cumplió con las características de  $A_w$  ( $< 0.6$ ) y humedad (5 %) recomendadas para garantizar su estabilidad química y microbiológica (NOM-218-SSA1-2011).

Los valores de los estimadores de los parámetros ( $\beta_i$ ) de los modelos que relacionan las temperaturas de secado con el contenido de humedad y la  $A_w$  del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 deshidratado por aspersión, se presentan en la Tabla 5.12 y la probabilidad de que las variables independientes ejerzan efecto sobre las dependientes, se presenta en la Tabla 5.13.

**TABLA 5.11** Efecto de las temperaturas de secado sobre la actividad de agua y el contenido de humedad del jugo de tuna roja deshidratado con maltodextrina (1:2) adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171.

Tratamiento	% humedad	Aw
180 y 80 °C	3.177 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.360 ± 0.068 <sup>a</sup>
180 y 70 °C	3.214 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.369 ± 0.129 <sup>a</sup>
170 y 80 °C	3.556 ± 0.008 <sup>ab</sup>	0.366 ± 0.441 <sup>a</sup>
170 y 70 °C	4.115 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.391 ± 0.056 <sup>a</sup>

Media ± desviación estándar. Diferencia significativa determinada mediante ANOVA y prueba de rango múltiple de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

**TABLA 5.12** Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersión sobre el contenido de humedad y actividad de agua del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 deshidratado con maltodextrina (1:2).

$\beta_i$	Humedad (%)	Aw
$\beta_0$	85.5216	2.93710
$\beta_1$	-0.4558	-0.01392
$\beta_2$	-0.9440	-0.03086
$\beta_{12}$	0.0052	0.00017

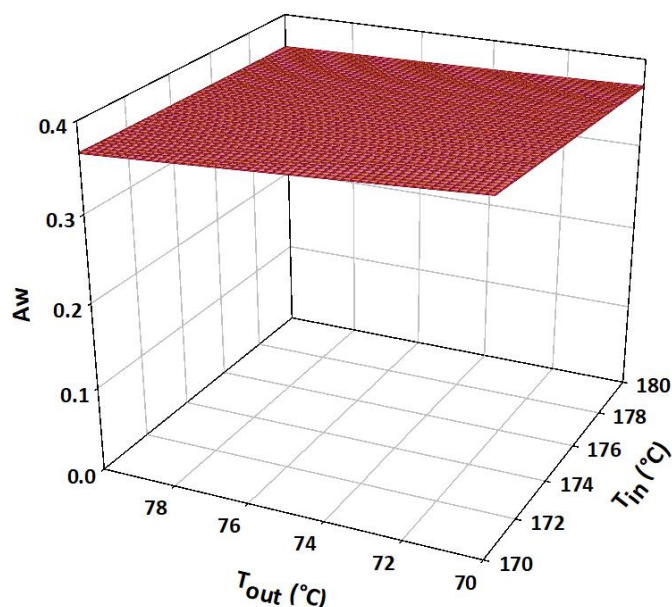
**TABLA 5.13** Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión sobre el contenido de humedad y la Aw del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 deshidratado por aspersión con maltodextrina (1:2).

Variable	T <sub>in</sub>	T <sub>out</sub>
Aw	0.191	0.174
Humedad (%)	0.120	0.091

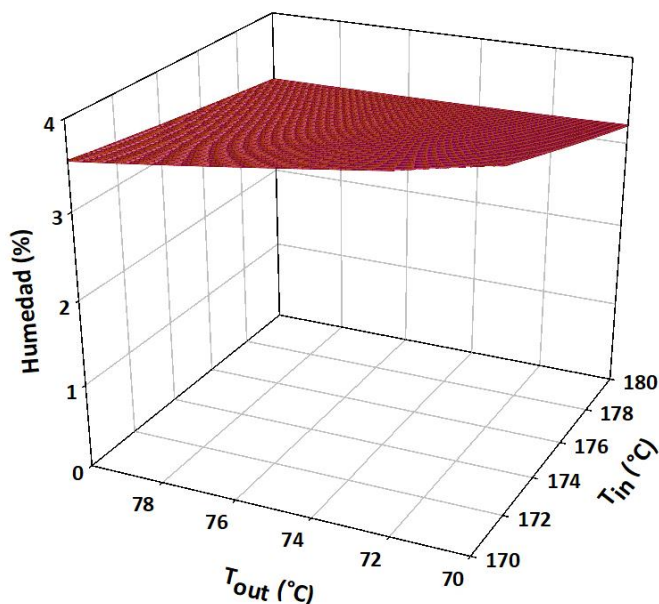
Valores de  $p < 0.05$  indicaron diferencia significativa



La temperatura de entrada y de salida no ejerció efecto significativo ( $p > 0.05$ ), sobre la actividad de agua del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* deshidratado, la temperatura más baja ejerció mayor influencia sobre el porcentaje de humedad; esto es debido a que el intervalo de temperatura de salida (70 y 80 °C) es relativamente bajo, si las temperaturas de salida fueran superiores se obtendría un producto con menor contenido de humedad (Jittanit *et al.*, 2010). El contenido de humedad se correlaciona con el aumento de temperatura en el proceso de secado, debido a que con el incremento en la temperatura de entrada existe un mayor gradiente de temperatura entre el aire y el producto que se está secando, esto permite una mayor transferencia de calor y masa, favoreciendo el incremento en la tasa de evaporación del agua y la disminución del contenido de humedad en el producto final seco (Frascareli *et al.*, 2012). El efecto de las temperaturas de entrada y salida también pueden observarse en las Figuras 5.4 y 5.5, en donde se observa que las superficies de respuesta son prácticamente paralelas al plano, indicando la ausencia de efectos.



**FIGURA 5.4** Efecto de la temperatura de secado por aspersión sobre la actividad de agua de jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 deshidratado.



**FIGURA 5.5** Efecto de la temperatura de secado por aspersión sobre el contenido de humedad de jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 deshidratado.

#### 5.5.4 Efecto de las temperaturas de secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* sobre el rendimiento

El rendimiento fue calculado incluyendo el jugo de tuna roja deshidratado recuperado del recipiente recolector. Con todos los tratamientos se obtuvieron rendimientos entre el 31 y el 41 % sin diferencia significativa entre ellos ( $p > 0.05$ ) (Tabla 5.14), indicando que el rendimiento no se vio afectado por las temperaturas de entrada y salida. Los rendimientos obtenidos fueron similares a los resultados obtenidos para jugo de piña probiótico (Torres *et al.*, 2018) y jugo de naranja probiótico (Barbosa *et al.*, 2016).

Los valores de los estimadores de los parámetros ( $\beta_i$ ) del modelo que relaciona las temperaturas de secado con el rendimiento del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* deshidratado por aspersión, se observan en la Tabla 5.15 y los valores de las probabilidades de que las variables independientes ejerzan efecto sobre el rendimiento, se presentan en la Tabla 5.16.

**TABLA 5.14** Efecto de las temperaturas de secado sobre el rendimiento del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 y deshidratado con maltodextrina (1:2).

Tratamiento	Rendimiento (%)
180 y 80 °C	41.275 ± 3.127 <sup>a</sup>
180 y 70 °C	35.010 ± 6.080 <sup>a</sup>
170 y 80 °C	37.344 ± 1.389 <sup>a</sup>
170 y 70 °C	31.694 ± 3.123 <sup>a</sup>

Media ± desviación estándar. El ANOVA y las pruebas de rango múltiple de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) demostraron que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**TABLA 5.15** Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersión sobre el rendimiento del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 y deshidratado con maltodextrina (1:2).

$\beta_i$	Valor del estimador
$\beta_0$	8.84474
$\beta_1$	-0.09827
$\beta_2$	-0.4709
$\beta_{12}$	0.00614

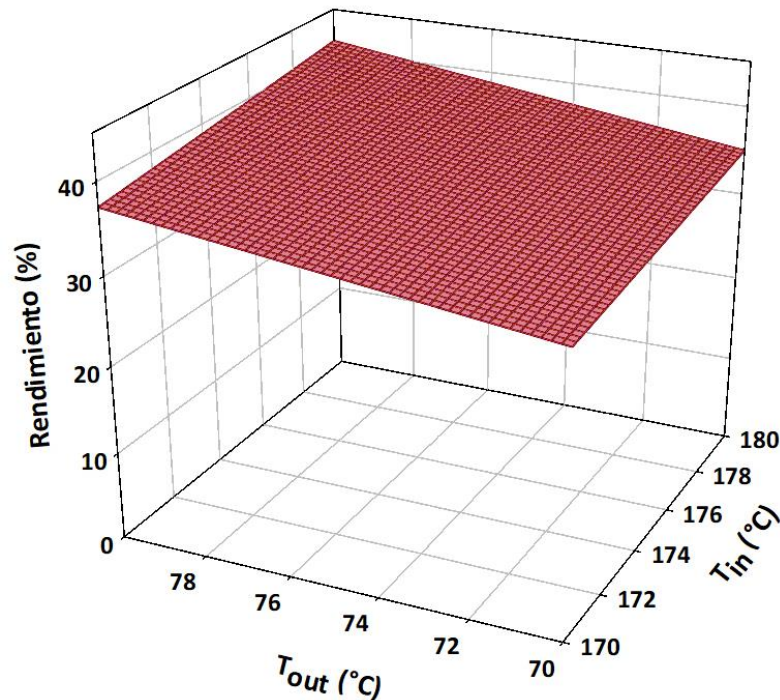
**TABLA 5.16** Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión sobre el rendimiento del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 y deshidratado por aspersión con maltodextrina (1:2).

Variable	$T_{in}$	$T_{out}$
Rendimiento (%)	0.962	0.982

Valores de  $p < 0.05$  indican diferencia significativa.

La Figura 5.6 muestra la superficie de respuesta del rendimiento del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri*, deshidratado, como se observa la superficie es

paeralela al plano, indicando que no hay diferencia significativa entre los tratamientos.



**FIGURA 5.6** Efecto de la temperatura de secado por aspersión sobre el rendimiento de jugo de tuna roja deshidratado adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171.

El rendimiento de los productos secados por aspersión puede verse influenciado por diferentes factores, incluida la temperatura de entrada, la velocidad de flujo de alimentación y la concentración de material de soporte (Fontes *et al.*, 2014). También puede verse afectado por la presencia de azúcares de bajo peso molecular como la fructosa, glucosa y sacarosa que generan mayor adherencia a las paredes de la cámara de secado (Barbosa *et al.*, 2015). Para que el proceso de secado por aspersión pueda ser considerado eficiente se deben obtener rendimientos por arriba del 50 % (Fang y Bhandari, 2011) sin embargo, en este trabajo los rendimientos obtenidos se encontraron por debajo de lo requerido, para aumentar el rendimiento se podría aumentar la cantidad de material de soporte para lograr una mejor encapsulación del jugo, ya que se disminuye la viscosidad e

higroscopicidad teniendo un efecto positivo en los rendimientos y eficiencia del proceso.

### 5.5.5 Efecto de las temperaturas de secado por aspersión del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical

El contenido de fenoles totales en el jugo de tuna roja deshidratado adicionado con *L. reuteri*, varió entre 0.83 y 1.33 mg EAG/g b.s. y el porcentaje de retención entre 28 y 17 % (Tabla 5.17). El ANOVA evidenció que las temperaturas de entrada y salida no ejercieron efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre el contenido de fenoles totales del jugo de tuna roja deshidratado adicionado con *L. reuteri*.

**TABLA 5.17** Efecto de las temperaturas de secado sobre el contenido de fenoles totales y su porcentaje de retención en jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 y deshidratado con maltodextrina (1:2).

Tratamiento	Fenoles totales (mg EAG/g b.s.)	% de retención
180 y 80 °C	0.833 ± 0.006	17.71 ± 0.144
180 y 70 °C	1.117 ± 0.161	23.75 ± 3.435
170 y 80 °C	1.072 ± 0.134	22.79 ± 2.86
170 y 70 °C	1.337 ± 0.061	28.44 ± 1.31

Media ± desviación estándar. El ANOVA y la prueba de rango múltiple de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos.

Por otro lado, la actividad antirradical en el jugo de tuna roja deshidratado con *L. reuteri*, varió entre 0.91 y 0.85 mg EAA/g b.s.; mientras que el porcentaje de retención se encontró entre 24 y 27 % (Tabla 5.18). La temperatura del proceso de secado no tuvo un efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre la actividad antirradical y su porcentaje de retención en el jugo de tuna roja.

Los valores de los estimadores de los parámetros ( $\beta_i$ ) del modelo que relaciona las temperaturas de secado con el contenido de fenoles y la actividad antirradical del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* deshidratado, se pueden observar en la Tabla 5.19 y los valores de significancia de las variables sobre el contenido de fenoles y la actividad antirradical se presentan en la Tabla 5.20.

**TABLA 5.18** Efecto de las temperaturas de secado sobre la actividad antirradical y su porcentaje de retención en jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 y deshidratado con maltodextrina (1:2).

Tratamiento	Actividad antirradical (mg EAA/g b.s.)	% de retención
180 y 80 °C	0.893 ± 0.916	26.66 ± 0.494
180 y 70 °C	0.850 ± 0.025	25.36 ± 0.765
170 y 80 °C	0.851 ± 0.000	24.61 ± 0.010
170 y 70 °C	0.914 ± 0.025	27.29 ± 0.749

Media ± desviación estándar. El ANOVA y la prueba de rango múltiple Tukey ( $p \leq 0.05$ ) no mostraron diferencia significativa entre tratamientos.

**TABLA 5.19** Estimadores de los parámetros del modelo que relaciona el efecto de la temperatura del secado por aspersion sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 y deshidratado con maltodextrina (1:2).

$\beta_i$	Fenoles totales	Actividad antirradical
$\beta_0$	4.75202	19.5102
$\beta_1$	-0.00914	-0.0998
$\beta_2$	0.00477	-0.2356
$\beta_{12}$	-0.0018	0.0013

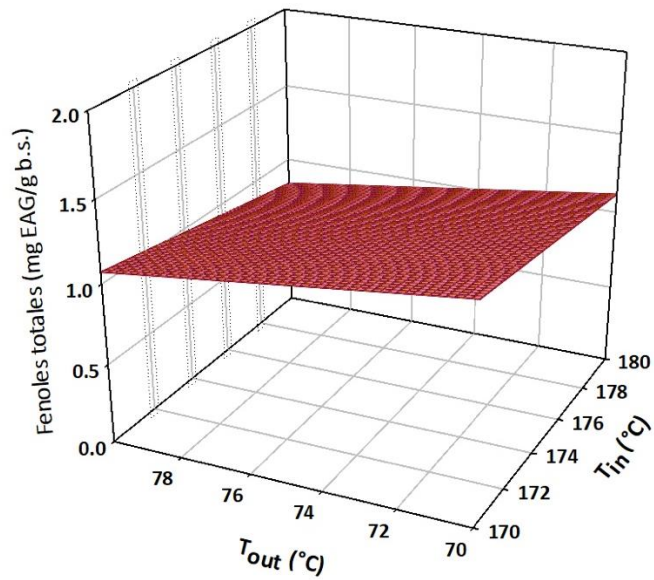
**TABLA 5.20** Significancia del efecto de las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical del jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 deshidratado por aspersión con maltodextrina (1:2).

<b>Variables</b>	<b>T<sub>in</sub></b>	<b>T<sub>out</sub></b>
<b>Fenoles totales</b>	0.987	0.941
<b>Act. antirradical</b>	0.009	0.009

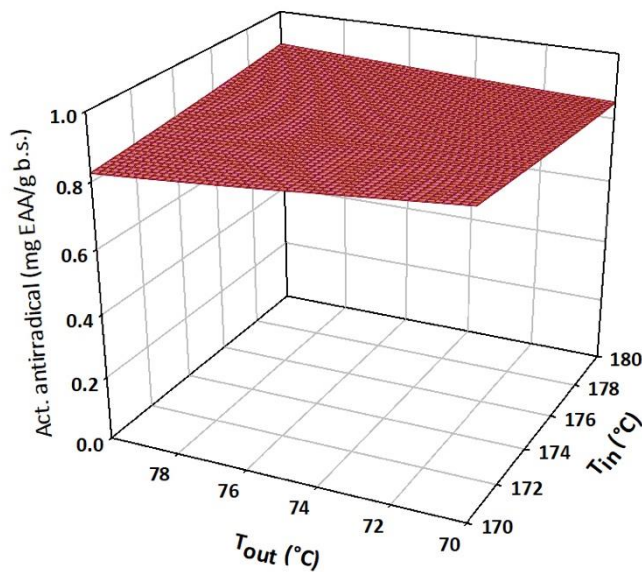
Valores de  $p < 0.05$  indican diferencia significativa

Las Figuras 5.7 y 5.8 muestran las superficies de respuesta que relaciona las temperaturas de entrada y salida, con el contenido de fenoles totales y la actividad antirradical, respectivamente, del jugo de tuna roja deshidratado adicionado con *L. reuteri*. En las Figuras 5.7 y 5.8 se puede observar que, en los intervalos de temperaturas estudiados, los efectos no son significativos, lo que coincide con los resultados del análisis de varianza (Tabla 5.19) y con los valores de probabilidad del efecto de las variables independientes (Tabla 5.20).

En comparación con el jugo fresco, el contenido de fenoles totales se redujo 70 % y la actividad antirradical 50 %, esta disminución depende en gran medida de la susceptibilidad al calor y a los cambios conformacionales que pueden sufrir los compuestos fenólicos, pues éstos tienen diferentes grados de tolerancia al calor, reorganización y degradación estructural, que a su vez pueden afectar su contenido y actividad (Saikia *et al.*, 2015b). Los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con los obtenidos por Torres y colaboradores en 2018, quien reportó el mismo porcentaje de pérdida de estos componentes; también son comparables con los resultados reportados para jugos de piña, mandarina y carambola deshidratados por aspersión por Saikia y colaboradores en 2015b.



**FIGURA 5.7** Efecto de la temperatura de secado por aspersion de jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 sobre el contenido de fenoles totales.



**FIGURA 5.8** Efecto de la temperatura de secado por aspersion de jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 sobre la actividad antirradical.

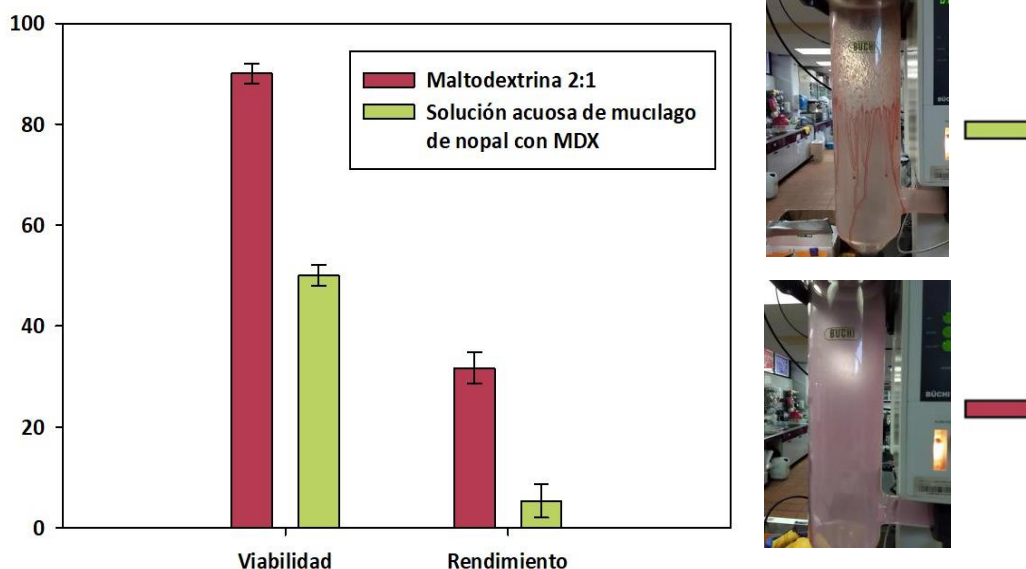


Se considera a los compuestos fenólicos importantes debido a que promueven efectos benéficos para la salud como la reducción de la presión arterial, disminución de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer gracias a que promueven la reducción del estrés oxidativo y la inhibición de la oxidación macromolecular, sin embargo estas moléculas son inestables y en jugo fresco tienen una vida útil muy corta (Shahidi y Naczsk, 2006). La tuna roja forma parte del grupo de alimentos funcionales debido a que posee alta actividad antioxidante como consecuencia de su elevada concentración de betalaínas, polifenoles y vitamina C (Tesoriere *et al.*, 2005).

#### **5.6 Efecto del tipo de soporte utilizado para el secado por aspersión de jugo de tuna roja sobre la viabilidad de *L. reuteri* y sobre el rendimiento**

El mejor resultado en cuanto a viabilidad fue para el tratamiento con la temperatura de entrada y salida más bajas de 170 °C y 70 °C, observándose la reducción de únicamente un ciclo logarítmico, por lo anterior se seleccionó esta condición para evaluar el efecto de la incorporación del extracto acuoso de mucílago de nopal en el soporte, sobre la viabilidad de la bacteria. El experimento se realizó con la misma cantidad de sólidos alimentados que la muestra original, usando la relación de 1:1:1 (sólidos de jugo:maltodextrina:sólidos de mucílago).

La alta viscosidad del extracto con mucílago ocasionó problemas al momento del secado, al quedarse adherida gran parte de la mezcla en las paredes de la cámara de secado. Se esperaba que el extracto, al tener mayor viscosidad y la misma cantidad de sólidos alimentados diera un mayor rendimiento y sobre todo protección a las células, sin embargo, el rendimiento fue de 5 % y la viabilidad de 50 %, en comparación con lo obtenido con jugo y maltodextrina 1:2. (Figura 5.9). Estos resultados pueden atribuirse a la viscosidad de la mezcla de alimentación que afectó al proceso de secado, y concuerdan con lo reportado por Perry y Green (2003) quienes mencionan que el contenido de sólidos, la viscosidad, la densidad y la velocidad de alimentación tienen efecto sobre el rendimiento y la calidad del polvo.



**FIGURA 5.9** Efecto del tipo de soporte usado en el secado por aspersión de jugo de tuna roja adicionado con *L. reuteri* NRRL B-14171 sobre la viabilidad y el rendimiento.

La reducción de la viabilidad celular pudo deberse al tamaño de la gota generado durante la atomización, el cual pudo haber sido modificado al disminuir el flujo de alimentación para lograr pasar la muestra. Se ha reportado que cuando el flujo de alimentación aumenta, también lo hace el tamaño de la gota asperjada, y viceversa, esto provocó que la transferencia de masa y calor se vieran alterados debido al tamaño de la partícula. Cuando las gotas son más pequeñas como es el caso con un flujo menor, los coeficientes de transferencia de calor y de masa son más grandes, provocando una rápida evaporación del agua, en consecuencia, el sólido es más expuesto al calor (Flores *et al.*, 2015). Aumenta también el tiempo de permanencia del polvo en el recipiente recolector, estos factores pudieron estresar al microorganismo de manera tal que su viabilidad se vio reducida a la mitad.

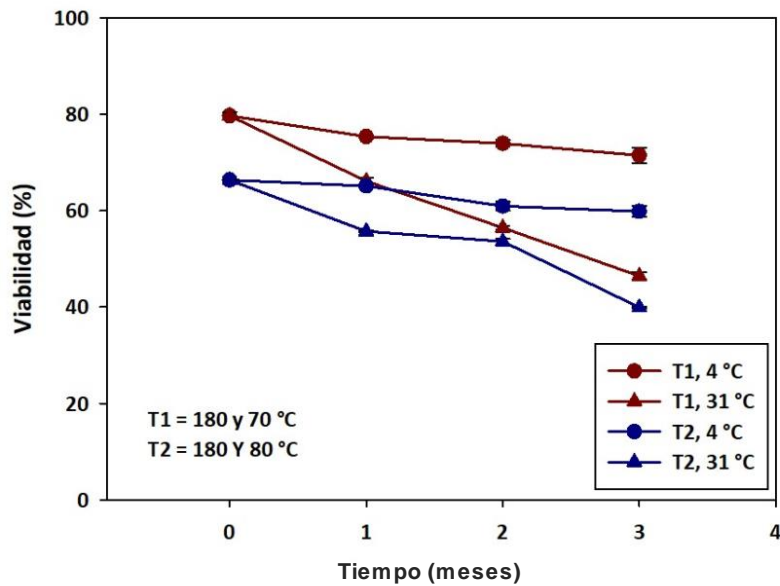
Queda evidenciado que el material de soporte juega un papel importante no solo durante el proceso de secado sino también en la protección que le otorga a las

células, por ejemplo, en 2012, Fernández Pereira y colaboradores secaron jugo de manzana con *Lactobacillus casei* NRRL B-442, usando maltodextrina y goma arábica como soporte, obtuvieron tasas de supervivencia superiores al 90 % para el jugo deshidratado almacenado a 4 °C durante 35 días (con ambos soportes) y superior al 70 % en el jugo deshidratado utilizando sólo maltodextrina y almacenado durante 21 días a 25 °C. Ambos soportes son ampliamente utilizados en el proceso de secado por aspersión.

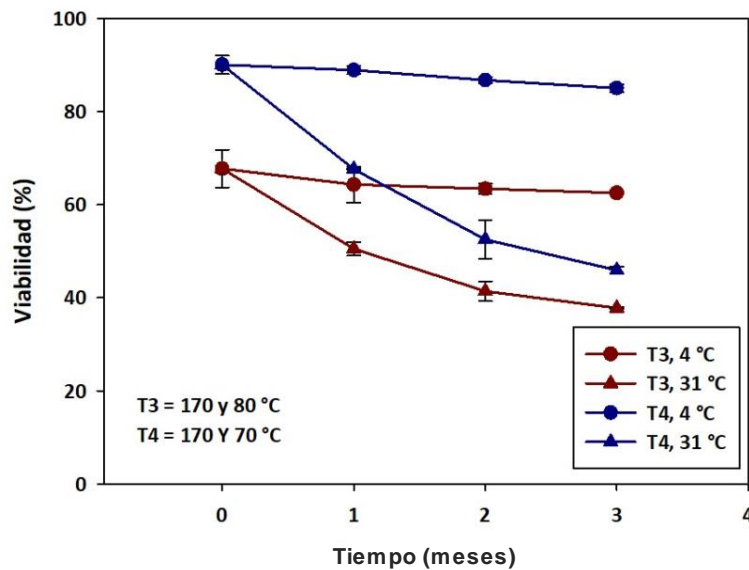
### **5.7 Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad de *L. reuteri* en jugo de tuna deshidratado**

El efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad del microorganismo fue evaluado en los jugos deshidratados a las condiciones de temperatura de entrada y salida siguientes: 180 y 70 °C (T1), 180 y 80 °C (T2), 170 y 80 °C (T3) y 170 y 70 °C (T4). El almacenamiento se realizó durante 3 meses a temperatura ambiente (31 °C) y en refrigeración (4 °C). El número de microorganismos viables fue determinado cada mes. Los resultados mostraron que la viabilidad celular en los productos almacenados a 4 °C se mantuvo estable en todos los tratamientos (Figuras 5.10 y 5.11) y no se observó diferencia significativa con respecto al tiempo ( $p > 0.05$ ).

La viabilidad de *L. reuteri* en el jugo deshidratado almacenado a temperatura ambiente disminuyó significativamente. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado para el almacenamiento a 4 °C de *L. reuteri* DSM 20016 después del secado por aspersión (Jantzen *et al.*, 2013) y para *L. helveticus* ATCC 27558 después del secado por aspersión y almacenado a 4 °C (Torres *et al.*, 2018), los resultados también son similares a los obtenidos por Lapsiri y colaboradores en 2012 quienes evaluaron la estabilidad de *L. plantarum* durante el almacenamiento y observaron que a 25 °C se reducía drásticamente la viabilidad en el producto.



**FIGURA 5.10** Estabilidad de *L. reuteri* NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado con maltodextrina (1:2), durante 3 meses de almacenamiento, T1 = 180 y 70 °C, T2 = 180 y 80 °C.



**FIGURA 5.11** Estabilidad de *L. reuteri* NRRL B-14171 en jugo de tuna roja deshidratado con maltodextrina (1:2), durante 3 meses de almacenamiento, T1 = 170 y 80 °C, T2 = 170 y 70 °C.

La menor reducción en la viabilidad de *L. reuteri* a bajas temperaturas pudo deberse a que los microorganismos se adaptan a las temperaturas bajas modificando sus rutas metabólicas, induciendo un aumento en la viscosidad del citoplasma debido a la acumulación de sales en el interior de las células (Albertini *et al.*, 2010; Lapsiri *et al.*, 2012). La pérdida de la viabilidad celular durante el almacenamiento también puede explicarse por la oxidación de los ácidos grasos que están presentes en la membrana celular, generando cambios en la composición, lo que provoca la muerte de la bacteria (Pereira *et al.*, 2013).

## 6 CONCLUSIONES

El proceso de secado por aspersión permitió obtener un jugo de tuna deshidratado usando como soporte maltodextrina y adicionado con *L. reuteri*, con el valor suficiente de microorganismos viables para ser considerado un producto probiótico ( $10^8$  UFC), y con las características de  $A_w$  y humedad deseables en un jugo deshidratado, aún cuando las temperaturas de entrada (180–170 °C) y salida (80-70 °C) ejercieron efecto significativo sobre la viabilidad de *L. reuteri*, del contenido de fenoles totales y de la actividad antirradical, después del secado por aspersión.

A las condiciones de estudio, la solución acuosa de mucílago de nopal en la proporción (1:1:1) utilizada no mejoró el rendimiento (5 %) y no se pudo observar efecto protector sobre *L. reuteri* con viabilidad de 50 % en comparación con maltodextrina (90 %).

El jugo de tuna deshidratado, adicionado con *L. reuteri*, usando como soporte maltodextrina y almacenado a 4 °C mantuvo la viabilidad celular durante 3 meses que duró el estudio, sin embargo en el jugo deshidratado almacenado a temperatura promedio de 31 °C se observó reducción significativa de la viabilidad. Por lo anterior, con este proceso se pudo obtener un jugo de tuna deshidratado adicionado con *L. reuteri* con vida de anaquel de al menos 3 meses en refrigeración, el cual proporcionaría los beneficios de la tuna más los proporcionados por el probiótico.

## 7 RECOMENDACIONES

Con base en los resultados de este trabajo, se recomienda:

- Realizar estudios de evaluación sensorial al jugo deshidratado, con la finalidad de evaluar su aceptación y la estabilidad de esa aceptación en el tiempo.
- Con el objetivo de mejorar el rendimiento, podría intentarse despectinar ó clarificar el jugo de tuna roja para reducir la viscosidad de la mezcla.
- Realizar más pruebas con el mucílago de nopal, con el fin de simplificar su obtención, mejorar el rendimiento y probar otras concentraciones. Es importante ahondar en los aspectos reológicos del mismo para facilitar su uso para el secado por aspersion.
- Evaluar la viabilidad de las bacterias en almacenamiento en un plazo más prolongado.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Amaya, J. 2009. El Cultivo de Tuna, *Opuntia Ficus indica*. Gerencia Regional Agraria La Libertad: Trujillo, Perú.
- Albertini, B., Vitali, B., Passerini, N., Cruciani, F., Di Sabatino, M., Rodríguez, L. y Brigidi, P. 2010. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. *Eur J Pharm Sci.* 40(4):359-366.
- Ananta, E., Volkert, M. y Knorr, D. A. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int Dairy J.* 15, 399–409.
- Anekella, K. 2011. Microencapsulation of probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*) in raspberry powder by spray drying: optimization and storage stability studies. *LWT – Food Sci Technol.* 50(1):17-24.
- AOAC Official Method 925.10 Solids (Total) and Moisture in Flour—Air Oven Method.
- AOAC Official Method 920.151, 2000, Solids (Total) in Fruits and Fruit Products.
- AOAC Official Method 983.17, 1983, Solids (Soluble) in Citrus Fruit Juices Refractometer Method;
- Astray, G., González-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero R. y Simal-Gándara, J. 2009. *Food Hydrocolloid.* 23: 1631-1640.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F. y Zuccotti, G.V. 2011. Probiotics and Health: An evidence- based review. *J Biochem Pharmacol Res.* 1-11.
- Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M. J., Oliveira, A., Pintado, M. E. y Teixeira, P. 2015. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *J Funct Foods.* 17, 340–351.
- Barbosa, J., Borges, S. y Teixeira, P. 2016. Effect if different conditions of growth and storage on the cell counts of two lactic acid bacteria after spray drying in orange juice. *Beverages.* 2(2):8.
- Begley, M., Hill, C. y Gahan, C. G. M. 2006. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *J Appl Environ Microbiol.* 72(3), 1729–1738.
- Bhandari, B. R., Senoussi, A., Dumoullin, E. D. y Lebert, A. 1993. Spray drying of concentrate fruits juices. *Dry Technol An Int J.* 11:1081-1092.
- Bhandari, B. R., 2009. Device and Method for Preparing Microparticles. *Publication number WO, 2009062254.*
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J. J., Lebeer, S. y Kiekens, F. 2016. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development



- of novel pharmabiotics. *Int J Pharm.* 505(1–2), 303–318.
- Cal K. y Sollohub K. 2010. Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *J pharm sci.* 99(2), 575-586.
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Sardagna, L. D. y Cal-Vidal, J. 2004. Mango Juice Dehydration Spray Drying Using Different Carriers and Functional Characterization. *14th International Drying Symposium* (pp. 2005–2012).
- Caplice, E., y Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations : role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 50, 131–149.
- Cárdenas, A.; Higuera-Ciapara, I. y Goycoolea, F.M. 1997. Rheology and Aggregation of Cactus (*Opuntia ficus indica*) Mucilage in solution. Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A.C. 152-157.
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V, Grosso, C. R. F. y Hubinger, M. D. 2013. Effect of different combination of wall materials on the encapsulation efficiency of flaxseed oil microencapsulated by spray drying. *J Food Eng.* 115, 443–451.
- Carr, F. J., Chill, D., y Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol.* 28(4), 281–370.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F. y Hernández, P.E. 2001. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci Technol Int.* 7(4), 281-305.
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald. G. F. y Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic *lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl Microbiol.* 96(5):1024-1039.
- Cortés, M., Chiralt, A. y Puente, L. 2005. Alimentos Funcionales: Una Historia con mucho Presente y Futuro. *Vitae*, 12 (1), 5-14
- Daeschel M.A. 1989. The antimicrobial substances of lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43: 164-167.
- De Angelis, M. y Gobbetti, M. 2011. *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. *E Dairy Sci.* 3, 78–90.
- De la Rosa, J.P. y Santana, D. 2001. El nopal. Usos, manejo agronómico y costes de producción en México. CONAZA-UACH-CIESTAAM. Texcoco, pp: 23-35.
- De Vos P., Faas M. M., Spasojevic M. y Sikkema J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J.* 20(4): 292-302.
- Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G. F., Collins K. y Ross R. P. 2001. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *Int Dairy J.* 11(10): 801-808.
- European Standards, 1994. Fruits and vegetable juices. Determination of the pH-value.

- Fang, Z. y Bhandari, B. 2011. Effect of spray drying and storage in the stability of bayberry polyphenols. *Food Chem.* 129(3): 1139-1147.
- FAO. 2016. Probiotics in animal nutrition and health (Vol. 179).
- FAO- OMS. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/OMS Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 1-52.
- Fernandes Pereira, A. L., Lima Almeida, F. D., Tibério de Jesus, A. L., Correia da Costa, J. M., y Rodrigues, S. 2012. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. *Food Bioproc Tech.* 6(11), 3155–3165.
- Fernandes Pereira, A. L., Almeida, D.L., Lima, M. A., da Costa, M.C. y Rodrigues, S. 2013. Spray-Drying of Probiotic Cashew Apple Juice. *Food Bioproc Tech.* 7(9), 2492-2499.
- Figueira, G., Park, K., Brod F. P. R. y Honorio, S. L. 2004. Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus* L.) with and without enzymatic inactivation. *J Food Eng* 6. 273–280.
- Fito, M.P., Andrés, G.A.M., Brat, B.J.M., y Albors, S.A. 2001. Introducción al secado de alimentos por aire caliente. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. Pp: 9-10.
- Flores, C., J., de Luna y P. Ramírez. 1995. El mercado mundial de la tuna. Informe final. Programa Nopal del CIESTAAM de la Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Flores Alcantar M. E. 2015. Estudio del proceso de secado por aspersión de muclágo de nopal (*Opuntia ficus indica*) y su efecto en las propiedades reológicas. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de México; Facultad de estudios superiores.
- Fontes, C. P. M. L., Silva, J. L. A., Sampaio-Neta, N. A., Correia da Costa. J. M. y Rodrigues, S. 2014. Dehydration of prebiotic fruit drinks by spray drying: operating conditions and powder characterization. *Food Bioproc Tech.* 7(10), 2942-2950.
- Frascareli, E., Silva, V., Tonon, R. y Hubinger, M. 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food Bioprod Process.* 90, 413–424.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. y Rémi, S., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *J Food Res Int.* 40:1107–1121.
- Ghandi, A., Powell, I. B., Howes, T., Chen, X. D. y Adhikari, B. 2012. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: A laboratory and pilot scale

- study. *J Food Eng.* 113(2), 194–200.
- Gomez Zavaglia, A., Tymczyszyn, E., De Antoni, G. y Disalvo, E. A. 2003. Action of threalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. *J Appl Microbiol.* 95(6):1315-1320.
- Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G. y Faria. J.A. 2010. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 9(3), 292-302.
- Granados-Sánchez, D. y Castañeda-Pérez, A. D. 1991. El nopal. Historia, fisiología genética e importancia frutícola. Ed. Trillas, 1ra edición, ISBN 968: 24-3850-0.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X. M., y Zhang, H. P. 2009. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT J Food Sci Technol.* 42(10), 1640–1646.
- Gupta, V., y Garg, R. 2009. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 27, 202–210.
- Jantzen, M., Göpel, A. y Beermann, C. 2013. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *J Appl Microbiol.* 115(4), 1029–1036.
- Juice Latin America Congress. 2010. Consultado el 30/03/15. Disponible en: <http://www.fruticulturasur.com/fichaNota.php?particuloid=931>.
- Jiménez-Aguilar, D. M., López-Martínez, J. M., Hernández-Brenes, C., Gutiérrez-Urbe, J. A. y Welte-Chanes, J. 2015. Dietary fiber, phytochemical composition and antioxidant activity of Mexican commercial varieties of cactus pear. *J Food Compost Anal.* 41, 66–73.
- Jittanit, W., Niti-Att, D. y Techanuntachaikul, O. 2010. Study of spray drying of pineapple juice using maltodextrin as an adjunct. *Chiang Mai J Sci.* 37(3), 498–506.
- Kha, T. C., Nguyen, M. H. y Roach, P. D. 2010. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *J Food Eng.* 98(3):385-392.
- Kingwatee, N., Apichartsrangkoon, A., Chaikham, P., Woramettrachanon, S., Techarung, J. y Pankasemsuk, T. 2015. Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in lychee juice varied carrier materials. *LWT – Food Sci Technol.* 62(1):847-853.
- Langrish, T. A. G. y Fletcher, D. F. 2001. Spray drying of food ingredients and applications of CFD in spray drying. *Chem Eng Process.* 40, 345–354.
- Lapsiri, W., Bhandari, B. y Wanchaitanwong, P. 2012. Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in different protectants during spray drying and storage. *Dry Technol.* 30(13), 1407-1412.
- LeBail, A., Boillereaux, L. Davenel, A., Hayert, M., Lucas, T. y Monteau, J. 2003.

- Phase transition in foods: effect of pressure and methods to assess or control phase transition. *Innov Food Sci Emerg.* 4, 15–24
- Leroy, F., y De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Tech.* 15(2), 67–78.
- León-Martínez. F. M., Rodríguez-Ramírez, J., Medina-Torres, L. L., Lagunas, L. M. y Bernad-Bernad, M. J. 2011. Effects of drying conditions on the rheological properties of reconstituted mucilage solutions (*Opuntia ficus-indica*). *Carbohydr polym.* 84 (1), 439-445.
- Liao, X., Guo, L., Ye, Z., Qiu, L. y Gu, F. 2016. Use of autochthonous lactic acid bacteria starters to ferment mango juice for promoting its probiotic roles. *Prep Biochem Biotechnol.* 46(4), 399–405.
- Liu, H., Gong, J., Chabot, D., Miller, S. S., Cui, S., Ma, J. y Wang, Q. 2015. Protection of heat-sensitive probiotic bacteria during spray-drying by sodium caseinate stabilized fat particles. *Food Hydrocolloid.* 51:459-267.
- Liu, Y., Li, Y., Shi, T., Zhao, J., Wang, H., Liu, T. y Zhu, Z. 2016. The optimization of spray drying process of *Lactobacillus reuteri*. *LWT - Food Sci Technol.* 68, 615–618.
- Majdoub, H., Roudesli, S. y Deratani, A. 2001. Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: extraction, characterization and polyelectrolyte behaviour. *Polym Int.* 50: 552- 560
- Masters, K. 1991. Applications in the food industry. In *Spray Drying Handbook*, 5th Ed.; Longman Scientific & Technical: New York, 587–638.
- Medina-Torres, L. Brito-de la Fuente, E., Torrestiana-Sanchez, B. y Katthain, R. 2000. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia picus-indica*). *Food Hydrocolloid.* 14: 417-424.
- Meng X. C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Daly C. y Rosset R. P. 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.* 106(4), 1406-1416.
- Mishra, V. y Prasad, D.N. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol.* 109-115.
- Monroy, M .C., Castro, T., Fernández, F.J. y Mayorga, L. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por Bacterias probióticas. *Contactos*, 63-72.
- Mostacero, J.; Mejía, F.; Zelada, W.; Medina, C. 2002. Biogeografía del Perú. Asamblea Nacional de Rectores. Trujillo – Perú
- Montiel Sánchez, M. 2015. Efecto de las variables de secado por aspersión sobre la retención de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del jugo de fruto *Ardisia compressa* Kunth. Tesis de maestría en ciencias en ingeniería bioquímica. Instituto tecnológico de Veracruz. Veracruz. México.

- Mujumdar, A.S. 1987. Handbook of industrial drying. Industrial spray drying system. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-092-SSA1-1994 1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-218-SSA1-2011. 2011. Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., y Hill, C. 2012. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol.* 152(3), 189–205.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. y Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and stabilised effects. *Int Dairy J.* 91(1), 43-52.
- Paéz, R., Lavari, L., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., Reinhermer, J. y Vinderola, G. 2013. Study of the effects of Spray-drying on the functionality of probiotic *Lactobacilli*. *Int J Dairy Technol.* 66(2):155-161.
- Peighambardoust, S. H., Golshan Taffi, A. y Hesari, J. 2011. Application of Spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends Food Sci Technol.* 72(1):215-224.
- Perry, R. y Green D. 2003. Manual del Ingeniero Químico, Ed, Mc Graw Hill, Vol III, 7 edición, 12 – 110: 12 – 115.
- Pop, O. L., Diaconeasa, Z., Brandau, T., Ciuzan, O., Pamfil, D., Vodnar, D. C. y Socaciu, C. 2015. Effect of glycerol, as cryoprotectant in the encapsulation and freeze drying of microspheres containing probiotic cells. *Bull. AUSVM Food Sci. Technol.* 72(1):195-199
- Reddy, K. B. P. K., Madhu, A. N. y Prapulla, S. G. 2009. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria: original research. *Int J Dairy Technol.* 62(2):240-248.
- Reid, G. 2008. Probiotics and prebiotics - Progress and challenges. *Int Dairy J.* 18(10-11), 969-975.
- Reiff, C. y Denise, K. 2010. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int J Med Microbiol.* 25-33.
- Rodríguez-Hernández, G. R., González-García, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. A. y Abud-Archila, M. 2005. Spray-Drying of Cactus Pear Juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the Physicochemical Properties of Powder and Reconstituted Product. *Dry Technol.* 23(4), 955–973.
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F. y Stanton, C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J Appl Microbiol.*

- 98(6), 1410–1417.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*, 84(3), 111-123.
- Saéenz, C., Tapia, S., Chávez, J. y Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.* 114(2), 616–622.
- Sáenz, C., Sepúlveda, E. y Matsuhira, B. 2004. *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *J Arid Environ.* 57, 275-290.
- Sáenz, C. 2006. Estudios de caso sobre la utilización agroindustrial de los nopales en distintos países. En: Utilización agroindustrial del nopal. FAO. Boletín de Servicios Agrícolas. 162, 121-136
- Saikia, S., Mahnot, N. K. y Mahanta, C. L. 2015a. Effect of Spray Drying of Four Fruit Juices on Physicochemical, Phytochemical and Antioxidant Properties. *J Food Process Preserv.* 39(6), 1656–1664.
- Saikia, S., Mahnot, N. K. y Mahanta, C. L. 2015b. A comparative study on the effect of conventional thermal pasteurization, microwave and ultrasound treatments on the antioxidant activity of five fruit juices. *Food Sci Technol Int*, 22(4), 1–14.
- Santhirasegaram, V., Razali, Z. y Somasundram, C. 2013. Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrason Sonochem.* 20(5):1276-1282.
- Santivarangkna C., Kulozik U. y Foerst P. 2007. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol Progr.* 23, 302-315.
- Santivarangkna C., Kulozik U. y Foerst P. 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J Appl Microbiol.* 105, 113.
- Sathyabama, S., Vijayabharathi, R., Bruntha Devi, P., Ranjith Kumar, M. y Priyadarisini, V. B. 2012. Screening for probiotic properties of strains isolated from feces of various human groups. *J Microbiol.* 50(4), 603–612
- Savadogo A, Ouattara CAT, Basssole NHI, Traoré SA. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *Afr J Biotechnol.* 5, 678-683.
- Schuttyser, M. A. I. y Boom, R. M. 2012. Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. *Trends Food Sci Tech.* 27(2), 73–82.
- Selmer-Olsen E., Sorhaug T., Birkeland S. E. y Pehrson R., 1999. Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 23(2), 79-85.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E. y Aceituno, C. 2007. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *J Arid Environ.* 68, 534-545.

- Shahidi, F. y Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci.* 33:501–547.
- Shahidi, F., M. Naczk. 2006. Phenolic compounds of major oilseeds and plant oils in phenolics in food and nutraceuticals. *J Food Sci Nutr.* 33:67-103
- Silva J., Carvalho A. S., Ferreira R., Vitorino R., Amado F., Domingues P., Teixeira P. y Gibbs P. A. 2005. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *J Appl Microbiol.* 98, 775–782.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. y Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. *Appetite*, 456-467.
- Souza, C.R. y Oliveira, W.P. 2006. Powder properties and system behavior during spray drying of *Bauhinia forficata* Link extract. *Dry Technol.* 24(6):735-749.
- Teixeira, P., Castro, H. y Kirby, R. 1995. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *K. Appl Bacteriol.* 78:456-462
- Teixeira, P., Castro, H. y Kirby, R. 1996. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Lett Appl Microbiol.* 22:34-38.
- Teixeira, P., Castro, H., Moha, C. y Kirby, R. 1997. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *J Appl Microbiol.* 83:219-226.
- Tesoriere, L., Fazzari, M. Allegra M. y Livrea, M.A. 2005. Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of Sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. *J Agric Food Chem.* 53(20): 7851-7855.
- Torres Aguilar, P. 2018. Efecto de las condiciones de secado por aspersión sobre la viabilidad de bacterias probióticas en jugo de piña (*Ananas comosu*) deshidratado. Tesis de maestría en ciencias en ingeniería bioquímica. Instituto tecnológico de Veracruz. Veracruz, Mexico
- Trachtenberg, S. y Mayer, A. M. 1981. Composition and Properties of *Opuntia ficus indica* mucilage. *Phytochemistry.* 20(12), 2665–2668.
- Vasiljevic, T. y Shah, N. P. 2008. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J.* 18, 714–728.
- Vicentini, A., Liberatore, L. y Mastrocola, D. 2016. Functional Foods: Trends and Development. *J Food Sci.* 28, 338–352.
- Wu, F. M., Doyle, M.P., Beuchat, L. R., Wells, J. G. y Mintz, E. D. 2000. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. *J Food Prot.* 63(5):568-572.
- Zamudio Jaramillo, M.A. 2007. Producción de reuterina por *Lactobacillus reuteri*

NRRL B-14171 inmovilizado en alginato. Tesis de maestría en ciencias en ingeniería bioquímica. Instituto tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.



## 9 ANEXOS

### 9.1 Composición y preparación del medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe (MRS)

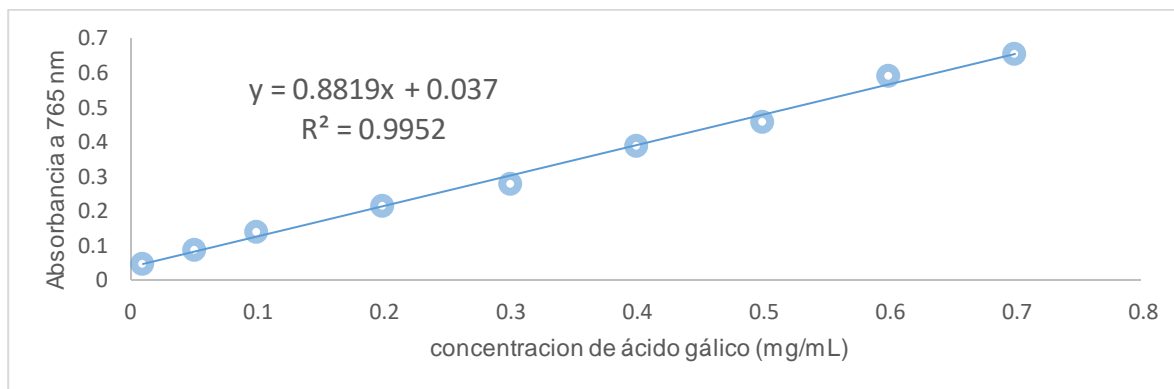
En este anexo se describe la composición del medio de cultivo empleado para el crecimiento de *L. reuteri*. Para el medio de cultivo sólido se preparó añadiendo un 1.2 % (p/v) de agar al caldo MRS. El caldo antes de usarse se esterilizó en autoclave durante 15 min.

**TABLA 9.1** Composición del medio de cultivo MRS.

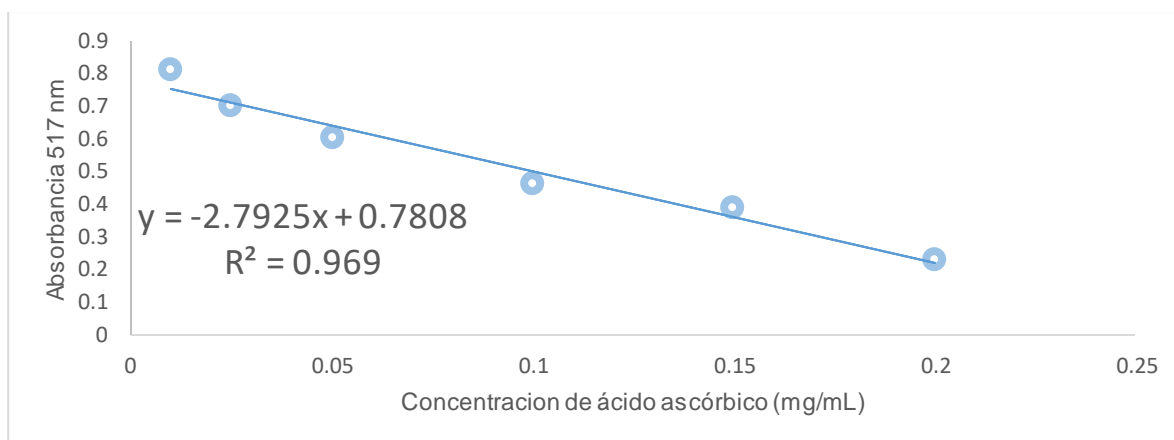
Componente	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
Acetato de sodio	5 g
$K_aHPO_4$	2 g
Citrato de amonio	2 g
$M_gSO_4$	0.2 g
$M_nSO_4$	0.04 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	8 g
Extracto de levadura	4 g
Tween 80	1 mL
Agar	20 g
Glucosa	20 g

pH 5.95

## 9.2 Curvas de calibración



**FIGURA 9.1** Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales, utilizando como disolvente agua destilada.



**FIGURA 9.2** Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación de actividad antirradical por DPPH, utilizando como disolvente etanol.