



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

## **Tesis Doctoral**

# **Incorporación de *Bacillus coagulans* a productos derivados de cereales**

Manuel López Cabanillas Lomelí

Directora: Dra. Blanca Edelia González Martínez

Tutora: Dra. Marta Capellas Puig

Doctorado en Ciencia de los alimentos

Departamento de Ciencia animal y de los alimentos

Facultad de Veterinaria

Universitat Autònoma de Barcelona

2017

# Tesis Doctoral

## Incorporación de *Bacillus coagulans* a productos derivados de cereales

Autor: Manuel López Cabanillas Lomelí



Directora: Dra. Blanca Edelia González Martínez



Tutora: Dra. Marta Capellas Puig

\_\_\_\_\_

Doctorado en Ciencia de los alimentos  
Departamento de Ciencia animal y de los alimentos  
Facultad de Veterinaria  
Universitat Autònoma de Barcelona

## RESUMEN

El papel de la dieta en el ser humano es el proporcionar suficientes nutrientes para satisfacer las necesidades metabólicas, además de brindar una sensación de satisfacción y bienestar. Hoy en día se sabe que los alimentos que consumimos juegan un papel importante en la modulación de diversas funciones fisiológicas de nuestro organismo. Las personas actualmente se preocupan más por los alimentos que consumen y sus beneficios a la salud que producen, por lo que gracias al avance del conocimiento sobre los que los alimentos pueden aportar, surgen los alimentos funcionales donde una de las categorías con mayor demanda y aceptación son los productos que contienen microorganismos beneficios a la salud, denominados alimentos con probióticos.

La mayoría de los alimentos con probióticos se encuentran en el sector de lácteos, pero existe un segmento importante de la población que no los consume, por lo que el desarrollo de productos derivados de cereales con probióticos puede ser una alternativa para ellos.

El objetivo de la investigación fue probar la factibilidad de la incorporación de microorganismos probióticos, específicamente *Bacillus coagulans* (Ganeden®) a una barra de cereal rellena de fruta y a una galleta de avena, y evaluar la sobrevivencia en condiciones de vida de anaquel.

Se realizó una caracterización de la cepa de *B. coagulans* (Ganeden®) mediante pruebas: microbiológicas básicas, de funcionalidad, de inocuidad y de identificación molecular, posteriormente se analizaron los flujos de elaboración a nivel industrial de los productos para determinar la forma de incorporación de los microorganismos probióticos. Posterior al proceso tecnológico se evaluó en las diferentes fases de elaboración de los productos (ingredientes secos, masa, masa fermentada y producto terminado) la sobrevivencia del *B. coagulans* incorporado. La sobrevivencia en la vida de anaquel en seis meses almacenados a temperatura ambiente y bajo condiciones de abuso de temperatura también fueron evaluadas.

En la presente investigación se comprobó la pureza, las características funcionales y de inocuidad del microorganismo utilizado *B. coagulans* (Ganeden®), así mismo se realizó una identificación con métodos moleculares hasta el nivel de especie, lo que da certeza del consumo en el caso de que el desarrollo llegara al mercado.

De los productos a los que se les incorporó el microorganismo probiótico en esta investigación, la galleta de avena presentó mejor sobrevivencia, ya que no se observa reducción en el contenido de microorganismos en los 6 meses estudiados, mientras que la barra de cereal con relleno de fruta presentó una reducción de medio ciclo logarítmico en el mismo tiempo, por lo que se considera que es factible en un futuro el poder escalar de forma industrial el proceso estudiado y poner a disposición del consumidor una nueva opción de productos derivados de cereales con probióticos.

## ABSTRACT

The role of diet in humans is to provide enough nutrients to satisfied metabolic needs, in addition to provide a sense of satisfaction and well-being. Today we know that the food we eat plays an important role in modulating physiological functions of our body. People nowadays are more concerned with the foods they eat and their health benefits, so thanks to the advance of the knowledge that food can provide functional foods arise where one of the categories with the highest demand and acceptance are products containing microorganisms with health benefits, called food with probiotics.

Most probiotic foods are in the dairy sector, but there is a large segment of the population that does not consume them, so the development of probiotic-based cereal products may be an alternative for them.

The objective of the research was to test the feasibility of incorporating probiotic microorganisms, specifically *Bacillus coagulans* (Ganeden®) into a fruit-filled cereal bar and an oatmeal cookie, and to evaluate survival in shelf-life conditions.

A characterization of the *B. coagulans* strain (Ganeden®) was carried out through basic microbiological, functional, safety and molecular identification tests, followed by an analysis of the industrial processing flows of the products to determine the way of incorporation of probiotic microorganisms. Subsequent to the technological process, the survival of *B. coagulans* was evaluated in the different stages of product processing (dry ingredients, dough, fermented dough and finished product). The survival during its shelf life during six months stored at room temperature and under conditions of temperature abuse were also evaluated.

In the present investigation, the purity, functional and safety characteristics of the microorganism used *B. coagulans* (Ganeden®) were verified, as well as an identification with molecular methods up to the species level, which gives certainty of the consumption in the case this development reach to the market.

Of the products to which the probiotic microorganism was incorporated in this research, the oat cracker presented better survival, since there was no reduction in the content of microorganisms in the 6 months studied, while the cereal bar filled with fruit presented a reduction of half log cycle at the same time, so it's considered that in the future may be feasible to scale the process in an industrial way and to make available to the consumer a new choice of products derived from cereals with probiotics.

## Contenido

<b>1. Introducción, hipótesis, objetivos y plan de trabajo</b> .....	9
<b>2. Antecedentes</b> .....	11
1.1 Probióticos.....	12
1.2. Probióticos en uso alimentario .....	13
1.3. Mercado de probióticos .....	15
1.4. Efectos benéficos de los probióticos a la salud.....	17
1.5. Diferentes cepas probióticas.....	19
1.6. Perspectivas de los alimentos con probióticos .....	22
1.7. Abordajes moleculares para la identificación bacteriana .....	23
1.8. Dosis de probióticos .....	25
1.9. Supervivencia de los probióticos.....	26
1.10. Micro encapsulación de microorganismos .....	29
1.11. Matriz del alimento .....	31
1.12. Evaluación de la seguridad.....	36
1.13. <i>Bacillus</i> .....	36
1.13.1. <i>Bacillus coagulans</i> .....	37
1.13.1.1 Beneficios del <i>B. coagulans</i> .....	39
1.13.1.2. Mecanismos de acción para <i>B. coagulans</i> .....	40
1.14. Alimentos derivados de cereales con probióticos .....	42
<b>3. Metodología</b> .....	45
3.1 Caracterización de la cepa de <i>Bacillus coagulans</i> . .....	46
3.1.1. Pruebas de microbiología básica. ....	46
3.1.1.1. Morfología de las colonias.....	46
3.1.1.2. Tinción de Gram y morfología de las bacterias. ....	46
3.1.1.3. Tinción de esporas.....	47
3.1.1.4. Motilidad. ....	47
3.1.1.5. Características bioquímicas.....	47
3.1.1.6. Esporulación y germinación. ....	47
3.1.1.7. Curva de crecimiento de <i>Bacillus coagulans</i> .....	48
3.1.2 Pruebas de Funcionalidad. ....	48
3.1.2.3. Tolerancia a condiciones de acidez y sales biliares .....	49
3.1.3. Pruebas de inocuidad .....	50

3.1.4. Identificación molecular de <i>Bacillus coagulans</i> .....	51
3.1.5. Microorganismos.....	51
3.1.6. Extracción de ADN.....	52
3.2. Incorporación del probiótico en el proceso industrial del producto .....	53
3.2.1. Análisis de los productos seleccionados.....	53
3.3. Supervivencia del probiótico durante el proceso de elaboración .....	56
3.4. Supervivencia del probiótico durante la vida de anaquel del producto .....	57
3.5. Análisis estadístico. ....	57
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>58</b>
4.1. Caracterización de las cepas .....	58
4.1.1 Morfología .....	58
4.1.3. Motilidad. ....	59
4.1.4. Características bioquímicas .....	60
4.1.5. Capacidad de germinación .....	62
4.1.6. Curva de crecimiento de <i>Bacillus coagulans</i> .....	63
4.2. Pruebas de Funcionalidad. ....	66
4.2.1. Actividad antimicrobiana.....	67
4.2.2. Tolerancia a condiciones de acidez y sales biliares. ....	68
4.3. Pruebas de Inocuidad.....	69
4.3.1. Prueba de resistencia a los antibióticos.....	69
4.4. Identificación molecular de <i>Bacillus coagulans</i> .....	69
4.4.1. Identificación molecular de una cepa de referencia de <i>Bacillus coagulans</i> .....	69
4.5. Especificidad respecto a otros probióticos. ....	70
4.6. Especificidad respecto a patógenos.....	71
4.7. Identificación molecular de cepas Geneden. BC 9M-E y BC-15M .....	72
4.8. Supervivencia del probiótico durante el proceso de elaboración. ....	73
4.8.1. Barras de cereal con relleno de fruta.....	73
4.8.2. Galleta de avena con pasas .....	77
4.9. Supervivencia de probióticos en productos almacenados por seis meses bajo condiciones normales de almacenamiento. ....	79
4.10. Comparación de supervivencia de probióticos a seis meses y en condiciones de almacenamiento con abuso de temperatura.....	81
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>83</b>
<b>6. Referencias</b> .....	<b>84</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1</b> Especies de bacterias ácido lácticas comúnmente utilizadas en preparaciones .....	20
<b>Tablas 2</b> Lista de cepas probióticas utilizadas en aplicaciones comerciales.....	21
<b>Tablas 3</b> Algunos productos probióticos no lácteos desarrollados .....	22
<b>Tablas 4</b> Criterios deseables para la selección de probióticos en aplicaciones comerciales.....	23
<b>Tabla 5</b> Características de las cepas usadas en este trabajo. ....	46
<b>Tabla 6</b> Secuencias de oligonucleótidos utilizadas .....	51
<b>Tabla 7</b> Descripción de los productos seleccionados para la adición de probióticos con la cantidad deseada y características de la materia prima.....	56
<b>Tabla 8</b> Descripción del muestreo. (Número de muestras en cada etapa de producción) .....	57
<b>Tabla 9</b> Metabolismo de carbohidratos de las cepas de <i>B. coagulans</i> . ....	61
<b>Tabla 10</b> Recuperación de células vegetativas de las diferentes cepas de <i>Bacillus coagulans</i> (UFC/ml de suspensión de esporas).....	63
<b>Tabla 11</b> Actividad antimicrobiana de <i>B. coagulans</i> contra patógenos .....	67
<b>Tabla 12</b> Supervivencia de <i>B. coagulans</i> a condiciones de acidez y sales biliares expresadas en Log UFC/mL y porcentaje de recuperación .....	69
<b>Tabla 13</b> Contenido de microorganismos totales (Log UFC/g) en ingredientes secos de barra de cereal con relleno de fruta .....	74
<b>Tabla 14</b> Contenido de microorganismos totales (Log UFC/g) en masa, masa fermentada y producto terminado (barra de cereal con relleno de fruta). ....	75
<b>Tabla 15</b> Contenido de microorganismos totales (Log UFC/g) en ingredientes secos de .....	77
<b>Tabla 16</b> Contenido de microorganismos totales (Log UFC/g) en masa y producto terminado en galleta de avena. ....	78
<b>Tabla 17</b> Promedio de microorganismos que se encontró al finalizar las pruebas de supervivencia a seis meses de almacenamiento y en condiciones de hot-pack. ....	81

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> Consumo de probióticos y beneficios a la salud (Adaptado de Parvez, Malik, Ah Kang & Kim, 2006) .....	18
<b>Figura 2</b> Aspectos cualitativos de alimentos probióticos (Tripathi & Giri, 2014) .....	32
<b>Figura 3</b> Factores que afectan la viabilidad de los probióticos (Tripathi & 2014) .....	33
<b>Figura 4</b> Esquema general del proyecto de investigación .....	45
<b>Figura 5</b> Diagrama de flujo de elaboración de galleta de avena.....	55
<b>Figura 6</b> Diagrama general de flujo del proceso de elaboración de barra con relleno de fruta.....	55
<b>Figura 7</b> Morfología de las colonias de <i>B. coagulans</i> .....	58
<b>Figura 8</b> Endosporas de las cepas de estudio en comparación con una cepa de <i>Bacillus subtilis</i> ...	59
<b>Figura 9</b> Imágenes de los patrones de fermentación de carbohidratos de las cepas de <i>B. coagulans</i> en las galerías de API® 50 CHTM .....	62
<b>Figura 10</b> Curvas de crecimiento de las cepas de <i>B. coagulans</i> utilizando el parámetro de densidad óptica.....	65
<b>Figura 11</b> Curvas de crecimiento de las cepas de <i>B. coagulans</i> utilizando el parámetro de Cuenta de células viables por mL en agar MRS .....	66
<b>Figura 12</b> Electroforesis en gel de agarosa al 3.5% visualizados con Br. Et. Carril 1: Hiperleader II, Carril 2: producto amplificado de 262pb de la cepa de referencia ATCC® 7050 TM de <i>B. coagulans</i> , Carril 3: Control negativo, Carril 4: Pro. ampli c. de <i>B.coagulans</i> .....	70
<b>Figura 13</b> Electroforesis en gel de agarosa al 3% visualizado con Br. Et. C.1: Hyperleader II, C.2: Producto amplificado de <i>B. coagulans</i> ATCC® 7050 TM de 262pb como control positivo, C.3: <i>Lactobacillus plantarum</i> , C.4: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , C.5: <i>Bifi.adolescentis</i> , C.6 <i>Lact. Rhamnosus</i> , C.7. <i>Bifi. Longum</i> , C.8. Control negativo .....	71
<b>Figura 14</b> Electroforesis en gel de agarosa al 3% visualizado con Br. Et. C.1: Hyperleader II (BIOLINE) de 2000 pb, C.2: Producto amplificado de <i>B. coagulans</i> ATCC® 7050 TM de 262pb como control positivo, C.3: <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Typhimurium</i> (ATCC 13311), C.....	72
<b>Figura 15</b> Electroforesis en gel de Agarosa al 3.5% visualizados con Br. Et. Carril 1: Hiperleader V, Carril 2: Producto amplificado de <i>B. coagulans</i> (BC-15M), Carril 3: Control negativo, Carril 4: Producto amplificado de <i>B. coagulans</i> (BC-9M-E). .....	73
<b>Figura 16</b> Contenido de microorganismos probióticos en las etapas del proceso de Barras de cereal con relleno de fruta.....	76
<b>Figura 17</b> Contenido de microorganismos probióticos en las etapas del proceso de Galletas de avena. ....	78
<b>Figura 18</b> Supervivencia de Probióticos en Barras de cereal con relleno de fruta por seis meses...	79
<b>Figura 19</b> Supervivencia de Probióticos en Galletas de avena con pasas por seis meses. ....	80
<b>Figura 20</b> Comparativo de supervivencia de probióticos en los diferentes productos por 6 meses	81

## 1. Introducción, hipótesis, objetivos y plan de trabajo

En la actualidad se sabe que los alimentos que consumimos juegan un papel importante en la modulación de diversas funciones fisiológicas de nuestro organismo. Las personas actualmente se preocupan más por los alimentos que consumen y sus beneficios a la salud que producen, por lo que gracias al avance del conocimiento sobre lo que los alimentos pueden aportar, surgen los alimentos funcionales donde una de las categorías con mayor demanda y aceptación son los productos que contienen microorganismos beneficios a la salud, denominados alimentos con probióticos.

La mayoría de los alimentos con probióticos se encuentran en el sector de lácteos, pero existe un segmento importante de la población que no los consume, por lo que el desarrollo de productos derivados de cereales con probióticos puede ser una alternativa para ellos.

### Hipótesis

*Bacillus coagulans* puede ser incorporado a los productos derivados de cereal y sobrevivir durante el proceso de elaboración y la vida de anaquel.

### Objetivo general

Incorporar el probiótico *Bacillus coagulans* en alimentos a base de cereales horneados como galletas y barras, y evaluar la sobrevivencia del probiótico durante la vida de anaquel de los productos.

### Objetivos específicos

1. Caracterizar la cepa del microorganismo probiótico a incorporar (*Bacillus coagulans*).
2. Diseñar la estrategia de incorporación del probiótico en un proceso industrial de producción de productos de panificación con cereales horneados.

3. Evaluar la sobrevivencia del probiótico durante las diferentes etapas del proceso de elaboración en los productos seleccionados.
4. Analizar la sobrevivencia del probiótico durante la vida de anaquel de los productos a temperatura ambiente durante 6 meses y en condiciones de abuso de temperatura.

Para el desarrollo de la investigación se establecieron cuatro fases., la primera en donde se caracterizó la cepa de *Bacillus coagulans* con pruebas de microbiológicas, de funcionalidad como probiótico, inocuidad, e identificación precisa de la especie. La segunda consistió en determinar la estrategia de incorporación del probiótico en el proceso industrial de los productos. En la tercera se realizaron las pruebas de sobrevivencia del probiótico durante el proceso de elaboración y por último se estudió la sobrevivencia en la vida de anaquel del producto.

## 2. Antecedentes

El papel principal de la dieta en el ser humano es proporcionar suficientes nutrientes para satisfacer los requerimientos metabólicos, mientras que proporciona al consumidor una sensación de satisfacción y bienestar. Sin embargo, el conocimiento reciente apoya la hipótesis de que, además de satisfacer las necesidades nutricionales, la dieta puede modular diversas funciones fisiológicas y puede desempeñar papeles perjudiciales o beneficiosos en algunas enfermedades (Koletzko et al., 1998).

Estos conceptos son particularmente importantes a la luz del aumento del costo de la atención de la salud, el aumento constante de la esperanza de vida y el deseo de las personas mayores de mejorar la calidad de vida (Roberfroid, 2007). Es por ello que la creciente preocupación por los hábitos alimentarios y su relación con la salud y la longevidad ha estimulado el desarrollo de un gran número de estudios en el campo de la ciencia alimentaria y la nutrición (Martinez, Bedani, & Saad, 2015).

Los alimentos funcionales son el resultado de los avances de la ciencia, el concepto de alimentos funcionales ha estado examinando compuestos bioactivos y/o aditivos alimentarios que pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, una clase importante de alimentos funcionales ha recibido una atención considerable: probióticos y prebióticos. Microbiota, un término utilizado para reemplazar el nombre anterior de la microflora intestinal, es un ecosistema formado por nichos diferenciados compuestos por una gran diversidad de especies y cepas bacterianas (Aureli et al., 2011; Laparra & Sanz, 2010).

Los seres humanos son colonizados desde el nacimiento por bacterias, que forman un complejo y dinámico consorcio de microorganismos conocidos como microbiota. En general, esta comunidad microbiana compleja supera a las células somáticas y

germinales del huésped y contiene colectivamente una variabilidad genética significativamente mayor que la del genoma del huésped (Bäckhed, Ley, Sonnenburg, Peterson, & Gordon, 2005)

## 1.1 Probióticos

La palabra "probiótico" significa "para la vida" (del griego  $\beta\iota\omicron\varsigma$ , pro bios). Los trabajos de Metchnikoff (Metchnikoff, 1907) y Tissier (Tissier, 1907) fueron los primeros en hacer sugerencias científicas sobre el uso probiótico de bacterias, incluso cuando la palabra "probiótico" no fue acuñada hasta 1960, para nombrar sustancias producidas por microorganismos que promovieron el crecimiento de otros microorganismos (Lilly & Stillwell, 1965). Otras definiciones siguieron, con Fuller siendo la primera en señalar la naturaleza microbiana de los probióticos redefiniendo la palabra "probiótico" como "un suplemento alimentario microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal"(Fuller, 1989). Havenaar y Huis in't Veld (1992) amplió la definición como "un cultivo monocultivo o mixto viable de bacterias que, cuando se aplica a animales o al hombre, beneficia al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona"(Havenaar & Huis, 1992). Guarner y Schaafsma, 1998 dieron una definición más reciente como "microorganismos vivos, que cuando se consumen en cantidades adecuadas, confieren un efecto sobre la salud del huésped"(Guarner & Schaafsma, 1998).

Los probióticos son definidos por la Organización Mundial de la Salud como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al huésped"(Araya, Morelli, Reid, Sanders, & Stanton, 2002). En todo el mundo, existen numerosas cepas de probióticos usadas en suplementos dietéticos y alimentos, pero la mayoría son inestables a temperatura ambiente, no soportan los tratamientos térmicos y necesitan ser liofilizados o encapsulados a través de procedimientos especiales para que permanezcan viables durante la fabricación, el almacenamiento y la exposición al ácido del estómago y a

la bilis en el intestino (Gilliland, 1990). Por consiguiente, para la mayoría de los probióticos, sólo un porcentaje muy pequeño del material de partida es realmente viable en el final de la vida útil. *Bacillus coagulans* es una notable excepción que, debido a su capacidad esporular, sobrevive sin manipulación especial y prolifera en el medio gastrointestinal (Jurenka, 2012).

Las bacterias probióticas se introducen a menudo como suplementos dietéticos vivos, pero también están presentes como microbiota viva en alimentos fermentados para consumo humano. Los mecanismos moleculares por los cuales los probióticos afectan beneficiosamente a la salud humana incluyen el fortalecimiento de la barrera intestinal, la modulación de la respuesta inmune y el antagonismo de los patógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos o la competencia por sitios de unión a la mucosa (Ventura & Perozzi, 2011)

En alimentos fermentados se han utilizado con anterioridad probióticos como parte del proceso, sin embargo, cada vez más se añaden como suplementos. Además hay también una tendencia creciente en el uso de probióticos como nutracéuticos, estando disponible en diversas formas, tales como en cápsulas. Esta tendencia cambiante en el suministro de probióticos puede conducir a una reducción de la eficacia funcional debido a la exclusión del efecto sinérgico potencial de los alimentos (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010).

El consumo de microorganismos probióticos y de ingredientes prebióticos es una alternativa prometedora para influir de manera beneficiosa en la ecología microbiana intestinal, manteniendo la homeostasis intestinal y controlando la disbiosis y, en consecuencia, mejorando la salud (Martínez et al., 2015).

## 1.2. Probióticos en uso alimentario

Para el uso en alimentos, se documentaron criterios importantes para los probióticos, en particular que no sólo debían ser capaces de sobrevivir al paso a través del tracto digestivo, exhibiendo tolerancia a ácidos y bilis, soportando

enzimas digestivas, sino que también tener la capacidad de proliferar en el intestino. Los probióticos deben ser capaces de ejercer sus beneficios en el huésped. Por lo tanto, la capacidad de permanecer viable en el sitio de destino y esta eficacia debe ser verificada para cada cepa. En 2002, un grupo de trabajo conjunto FAO/OMS elaboró Directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos (Araya et al., 2002). Se recomendó adoptar oficialmente la definición FAO / OMS de probióticos y utilizar y adoptar las directrices en el informe de este grupo de trabajo como requisito previo para denominar una cepa microbiana "probiótica".

Los requisitos mínimos necesarios para el probiótico incluyen: (I) la evaluación de la identidad de la cepa (género, especie, nivel de cepa); (II) ensayos *in vitro* para detectar posibles cepas probióticas: resistencia a la acidez gástrica, ácidos biliares y enzimas digestivas, actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas, etc.; (III) evaluación de la seguridad: requisitos para demostrar que una cepa probiótica es segura y sin contaminación en su forma de suministro; (IV) estudios *in vivo* para corroborar los efectos sobre la salud en el huésped objetivo (Araya et al., 2002).

Gupta & Garg, 2009 sugieren una dosis de 5 mil millones de unidades formadoras de colonias (UFC) durante al menos 5 días ( $5 \times 10^9$  UFC / día) para tener beneficios a la salud; los probióticos pueden estar disponibles en alimentos y suplementos dietéticos (cápsulas, tabletas y polvos). En los alimentos probióticos y suplementos, las bacterias pueden haber estado presentes originalmente o ser añadidos durante la preparación. Los probióticos deben sobrevivir a los ácidos gástricos y biliares para alcanzar el tracto intestinal, colonizar el epitelio huésped y exhibir un efecto beneficioso. La mayoría de las formas convencionales de probióticos de tipo lactobacilos no poseen la capacidad de formación de esporas y, por lo tanto, son inactivadas por la bilis y el pH gástrico bajo. Además, los probióticos seleccionados para uso comercial deben sobrevivir a la fabricación industrial y el almacenamiento para asegurar la viabilidad a largo plazo y la actividad biológica (V. Gupta & Garg, 2009). La mayoría de las células de lactobacilos convencionales mueren a 70°C,

mientras que las bacterias que forman ácido láctico que contienen esporas no muestran una disminución en las células viables, incluso después de calentar en solución salina a 85°C durante 30 min (Iannitti & Palmieri, 2010).

Los probióticos se incluyen tradicionalmente en los productos lácteos (Stanton et al., 2002), aunque algunos productos fermentados no lácteos también están en el mercado. Estos productos tienen en común que deben ser almacenados y transportados a temperaturas refrigeradas y tienen una vida útil bastante corta. Para evitar estas limitaciones, los probióticos se han incluido en los suplementos dietéticos. Sin embargo, un enfoque alternativo sería incluir probióticos en una matriz de alimentos secos o de humedad intermedia (Molin, 2001).

### 1.3. Mercado de probióticos

El mercado mundial de alimentos y bebidas funcionales ha crecido de 33.000 millones de dólares en 2000 a 176.700 millones de dólares en 2013, lo que representa el 5% del mercado global de alimentos y es el motor del crecimiento de la industria alimentaria en su conjunto (Granato, Branco, Nazzaro, Cruz, & Faria, 2010; Hennessy, 2013). Se ha estimado que los alimentos probióticos comprenden entre 60% y 70% del mercado total de alimentos funcionales (Holzapfel, 2006; Kołozyn-Krajewska & Dolatowski, 2012; Stanton et al., 2002).

Sin embargo, teniendo en cuenta la alta prevalencia de la intolerancia a la lactosa, se han desarrollado en los últimos años diferentes productos probióticos no lácteos como productos vegetarianos, productos a base de cereales, jugos de frutas, productos a base de soja, postres a base de avena, productos de confitería, cereales para el desayuno y para los bebés (Anekella & Orsat, 2013; M. Chen & Mustapha, 2012; Granato et al., 2010; S. Gupta & Abu-Ghannam, 2012; Mortazavian, Khosrokhavar, Rastegar, & Mortazaei, 2010; Noorbakhsh, Yaghmaee, & Durance, 2013; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010; Yk & Salminen, 1995).

Los productos que contienen probióticos son comunes en Japón y Europa desde hace varias décadas (Sanders, 1999). Una revisión del mercado del yogur en Europa muestra que los yogures probióticos constituyen el 13% del mercado en el Reino Unido y Alemania, y el 20% del mercado en Dinamarca (Fonden et al., 1999). Un estudio de fabricantes de alimentos, minoristas y productores de ingredientes realizado por Leatherhead Research en el Reino Unido proyectó un crecimiento del 60% en alimentos funcionales en estos países y un crecimiento de 78% en los EE.UU. en los próximos 15 años. Si estas proyecciones son exactas, los alimentos en los estantes de los supermercados estadounidenses que contienen cultivos probióticos aumentarán (Fonden et al., 1999)

El mercado global de ingredientes, suplementos y probióticos ha tenido una evolución importante a nivel global, presentó un valor de mercado de 14.900 millones de dólares en 2007 y alcanzó los 16.000 millones de dólares en 2008. Las estimaciones apuntan a un total de 19.600 millones de dólares en ventas para el 2013, una tasa de crecimiento anual compuesta del 4.3% (Granato et al., 2010).

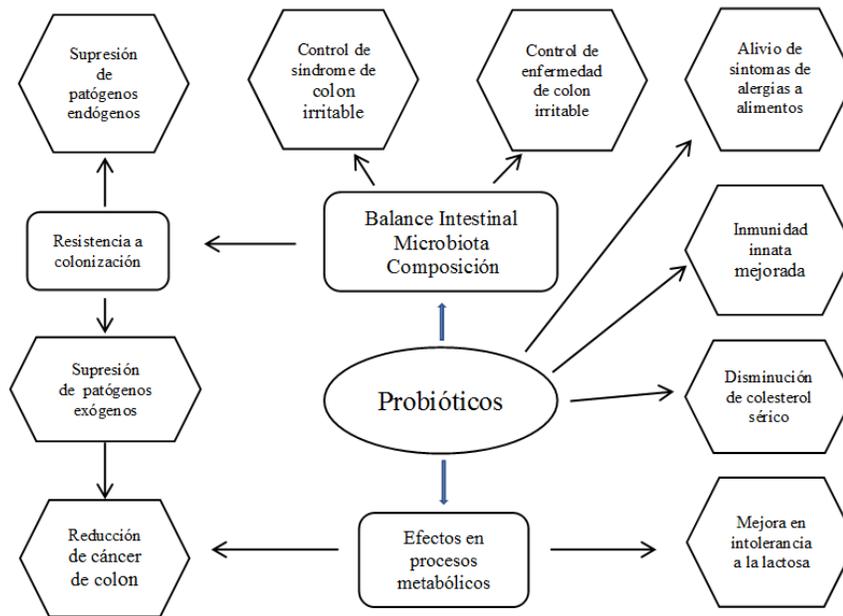
Los probióticos del género *Lactobacillus* representaron la mayor proporción, el 61.9% de la ventas totales en 2007 (Food Processing, 2009). Las aplicaciones de alimentos probióticos se encuentran principalmente en productos lácteos, yogures, kéfir y bebidas con cultivos, que representan las categorías principales. Los productos del yogurt representaron la mayor parte de ventas un 36,6%, con una alta aceptación sensorial (De Almeida et al., 2009; De Almeida et al., 2008; Zoellner et al., 2009). La aplicaciones de alimentos emergentes incluyen probióticos: helados, barras de nutrición, cereales para el desayuno, formula infantil y otros más (Adriano G da Cruz, Antunes, Sousa, Faria, & Saad, 2009; Gomes , Buriti, de Souza, Faria, & Saad, 2009).

Los productos probióticos no lácteos tienen una gran importancia mundial debido a la tendencia actual del vegetarianismo ya una alta prevalencia de intolerancia a la lactosa en muchas poblaciones alrededor del mundo. Sin embargo, no hay duda de que el sector lácteo, fuertemente vinculado a los probióticos, es el mayor mercado de alimentos funcionales, representando casi el 33% del amplio mercado, mientras que los cereales superan el 22% (Intl, 2006). Un total de 78% de las ventas actuales de probióticos en el mundo de hoy se entregan a través de yogur. Los jugos de frutas, postres y productos a base de cereales que contienen probióticos pueden ser otros medios adecuados para suministrar probióticos (Cargill, 2009).

De acuerdo a lo publicado en Euromonitor 2012, el crecimiento del segmento de alimentos probióticos ha sido notable en la última década con predominio de los productos lácteos, como el yogur, el helado, el queso y la leche, los jugos y las bebidas y las formulaciones para lactantes (Euromonitor, 2012).

#### 1.4. Efectos benéficos de los probióticos a la salud

Los probióticos proporcionan una serie de beneficios para la salud, principalmente a través del mantenimiento de la microbiota intestinal normal, la protección contra los patógenos gastrointestinales (Gilliland, 1990), el aumento del sistema inmunológico (D'Aimmo, Modesto, & Biavati, 2007; Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001), reducción del nivel de colesterol sérico y de la presión arterial, actividad anticarcinogénica, mejor utilización de los nutrientes y valor nutricional mejorado de los alimentos (Rasic, 2003) (Fig. 1).



**Figura 1** Consumo de probióticos y beneficios a la salud (Adaptado de Parvez, Malik, Ah Kang & Kim, 2006)

Las aplicaciones terapéuticas de los probióticos incluyen la prevención de la diarrea infantil, las enfermedades urogenitales, la osteoporosis, la alergia alimentaria y las enfermedades atópicas; reducción de la diarrea; alivio del estreñimiento e hipercolesterolemia; control de enfermedades inflamatorias intestinales; y protección contra el cáncer de colon y de vejiga (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001; Mattila-Sandholm et al., 2002; Salminen, 1996; Venturi et al., 1999).

Existen varias evidencias que apoyan aplicaciones clínicas potenciales de probióticos en la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales, urogenitales y enfermedades respiratorias (Gardiner et al., 2002). Mann & Spoerry (1974) descubrieron que los niveles de colesterol en el suero sanguíneo disminuían significativamente al beber yogur fermentado con cepas silvestres de *Lactobacillus* sp. (Mann & Spoerry, 1974). Harrison et al., (1975) informaron de la disminución de los niveles de colesterol sérico mediante el consumo de fórmula infantil añadida con células de *Lactobacillus acidophilus*. (Harrison, Peat, & Heese, 1975). Del mismo modo, Gilliland (1990) y Gill & Guarner (2004) mostraron el control de los niveles de

colesterol sérico en experimentos humanos adultos. (Gilliland, 1990, Gill & Guarner 2004).

### 1.5. Diferentes cepas probióticas

La relevancia de la identificación fiable y la tipificación de las cepas utilizadas en aplicaciones probióticas siguen aumentando debido a las dos razones principales. En primer lugar, está claro que el uso de cepas probióticas ya no está estrictamente restringido a las aplicaciones de alimentos en las que la historia de uso seguro en los alimentos fermentados (tradicionales) era un argumento importante para la importancia de la clasificación correcta de los probióticos. En los últimos años, sin embargo, los probióticos también se utilizan cada vez más en aplicaciones bioterapéuticas y farmacéuticas, dirigidas a grupos de pacientes específicos, cada uno con sus propios perfiles de riesgo clínico.

En la actualidad, el uso inadecuado de los métodos de identificación se considera como la principal causa de la designación incorrecta de las cepas probióticas (Huys et al., 2006). Muchos microorganismos diferentes se han utilizado como probióticos, principalmente cepas de los géneros bacterianos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero también cepas de *Escherichia coli*, *Saccharomyces boulardii* o *Bacillus coagulans*, junto con otros bacilos formadores de esporas. Por su naturaleza formadora de esporas, estos últimos organismos poseen viabilidad y estabilidad mejoradas en comparación con otras cepas bacterianas probióticas. La capacidad de soportar procesos a alta temperatura, tales como hornear y hervir, representando así una elección ideal para el desarrollo de productos funcionales a base de cereales (Cutting, 2011).

Aunque una amplia variedad de géneros y especies de microorganismos se consideran probióticos potenciales (Holzapfel, 1998, Shah & Ravla, 2004), los utilizados comercialmente en alimentos probióticos son predominantemente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Tablas 1 y 2). La principal

razón de ser ambos géneros tiene una larga historia de uso seguro y se consideran como GRAS (generalmente reconocido como seguro)

**Tabla 1** Especies de bacterias ácido lácticas comúnmente utilizadas en preparaciones

Bacteria probiótica	Cepa
<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii ssp.</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i>
<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. longum</i>
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Ent. faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i>
<i>Streptococcus sp</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i>

Fuente: Tripathi M.K. & Giri S.K (2014)

Para el año 2004 se encontraban disponibles varias decenas de cepas probióticas, en la tabla 2 se presentan las casas comerciales y las cepas probióticas ofrecidas.

**Tablas 2** Lista de cepas probióticas utilizadas en aplicaciones comerciales

Fuente/ producto	Cepa
Chr. Hansen	<i>L. acidophilus</i> LA1/LA5
	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> Lb12
	<i>L. paracasei</i> CRL431
	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb12
Danisco	<i>L. acidophilus</i> NCFMs
	<i>L. acidophilus</i> La
	<i>L. paracasei</i> Lpc
	<i>B. lactis</i> HOWARUTM/BI
DSM Food Specialties	<i>L. acidophilus</i> LAFTIs L10
	<i>B. lactis</i> LAFTIs B94
	<i>L. paracasei</i> LAFTIs L26
Nestle Snow Brand Milk Products Co. Ltd. Institute Rosell	<i>L. johnsonii</i> La1
	<i>L. acidophilus</i> SBT-20621
	<i>B. longum</i> SBT-29281
	<i>L. rhamnosus</i> R0011
Yakult	<i>L. acidophilus</i> R0052
	<i>L. casei</i> Shirota
	<i>B. breve</i> strain Yaku
	<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)
Probi AB	<i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)
	<i>L. plantarum</i> 299V
	<i>L. rhamnosus</i> 271
Danone	<i>L. casei</i> Immunitas
	<i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)
	<i>L. rhamnosus</i> LB21
Essum AB	<i>Lactococcus lactis</i> L1A
	<i>L. reuteri</i> SD2112
Biogaia	<i>B. longum</i> BB536
	<i>L. acidophilus</i> LB
Morinaga Milk Industry Co. Ltd.	<i>L. paracasei</i> F19

Fuente: Holm, 2003; Shah, 2004.

De hecho, las endosporas del género *Bacillus* son una forma de duración muy estable y muestran una alta estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento del producto alimenticio (Bader, Albin, & Stahl, 2012). En 2008 el microorganismo *B. coagulans* se reconoció por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA) como producto Reconocido Generalmente Como Seguro por su siglas en inglés (GRAS) después de la evaluación de estudios toxicológicos (Endres et al., 2011). Además, la especie *B. coagulans* se incluye en la lista de agentes biológicos de presunción de seguridad (QPS) que pueden añadirse a los alimentos (Panel EFSA, 2013).

## 1.6. Perspectivas de los alimentos con probióticos

La viabilidad futura y el éxito de los alimentos funcionales en el mercado dependen de varios elementos. La cuestión clave es la aceptación por parte de los consumidores de dichos productos. Para que los consumidores acepten pagar el costo asociado con los alimentos funcionales, deben ser convencidos por sus afirmaciones de salud a través de mensajes claros, veraces e inequívocos.

Para este propósito, se deben realizar nuevos estudios para: probar ingredientes, explorar más opciones de medios que aún no se han utilizado industrialmente, reingeniería de productos y procesos, y demostrar que los consumidores intolerantes a la lactosa y vegetarianos demandan nuevos productos probióticos nutritivos y sabrosos. (Granato et al., 2010).

En la década pasada se han desarrollado en forma importante las diferentes categorías de alimentos disponibles en el mercado, con características específicas que aportan beneficios a la salud. Los alimentos con probióticos no lácteos han ocupado un lugar en esta categoría, en la siguiente tabla se muestran algunos de ellos.

**Tablas 3** Algunos productos probióticos no lácteos desarrollados

Productos
Pudines a base de cereal
Yogurt a base de cereal de arroz
Bebida a base de avena
Productos de avena
Yosa (pudin de avena y cereales)
Bebida a base de maíz; malta
Boza (cereales fermentados)
Bebida fermentada probiótica de trigo, centeno, mijo, maíz y otros cereales
Mahewu (bebida de maíz fermentado)
Bebida probiotica fermentada a base de maíz, sorgo, malta de mijo

Fuente: Granato et al., 2010

La selección de las cepas probióticas adecuadas en dosis adecuadas es el primer requisito para desarrollar un producto alimenticio probiótico. La viabilidad durante

las operaciones de procesamiento y almacenamiento, la supervivencia durante el tránsito intestinal y los beneficios potenciales para la salud de los consumidores son los criterios principales para seleccionar cepas adecuadas de especies probióticas bacterianas (Talayar & Kailasapathy, 2004).

La sobrevivencia de las bacterias contra diferentes factores perjudiciales durante el procesamiento y el desarrollo del producto es específica de especies y cepas (Tamime, Saarela, Sondergaard, Mistry, & Shah, 2005). En términos de robustez de los organismos probióticos, los lactobacilos son generalmente más fuertes que las Bifidobacterias (Mättö, Alakomi, Vaari, Virkajärvi, & Saarela, 2006; Ross, Desmond, Fitzgerald, & Stanton, 2005).

Se han reconocido y sugerido numerosos criterios para la selección de organismos probióticos adecuados (Mattila-Sandholm et al., 2002; Ouwehand, Kirjavainen, Shortt, & Salminen, 1999; G. Reid, 1999). La Tabla 4 muestra algunas de las características tecnológicas y fisiológicas de las cepas probióticas como criterios deseables para la selección de probióticos en aplicaciones comerciales.

**Tablas 4** Criterios deseables para la selección de probióticos en aplicaciones comerciales

Criterio	Propiedad
Seguridad	Ausencia de patogenicidad e infectividad Factores de virulencia (toxicidad, actividad metabólica y propiedades intrínsecas, i.e., resistencia a antibióticos)
Tecnológico	Cepas genéticamente estables Viabilidad deseada durante el procesamiento y almacenamiento Buenas propiedades sensoriales Producción a gran escala Resistencia a los fagos
Funcional	Tolerancia a ácido gástrico Tolerancia a billis
Fisiológico	Adhesión a superficie de la mucosa Immunomodulación Actividad antagonista Metabolismo de colesterol Metabolismo de lactosa Antimutagénica y propiedades anticarcinogénicas

Fuente: Shah, 2006; Morelli, 2007.

### 1.7. Abordajes moleculares para la identificación bacteriana

El método considerado actualmente como el "patrón oro" para la delimitación y descripción de nuevas especies bacterianas es la asociación ADN-ADN pero no es práctico en la identificación rutinaria de cultivos bacterianos. Por lo tanto, se prefieren otros métodos moleculares siempre que ofrezcan suficiente reproducibilidad experimental y una resolución taxonómica apropiada y que utilicen bases de datos de identificaciones actualizadas y fácilmente disponibles y validadas (Huys et al., 2013). El uso de enfoques moleculares para la identificación de especies utilizadas en aplicaciones probióticas se cubre con gran detalle en varios artículos de revisión (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth, & Schillinger, 2001; Holzapfel et al., 1998; Ward & Roy, 2005). El análisis secuencial de la parcial o completa del gen 16S ribosomal ARN (ARNr) es ahora común como la primera herramienta para utilizar para el posicionamiento taxonómico de microorganismos probióticos (Yeung, Sanders, Kitts, Cano, & Tong, 2002).

Es un hecho bien conocido que las especies de *Bacillus* tienen la capacidad de formar esporas cuando las condiciones de crecimiento no están a su favor y pueden permanecer en la fase latente por muchos años. Sin embargo, cuando las condiciones de crecimiento son favorables, tales como: contenido de nutrientes específicos, pH, temperatura y humedad, pueden causar que las esporas produzcan células vegetativas a través del proceso de germinación (Nicholson, Munakata, Horneck, Melosh, & Setlow, 2000). *Bacillus coagulans* (anteriormente conocido como *Lactobacillus sporogenes*) es un microorganismo Gram positivo con forma de varilla, de 0,9 por 3,0 a 5,0 µm de tamaño, microaerófilico y produce L (+) ácido láctico predominantemente. El uso seguro y eficaz de muchas cepas de *B. coagulans* como probiótico tanto en animales como en seres humanos ha sido bien documentado (Cutting, 2011; Jurenka, 2012; Monograph, 2002).

Por lo tanto, existe la necesidad de una cepa probiótica termoestable que pueda soportar duras condiciones de fabricación y proporcionar un conteo viable suficiente y deseado durante el transporte, almacenamiento y permanezca hasta el momento del consumo.

## 1.8. Dosis de probióticos

La dosis suficiente de microorganismos probióticos para producir efectos benéficos para la salud puede variar dependiendo de la cepa y del producto. En general, los productos que contienen microorganismos probióticos deben tener un número mínimo de células viables, con una eficacia comprobada establecida en ensayos clínicos en seres humanos, estimada entre  $10^6$  y  $10^8$  unidades formadoras de colonias por gramo (UFC / g) de producto final o  $10^8 - 10^{10}$  CFU / d (considerando 100 g o 100 ml del alimento ingerido) (Champagne, Ross, Saarela, Hansen, & Charalampopoulos, 2011).

Un número similar de células probióticas viables ( $10^9$  UFC) por ración, consumido diariamente, también es recomendado por Health Canada (Champagne et al., 2011) así como el Ministerio de Salud Italiano (2013) (Ministerio della Salute, 2013) recomienda dosis de  $10^8-10^{10}$  UFC / d (considerando 100 g o 100 ml del alimento ingerido).

Los beneficios para la salud de los probióticos sólo pueden obtenerse cuando el alimento contiene el mínimo necesario de microorganismos viables en el momento del consumo. La industria alimentaria en general ha adoptado el nivel mínimo recomendado de  $10^6$  UFC/ml en el momento del consumo (Boylston, Vinderola, Ghoddusi, & Reinheimer, 2004; K Kailasapathy & Rybka, 1997).

También se ha indicado que los productos probióticos deben ser consumidos regularmente con una cantidad aproximada de 100 g/día con el fin de aportar alrededor de  $10^9$  células viables en el intestino (Karimi, Mortazavian, & Da Cruz, 2011).

## 1.9. Supervivencia de los probióticos

Los lácteos son los alimentos más estudiados en este tema, un factor clave en la selección de un iniciador probiótico adecuado es su capacidad para sobrevivir al ambiente ácido del producto fermentado final (*in vitro*) y las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (*in vivo*). La supervivencia de las bacterias probióticas *in vitro* podría estar influenciada por los metabolitos formados por el iniciador como el ácido láctico y el ácido acético, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas (Saarela, Mogensen, Fonden, Mättö, & Mattila-Sandholm, 2000). Aunque existen diferencias entre las especies y las cepas específicas, los lactobacilos generalmente se consideran intrínsecamente resistentes (Kashket, 1987), especialmente a valores de pH superiores a 3,0 (Hood & Zoitola, 1988). De las diversas bacterias probióticas, *L. casei* y *L. plantarum* parecen tener vidas de anaquel más largas que *L. acidophilus*, *L. reuteri* y que las diferentes especies de bifidobacterias en la leche cultivada (Yk & Salminen, 1995).

La seguridad, la eficacia y la funcionalidad de los probióticos son dependientes de la cepa ya que cada cepa es genéticamente única. Los datos de una cepa no se pueden utilizar para soportar una cepa cercana, sino que cada cepa necesita ser estudiada para demostrar las afirmaciones (Fares et al, 2015). Las condiciones de procesamiento durante la producción pueden conducir a pérdidas significativas de viabilidad probiótica debidas a lesiones celulares inducidas por calor, mecánica u osmótica (Bustos & Bórquez, 2013; Fu & Chen, 2011).

La selección de las cepas probióticas debe dirigirse a los efectos deseados mostrados por los microorganismos de interés, soportados por ensayos *in vitro* e *in vivo*, cuando se ensayan solos o se incorporan en una matriz alimenticia o una preparación farmacéutica. Para la producción y el procesamiento industrial a gran escala se deberían caracterizar adecuadamente y adecuarse a cada tipo de producto en el que se entregarán, incluida la alta viabilidad durante todo el período

de almacenamiento y la evidencia científica para declaraciones de propiedades saludables específicas (Martinez et al., 2015).

En los últimos años se han investigado varias estrategias para superar estos obstáculos de procesamiento para establecer la máxima viabilidad de los probióticos a lo largo de todo el ciclo de producción, incluyendo el almacenamiento del producto, la distribución en el mercado y también durante el consumo, es decir, bajo condiciones del jugo gástrico y las sales biliares intestinales. La microencapsulación de probióticos en matrices de pulverización o liofilizadas y la inclusión de probióticos en microcápsulas basadas en biopolímeros son la vías más comunes para la producción de bacterias probióticas viables en sistemas alimentarios reales (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011; Dianawati, Mishra, & Shah, 2013; Fritzen-Freire et al., 2012; Malmo, La Stora, & Mauriello, 2013; Soukoulis, Behboudi-Jobbehdar, Yonekura, Parmenter, & Fisk, 2014; Yonekura, Sun, Soukoulis, & Fisk, 2014).

El contenido de grasa, la concentración y el tipo de proteínas, los azúcares y el pH del producto son algunos factores que podrían afectar el crecimiento y la supervivencia de los probióticos en los alimentos. Por lo tanto, la formulación del producto puede manipularse para ayudar a su eficacia. Los alimentos, en particular los productos lácteos, se consideran un vehículo ideal para suministrar bacterias probióticas al tracto gastrointestinal humano (Ross et al., 2005; Ross, Fitzgerald, Collins, & Stanton, 2002). En la actualidad las bacterias probióticas se incorporan principalmente en productos lácteos como queso, yogur, helado y otros postres lácteos. Las limitaciones de los productos lácteos, como la presencia de alérgenos y la necesidad de instalaciones de almacenamiento en frío, así como la creciente demanda de nuevos alimentos y sabores, han iniciado una tendencia en el desarrollo de productos probióticos no lácteos (Lavermicocca, 2006).

La supervivencia de las cepas probióticas durante el tránsito gástrico también está influenciada por las propiedades fisicoquímicas del soporte alimentario utilizado. La capacidad tamponadora y el pH del medio portador son factores significativos, ya que las formulaciones alimentarias con pH entre 3,5 y 4,5 y alta capacidad tamponadora aumentarían el pH del tracto gástrico y, por lo tanto, aumentarían la estabilidad de la cepa probiótica (Kaila Kailasapathy & Chin, 2000; Zárate, Chaia, González, & Oliver, 2000).

Sobre la base de lo anterior, el pH final óptimo y las concentraciones de ácido láctico y ácido acético en el producto de cereal fermentado en relación con las propiedades de cada cepa probiótica específica tienen que ser investigadas con el fin de maximizar la viabilidad durante el almacenamiento. Además de la estabilidad intrínseca de cada cepa, se ha señalado que la inclusión de fuentes de energía de metabolización lenta, como la arginina, la fructosa, el ácido cítrico y el ácido málico, presentes en los productos de cereales, tienen efecto de aumentar la viabilidad del probiótico al proporcionar energía (Lee & Salminen, 1995).

Además, se ha demostrado que los extractos de malta, trigo y cebada presentan un efecto protector significativo sobre la viabilidad de las cepas de *L. plantarum* y *L. acidophilus* de origen humano en condiciones ácidas que imitan el estómago, esta afirmación se basa en experimentos con dietas experimentales, los efectos positivos podrían atribuirse principalmente a la presencia de azúcares solubles en los extractos de cereales y, en menor medida, al contenido de nitrógeno derivados de amino libre, dependiendo de la cepa (Charalampopoulos et al., 2012). Sin embargo, la mayoría de ellos pierden la viabilidad durante la fabricación y el almacenamiento de alimentos funcionales (alimentos horneados, bebidas, conservas de frutas) debido a la alta temperatura u otras condiciones de fabricación severas. Por lo tanto, estos probióticos requieren encapsulación mediante procedimientos especiales para conservar su viabilidad durante la fabricación, almacenamiento y exposición a condiciones no favorables como ácido y bilis presentes en el sistema gastrointestinal (Soukoulis et al., 2014; Zhang, Huang, Ananingsih, Zhou, & Chen, 2014).

### 1.10. Micro encapsulación de microorganismos

La microencapsulación es el proceso de encerrar las células recubriéndolas con una sustancia apropiada de una manera que resulta en la liberación de células apropiadas en el medio intestinal (Mortazavian et al., 2008). La microencapsulación ayuda a segregar las células del entorno circundante. Los materiales utilizados para encapsular células probióticas incluyen diferentes polisacáridos tales como alginatos, gomas vegetales y microbianas, quitosan, almidón, K-carragenano, acetato ftalato de celulosa, gelatina, proteínas de leche y grasas (Burgain et al., 2011; Iannitti & Palmieri, 2010).

Para la microencapsulación de las células probióticas, los hidrogeles insolubles en agua basados en proteínas se aplican como una alternativa prometedora que se ha aplicado con éxito. (Annan, Borza, & Hansen, 2008; Heidebach, Först, & Kulozik, 2009). Muchas revisiones han demostrado el potencial de la microencapsulación para mejorar la supervivencia de los probióticos durante el procesamiento y el almacenamiento en productos alimenticios o en el tránsito gastrointestinal (Mohammadi, Mortazavian, Khosrokhavar, & da Cruz, 2011; Heidebach, Leeb, Först, & Kulozik, 2010; Sun & Griffiths, 2000).

Las células probióticas han sido microencapsuladas con éxito para preservarlas de factores perjudiciales durante el procesamiento y almacenamiento, tales como pH bajo y alta acidez (Shah & Ravla, 2004), (Stenson, Klaenhammer, & Swaisgood, 1987), oxígeno molecular en el caso de microorganismos anaeróbicos (Sunohara et al., 2000), las sales biliares (Lee & Heo, 2000), bacteriófagos y agentes antimicrobianos químicos (Sultana et al., 2000). Además, la microencapsulación puede ayudar a mejorar y estabilizar las propiedades sensoriales (Gomes & Malcata, 1999) y la inmovilización de las células para su distribución homogénea en todo el producto (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003).

Diversos estudios han reportado el efecto de la microencapsulación sobre la supervivencia de los probióticos durante el proceso de calentamiento, Mansouripour (2013) (Mansouripour, Esfandiari, & Nateghi, 2013), observó que cepas encapsuladas con alginato mostraron más supervivencia y menos pérdida en comparación a cepas sin encapsular sometidas a 65°C durante máximo 1 h, sin embargo, cuando los cultivos o microencapsulados con alginatos se expusieron a los mismos 65°C durante 30 min de tratamiento, los valores de  $D_{65^{\circ}\text{C}}$  aumentaron dos veces (11-21 min) (Ding & Shah, 2007), resultados similares fueron reportados por Mandal y colaboradores (2006). Era notable que las pérdidas de viabilidad de cultivos libres y microencapsulados fueran muy similares después de 60 minutos de incubación a 65°C (Mandal, Puniya, & Singh, 2006).

Esto sugiere que las bacterias microencapsuladas fueron protegidas a través de la reducción de la transferencia de calor a las células, una protección que era sólo temporal. Un resultado de esta propiedad es que la microencapsulación podría encontrar aplicaciones en procesos que usan periodos de calentamiento cortos. Se desconoce cómo las células microencapsuladas reaccionarían a 73 ° C durante 16 s en condiciones actuales del proceso de pasteurización de la leche. Sin embargo, los datos de Chen y colaboradores (2007) sugiere que la supervivencia podría ser satisfactoria debido a que algunos cultivos microencapsulados con gellan-alginato expuestos a 75 ° C durante 1 min presentaron pérdidas menores de 0,5 log CFU / mL (M. J. Chen, Chen, & Kuo, 2007)

Por lo tanto, a menos que la encapsulación pueda prevenir la mortalidad celular, sólo los probióticos que sintetizan un compuesto bioactivo termoestable durante la fermentación pueden ser útiles en la fabricación de productos de panificación (Goger et al., 2008; Kedia, Wang, Patel, & Pandiella, 2007). Las cepas de probióticos *Bacillus* podrían adaptarse mejor a aplicaciones de panificación.

Hay otros alimentos en los que la microencapsulación proporcionó una mayor supervivencia durante el calentamiento en productos como lo son galletas (Reid,

Champagne, Gardner, Fustier, & Vuilleumard, 2007), salchichas secas y chocolate (Muthukumarasamy & Holley, 2006).

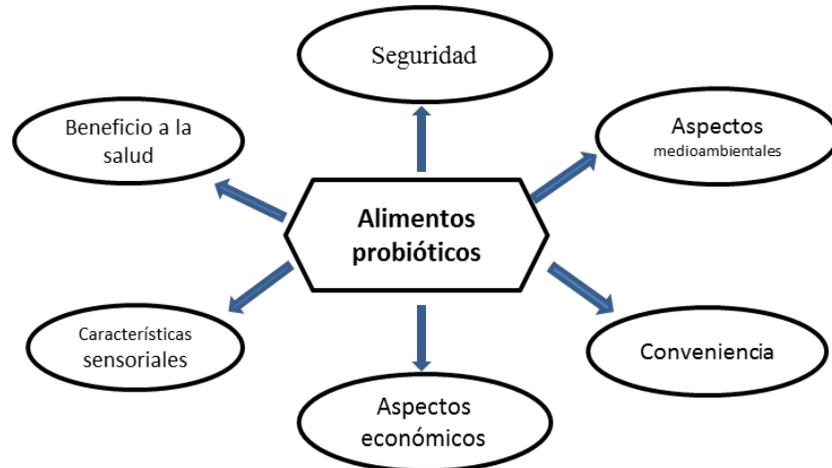
El proceso de encapsulación produce una protección relativa y una viabilidad mejorada durante el proceso de calor.

#### 1.11. Matriz del alimento

La adición de carbohidratos, glicerol y manitol influye en los alimentos. Por regla general, la reducción de la  $a_w$  mejora la estabilidad de los probióticos durante el almacenamiento. En cereales y polvos, el  $a_w$  debe estar entre 0,1 y 0,2 (Ishibashi et al., 1985), particularmente si el producto se va a almacenar a temperatura ambiente. Esto típicamente representa de 2 a 8% de humedad en el polvo.

Hasta la década pasada la inclusión de probióticos en una matriz de alimentos secos tendría ventajas, pero esto recibió poca atención, Ouwehand y colaboradores en el 2004 demostraron que el *Bifidobacterium lactis* Bb-12 está presente en las heces después del consumo de una barra de cereal a base de avena que contiene  $5 \times 10^9$  *B. lactis* Bb-12 (Ouwehand, Kurvinen, & Rissanen, 2004).

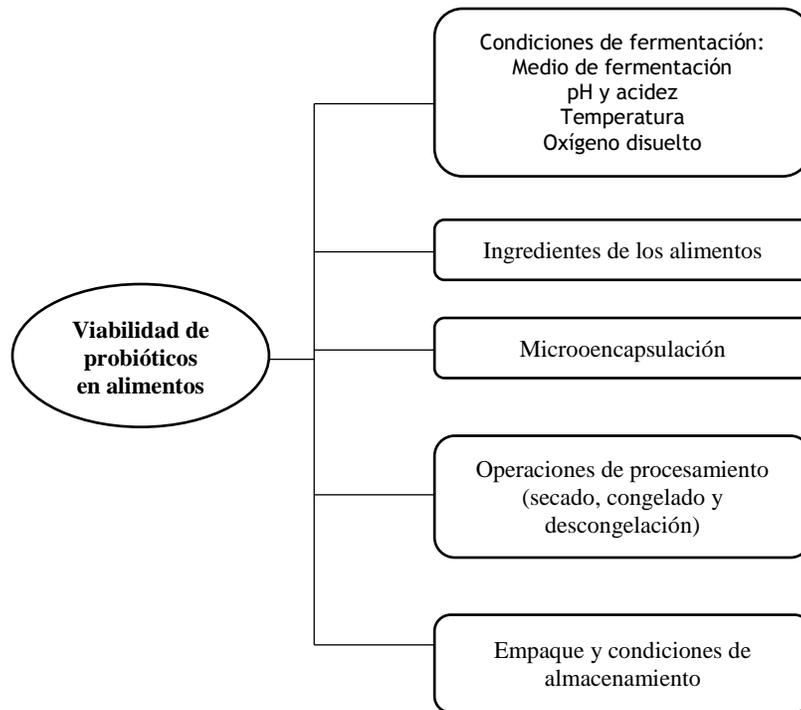
Las propiedades tecnológicas asociadas con la incorporación de cepas probióticas en los productos alimenticios se presentan en la Fig. 2. Los materiales de embalaje utilizados y las condiciones de almacenamiento en las que se almacenan los productos son importantes para la calidad de los productos que contienen probióticos.



**Figura 2** Aspectos cualitativos de alimentos probióticos (Tripathi & Giri, 2014)

La composición de los alimentos, los tipos de material de envasado y el ambiente de almacenamiento (temperatura de almacenamiento, contenido de humedad de los polvos, humedad relativa, contenido de oxígeno y exposición a la luz, entre otros) influyen significativamente en la supervivencia de los probióticos (Mattila-Sandholm et al., 2002).

Se han hecho varios intentos para mejorar la viabilidad de los probióticos en diferentes productos alimenticios durante su producción hasta el momento del consumo. Los factores presentados en la figura 3 han sido identificados con efecto en la viabilidad de los probióticos incluyen los parámetros intrínsecos de los alimentos (pH, acidez titulable, oxígeno molecular, actividad del agua, presencia de sal, azúcar y otros). Productos químicos que pueden estar presentes como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, aromatizantes artificiales y agentes colorantes); parámetros de procesamiento (tratamiento térmico, temperatura de incubación, velocidad de enfriamiento de los materiales de envasado del producto y métodos de almacenamiento, y escala de producción); y parámetros microbiológicos (cepas de probióticos y proporción de inoculación) (Tripathi & Giri, 2014).



**Figura 3** Factores que afectan la viabilidad de los probióticos (Tripathi & 2014)

### Ingredientes y aditivos alimentarios

Los ingredientes de los alimentos pueden ser protectores, neutrales o perjudiciales para la estabilidad probiótica (Mattila-Sandholm et al., 2002), por lo que la compatibilidad de los probióticos con diferentes ingredientes alimenticios desempeña un papel importante en su supervivencia. Los aditivos generalmente utilizados en la industria alimenticia incluyen diferentes tipos de azúcares, edulcorantes, sales, compuestos aromáticos (diacetil, acetaldehído y acetoina), aromatizantes o colorantes naturales o artificiales, nisina (un antibiótico del tipo polipeptídico), natamicina, lisozima y nitrito.

Estos aditivos podrían afectar drásticamente el crecimiento y la viabilidad de las bacterias probióticas utilizadas para los productos fermentados y no fermentados (Vinderola, 2002). Los niveles más altos de ciertos ingredientes pueden inhibir el crecimiento de probióticos durante el almacenamiento (Boylston et al., 2004; Lee & Salminen, 2009)

## Calentamiento

La sensibilidad de las bacterias probióticas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterias*) al calentamiento es tal que los fabricantes prefieren añadir los cultivos después del tratamiento térmico. Esta práctica es una preocupación por razones de seguridad y deterioro. Idealmente, los cultivos probióticos podrían añadirse a la leche y los jugos antes de la pasteurización y sobrevivirían a la etapa de calentamiento. Por lo tanto, la sensibilidad de las bacterias probióticas al calor es una característica que merece atención especial (Champagne, 2009).

Hay afirmaciones de que algunas cepas de la familia *Bacillus* poseen propiedades probióticas. Dado que el *Bacillus* produce endosporas resistentes al calor, parecen apropiados en procesos que llevan una etapa de calentamiento por debajo de 100°C (Belvis et al., 2006). Desafortunadamente estos cultivos están lejos de estar tan bien documentados como las bifidobacterias o los lactobacilos en cuanto a efectos sobre la salud. Por lo tanto, su atractivo es actualmente limitado, incluso en esta situación tecnológica.

Las células de *Bacillus* que han sido sometidas a un estrés térmico leve, por ejemplo 52°C durante 15 min, sintetizan los componentes de resistencia al estrés (De Angelis et al., 2004; Prasad, McJarrow, & Gopal, 2003). Estas células son posteriormente más resistentes a las condiciones de calentamiento letal (Saarela et al., 2004).

## Contenido de oxígeno y potencial redox

El contenido de oxígeno y el potencial redox están entre los factores importantes que afectan la viabilidad de los probióticos, especialmente durante el período de almacenamiento (Lee & Salminen, 2009). El oxígeno molecular es perjudicial para la supervivencia y el crecimiento de los probióticos del género *Bifidobacterium*, ya que la mayoría de las especies son estrictamente anaeróbicas y sacaroclasticas (De Vuyst, 2000) (Holzapfel et al., 2001). El oxígeno afecta a los probióticos de tres maneras: (i) es directamente tóxico para algunas células, (ii) ciertos cultivos

producen peróxidos tóxicos en presencia de oxígeno y (iii) los radicales libres producidos por la oxidación de componentes (por ejemplo, grasas) son tóxicos para las células probióticas (Korbekandi, Mortazavian, & Iravani, 2011).

#### Contenido de humedad / actividad del agua

El contenido de humedad de los productos probióticos es otro factor que influye en la estabilidad de la vida útil de las bacterias vivas por ejemplo. El almacenamiento en presencia de oxígeno y humedad fue perjudicial para la supervivencia bacteriana en un cultivo (Önneby et al., 2013). La cantidad de agua que queda después del secado afecta no sólo a la viabilidad de las bacterias tal como se determina inmediatamente después del proceso, sino también a la tasa de pérdida de viabilidad durante el almacenamiento posterior

#### Temperatura de almacenamiento

La viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento está inversamente relacionada con la temperatura de almacenamiento (Gardiner et al., 2000). Los productos alimenticios probióticos deben almacenarse preferiblemente a una temperatura de 4-5°C (Mortazavian et al., 2007a).

#### PH y acidez titulable

La supervivencia de los probióticos durante el almacenamiento se ve considerablemente afectada por el pH y la acidez titulable de los productos (Mortazavian et al., 2010). Un valor de pH muy bajo aumenta la concentración de ácidos orgánicos no disociados en productos fermentados, mejorando así el efecto bactericida de estos ácidos. Las bebidas como los zumos de frutas con bajos valores de pH poseen un desafío significativo para los probióticos (Tripathi & Giri, 2014)

#### Aspectos de embalaje

Diferentes aspectos del envasado, como el tipo y grosor de los materiales de envasado, el gas (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y vapor de agua) y la permeabilidad a la luz a través del

material, y la técnica de envasado (sistemas de envasado modificados, activos/inteligentes) podrían influir en la supervivencia de los probióticos (Korbekandi et al., 2011). La temperatura y la humedad relativa de la atmósfera pueden afectar a la permeabilidad al gas del material de envasado, afectando así la viabilidad (Cruz et al., 2007).

### 1.12. Evaluación de la seguridad

En general, los microorganismos utilizados en la producción de fermentación alimentaria tienen un largo historial de uso seguro y se conocen a menudo como microorganismos GRAS (generalmente reconocidos como seguros). (Holzapfel et al., 1998). Este es el caso de la mayoría de Lactobacilos y *Bifidobacterias* (Leroy & De Vuyst, 2004; Moreno, Sarantinopoulos, Tsakalidou, & De Vuyst, 2006; Wessels et al., 2004). En Europa, existe el concepto de presunción de seguridad calificada (QPS) con una lista de microorganismos que pueden considerarse seguros para su uso. Los microorganismos destinados al consumo humano están regulados en la UE en el contexto de la nueva regulación de los alimentos (Reglamento (CE) N° 258/97; [http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/index\\_en.Htm](http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/index_en.Htm)).

Para establecer pautas de seguridad para los microorganismos probióticos, un grupo de trabajo FAO/OMS recomendó que las cepas probióticas se caracterizan por una serie de pruebas que incluyen resistencia a antibióticos, actividades metabólicas, producción de toxinas, actividades hemolíticas, infectividad en modelos animales inmunocomprometidos, efectos secundarios en humanos y los resultados adversos en los consumidores (Araya, Morelli, Reid, Sanders, & Stanton, 2002).

### 1.13. *Bacillus*

Las especies de *Bacillus* se han utilizado como probióticos durante al menos 50 años, uno de los primeros productos en los que fue utilizado es el producto italiano conocido como Enterogermina, registrado en Italia en 1958 como suplemento

medicinal. El interés científico en las especies de *Bacillus* como probióticos, sin embargo, sólo ha ocurrido en las últimas décadas y tres revisiones principales han cubierto el campo (Hong & Cutting, 2005; Mazza, 1994; M. Sanders, Morelli, & Tompkins, 2003). De las especies que se han examinado más extensamente se encuentran *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus licheniformis*. Las esporas que son termoestables tienen una serie de ventajas sobre otros no formadores de esporas tales como *Lactobacillus spp.* A saber, que el producto puede ser almacenado a temperatura ambiente en una forma desecada sin ningún efecto deletéreo sobre la viabilidad. Una segunda ventaja es que la spora es capaz de sobrevivir al pH bajo de la barrera (Barbosa, Serra, La Ragione, Woodward, & Henriques, 2005; Spinosa et al., 2000) lo cual no es el caso de todas las especies de *Lactobacillus* (Tuohy et al., 2007) Así que en principio una dosis especificada de esporas puede almacenarse indefinidamente sin refrigeración y de tal manera que las bacterias ingeridas llegarán intactas al intestino delgado.

Las cepas de *Bacillus* como probiótico están ganando interés cada vez mayor porque su capacidad de formación de esporas tiene obvias ventajas en relación con la estabilidad y la viabilidad del producto probiótico cuando este contiene esporas en lugar de células vegetativas. El uso de esporas de *Bacillus* como probiótico implica el consumo directo de altas concentraciones de células viables. Uno de los productos comerciales producidos en Europa y comercializados en la Unión Europea, es Bactisubtil, que contiene esporas de *B. cereus*, (Sanders et al., 2003).

#### 1.13.1. *Bacillus coagulans*

Esta especie se etiqueta a menudo, incorrectamente, como *Lactobacillus sporogenes* que es un nombre de especie no reconocido. El origen de esta especie para su uso en probióticos proviene de la India, donde una serie de fabricantes producen *B. coagulans* como ingrediente alimentario para la exportación y reetiquetado en Europa y los EE.UU. *B. coagulans*, secreta una bacteriocina, la coagulina, que tiene actividad contra un amplio espectro de microorganismos entéricos (Hyronimus, Le Marrec, & Urdaci, 1998). Una cepa, etiquetada como

Ganeden BC30, ha obtenido el estatus de GRAS por la FDA en los Estados Unidos. La cepa comercializado por Ganeden, como Ganeden BC30it se está utilizando en una serie de productos como Sustenex y también se está incorporando en los alimentos donde las esporas pueden sobrevivir a los tratamientos térmicos suaves utilizados para esterilizar los alimentos (Cutting, 2011).

*Bacillus coagulans* es un bacilo gram-positivo, microaerofílico, productor de esporas. Fue originalmente aislado y descrito en 1932 por Horowitz y Wlassowa y llamado *Lactobacillus sporogenes* (*L. sporogenes*) (Gilliland ,1998) En 1957, el organismo fue reclasificado en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey basado en sus propiedades bioquímicas y la nomenclatura correcta actual es *Bacillus coagulans* (*B. coagulans*) (Bergey, 1993).

*B. coagulans* MTCC 5856 ha mostrado resisitencia al calor, esta propiedad puede atribuir a su fase inactiva, es decir, esporas. La espora o endospora es una fase metabólicamente latente de varias especies de *Bacillus* y se forma en el proceso denominado "esporulación", que suele inducirse en condiciones adversas para el microorganismo como niveles reducidos de nutrientes en el medio ambiente (Drigot, 2002).

En un estudio realizado por Majeed y colaboradores en 2014 reporto que *B. coagulans* MTCC 5856 es estable durante el procesamiento y las respectivas condiciones de almacenamiento de alimentos horneados, bebidas, aceite vegetal, jarabe concentrado de glucosa e incluso en café elaborado (Majeed et al., 2014).

*B. coagulans* MTCC 5856 tiene una historia de varios años de uso seguro y eficaz como ingredientes dietéticos en diversas gamas de productos tales como cápsulas, tabletas, yogur congelado y recientemente en pan. La preparación de esporas de *B. coagulans* se añade actualmente a los alimentos previstos a niveles de  $10^8$  a  $2 \times 10^9$  ufc / porcion (Majeed & Prakash, 1998; Majeed & Kamarei, 2012; Majeed et al., 2014).

## Farmacocinética

Después de la administración oral, *B. coagulans* llega al estómago en forma de esporas, donde se expone a la acción del estómago y a un pH ácido que hace que el revestimiento de esporas absorba agua, se hinche y comience el proceso de germinación. Al llegar al duodeno, las esporas germinan y se multiplican rápidamente. Las estimaciones sugieren que la duración media del tiempo entre la dosificación oral y la germinación es 4-6 horas, (Ghandi, 1988) con aproximadamente el 85 por ciento del material de partida que llega al tracto intestinal. Después de la germinación, *B. coagulans* es metabólicamente activo en los intestinos, produciendo L (+) ácido láctico levógiro, la forma más fácilmente metabolizada en la síntesis de glucógeno por el cuerpo (es decir, la forma isómera que no se esperaría que contribuyera a la acidosis metabólica) *B. coagulans* se considera un probiótico colonizante transitorio, indicando que sólo ocupa residencia temporal en los intestinos humanos.) Las esporas de *B. coagulans* se excretan lentamente a través de las heces durante aproximadamente siete días después de suspender la administración (Jurenka, 2012).

### 1.13.1.1 Beneficios del *B. coagulans*

En personas con problemas gastrointestinales se encontró que *B. coagulans* MTCC 5856 disminuyó los síntomas clínicos como distensión abdominal, vómitos, diarrea, dolor abdominal y frecuencia de heces en un ensayo clínico aleatorizado multicéntrico que en sus conclusiones sugiere a este microorganismo como de uso seguro y efectivo en el manejo de la diarrea, en el síndrome del intestino irritable (Majeed et al., 2014).

Recientes estudios han demostrado que los probióticos apoyan una función digestiva e inmunológica saludable, ayudan a la absorción de proteínas y disminuyen la inflamación. (Jäger et al., 2016)

*Bacillus coagulans* produce enzimas digestivas (Wang & Gu, 2010) que son activas bajo condiciones intestinales (proteasas alcalinas, etc.) y se ha demostrado que estas proteasas digieren proteínas más eficientemente que las proteasas endógenas humanas solas (Minevich et al., 2015). *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 mejora la salud de las células del revestimiento intestinal mejorando la absorción de nutrientes, incluyendo minerales, péptidos y aminoácidos, disminuyendo la inflamación y estimulando el desarrollo óptimo del área de absorción de las vellosidades (Kimmel, Keller, Farmer, & Warrino, 2010). *B. coagulans* ha mostrado efectos significativos como terapia complementaria para aliviar los síntomas de la artritis reumatoide (Mandel, Eichas, & Holmes, 2010).

#### 1.13.1.2. Mecanismos de acción para *B. coagulans*

A pesar de la naturaleza transitoria de este organismo en el tracto digestivo, se piensa que produce un cambio en el ambiente intestinal en apoyo de una flora gastrointestinal compleja. Se presume que es un resultado de la mejora de la ecología gastrointestinal reponiendo la cantidad de los microorganismos obligatorios deseables y antagonizando con los microorganismos patógenos. (Gilliland, 1999; Adami & Cavazzoni, 1999)

*B. coagulans in vitro* ha mostrado producir bacteriocinas (Majeed & Prakash, 1998) y ácidos grasos de cadena corta que nutren la mucosa de la colonia. "Las bacteriocinas son péptidos producidos por algunas cepas de bacterias que inhiben el crecimiento de otras bacterias. La coagulina, una sustancia con actividad de bacteriocina (Hyronimus et al., 1998) y la lactosporina, una proteína antimicrobiana única con un resto lipídico (Riazi, Wirawan, Badmaev, & Chikindas, 2009).

Los bioensayos *in vitro* también han demostrado que los componentes de la pared celular y el sobrenadante de ciertas cepas de *B. coagulans* influyen en la inflamación del intestino a través de la modulación de las citoquinas, la inhibición de las especies reactivas del oxígeno y mejorando la fagocitosis mejorad (Kodali & Sen, 2008).La

investigación en humanos también ha mostrado que el consumo de *B. coagulans* GBI- 6086 aumentó la respuesta del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) a adenovirus en 250 por ciento sobre la línea de base después de 30 días de tratamiento. También se observó un aumento de 1.709 por ciento en la respuesta del TNF $\alpha$  a la gripe A, pero no se observó ningún efecto para otras cepas de influenza (Baron, 2009). La actividad antifúngica de *B. coagulans* también se ha demostrado *in vitro* contra las especies de *Fusarium*, posiblemente el mecanismo es que *B. coagulans* posee una actividad significativa de la  $\beta$  galactosidasa (lactasa) *in vitro* y también puede tener actividad de ácido deshidrogenasa láctica, potenciando así la digestibilidad de la lactosa en aquellos que son intolerantes (Kim YM, 1985; Majeed & Prakash, 1998). *B. coagulans* asimila e incorpora colesterol en su estructura celular, se une al colesterol en el intestino y puede inhibir la enzima productora de colesterol 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima reductasa (HMG-CoA reductasa) (Mohan, Arora, & Khalilullah, 1990).

#### Seguridad de *B. coagulans*

La seguridad de las especies de *Bacillus* ha sido ampliamente revisada en otros lugares (de Boer Sietske & Diderichsen, 1991; Ishibashi & Yamazaki, 2001; Logan, 2004).

En 2008 la cepa de *B. coagulans* GenedenBC30 fue la primera cepa de *Bacillus* que recibió la aprobación GRAS por la Federal Drug Administration (FDA). En Europa, dependiendo sea su uso han sido aprobados diferentes tipos de *Bacillus*, *B. subtilis* ha sido aprobado para ser usado como un suplemento, y en Reino Unido el *B. clausii* se encuentra en el producto medicinal denominado Enterogermina® y *B. cerus* IP5832 (Bactisubtil®) registrado como medicina para uso específico de prevención de diarrea en niños (Cutting. 2011).

Los resultados de evaluación de seguridad toxicológica de Geneden BC30 reportados por Endres y colaboradores en 2009 indican que *B. coagulans* no demuestra efectos mutagénicos, clastogénicos o genotóxicos. Además, los

resultados de los estudios agudos y de toxicidad oral subcrónica de 90 días en ratas resultaron en la conclusión de un NOAEL (Non Observed Adverse Effects Level) mayor de 1000 mg/kg por día. Dado que la concentración de la masa celular utilizada en el estudio de 90 días fue de  $1.36 \times 10^{11}$  UFC/g, esto corresponde a  $95.2 \times 10^{11}$  UFC para un humano de 70 kg y puesto que la dosis humana sugerida está en el intervalo de  $100 \times 10^6$  a  $3 \times 10^9$  UFC, esto da un factor de seguridad que oscila entre 3,173 y 95,200 veces (Endres et al., 2009).

Basado en procedimientos científicos y respaldados por el historial de uso, GanedenBC30™ se considera seguro para el consumo humano en forma continua (Endres et al., 2009).

*B. coagulans* está actualmente disponible en productos comerciales probióticos, incluyendo Ganeden BC30 (*B. coagulans* GBI-30, 6086), una preparación probiótica patentada que se considera segura para el consumo humano y se ha asociado al alivio de los síntomas gastrointestinales de dolor el síndrome de intestino irritable (Dolis, 2009, Hun, 2009).

De acuerdo a Julie & Jurenka, 2012 las dosis diarias de *B. coagulans* varían entre 100 millones y 5 mil millones de UFC/día. Actualmente, para *B. coagulans* GBI-30-6086 suministrados en cápsulas, una recomendación de dosificación típica es de 100 mg 2-3 veces al día, con cada 100 mg que contiene aproximadamente 1.5 billones de unidades formadoras de colonias (Jurenka, 2012) .

#### 1.14. Alimentos derivados de cereales con probióticos

El desarrollo de productos probióticos no lácteos es un desafío para la industria alimentaria en su esfuerzo por utilizar los abundantes recursos naturales produciendo productos funcionales de alta calidad. A este respecto, se han desarrollado alimentos para bebés que contienen probióticos o formulaciones de confitería añadiendo las cepas como aditivos (Saarela et al., 2000). En los últimos

años, también se han investigado cereales sobre su posible uso en el desarrollo de alimentos funcionales. Los cereales se cultivan más del 73% de la superficie total cosechada en el mundo y contribuyen con más del 60% de la producción mundial de alimentos que proporcionan fibra dietética, proteínas, energía, minerales y vitaminas necesarias para la salud humana. Las posibles aplicaciones de cereales o componentes de cereales en las formulaciones alimentarias funcionales podrían ampliarse (Charalampopoulos et al., 2002).

Según Jousse, (2008). El desarrollo de nuevos productos es un desafío constante para la investigación científica y aplicada, y se ha observado que el diseño de alimentos es esencialmente un problema de optimización para generar mejor la formulación. Uno de los aspectos a considerar de suma importancia en la composición de los alimentos es la sinergia entre los ingredientes y la forma como algunos de ellos y/o los aditivos alimentarios pueden interactuar con los microorganismos probióticos presentes.

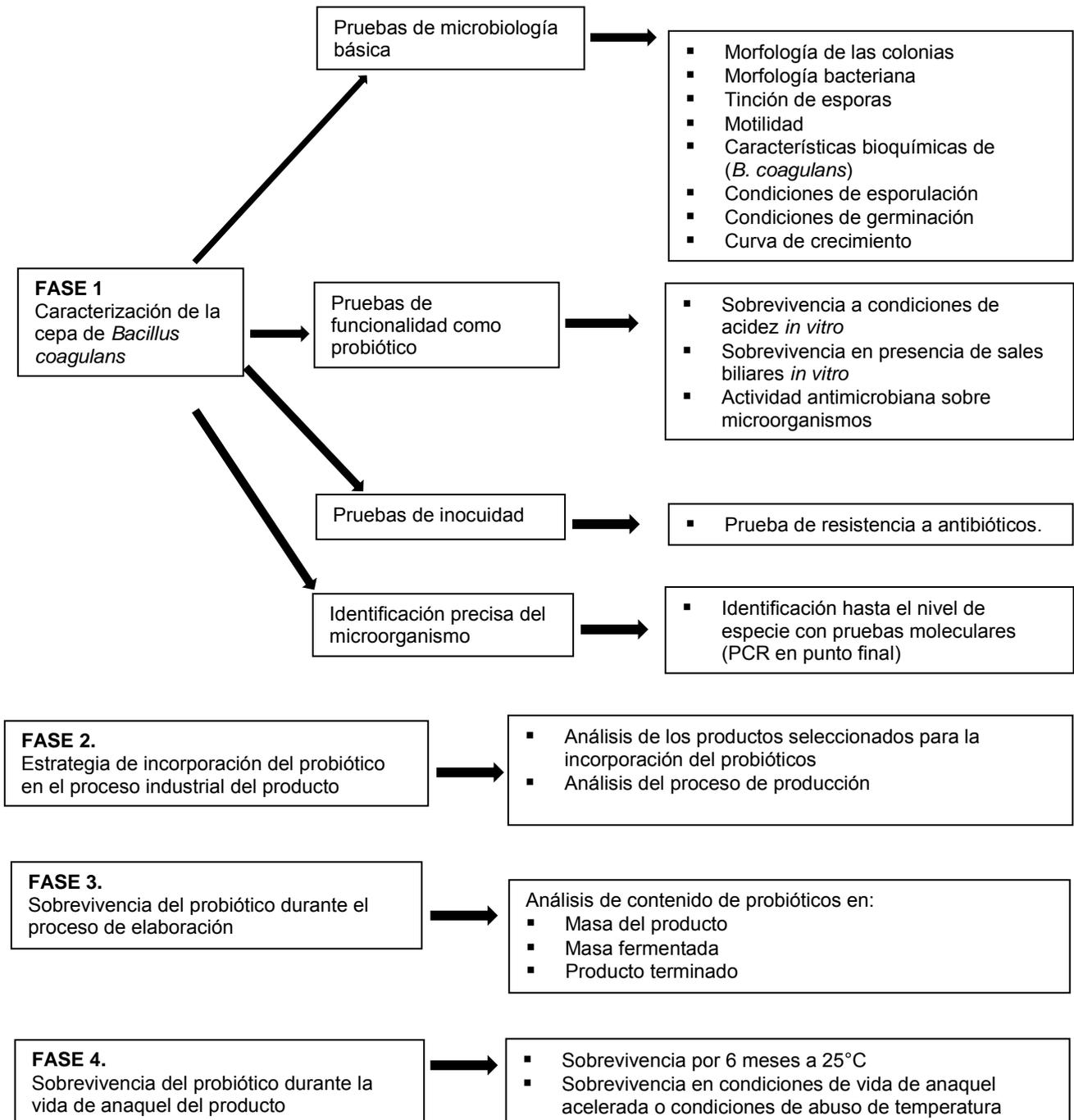
Los cereales pueden considerarse fuentes importantes de ingredientes funcionales, ya que contienen, especialmente en las capas externas de granos, sustancias bioactivas principalmente polifenoles con actividades protectoras relacionadas con la reducción de la incidencia de cardiopatía coronaria, diabetes y cáncer (Hemery et al., 2007). De hecho, el beneficio potencial para la salud de los polifenoles está asociado con la protección contra el estrés oxidativo el cual que puede dar lugar a una inflamación crónica y a una posible resistencia a la insulina (Willcox et al., 2004).

Los múltiples efectos beneficiosos de los cereales pueden explotarse de diferentes maneras, lo que conduce al diseño de nuevos alimentos derivados de cereales o ingredientes de cereales que pueden dirigirse a poblaciones específicas. Los cereales se pueden utilizar como sustratos fermentables para el crecimiento de microorganismos probióticos. Los principales parámetros que deben considerarse son la composición y procesamiento de los granos de cereales, la formulación del sustrato, la capacidad de crecimiento y la productividad del cultivo iniciador, la estabilidad de la cepa probiótica durante el almacenamiento, las propiedades

organolépticas y el valor nutricional del producto final. (Charalampopoulos et al., 2002).

### 3. Metodología

En la figura 4 se presenta en forma esquematizada las cuatro diferentes etapas de la metodología empleada en la investigación



**Figura 4** Esquema general del proyecto de investigación

### 3.1 Caracterización de la cepa de *Bacillus coagulans*.

Se tomó como base las Guías internacionales propuestas por la FAO y la Organización Mundial de la Salud en el año 2002 (Araya et al., 2002).

Esta etapa del proyecto fue desarrollada en los laboratorios de Alimentos y de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación de Nutrición y Salud Pública de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

Se analizaron tres cepas, dos de ellas fueron cepas comerciales de la marca Ganeden® (OH, EE.UU) y una adquirida de American Type Culture Collection (ATCC) (VA, EE.UU), en la tabla 5 se describen las características de las cepas.

**Tabla 5** Características de las cepas usadas en este trabajo.

Código	Descripción	Característica	Fuente
BC-9M-E	Ganeden® BC30 $9 \times 10^9$ UFC/g	Encapsulada	Ganeden®
BC-15M	Ganeden® BC30 $1.5 \times 10^{10}$ UFC/g	No encapsulada	Ganeden®
ATCC	Cepa de referencia de <i>Bacillus coagulans</i> ATCC® 7050™	No encapsulada	American Type Culture Collection (ATCC)

La metodología empleada para cada una de las pruebas se describe a continuación:

#### 3.1.1. Pruebas de microbiología básica.

##### 3.1.1.1. Morfología de las colonias

Las cepas fueron analizadas después de 48 horas de crecimiento a 37° C en cajas petri con agar soya tripticaseina (AST) (Difco Laboratorios. Detroit, MI. EE.UU), previa dilución seriada con tampon de fosfatos (SIGMA-ALDRICH, MO, EE.UU) (0.3 mM) pH 7.2 (NOM 110-SSA1. 1994). Se constató que las colonias presentaran las características descritas en el Manual de Bergey (Logan, 2009).

##### 3.1.1.2. Tinción de Gram y morfología de las bacterias.

Se realizó una tinción de Gram de las tres cepas de estudio y se observaron al microscopio óptico (CARL ZEISS, México) con objetivo de 100x con aceite de

inmersión para comprobar las características de bacterias del género *Bacillus*. (Logan, 2009).

#### 3.1.1.3. Tinción de esporas.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Schaeffer y Fultton (1993) el cual consiste en una tinción con dos colorantes, el verde de malaquita y la safranina, las endoesporas de *Bacillus* no perdieron el colorante de la primera tinción con el agua de lavado, mientras que esto si sucede con las formas vegetativas, las cuales quedaron teñidas con el segundo colorante (Schaeffer & Fulton, 1933).

#### 3.1.1.4. Motilidad.

Las cepas de estudio fueron colocadas en caldo soya tritpicaseina (CST) (Laboratorios Difco) y se mantuvieron 24 horas a 37° C para su crecimiento. Tubos con 4 ml de medio MIO (Motilidad Índol Ornitina) (DIBICO, México) se inocularon por picadura en el centro de la columna de agar con un asa estéril. Los tubos fueron incubados a 37° C por 24 horas (Ederer & Clark, 1970).

#### 3.1.1.5. Características bioquímicas.

Para conocer las características bioquímicas de las diferentes cepas de *B. coagulans* se utilizó la técnica rápida denominada API® 50 CH™ (bioMeriux, Marcy-l'Étoile, Francia). Se inocularon las cepas en CST y se incubaron a 37° C por 18 horas, los cultivos se ajustaron a una densidad óptica de 1 Abs (espectrofotómetro Evolution 300, Thermo Electron corporation, MA, EE.UU) utilizando agua estéril

Posteriormente, 1 ml de este cultivo se agregó a un tubo con el medio CHB/E de API (bioMeriux, Marcy-l'Étoile, Francia), se homogenizó y la suspensión bacteriana se distribuyó en los 50 tubos de las galerías, las cuales se incubaron a 37° C por 48 horas (Logan y Berkeley 1984).

#### 3.1.1.6. Esporulación y germinación.

La capacidad de formación de esporas se analizó como lo describe Palop y col. (1997) se inocularon por estría las cepas de estudio en cajas petri con AST, las

cajas fueron incubadas bajo condiciones de estrés (5 días a 52°C) para obtener la esporulación total de las bacterias. Las esporas fueron recolectadas de la superficie del cultivo por flotación usando como medio agua estéril. Estas suspensiones fueron transferidas a frascos estériles y almacenados a 0°C.

La suspensión de esporas fue purificada mediante tratamiento térmico a 70°C durante 30 minutos para la eliminación de las células vegetativas. La formación de esporas fue corroborada mediante la observación de las mismas al microscopio óptico.

El proceso de germinación o activación de las esporas del probiótico se realizó siguiendo el método descrito por Hitchins (1968) ); consiste en colocar las muestras de suspensión de esporas en condiciones óptimas de cultivo. Para esto se realizaron diluciones decimales en agua estéril para después ser sembrados en cajas petri con (AST) e incubadas a 35°C por 24 horas (Hitchins, 1968).

#### 3.1.1.7. Curva de crecimiento de *Bacillus coagulans*

Se analizaron las curvas de crecimiento de estas cepas de microorganismos. Con este propósito, se prepararon 400 ml de caldo soya tripticaseína (ST) y se esterilizaron en autoclave. El medio fue inoculado con *B. coagulans* hasta obtener una absorbancia de 0.01 a 600 nm con cada cepa del probiótico en fase logarítmica. El medio inoculado se incubó a 37° C con agitación ininterrumpida. Cada hora se tomaron 600 µl para medir densidad óptica a 600 nm y cada 3 horas se tomó 1 ml (espectrofotómetro Evolution 300, Thermo Electron corporation, MA, EE.UU) para realizar conteo celular en agar soya tripticaseína. Se decidió el uso de los parámetros densidad óptica y cuenta en placa debido a que el uso del primero tiene la desventaja de cuantificar la masa celular por lo que no distingue entre microorganismos vivos o muertos (Epstein & Grossowicz, 1969).

#### 3.1.2 Pruebas de Funcionalidad.

##### 3.1.2.1. Tolerancia a la acidez.

Se utilizó como referencia la metodología propuesta por Chou y Weimer (1999) con algunas modificaciones que a continuación se describen. Se inocularon las cepas en (CST) estéril previamente ajustado el pH a 3.5 por 90 minutos. Los cultivos

fueron incubados a 37° C, por 24 horas, tomando una alícuota de cada cultivo, los cuales se pasaron a soluciones de agua peptonada (DIFCO Laboratorios), se realizaron diluciones y se tomó 1mL de las diluciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  de las cepas BC-9M-E y de las diluciones decimales  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  de la cepa BC-15M y de la cepa de referencia ATCC para cultivarlas en agar ST; se incubaron a 37° C por 24 h. Cada experimento se realizó por triplicado (Chou & Weimer, 1999).

#### 3.1.2.2. Tolerancia a sales biliares.

Se inocularon las cepas pasando una alícuota de 100 µl de cada cultivo a tubos con agua peptonada al 1%, con 0.2% de sales biliares (oxgall Difco™) se incubaron por 180 minutos a 37° C. Se realizaron diluciones y tomó 1 mL de las diluciones  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  de las cepas de BC-9M-E y de las diluciones  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  de la cepa BC-15M y de la cepa de referencia ATCC para cultivarlas en agar ST; se incubaron a 37° C por 24 h. Cada experimento se realizó por triplicado (Lankaputhra & Shah, 1995).

#### 3.1.2.3. Tolerancia a condiciones de acidez y sales biliares

También se realizó una prueba combinada (acidez y sales biliares) después de la prueba de tolerancia a acidez a 37°C por 90 min, una muestra del cultivo del probiótico fue neutralizada con NaOH estéril (1N) hasta alcanzar un pH de 6.8 y transferida a una solución de agua peptonada con sales biliares (0.2%) para lograr una mayor similitud con el proceso de digestión monogástrica utilizando las condiciones antes descritas (Chou & Weimer, 1999).

#### 3.1.2.4. Actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana se evaluó al medir los halos de inhibición que generaron las diferentes cepas de *B. coagulans* en cajas de agar Luria (Difco Laboratorios.) que contenían los microorganismos patógenos de prueba (*Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*) tomando como base la metodología descrita por Tagg et al., (1976) y realizando algunas modificaciones que a continuación se describen. Los microorganismos probióticos se cultivaron en caldo MRS (Difco Laboratorios) a 37°C por 48hrs, posteriormente se ajustaron los cultivos a una densidad óptica

de 1.0 con un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 640, CA, EE.UU) a una longitud de onda de 600nm. La suspensión se centrifugó para obtener el sobrenadante. Por otro lado, se cultivaron los microorganismos patógenos en caldo soya tripticasa por 24 horas, los cultivos se ajustaron a una densidad óptica de 0.1 con el equipo y las condiciones ya descritas. Una muestra de 100 µl de cada uno de los cultivos de microorganismos patógenos fue colocada en cajas Petri estériles y mezclado con agar Luria (SIGMA-ALDRICH) una vez solidificado el agar se realizaron perforaciones de 5 mm de diámetro. En cada orificio se colocaron de 50 a 200 µl del sobrenadante del probiótico, y se permitió que el sobrenadante se difundiera en el agar. Las cajas fueron incubadas en posición invertida por 24 horas a 37°C y revisadas posteriormente para determinar la inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos. La cepa se consideró positiva cuando se observó un halo de inhibición de al menos 2 mm medido a partir del borde del orificio.

### 3.1.3. Pruebas de inocuidad

#### 3.1.3.1. Prueba de resistencia a los antibióticos.

Una vez aislado y purificado el microorganismo probiótico de los productos de Ganeden® y de un cultivo de la cepa de referencia, se tomaron con una asa 5 colonias de cada una de las cepas de estudio y se inocularon de forma independiente en 5 ml de caldo Mueller-Hillton (Difco Laboratorios) para ser incubados a 35°C hasta que apareció una ligera turbidez. Posteriormente se preparó el medio agar Muller-Hillton con un pH entre 7.2 y 7.4, y se colocaron en cajas petri. Para inocular el agar se utilizó un hisopo estéril de algodón el cual se humedeció con la suspensión microbiana, se estrió en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar y se dejó secar. Una vez seco se tomaron los multidiscos (Multidiscos combinados BIO-RAD 71080380, CA, EE.UU) se colocaron en el medio presionándolos ligeramente para asegurar el contacto con la superficie. Se incubaron las cajas petri a 35°C por 18 horas, y se midió el halo de inhibición en mm.

Las cepas se clasificaran en Resistentes (R), Intermedias (I) o Sensibles (S), de acuerdo a las especificaciones del fabricante: Amikacina ( $\geq 17$ mm), Ampicilina ( $\geq 17$  mm), Cefalotina ( $\geq 18$  mm), Ceftriaxona ( $\geq 21$  mm), Cloranfenicol ( $\geq 18$  mm), Dicloxacilina ( $\geq 13$  mm), Enoxacina ( $\geq 18$  mm), Eritromicina ( $\geq 23$  mm), Gentamicina

(≥15 mm), Netilmicina (≥15 mm), Penicilina (≥23 mm) y Trimetoprim-Sulfametoxazol (≥16 mm) (BIO RAD, 2017).

#### 3.1.4. Identificación molecular de *Bacillus coagulans*

Para confirmar la presencia de *Bacillus coagulans* en los productos Geneden®, se utilizó la técnica de PCR de punto final; se tomó como base la metodología descrita por Hidaka et al., (2010). Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos que corresponden a un segmento del gen para el ARNr 16S. Para confirmar que los oligonucleótidos corresponden al segmento señalado de *B. coagulans* se realizó una búsqueda en las bases internacionales de datos de genes (Blast; Gen Bank). La búsqueda en el GenBank arrojó que los oligonucleótidos amplifican un segmento de 262 pares de base del gen que codifica para el RNA 16S de *B. coagulans* y de otros 2 *Bacillus* de especie no reportada, pero que presumiblemente son cepas del mismo microorganismo.

En la tabla 6 se describen los oligonucleótidos empleados para la identificación molecular.

**Tabla 6** Secuencias de oligonucleótidos utilizadas

Bacteria	Oligo		Secuencia	Locación
<i>Bacillus coagulans</i>	BACO186	F	GCATGGAGGAAAAAGGAA	16S rRNA
	BACO447	R	CCCGGCAACAGAGTTTTA	

Fuente: Hidaka, Horie, Akao, & Tsuno, 2010

Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos que corresponden a un segmento del gen para el RNAr 16S, los cuales fueron corroborados en el programa Gene Bank y Blast Gene Bank y Blast ([www.ncbi.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nih.gov/genbank) y [www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST))(Blast; GenBank).

#### 3.1.5. Microorganismos Cepa de referencia.

Para la identificación molecular se utilizó la cepa de referencia de *Bacillus coagulans* ATCC® 7050™; se activó tomando 0.1 gr de la cepa, se resuspendió en caldo de cultivo ICC BD (Bioxon, México) y se incubó a 37°C por 48 hrs.

### Cepas de prueba de *Bacillus coagulans*.

Fueron aisladas del producto comercial Ganeden<sup>®</sup>, el probiótico se aisló mediante su cultivo en agar MRS previa dilución en tampon de fosfatos 0.3 mM, pH 7.2 y se incubó a 37°C por 48 hrs, se tomaron colonias aisladas y se resembraron por estría en tres campos nuevamente en agar MRS para su posterior identificación.

### Microorganismos probióticos.

Para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos de *B. coagulans*, se utilizó ADN de 5 cepas comerciales de probióticos (*L. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* y *Bifidobacterium longum*) almacenados a -20°C, estas cepas fueron proporcionadas por la empresa Lacti lab de México (Nuevo León, México). Las cepas liofilizadas fueron activadas y mantenidas a 4° C en agar Man-Rogosa-Sharp (MRS)

### Microorganismos patógenos.

Para las pruebas de especificidad de los oligonucleótidos también se utilizaron cepas de referencia de los siguientes microorganismos: *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium (ATCC 13311), *S. enteritidis* var. *Enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus cereus* (ATCC 13061), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (ATCC 4350). Las cepas fueron activadas en (CST) y se incubaron a 37°C por 48 hrs, posteriormente se resembraron por estría en tres campos en agar MRS.

#### 3.1.6. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial DNAzol<sup>®</sup> (OH, EE.UU). Se tomó 1 ml de la cepa extraída de Ganeden<sup>®</sup> y se centrifugó a 6000g durante 4 min., se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 400 µl de buffer Tampon de Extracción 1X (TE Buffer) - pH 8, con agitación en el vortex hasta lograr una suspensión homogénea, el ADN extraído se refrigeró a 4° C durante toda la noche y finalmente se almacenó a -20°C.

### 3.1.6.1. Condiciones de amplificación

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía: 4 µl de ADN bacterial, 0.5 U Taq polimerasa (Bioline, UK), 2.5 µl Buffer 10X, 1 µl MgCl 50mM, 2.5 µl DNTP's 10 pmol/µl, 0.3µl de cada primer y 13.9 µl de H<sub>2</sub>O (Hidaka, Horie, Akao, & Tsuno, 2010).

La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca AXYGEN modelo MAXYGEN-GRADIENT (CORNING, MA, EE.UU) programado para 30 ciclos. En cada ciclo la desnaturalización fue a 94°C por 20 seg, la alineación fue de 48°C por 20 seg y la extensión fue a 72°C por 40 seg. La extensión final fue a 72°C por 5 min al finalizar los 30 ciclos. En todas las corridas se utilizó agua ultra pura estéril en reemplazo de ADN como control negativo (Sambrook & Russell, 2001; Sudha, Chauhan, Dixit, Babu, & Jamil, 2010).

El producto amplificado se analizó en un gel de agarosa al 3.5% utilizando un buffer de carga Tris-acetato-EDTA en una cámara de electroforesis MINI-SUB-GT (BIO-RAD) y fuente de poder POWER PAC-300 (BIO-RAD), aplicando energía de 20 voltios/5 min y 80 voltios/45 min.

## 3.2. Incorporación del probiótico en el proceso industrial del producto

### 3.2.1. Análisis de los productos seleccionados

Los productos seleccionados para la incorporación del probiótico *B. coagulans* fueron:

#### A. Galleta con avena y pasas.

Los ingredientes para la elaboración de este producto son los siguientes: Harina de trigo, harina de avena de grano entero, azúcar, grasa vegetal (contiene TBHQ, palmitato de ascorbilo, tocoferoles), hojuelas de avena de grano entero, pasas, inulina, huevo, lecitina de soya, sal yodada, almidón, monoesterato de glicerol, estearoil, lactilato de sodio.

## B. Barra de cereal con relleno de fruta.

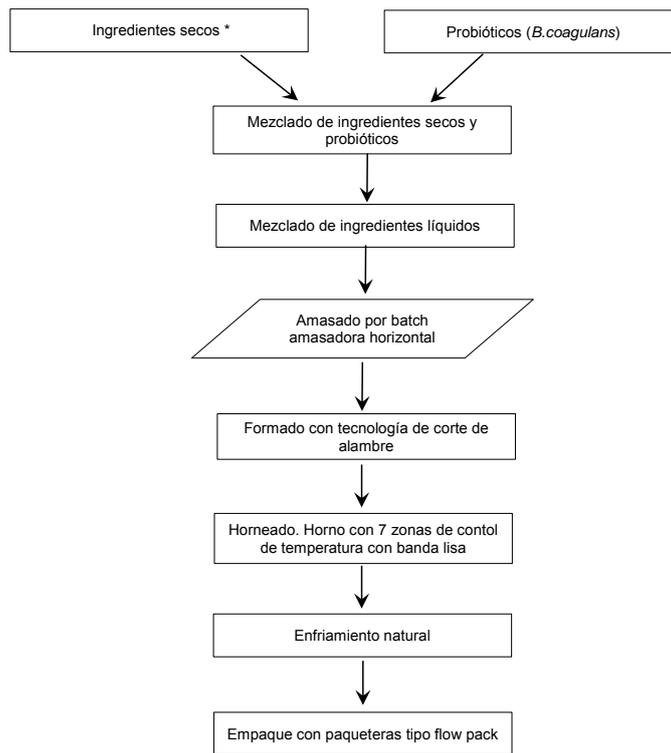
Los ingredientes para la elaboración de este producto son los siguientes: relleno de futa, almidón modificado, dextrosa, glicerina, ácido cítrico, pectina, sal yodada, aceite vegetal, harina de avena de grano entero, harina de trigo, hojuelas de avena endulzadas, almidón modificado, grasa vegetal (contiene TBHQ, palmitato de ascorbilo, tocoferoles), lactilato de sodio, sólidos de leche, gluten de trigo, azúcar, jarabe de maíz de alta fructosa, salvado, lecitina de soya, metabisulfito de sodio, goma xantana.

La selección de estos productos comerciales se realizó considerando su composición, la factibilidad para incorporar los probióticos, el proceso de producción disponible para realizar el proyecto y las preferencias de consumo de estos productos.

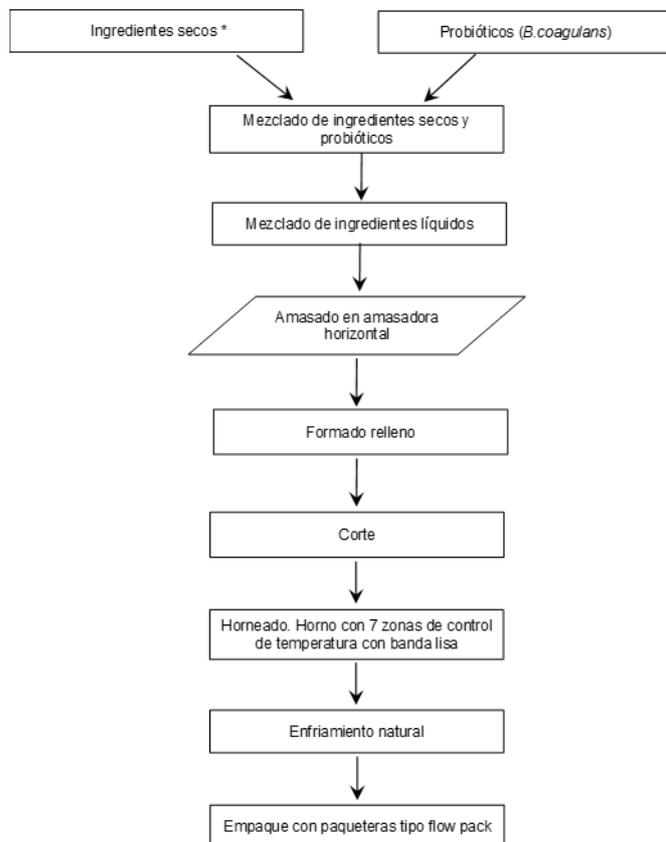
### 3.2.2. Análisis del proceso de producción

Se analizaron las operaciones unitarias en los procesos de producción de los productos seleccionados para determinar la mejor manera de incorporación de los probióticos. Se seleccionó la incorporación del probiótico en los ingredientes secos a través de un proceso de mezclado. El mezclado de las barras de cereales se llevó a cabo en el Lote 1 en una mezcladora tipo Artesa y en el Lote 2 y Lote 3 en mezcladora de Listón. El proceso de mezclado de las galletas de avena se realizó en una mezcladora de Listón. Los ingredientes secos adicionados con el probiótico fueron analizados en tres tiempos diferentes (10, 20 y 30 minutos) de mezclado para determinar cuál era el más adecuado para una mejor dispersión.

A continuación se presentan los esquemas generales de producción de productos seleccionados. Figura 5 y 6.



**Figura 5** Diagrama de flujo de elaboración de galleta de avena



**Figura 6** Diagrama general de flujo del proceso de elaboración de barra con relleno de fruta

En la tabla 7 se muestran las cantidades de probiótico calculadas que se incorporaron a los diferentes productos, así como las características del probiótico liofilizado (Ganeden®).

**Tabla 7** Descripción de los productos seleccionados para la adición de probióticos con la cantidad deseada y características de la materia prima.

Producto	Contenido calculado de probiótico(UFC/g)	Tamaño de la porción(g)	Características del liofilizado	
			Concentración (UFC/g)	Presentación
Barra de cereal con relleno de fruta.	5 X 10 <sup>8</sup>	50	1 x 10 <sup>9</sup>	Encapsulado
Galleta de avena con pasas.	1 X 10 <sup>9</sup>	60	1.5 x 10 <sup>10</sup>	No encapsulado

En cada uno de los lotes en los diferentes tiempos de mezclado se determinó el contenido de microorganismos probióticos (*B. coagulans*) mediante la técnica propuesta por el proveedor (Ganeden®) la cual consiste en una cuenta en placa en (AST) incubado a 37 °C por 48 h. Posteriormente fueron obtenidas muestras en las diferentes etapas del proceso de producción (masa, masa fermentada y producto terminado).

También se evaluaron productos sin la adición de *B. coagulans* como control negativo, para determinar la cantidad de microorganismos que contenía el producto en su forma original ya que la metodología empleada (recomendada por el proveedor), no es selectiva para *B. coagulans* y permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

### 3.3. Supervivencia del probiótico durante el proceso de elaboración

El producto terminado fue analizado en su contenido de microorganismos probióticos para determinar la supervivencia del mismo durante el proceso de horneado en las barras y las galletas. En estos productos se hicieron muestreos en tomando producto de la banda de horneado en diferentes tiempos y lugares para determinar la homogeneidad de esta operación unitaria (tabla 8).

**Tabla 8** Descripción del muestreo. (Número de muestras en cada etapa de producción).

Producto	Etapas de producción			
	Ingredientes secos	Masa	Masa fermentada	Producto terminado
Barra de cereal con relleno de fruta.	5* 3*	3	3	3 tiempos <sup>1</sup> y 3 lugares <sup>2</sup>
Galleta de avena con pasas.	3**	3	3	3 tiempos <sup>1</sup> y 3 lugares <sup>2</sup>

\* Mezclado en artesa, \*\* Mezclado en listón, 1 Inicio, medio y fin, 2 Sur, centro y norte

### 3.4. Supervivencia del probiótico durante la vida de anaquel del producto

Para el análisis de supervivencia durante la vida de anaquel a seis meses, los productos fueron conservados a temperatura ambiente (20-25°C) y cada 10 días se tomó una muestra de cada uno de tres lotes independientes elaborados; se analizó la presencia del probiótico mediante la técnica propuesta por el proveedor (Ganeden®) que consiste en la determinación de cuenta en placa en (AST) a 37°C por 48 h.

Para el análisis de supervivencia en vida de anaquel acelerada o almacenada en condiciones de abuso de temperatura los productos fueron conservados a temperatura de 48°C y humedad relativa de 85% (en una bodega de diseñada para tal fin en la planta de producción) por 9 semanas, cada semana se tomó una muestra de los 2 productos, se cuantificó la presencia del probiótico mediante la determinación de cuenta en placa en (AST) a 37°C por 48 h.

### 3.5. Análisis estadístico.

De cada uno de los productos se elaboraron tres lotes independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el programa computacional SPSS V.22 (IBM, Illinois, EE.UU) y contiene estadística descriptiva como la media (M) y el error estándar (Es) e inferencial (análisis de varianza con un 95% de confiabilidad) previa comprobación de normalidad y homocedasticidad.

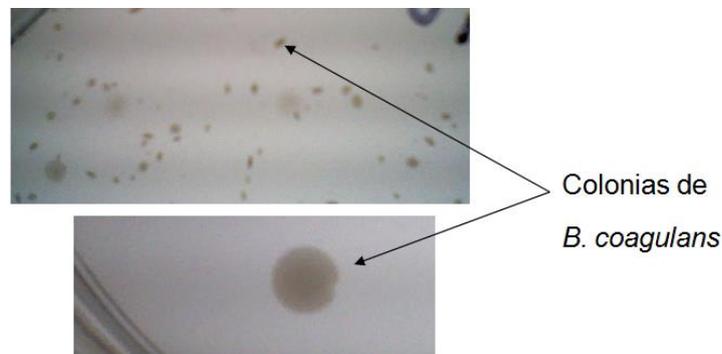
## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Caracterización de las cepas

Las pruebas de microbiología básica permitieron identificar las características generales de las cepas y la pureza de las mismas.

#### 4.1.1 Morfología

Se observaron colonias con apariencia brillante, blancas, no viscosas, de 1 a 2 mm de diámetro, con un borde completo (Figura 7) Estos resultados son similares a los encontrados por Sarles & Hammer (1932) quienes, al revisar la morfología de *B. coagulans*, se encontraron colonias de redondas a ovaladas, blancas no viscosas y de diferentes diámetros y observaron colonias más pequeñas bajo la superficie del agar, pero con características similares (Sarles & Hammer, 1932).



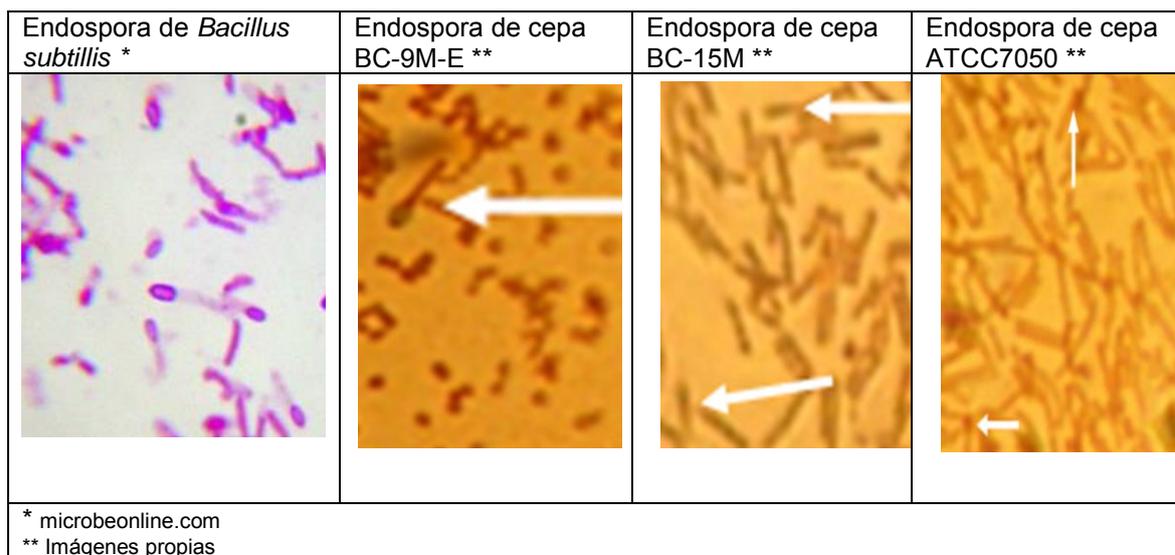
**Figura 7** Morfología de las colonias de *B. coagulans*

#### 4.1.2. Tinción de Gram.

En todas las cepas se observaron bacilos cortos Gram positivos, sin embargo, dentro de los mismos frotis también se encontraron bacterias gram negativas, esta peculiaridad ha sido reportada en la literatura señalando que *Bacillus coagulans* tiende a presentarse como bacteria Gram negativa cuando se encuentra en la fase estacionaria (Fujiwara, 2004).

#### 4.1.2.1. Tinción de esporas.

Se observó que todas las cepas analizadas muestran una endospora esférica con localización terminal y deformante de la célula por lo que se denomina como palillo de tambor (figura 8).



**Figura 8** Endosporas de las cepas de estudio en comparación con una cepa de *Bacillus subtilis*.

La formación de esporas de *B. coagulans* queda evidenciada al mostrar la forma característica de palillo de tambor, resultado esperado al tomar como referencia el estudio realizado por Sarles & Hammer (1932), donde encontraron formación de esporas en posición subterminal (Sarles & Hammer, 1932).

#### 4.1.3. Motilidad.

Las cepas Geneden BC-9M-E, BC-15M y ATCC7050 mostraron motilidad positiva, manifestada por una opacidad del medio de crecimiento que progresó lateralmente respecto a la línea de inoculación. *Bacillus coagulans* ha sido reportado en la literatura como una bacteria flagelada y en consecuencia con motilidad (Fujiwara, 2004) esta prueba muestra un resultado positivo al observarse turbidez del medio de cultivo.

#### 4.1.4. Características bioquímicas

En la tabla 9 se observa que las dos cepas del estudio (Ganeden®) muestran resultados iguales mientras que la cepa de referencia ATCC presenta un patrón diferente en 15 de las 50 pruebas (30%). Cabe señalar que los resultados iguales en las diferentes cepas de *B. coagulans* de Ganeden® proporcionan confianza de la pureza y estabilidad del microorganismo en el producto.

Algunas de las diferencias encontradas con respecto a la cepa de referencia fueron para el metabolismo de azúcares simples como L-arabinosa, D-ribosa y D-xilosa dando positivo para las cepas de Ganeden® en contraste con la cepa de referencia.

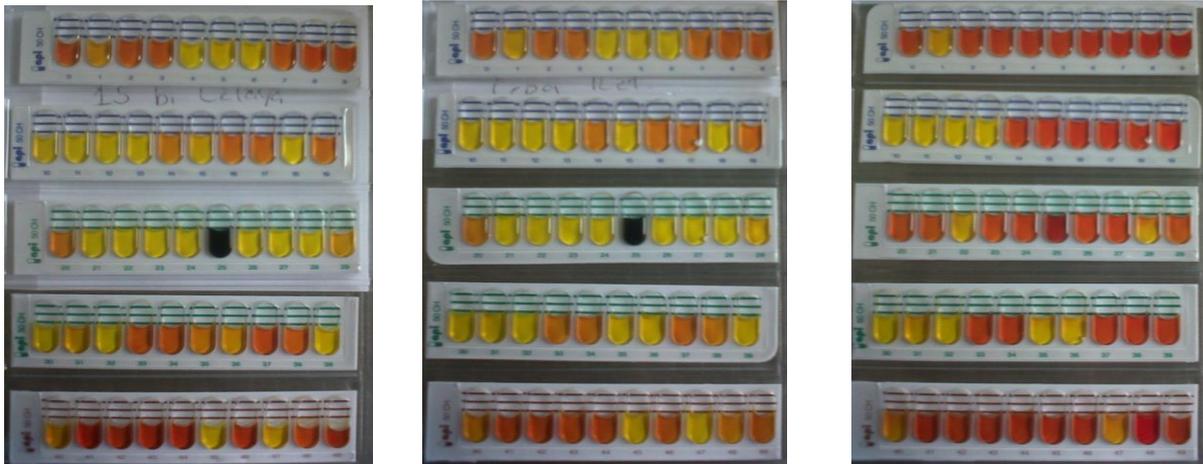
También se encontraron diferencias en la utilización de algunas pentosas como L-rhamnosa y disacáridos como D-celobiosa D-lactosa y gentiobiosa, también en azúcares alcoholes como el xilitol, D-manitol y D-arabitol. El grupo donde se encontraron más diferencias es los glucósidos (azúcares complejos) ya que la cepa ATCC dio resultados negativos en metil- $\alpha$  D-glucosido, amigdalina, arbutina, esculina y salicina.

**Tabla 9** Metabolismo de carbohidratos de las cepas de *B. coagulans*.

Test	Componente activo	Cepas de <i>B. coagulans</i>		
		BC-9-M-E	BC-15M	ATCC
GLY	Glicerol	+	+	+
ERY	Eritritol	-	-	-
DARA	D-Arabinosa	-	-	-
LARA	L-Arabinosa	+	+	-
RIB	D-Ribosa	+	+	-
DXYL	D-Xilosa	+	+	-
LXYL	L-Xilosa	-	-	-
ADO	D-Adonitol	-	-	-
MDX	B Metil-D-Xiloxido	-	-	-
GAL	D-Galactosa	+	+	+
GLU	D-Glucosa	+	+	+
FRU	D-Fructosa	+	+	+
MNE	D-Manosa	+	+	+
SBE	L-Sorbosa	-	-	-
RHA	L-Rhamnosa	+	+	-
DUL	Dulcitol	-	-	-
INO	Inositol	-	-	-
MAN	D-Manitol	+	+	-
SOR	D-Sorbitol	-	-	-
MDM	$\alpha$ Metil- D-Manosido	-	-	-
MDG	A Metil-D-Glucocido	+	+	-
NAG	N-Acetil-Glucosamina	+	+	+
AMY	Amigdalina	+	+	-
ARB	Arbutina	+	+	-
ESC	Esculina	+	+	-
SAL	Salicina	+	+	-
CEL	D-Celobiosa	+	+	-
MAL	D-Maltosa	+	+	+
LAC	D-Lactosa	+	+	-
MEL	D-Melibiosa	+	+	+
SAC	D-Sacarosa	+	+	+
TRE	D-Trehalosa	+	+	+
INU	Inulina	-	-	-
MLZ	D-Melezitosa	-	-	-
RAF	D-Rafinosa	+	+	+
AMD	Almidón	+	+	+
GLYG	Glucógeno	-	-	-
XLT	Xilitol	+	+	-
GEN	Gentiobiosa	+	+	-
TUR	D-Turanosa	+	+	+
LYX	D-Lixosa	-	-	-
TAG	D-Tagatosa	-	-	-
DFUC	D-Fucosa	-	-	-
LFUC	L-Fucosa	-	-	-
DARL	D-Arabitol	+	+	-
LARL	L-Arabitol	-	-	-
GNT	Gluconato potásico	+	+	+
2KG	2-Cetogluconato potásico	-	-	-
5KG	5-Cetogluconato potásico	-	-	-

+ Componente expresado como positivo, - Componente expresado como negativo.

Las diferencias entre los resultados de *B. coagulans* de las cepas de Geneden® y la cepa de referencia ATCC son normales dada la variabilidad entre cepas de la misma especie como ha sido reportado por Nakamura en 1988 quien encontró variaciones similares a las reportadas en el presente estudio al analizar 22 cepas utilizando la misma técnica. En la figura 9 se presentan las imágenes de las galerías de API de las cepas analizadas (Nakamura, Blumenstock, & Claus, 1988).



*B. coagulans* 9M-E

*B. coagulans* BC-15M

*B. coagulans* ATCC7050

**Figura 9** Imágenes de los patrones de fermentación de carbohidratos de las cepas de *B. coagulans* en las galerías de API® 50 CHTM

#### 4.1.5. Capacidad de germinación

La capacidad de esporulación le permite a *Bacillus coagulans* sobrevivir los extremos de calor, la acidez del estómago y los ácidos biliares tiene una mayor estabilidad y una mayor vida útil de anaquel, además de presentar una capacidad de supervivencia durante varios días en el intestino cuando se consume por vía oral y sin repetir la ingesta.

Esta capacidad de formación de esporas es relevante para su incorporación en alimentos con tratamiento térmico ya que le permitirá una mayor capacidad de sobrevivencia a los procesos a los que se someta el alimento, así como permanecer viable por largos periodos de tiempo en almacenamiento. La formación de esporas fue corroborada mediante la observación de las mismas al microscopio óptico.

Los resultados de la germinación de esporas de las diferentes cepas estudiadas se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10** Recuperación de células vegetativas de las diferentes cepas de *Bacillus coagulans* (UFC/ml de suspensión de esporas)

Cepa	Código	Células viables (UFC/mL) *
<i>B. coagulans</i> ATCC7050	ATCC	$1.8 \times 10^3$
<i>B. coagulans</i> BC-15 Millones	BC-15M	$3.0 \times 10^2$
<i>B. coagulans</i> BC-9 Millones esporulada	BC-9M-E	$8.5 \times 10^2$

\*Valores promedio de 3 repeticiones

Los resultados muestran que todas las cepas de *B. coagulans* poseen la capacidad de formar esporas bajo condiciones de estrés, así como la capacidad de germinar al colocarlas en las condiciones optimas de cultivo.

Los resultados de recuperación de las esporas de las cepas de *B. coagulans* de Geneden® son similares entre sí y con la cepa de referencia.

#### 4.1.6. Curva de crecimiento de *Bacillus coagulans*

La curva del crecimiento bacteriano resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación (Madigan, Martinko, & Parker, 2003). Ya que el efecto benéfico de *B. coagulans* como probiótico depende de su cantidad, se analizaron las curvas de crecimiento de estos microorganismos. Se decidió el uso de los parámetros densidad óptica y cuenta en placa debido a que el uso del primero tiene la desventaja de cuantificar la masa celular por lo que no distingue entre microorganismos vivos o muertos.

Dicha curva se divide en fases, a continuación se describen las más relevantes.

##### Fase de Rezago o fase Lag.

Este periodo consiste en la adaptación de las células microbianas a su nuevo ambiente, se caracteriza por un crecimiento nulo o cero ya que en este lapso de tiempo se forman las enzimas y los metabolitos intermedios hasta alcanzar las concentraciones necesarias para reiniciar el crecimiento.

#### Fase Exponencial o fase Log.

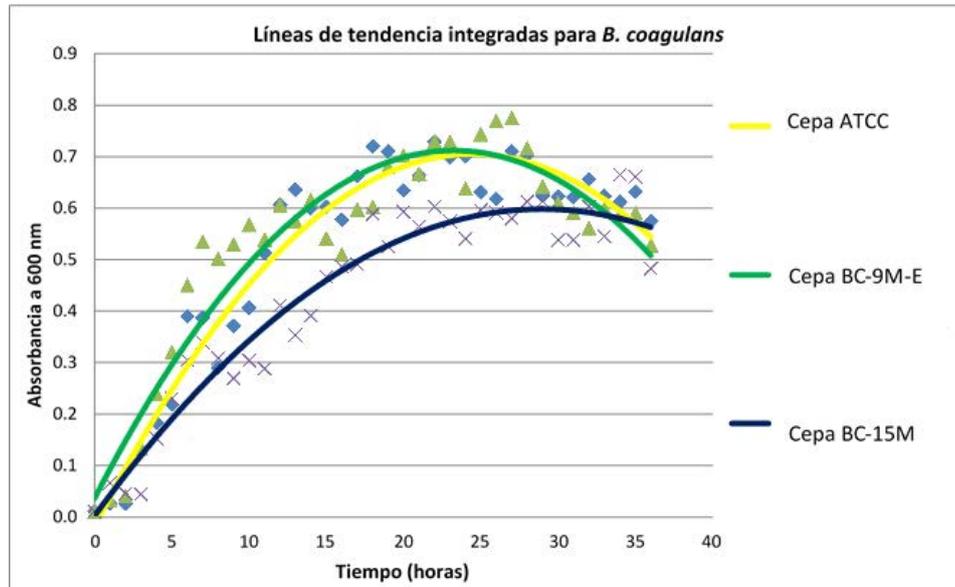
Como el nombre lo indica, en esta fase las células se encuentran en un estado de crecimiento sostenido o exponencial constante. Se sintetiza nuevas células del microorganismo a una tasa constante y la masa aumenta de manera exponencial. Lo anterior continua hasta que uno o más nutrimentos se agoten, o hasta que se acumule tal cantidad de metabolitos tóxicos que se inhiba el crecimiento.

#### Fase Estacionaria Máxima.

Ante el agotamiento de nutrimentos en el medio o la acumulación de metabolitos tóxicos el crecimiento cesa por completo después de un periodo de decrecimiento en la tasa de crecimiento, lo cual corresponde a la fase de retraso.

No obstante, por lo general en esta fase se puede observar recambio celular, lo cual se debe a que, aunque existe una pérdida lenta de células por muerte, dicha pérdida se compensa exactamente por la formación de nuevas células a través de crecimiento y división. Así, la cifra de células viables se mantiene constante, aunque en realidad en el conteo aumente poco a poco el número de células, si se cuentan también las muertas.

En la figura 10 se muestran las curvas de crecimiento utilizando el parámetro de densidad óptica expresado como la absorbancia a 600 nm con respecto al tiempo. Todas las cepas analizadas muestran las tres fases descritas anteriormente.



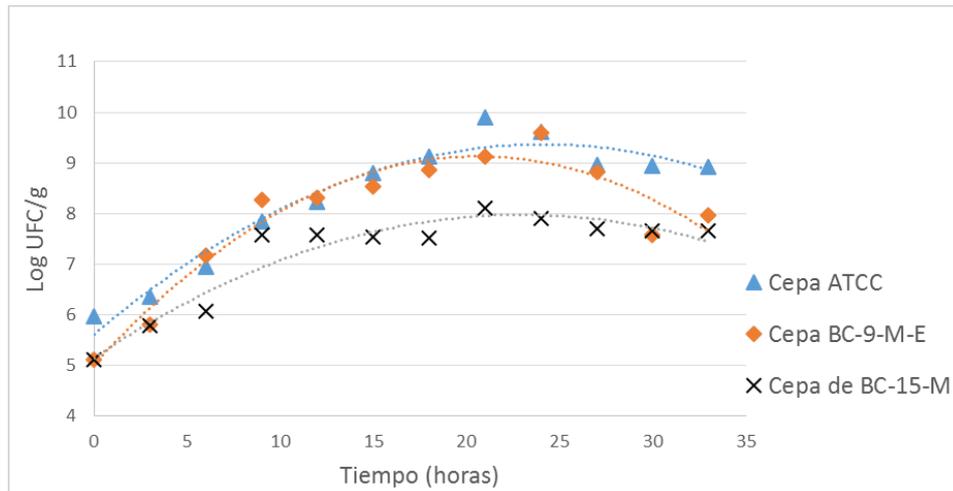
**Figura 10** Curvas de crecimiento de las cepas de *B. coagulans* utilizando el parámetro de densidad óptica.

En la figura anteriores se observan graficas sigmoideas con una fase lag de 0 a 2 horas, seguida de una fase logarítmica que alcanza su máximo valor a las 23 horas en la cepa de referencia (ATCC) y la cepa comercial que se encuentra encapsulada (Cepa BC-9M-E) mientras que la cepa comercial no encapsulada (Cepa BC-15M) el valor máximo se alcanza hasta las 28 horas a partir de la cual inicia la fase estacionaria.

Es de señalar que la cepa comercial no encapsulada presentó valores inferiores de densidad óptica afectando el tiempo de generación y la velocidad máxima de crecimiento. Son muchos los factores que pueden afectar el tiempo de generación, es probable que el proceso de encapsulación tenga algún efecto en la vitalidad de los microorganismos, o que se requiera mayor tiempo para que se liberen los microorganismos del encapsulado, quizá también el mayor contenido de UFC/g de producto haya agotado los elementos nutritivos del sistema.

Los resultados presentados aquí de los tiempos coinciden con lo reportado por Khurshed (2003) para una cepa de *B. coagulans* quien analizó diferentes cepas del genero *Bacillus* (Khurshed, 2003).

Las curvas de crecimiento utilizando el parámetro de células viables expresado como logaritmo de UFC/ml se muestran en la figura 11.



**Figura 11** Curvas de crecimiento de las cepas de *B. coagulans* utilizando el parámetro de Cuenta de células viables por mL en agar MRS

La curva de crecimiento de la cepa de referencia tuvieron una fase lag de 3 horas, seguidas de una fase logarítmica que concluyó a las 23 horas donde se alcanzó una concentración arriba de 9 Log de UFC/ml.

En cambio, las cepas comerciales BC-9M-E y BC-15M mostraron curvas de crecimiento un tanto diferentes, la cepa BC-9M-E tiene una mayor pendiente en la etapa inicial de la fase logarítmica y alcanza la concentración máxima de 9 Log UFC/ml a las 21 horas. mientras que la cepa de BC-15M alcanza una concentración máxima de 8 Log de UFC/ml. Los resultados de la cinética con recuentos bacterianos son consistentes con los valores de la densidad óptica.

#### 4.2. Pruebas de Funcionalidad.

Estas pruebas son necesarias cuando se trabaja con microorganismos probióticos ya que permiten identificar la interacción de éstos con los componentes del alimento, así como con otros microorganismos presentes en el producto como las levaduras.

## 4.2.1. Actividad antimicrobiana

Las cepas de *B. coagulans* no mostraron actividad antimicrobiana contra los patógenos *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* y *E. coli*; en cambio, si se encontró un efecto inhibitorio contra *Listeria monocytogenes*, en la tabla 11 se muestra el efecto dosis dependiente del sobrenadante del probiótico.

**Tabla 11** Actividad antimicrobiana de *B. coagulans* contra patógenos

Patógeno	Cepa								
	<i>B. coagulans</i> Ganeden® BC30-9 billones UFC/g			<i>B. coagulans</i> Ganeden® BC30-15 billones UFC/g			Cepa de referencia ATCC 7050 de <i>B. coagulans</i>		
	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl
<i>S. enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. tiphy</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	<b>2</b>	-	-	<b>5</b>	-	-	<b>5</b>
<i>B. cerus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Resultado negativo, Valores en mm de inhibición.

Se puede observar que la cepa ATCC 7050 y BC-15M mostraron mayores halos de inhibición con un diámetro de 5 milímetros con un volumen de sobrenadante de 200 µl, mientras que la cepa menos activa fue la Cepa de Ganeden® BC-9M con un diámetro de 2 mm.

Este dato es de gran relevancia, dada la importancia de que este probiótico tiene la capacidad de inhibir a un patógeno que sobrevive en refrigeración y puede ser una mortalidad de más de un 30% y que además es difícil de eliminar por otros métodos de conservación (Madigan et al., 2003). Resultados similares han sido encontrados por otros autores donde se ha reportado que *B. coagulans* produce una proteasa

sensitiva antibacterial (bacteriocina) llamada coagulina y que actúa contra patógenos, entre ellos *Listeria* (Hyronimus et al., 1998).

#### 4.2.2. Tolerancia a condiciones de acidez y sales biliares.

Estas pruebas permiten evaluar si el microorganismo es capaz de sobrevivir en el tracto gastrointestinal utilizando condiciones *in vitro*, ya que es necesario que el probiótico llegue hasta el colon para ejercer su efecto benéfico en la salud de los individuos.

Los resultados se muestran en la tabla 12 donde se observa que las cepas de Ganeden® se comportan diferente a la cepa de referencia ATCC, ya que las primeras presentan un porcentaje de recuperación a la acidez entre un 82 y 90%, en cambio la cepa ATCC presenta mayor sensibilidad (56%).

Con respecto a las pruebas de sensibilidad a sales biliares, las cepas de Ganeden® muestran porcentajes de recuperación en un rango de 79 a 81%; mientras que la cepa de referencia no muestra sensibilidad a las sales biliares. Las marcadas diferencias entre las cepas de Ganeden® y la de referencia se explican como una variación en el perfil metabólico ya evidenciado en las pruebas de caracterización bioquímica descrito anteriormente.

Cabe señalar que la literatura muestra que todas las cepas de probióticos tienen sensibilidad a estas condiciones en diferente grado, por lo que es recomendable utilizar cepas con tolerancia a estas condiciones y en cantidades de 100 millones de microorganismos por gramo o mililitro de alimento.

**Tabla 12** Supervivencia de *B. coagulans* a condiciones de acidez y sales biliares expresadas en Log UFC/mL y porcentaje de recuperación

Cepa	Cuenta inicial	Acidez	% de recuperación	Sales biliares	% de recuperación	Combinado	% de recuperación
BC-9M-E	7.3 $\pm$ 0.05	6.00 $\pm$ 0.20	82.2 <sup>a</sup>	5.92 $\pm$ 0.07	81.1 <sup>a</sup>	5.70 $\pm$ 0.13	78.0 <sup>a</sup>
BC-15M	7.15 $\pm$ 0.21	6.43 $\pm$ 0.02	90.0 <sup>a</sup>	5.67 $\pm$ 0.24	79.3 <sup>a</sup>	6.27 $\pm$ 0.37	87.3 <sup>a</sup>
ATCC 7050	5.75 $\pm$ 0.03	3.23 $\pm$ 0.4	56.2 <sup>b</sup>	7.87 $\pm$ 0.12	136.9 <sup>b</sup>	4.95 $\pm$ 0.19	86.0 <sup>a</sup>

Superíndices diferentes indican diferencia significativa en la columna

#### 4.3. Pruebas de Inocuidad.

##### 4.3.1. Prueba de resistencia a los antibióticos.

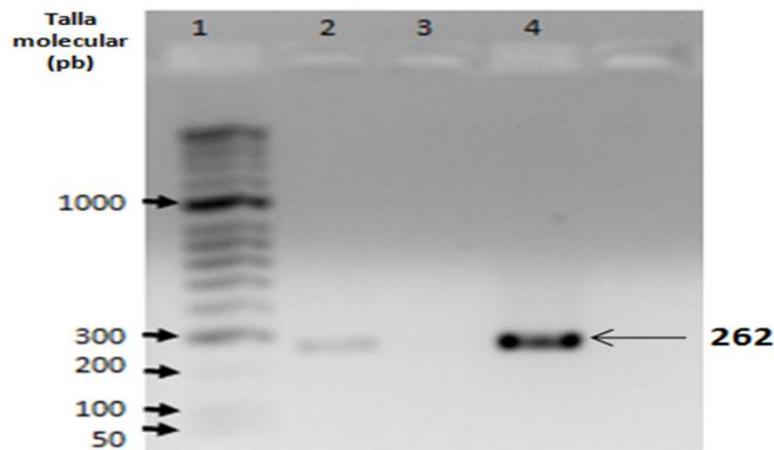
Las cepas de *B. coagulans* de Ganneden® y la cepa de referencia fueron analizadas en su capacidad de resistencia a antibióticos y se clasificaron en Resistentes (R), Intermedias (I) o Sensibles (S), a los diferentes antibióticos probados, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Todas las cepas analizadas mostraron ser sensibles a los antibióticos Amikacina, Ampicilina, Cefalotina, Ceftriaxona, Cloranfenicol, Dicloxacilina, Enoxacina, Eritromicina, Gentamicina, Netilmicina, Penicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol debido a que presentan un halo de inhibición en crecimiento mayor o igual al establecido por el kit de multidiscos combinados.

#### 4.4. Identificación molecular de *Bacillus coagulans*

Para confirmar la presencia de *B. coagulans* en las cepas de Ganneden® se utilizó la técnica de PCR de punto final.

##### 4.4.1. Identificación molecular de una cepa de referencia de *Bacillus coagulans*.

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de PCR para la identificación molecular de la cepa de referencia ATCC® 7050™ de *B. coagulans*, se muestra el producto amplificado de 262 pb.

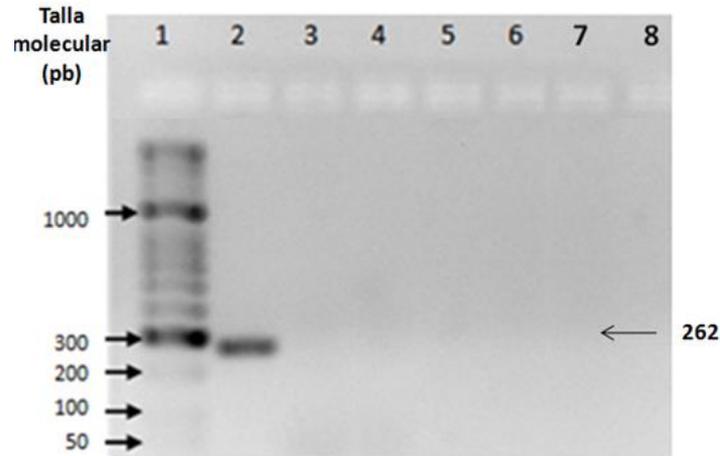


**Figura 12** Electroforesis en gel de agarosa al 3.5% visualizados con Br. Et. Carril 1: Hiperleader II, Carril 2: producto amplificado de 262pb de la cepa de referencia ATCC® 7050 TM de *B. coagulans*, Carril 3: Control negativo, Carril 4: Pro. ampli c. de *B.coagulans*

Se puede afirmar que la cepa de referencia ATCC 7050 corresponde como *B. coagulans* al mostrar un producto amplificado de 262 pb que codifica para un fragmento del RNA 16S de *B. coagulans*.

#### 4.5. Especificidad respecto a otros probióticos.

En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de PCR utilizando los oligonucleotidos específicos para amplificar el segmento del gen del ARNr 16S de *B. coagulans*, con el objetivo de comprobar su especificidad aplicados a otra especie de bacterias (*L. plantarum*, *Lactococcus lactis* sbsp. *lactis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* y *longum*).

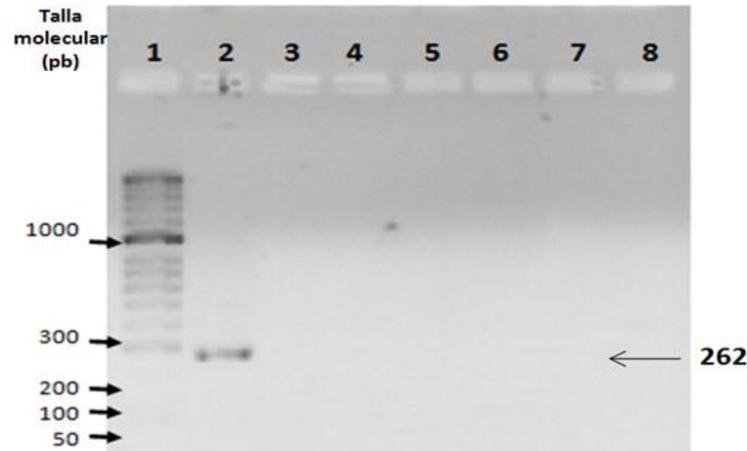


**Figura 13** Electroforesis en gel de agarosa al 3% visualizado con Br. Et. C.1: Hyperleader II, C.2: Producto amplificado de *B. coagulans* ATCC® 7050 TM de 262pb como control positivo, C.3: *Lactobacillus plantarum*, C.4: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, C.5: *Bifi.adolescentis*, C.6 *Lact. Rhamnosus*, C.7. *Bifi. Longum*, C.8. Control negativo

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que los oligonucleotidos utilizados para amplificar el segmento del gen del ARNr 16S de *B. coagulans*, son específicos ya que no amplifican al probarlos con el DNA de otras especies de probióticos.

#### 4.6. Especificidad respecto a patógenos.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de PCR utilizando los oligonucleotidos específicos para amplificar el segmento del gen del ARNr 16S de *B. coagulans*, con el objetivo de comprobar su especificidad respecto a otros patógenos.

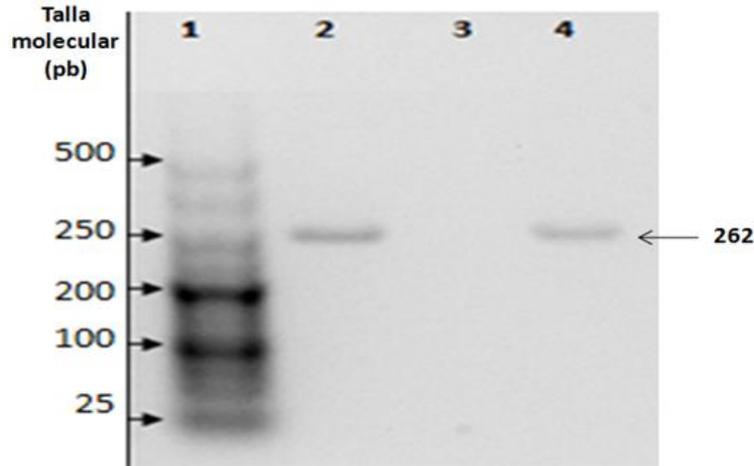


**Figura 14** Electroforesis en gel de agarosa al 3% visualizado con *Br. Et. C.1: Hyperleader II* (BIOLINE) de 2000 pb, C.2: Producto amplificado de *B. coagulans* ATCC® 7050 TM de 262pb como control positivo, C.3: *Salmonella enteritidis* var. *typhimurium* (ATCC 13311), C.4 *Bacillus cerus* (ATCC13061), C.5 *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), C.6. *Listeria monocytogenes* (ATCC7644), C.7. *Escherichia coli* (ATCC4350) y C.8. Control negativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que los oligonucleotidos utilizados para amplificar el segmento del gen del ARNr 16S de *B. coagulans*, son específicos una vez que han sido aplicados a organismos patógenos.

#### 4.7. Identificación molecular de cepas Ganeden. BC 9M-E y BC-15M

En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de PCR utilizando los oligonucleotidos específicos para amplificar el segmento del gen del ARNr 16S de *B. coagulans*. En el carril 1 se puede observar el marcador de talla molecular, y en los carriles subsecuentes se presentan los productos amplificados que migran entre los 250 y 275 pb ya que corresponden al producto amplificado de 262 pb.



**Figura 15** Electroforesis en gel de Agarosa al 3.5% visualizados con Br. Et. Carril 1: Hiperleader V, Carril 2: Producto amplificado de *B. coagulans* (BC-15M), Carril 3: Control negativo, Carril 4: Producto amplificado de *B. coagulans* (BC-9M-E).

Los productos amplificados corresponden al segmento génico del ARNr 16S del *B. coagulans*, y con su visualización se logró identificar por método molecular al microorganismo *B. coagulans* en las muestras analizadas de Geneden®.

#### 4.8. Supervivencia del probiótico durante el proceso de elaboración.

Los resultados se presentan por tipo de producto, analizando primeramente los ingredientes secos, la masa, y la masa fermentada (solo en barras de cereal) y finalmente producto terminado.

##### 4.8.1. Barras de cereal con relleno de fruta.

##### 4.8.1.1. Ingredientes secos.

El promedio de microorganismos en los diferentes tiempos de mezclado (10, 20 y 30 min) no fue significativamente diferente entre los lotes (L1 F= 2.462 P=0.094; L2 F=0.082 P=0.921 y L3 F=2.232 P=0.123). El mínimo valor encontrado expresado en log de UFC/g fue 6.33 en el lote 3 a los 20 minutos y el máximo fue 7.21 en el lote 2 a los 20 min, aunque los valores fueron más homogéneos a mayor tiempo de mezclado. Cabe señalar, que para el lote 1 se utilizó una mezcladora tipo artesa mientras que los demás se mezclaron en una tipo listón. Tabla 13.

**Tabla 13** Contenido de microorganismos totales (Log UFC/g) en ingredientes secos de barra de cereal con relleno de fruta.

Lote	Tiempo de mezclado			
	10	20	30	Control
1*	6.88 ± 0.43 <sup>a</sup>	7.05 ± 0.40 <sup>a</sup>	7.15 ± 0.32	2.50 ± 0.18 <sup>a</sup>
2**	7.18 ± 0.36 <sup>a</sup>	7.21 ± 0.33 <sup>a</sup>	7.15 ± 0.31	2.72 ± 0.20 <sup>a</sup>
3**	6.36 ± 0.52 <sup>b</sup>	6.33 ± 0.68 <sup>b</sup>	6.75 ± 0.40	2.14 ± 0.12 <sup>a</sup>
Total ***	6.82 ± 0.53	6.90 ± 0.59	7.04 ± 0.38	2.71 ± 0.17

\*N= 20, \*\*N= 12, \*\*\*N=44 Superíndices diferentes indican diferencia significativa en la columna

No se encontraron diferencias significativas entre las medias del número de microorganismos al agrupar en los tres tiempos para cada lote, al analizar cada tiempo de mezclado si se observan diferencias significativas entre los lotes analizadas marcadas en la tabla 13 con subíndices. Lo que indica que el mezclado es un punto crítico para la distribución de los microorganismos incorporados.

Es importante destacar el bajo contenido de microorganismos que se encontraron en el grupo control con valores entre 2.14 y 2.72 LogUFC/g sin presentar diferencia significativa entre los lotes.

#### 4.8.1.2. Masa y masa fermentada.

En las muestras obtenidas en estas etapas se encontraron valores superiores de microorganismos, 6.36 log de UFC/g en la masa y 7.69 log de UFC/g en la masa fermentada, con respecto a los ingredientes secos. No se encontró diferencia significativa entre los tres lotes analizados Tabla 14.

**Tabla 14** Contenido de microorganismos totales (Log UFC/g) en masa, masa fermentada y producto terminado (barra de cereal con relleno de fruta).

Lote	Masa	Control	Masa fermentada	Control	Producto terminado	Control
1*	6.44 ± 0.37	3.01 ± 0.15 <sup>a</sup>	7.49 ± 0.37	3.40 ± 0.19 <sup>a</sup>	6.21 ± 0.58 <sup>a</sup>	1.91 ± 0.12 <sup>a</sup>
2*	6.15 ± 0.22	2.90 ± 0.16 <sup>a</sup>	7.80 ± 0.40	3.24 ± 0.17 <sup>a</sup>	5.53 ± 0.43 <sup>b</sup>	1.52 ± 0.14 <sup>a</sup>
3*	6.50 ± 0.16	3.12 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.78 ± 0.83	3.31 ± 0.17 <sup>a</sup>	6.06 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.09 <sup>a</sup>
Total**	6.36 ± 0.30	3.04 ± 0.14 <sup>a</sup>	7.69 ± 0.57	3.32 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.53	1.47 ± 0.11 <sup>a</sup>

\*N=36, \*\*N=108 Superíndices diferentes indican diferencia significativa en la columna

El grupo control presentó incremento de 0.3 y 0.6 ciclos logarítmicos en la masa y la masa fermentada respectivamente con respecto a los ingredientes secos. Los valores en los controles son muy bajos por lo que se podría considerar que tienen poco impacto en las cuentas de los productos con incorporación de *B. coagulans*.

#### 4.8.1.3. Producto terminado

El contenido de microorganismos en el producto terminado fue inferior aproximadamente en un ciclo logarítmico del inicial contabilizado en los ingredientes secos (6.92 a 5.93 log de UFC/g). Es normal esperar una disminución del contenido de microorganismos como resultado del proceso térmico en el producto. Resultados superiores de destrucción se observan en microorganismos que no poseen la capacidad de esporular.

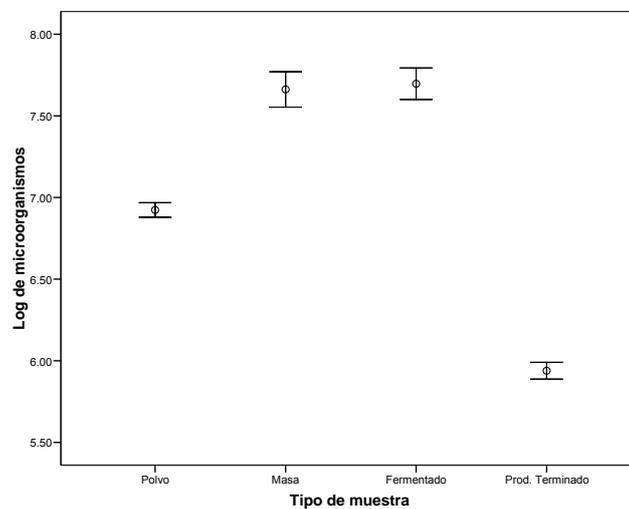
Al analizar el contenido promedio de microorganismos entre los lotes, se encontró diferencia significativa ( $F=22.41$   $P=0.000$ ). El lote 2 mostró valores inferiores ( $5.53 \pm 0.07$ ) a los descritos en el lote 1 y 3 ( $6.21 \pm 0.09$  y  $6.06 \pm 0.04$ ) respectivamente. El producto terminado fue muestreado al concluir el horneado, se tomaron 3 muestras diferentes (inicio, medio y fin) de la banda de enfriamiento.

Cuando se analizó el contenido de microorganismos en el producto en diferentes tiempos (inicio, medio y final de cada lote), no se encontró diferencia significativa ( $F=1.28$   $P=0.280$ ); esto indica un buen control de este proceso con respecto al tiempo.

Así mismo, se tomaron muestras a lo ancho de la banda para asegurar, que el calor fuera homogéneo y el efecto sobre los microorganismos fuera similar. Las muestras se denominaron norte, centro y sur. Al determinar el contenido de microorganismos según el punto de muestreo en la banda de horneado (norte, centro y sur) no se encontró diferencia significativa ( $F=1.42$ .  $P=0.244$ ).

Los valores del contenido de microorganismos en el grupo control se redujeron con el tratamiento térmico en una mayor proporción que en los lotes que contenían probióticos. Se observaron reducciones de 1.57 y 1.85 ciclos logarítmicos con respecto a la masa y a la masa fermentada respectivamente. La destrucción en mayor escala nos sugiere que la mayoría de microorganismos que se encontraban en el grupo control no poseen la capacidad de esporular.

Los resultados de los promedios en cada etapa del proceso se muestran en la Figura 16



**Figura 16** Contenido de microorganismos probióticos en las etapas del proceso de Barras de cereal con relleno de fruta.

En la figura 16 se observa con claridad que los microorganismos aumentaron su número cuando se elaboró la masa, las condiciones de humedad son determinantes en este incremento. También se observa la reducción que se produce por el tratamiento térmico.

#### 4.8.2. Galleta de avena con pasas

##### 4.8.2.1. Ingredientes secos

El promedio de microorganismos en los diferentes tiempos de mezclado (10, 20 y 30 min) fue diferente entre los lotes (L1 F=24.10 P=0.000; L2 F=7.56 P=0.002; L3 F=7.72 P=0.002).

El mínimo valor encontrado fue 6.37 log de UFC/g (L3, a 10 minutos) y el máximo fue 7.00 log de UFC/g (L1, a 10 minutos) aunque los valores fueron más homogéneos a mayor tiempo de mezclado en forma importante. Tabla 15.

Los resultados del grupo control al igual que en el producto anterior (barras de cereal con relleno de fruta) son bajos.

**Tabla 15** Contenido de microorganismos totales (Log UFC/g) en ingredientes secos de

Lote	Tiempo de mezclado			Control
	10	20	30	
1*	7.00 ± 0.30 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.17	6.38 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.22 ± 0.19
2*	6.38 ± 0.27 <sup>b</sup>	6.71 ± 0.25	6.64 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.05 ± 0,27
3*	6.37 ± 0.11 <sup>b</sup>	6.63 ± 0.25	6.62 ± 0.13 <sup>b</sup>	2.16 ± 0.15
Total **	6.58 ± 0.38	6.70 ± 0.23	6.55 ± 0.16	2.14 ± 0.21

\*N=12,\*\*N=36 Superíndices diferentes indican diferencia significativa en la columna

##### 4.8.2.2. Masa

En las muestras obtenidas en esta etapa se encontraron valores promedio de microorganismos de (6.37± 0.30) ligeramente inferiores a los encontrados en los

ingredientes secos ( $6.61 \pm 0.26$ ). Se encontró diferencia significativa entre los tres lotes analizados existiendo diferencia en el lote 2 ( $F=5.87$   $P=0.007$ ). Tabla 16

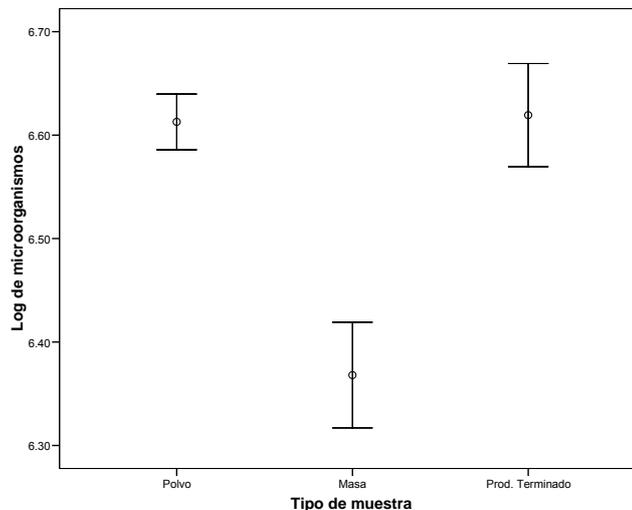
**Tabla 16** Contenido de microorganismos totales (Log UFC/g) en masa y producto terminado en galleta de avena.

Lote	Masa	Control	Producto terminado	Control
1*	$6.44 \pm 0.37^a$	$2.54 \pm 0.25$	$6.09 \pm 0.48^a$	$1.43 \pm 0.22^a$
2*	$6.15 \pm 0.23^b$	$2.18 \pm 0.19$	$6.79 \pm 0.30^b$	$1.17 \pm 0.25^a$
3*	$6.51 \pm 0.17^a$	$2.35 \pm 0.42$	$6.96 \pm 0.23^b$	$1.38 \pm 0.33^a$
Total**	$6.37 \pm 0.30$	$2.47 \pm 0.55$	$6.61 \pm 0.51$	$1.24 \pm 0.21^a$

\*N=12, \*\*N=36 Superíndices diferentes indican diferencia significativa en la columna

#### 4.8.2.3. Producto terminado

Se presenta una diferencia significativa ( $F=59.24$   $P=0.000$ ) entre los lotes, los valores más bajos corresponden al lote 1 mientras que los lotes 2 y 3 son similares. El contenido de microorganismos en el producto terminado ( $M=6.62$ ) se mantiene a los valores encontrados en los ingredientes secos ( $6.61 \pm 0.26$ ). Los resultados promedio y su desviación estándar se muestran en la figura 17.

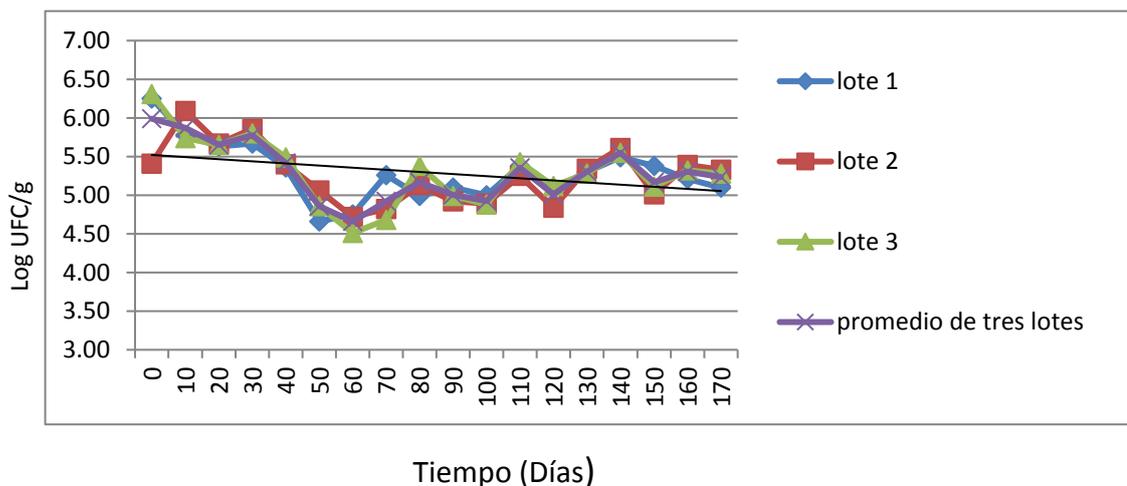


**Figura 17** Contenido de microorganismos probióticos en las etapas del proceso de Galletas de avena.

Se observa que el contenido de microorganismos totales es ligeramente menor en la masa que en los ingredientes secos, esta disminución pudiera ser causada por un efecto de dilución con el agua adicionada en el proceso de elaboración de la masa. Cabe hacer mención que la masa de las galletas de avena no lleva fermentación, y pasa inmediatamente a la etapa de horneado.

#### 4.9. Sobrevivencia de probióticos en productos almacenados por seis meses bajo condiciones normales de almacenamiento.

En la figura 18 se muestra la sobrevivencia de los microorganismos totales en barras de cereal con relleno de fruta en los 3 lotes, el promedio de los lotes y la línea de tendencia para este último.



**Figura 18** Sobrevivencia de Probióticos en Barras de cereal con relleno de fruta por seis meses.

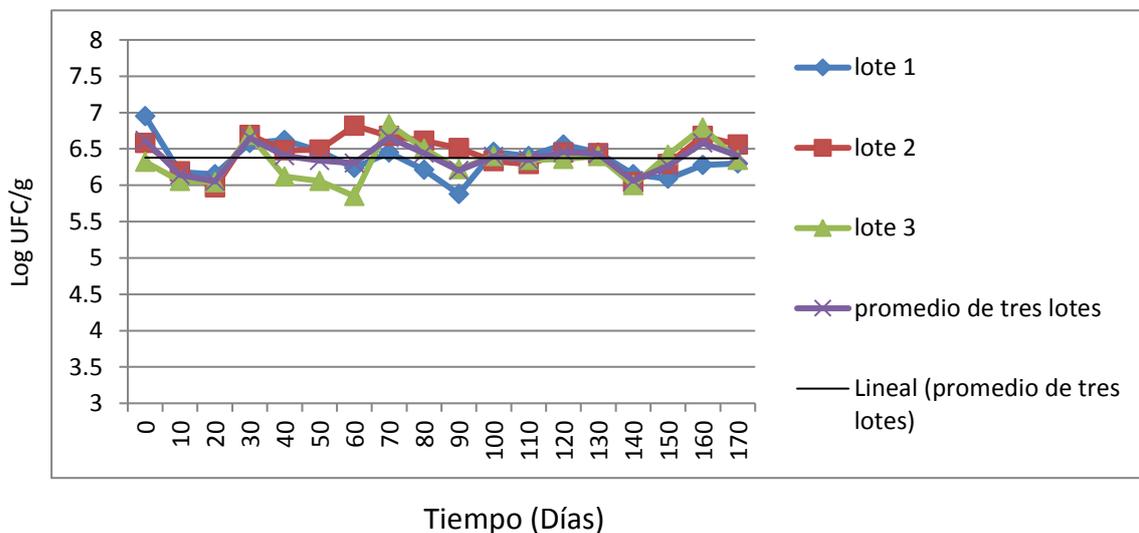
Se observó una reducción de 1.15 ciclos logarítmicos, ya que inicia con un contenido de 5.9 (Log UFC/g) y a los tres meses sólo presenta un contenido de 4.75 Log UFC/g. Posteriormente, se observó un incremento paulatino de los microorganismos totales hasta finalizar con un contenido de 5.1 Log UFC/g. Este incremento puede ser debido a las características del producto (relleno de la barra, humedad, etc.) hayan permitido el crecimiento de *Bacillus coagulans*.

Las barras de cereal con relleno de fruta recién elaboradas contenían 39 millones de *B. coagulans* viables en una porción de 2 barras (50 gramos) y a los seis meses solo contenía 6.8 millones de probióticos.

Las galletas control presentaron valores de microorganismos inferiores a 100 UFC/g en los diferentes tiempos de almacenamiento.

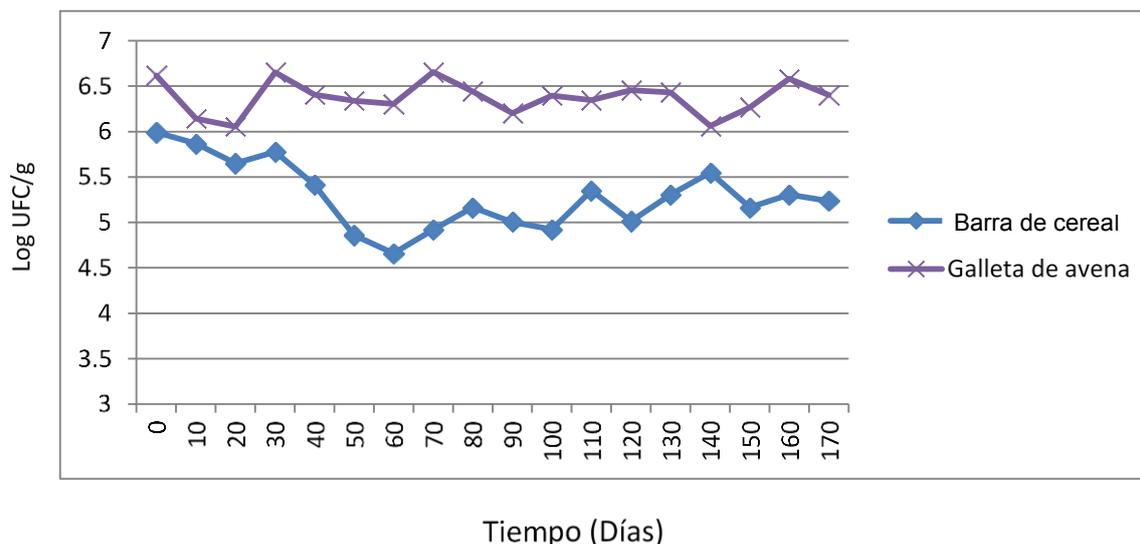
La sobrevivencia de los probióticos en galletas de avena con pasas se muestra en la figura 19; se incluyen los resultados de cada uno de los 3 lotes, el promedio de los lotes y la línea de tendencia para éste último. No se observó reducción durante los seis meses de la vida de anaquel ya que inicia y finaliza con un contenido de 6.4

Log UFC/g. Estos resultados equivalen a consumir más de 150 millones de microorganismos viables en un paquete de 60 gramos de galleta de avena.



**Figura 19** Sobrevivencia de Probióticos en Galletas de avena con pasas por seis meses.

La sobrevivencia a seis meses se presenta en la figura 20 en forma comparativa el promedio de los diferentes lotes de los productos analizados. Se observó que la galleta de avena con pasas mantiene el contenido de probióticos incorporados superior al de las barras de cereal con fruta.



**Figura 20** Comparativo de sobrevivencia de probióticos en los diferentes productos por 6 meses

#### 4.10. Comparación de sobrevivencia de probióticos a seis meses y en condiciones de almacenamiento con abuso de temperatura.

Las pruebas de almacenamiento con abuso de temperatura son un método ampliamente utilizado para la predicción de la estabilidad en la vida útil de los productos y la calidad de los mismos. Generalmente los resultados de estas pruebas son extrapolados a los resultados de almacenamiento en condiciones de temperatura ambiente (20-25 °C).

En la tabla 17 se muestran los promedios del contenido de microorganismos totales que sobrevivió al finalizar vida de anaquel a 6 meses y de almacenamiento con abuso de temperatura.

**Tabla 17** Promedio de microorganismos que se encontró al finalizar las pruebas de sobrevivencia a seis meses de almacenamiento y en condiciones de abuso de temperatura.

Producto	Prueba (log UFC/g)		Diferencia
	6 meses	Abuso de temp.	
Barra de cereal con relleno de fruta	5.2	4.8	- 0.4
Galleta de avena con pasas	6.4	5.7	- 0.7

Se muestra que en los productos Barras de cereal con relleno de fruta y Galleta de avena, el contenido de microorganismos fue menor en almacenamiento con abuso de temperatura que, en las condiciones normales de almacenamiento, por lo que la prueba de almacenamiento con abuso de temperatura parece subestimar el contenido de probióticos por lo que es necesario tomar en cuenta a la hora de ser considerado como predictor.

La sobrevivencia de los microorganismos probióticos depende de diversos factores tales como las características específicas del género y especie, la matriz en la que se encuentre (alimento, excipiente, etc.) ya que cada producto tiene características diferentes de pH, Aw, nutrimentos disponibles, así como las condiciones ambientales de almacenamiento como temperatura, humedad, tipo de empaque, presencia de luz, etc.

El *Bacillus coagulans* incorporado a los productos derivados de cereales presento comportamientos diferentes, también se observó una diferencia en la sobrevivencia en la vida de anaquel.

## 5. Conclusiones

1. La cepa de *Bacillus coagulans* Ganeden® reúne las características morfológicas, bioquímicas y de crecimiento propias de la especie. No presenta resistencia a antibióticos y posee capacidad de formar esporas cuando se somete a tratamientos térmicos.
2. La identificación molecular comprueba que el *B. coagulans* Ganeden® corresponde a la especie de interés solicitada.
3. Es factible incorporar el probiótico *B. coagulans* Ganeden® en las líneas de producción de productos derivados de cereales.
4. La estrategia de incorporar el *B. coagulans* Ganeden® en los ingredientes secos fue efectiva sin encontrar diferencia en los tiempos de mezclado.
5. El microorganismo adicionado presenta comportamientos diferentes en las matrices evaluadas. En la barra de cereal con fruta se observa un incremento en el contenido de microorganismos en la masa y la masa fermentada, para posteriormente tener una reducción de un ciclo logarítmico en el tratamiento térmico, efecto contrario se observa en la galleta de avena donde no se incrementa el número de microorganismos en la masa y tampoco se presenta una reducción en el producto terminado.
6. La sobrevivencia de los microorganismos en el estudio de vida de anaquel (seis meses a temperatura ambiente) difiere en las matrices evaluadas, la galleta de avena presentó mejores resultados (sin disminución en el contenido de microorganismos). La barra de cereal con relleno de fruta presentó una disminución de 0.5 ciclos logarítmicos.
7. Los productos derivados de cereales pueden ser una opción para la incorporación de microorganismos probióticos cuando se utilizan microorganismos resistentes a los tratamientos térmicos.

## 6. Referencias

- Adami, A., & Cavazzoni, V. (1999). Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *Journal of basic microbiology*, 39(1), 3-10.
- AFRC, R. F. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*, 66(5), 365-378.
- Anekella, K., & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 17-24.
- Annan, N., Borza, A., & Hansen, L. T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, 41(2), 184-193.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M., & Stanton, C. Joint FAO/WHO Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada. 2002. In.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M., & Stanton, C. (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario. In.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., . . . Zuccotti, G. V. (2011). Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacological research*, 63(5), 366-376.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *science*, 307(5717), 1915-1920.
- Bader, J., Albin, A., & Stahl, U. (2012). Spore-forming bacteria and their utilisation as probiotics. *Beneficial microbes*, 3(1), 67-75.
- Barbosa, T. M., Serra, C. R., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., & Henriques, A. O. (2005). Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 968-978.
- Baron, M. (2009). A patented strain of *Bacillus coagulans* increased immune response to viral challenge. *Postgraduate medicine*, 121(2), 114-118.

- Belvis, J., Tompkins, T., Wallace, T., Casavant, L., Fortin, C., & Caron, C. (2006). Stairility of probiotics bacteria in foodstuffs.
- Bergey, D. (1993). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (t. ed. Ed.). Baltimore: MD. The Williams and Wilkens Company.
- Blast. Retrieved from <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., & Reinheimer, J. A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International dairy journal*, 14(5), 375-387.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.
- Bustos, P., & Bórquez, R. (2013). Influence of osmotic stress and encapsulating materials on the stability of autochthonous *Lactobacillus plantarum* after spray drying. *Drying Technology*, 31(1), 57-66.
- C1, I. I. o. R. C. (1985). *Fundamentals and Applications of Freeze-drying to Biological Materials, Drugs and Foodstuffs*: Institut international du froid.
- Cargill. (2009). Cargill beverage concepts will address consumer demands for health, taste and texture at IFT 2008. Retrieved from <http://www.cargill.com/news-center/news-releases/2008/NA3007612.jsp>.
- Champagne, C. P. (2009). Some technological challenges in the addition of probiotic bacteria to foods. In *Prebiotics and probiotics science and technology* (pp. 761-804): Springer.
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International journal of food microbiology*, 149(3), 185-193.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International journal of food microbiology*, 79(1), 131-141.
- Chen, M., & Mustapha, A. (2012). Survival of freeze-dried microcapsules of  $\alpha$ -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food microbiology*, 30(1), 68-73.
- Chen, M. J., Chen, K. N., & Kuo, Y. T. (2007). Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan–alginate microparticles. *Biotechnology and bioengineering*, 98(2), 411-419.

- Chou, L.-S., & Weimer, B. (1999). Isolation and Characterization of Acid-and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*1. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 23-31.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., & Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International journal of food microbiology*, 115(1), 35-42.
- da Cruz, A. G., Antunes, A. E., Sousa, A. L. O., Faria, J. A., & Saad, S. M. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 42(9), 1233-1239.
- da Cruz, A. G., Buriti, F. C. A., de Souza, C. H. B., Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 344-354.
- da Cruz, A. G., de AF Faria, J., & Van Dender, A. G. (2007). Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, 40(8), 951-956.
- De Almeida, M., da Cruz, A., Faria, J., Moura, M., de Carvalho, L., & Freitas, M. (2009). Effect of the açai pulp on the sensorial attributes of probiotic yogurts. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 4(1), 41-44.
- De Almeida, M. H., Zoellner, S. S., Da Cruz, A. G., Moura, M. R., De Carvalho, L. M., Freitas, M. C. J., & DE S SANT'ANA, A. (2008). Potentially probiotic açai yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 61(2), 178-182.
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Huet, C., Crecchio, C., Fox, P. F., & Gobbetti, M. (2004). Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1336-1346.
- de Boer Sietske, A., & Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(1), 1-4.
- Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2013). Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* during storage at room temperature at low a w. *Food Research International*, 50(1), 259-265.
- Ding, W., & Shah, N. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9).
- Ederer, G. M., & Clark, M. (1970). Motility-indole-ornithine medium. *Applied microbiology*, 20(5), 849-850.

- Endres, J., Clewell, A., Jade, K., Farber, T., Hauswirth, J., & Schauss, A. (2009). Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1231-1238.
- Epstein, I., & Grossowicz, N. (1969). Prototrophic thermophilic bacillus: isolation, properties, and kinetics of growth. *Journal of bacteriology*, 99(2), 414-417.
- Euromonitor. (2012). Pre & Probiotics across the globe. Pre- and probiotics webinar.
- Parlamento Europeo, & de la Unión Europea, C. Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, (43), 1-6.
- Food Processing. . (2009).
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45(1), 306-312.
- Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44(5), 1127-1149.
- Fujiwara, D. (2004). A novel method to produce low salinity and healthier Indian lemon (*Citrus limonum*) pickle. *Biosci Bioindust*, 62, 805–808.
- Gandhi, A. (1988). *Lactobacillus sporogenes*, an advancement in *Lactobacillus* therapy. *The Eastern Pharmacist*, 41-43.
- Gardiner, G., O'sullivan, E., Kelly, J., Auty, M., Fitzgerald, G., Collins, J., . . . Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2605-2612.
- Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G., . . . Stanton, C. (2002). A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International dairy journal*, 12(9), 749-756.
- GenBank, S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>. *One of the main sequence databases*.

- Gill, H., & Guarner, F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 80(947), 516-526.
- Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology letters*, 87(1-2), 175-188.
- Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (1999). Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4), 139-157.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 292-302.
- Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol*, 39(3), 237-238.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2012). Probiotic fermentation of plant based products: possibilities and opportunities. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(2), 183-199.
- Gupta, V., & Garg, R. (2009). Probiotics. *Indian journal of medical microbiology*, 27(3), 202.
- Harrison, V., Peat, G., & Heese, H. D. V. (1975). Fetal growth in relation to histamine concentration in urine. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 30(4), 245-246.
- Havenaar, R., & Huis, I. (1992). The lactic acid bacteria in health and disease. *The lactic acid bacteria in health and disease*.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19(2), 77-84.
- Heidebach, T., Leeb, E., Först, P., & Kulozik, U. (2010). 13 Microencapsulation of Probiotic Cells. *Colloids in biotechnology*, 152, 293.
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., & Abecassis, J. (2007). Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 327-347.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.09.008>

- Hennessy, M. (2013). What's driving growth in functional food and beverages? A convergence of nutrition, convenience and taste [online]. 2013. In.
- Hidaka, T., Horie, T., Akao, S., & Tsuno, H. (2010). Kinetic model of thermophilic L-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification. *Water Res*, *44*(8), 2554-2562.  
doi:10.1016/j.watres.2010.01.007
- Hitchins, A. D. (1968). Factors influencing the extent of germination of bacillus coagulans spore populations. *J Gen Microbiol*, *54*(2), 247-254.  
doi:10.1099/00221287-54-2-247
- Holzapfel, W. H. (2006). Introduction to prebiotics and probiotics. *Probiotics in food safety and human health*, 1-33.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), 365s-373s.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, *41*(2), 85-101.
- Hong, H. A., & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(4), 813-835.
- Hood, S., & Zoitola, E. (1988). Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science*, *53*(5), 1514-1516.
- Hun, L. (2009). *Bacillus coagulans* significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. *Postgraduate medicine*, *121*(2), 119-124.
- Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Vankerckhoven, V., Goossens, H., & Swings, J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Research in microbiology*, *157*(9), 803-810.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., & Urdaci, M. (1998). Coagulin, a bacteriocin-like-inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I. *Journal of Applied Microbiology*, *85*(1), 42-50.
- Iannitti, T., & Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical nutrition*, *29*(6), 701-725.
- Intl, L. L. F. (2006). Leatherhead Food International. The international market for functional foods. . *Functional Food Market Report*.

- Ishibashi, N., & Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 465s-470s.
- Jäger, R., Shields, K. A., Lowery, R. P., De Souza, E. O., Partl, J. M., Hollmer, C., . . . Wilson, J. M. (2016). Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 reduces exercise-induced muscle damage and increases recovery. *PeerJ*, 4, e2276.
- Jousse, F. (2008). Modeling to improve the efficiency of product and process development. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 7(1), 175-181.
- Jurenka, J. S. (2012). *Bacillus coagulans*: Monograph. *Altern Med Rev*, 17(1), 76-81.
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and cell Biology*, 78(1), 80.
- Kailasapathy, K., & Rybka, S. (1997). *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.-their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52(1), 28.
- Karimi, R., Mortazavian, A. M., & Da Cruz, A. G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science & Technology*, 91(3), 283-308.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 233-244.
- Kedia, G., Wang, R., Patel, H., & Pandiella, S. S. (2007). Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. *Process Biochemistry*, 42(1), 65-70.
- Khurshed, N. (2003). *Studies on the locally isolated strains of acillus for their possible use as bioinsecticides*. University of the Punjab, Lahore,
- Kim YM, e. a. (1985). Studies on the production of  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus coagulans*. Properties and applications of  $\beta$ -galactosidase. . *Korean J Applied Microbiol Bioeng*, 13, 355-360.
- Kimmel, M., Keller, D., Farmer, S., & Warrino, D. E. (2010). A controlled clinical trial to evaluate the effect of GanedenBC(30) on immunological markers. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 32(2), 129-132.  
doi:10.1358/mf.2010.32.2.1423881

- Korbekandi, H., Mortazavian, A., & Iravani, S. (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. *Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health*, 131-169.
- Kodali, V. P., & Sen, R. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnology journal*, 3(2), 245-251.
- Koletzko, B., Aggett, P. J., Bindels, J., Bung, P., Ferre, P., Gil, A., . . . Strobel, S. (1998). Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S5-S45.
- Kołożyn-Krajewska, D., & Dolatowski, Z. J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 47(12), 1761-1772.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological research*, 61(3), 219-225.
- Lavermicocca, P. (2006). Highlights on new food research. *Digestive and Liver Disease*, 38, S295-S299.
- Lee, K.-Y., & Heo, T.-R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), 869-873.
- Lee, Y. K., & Salminen, S. (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics*: John Wiley & Sons.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *science*, 147(3659), 747-748.
- Logan, N. (2004). Safety of aerobic endospore-forming bacteria. *Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Applications*, 93-106.
- Logan, N., & Berkeley, R. (1984). Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Microbiology*, 130(7), 1871-1882.

- Logan N.A., D. V. P. (2009). Genus *Bacillus* en Bergey's Manual Trust. *John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust*, 43.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1), 1-17.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). Brock, Biología de los microorganismos. 10 Edición. Southern Illinois University Carbondate. In: Pearson, Prentice Hall.
- Majeed, M., & Kamarei, R. (2012). *Bacillus coagulans*: Probiotic of choice. *Prebiotics/Probiotics*, 19-21.
- Majeed, M., Nagabhushanam, K., Sankaran, N., Vaidyanathan, P., Arumugam, S., & Karri, S. K. (2014). Process for the therapeutic management of diarrhea predominant irritable bowel syndrome using *Bacillus coagulans* SBC-37-01, MTCC 5856. In: Google Patents.
- Majeed, M., Nagabhushanam, K., Sankaran, N., Vaidyanathan, P., Arumugam, S., & Karri, S. K. (2017). Process for the therapeutic management of diarrhea predominant irritable bowel syndrome using *Bacillus coagulans* SBC-37-01, MTCC 5856. In: Google Patents.
- Majeed, M., & Prakash, L. (1998). Lactospore®: The Effective Probiotic. *Piscataway, NJ: NutriScience Publishers, Inc. ISBN 0-9647856-4-1*.
- Malmo, C., La Stora, A., & Mauriello, G. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate soufflé. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 795-805.
- Mandel, D. R., Eichas, K., & Holmes, J. (2010). *Bacillus coagulans*: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 1.
- Mann, G. V., & Spoerry, A. (1974). Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 27(5), 464-469.
- Mansouripour, S., Esfandiari, Z., & Nateghi, L. (2013). The effect of heat process on the survival and increased viability of probiotic by microencapsulation: a review. *Ann Biol Res*, 4(4), 83-87.
- Martinez, R. C. R., Bedani, R., & Saad, S. M. I. (2015). Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *British Journal of Nutrition*, 114(12), 1993-2015.

- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2), 173-182.
- Mättö, J., Alakomi, H.-L., Vaari, A., Virkajärvi, I., & Saarela, M. (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, 16(9), 1029-1037.
- Mazza, P. (1994). The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. *Bollettino chimico farmaceutico*, 133(1), 3-18.
- Metchnikoff, E. (1907). *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. London: Heincmann.
- Mexicana, N. O. (1994). NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. *Diario Oficial de la Federación. DV*, 11, 16.
- Minevich, J., Olson, M. A., Mannion, J. P., Boublik, J. H., McPherson, J. O., Lowery, R. P., . . . Wilson, J. M. (2015). Digestive enzymes reduce quality differences between plant and animal proteins: a double-blind crossover study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12(1), P26.
- Ministerio della Salute, C. u. o. n. e. l. d. (2013). Guideles on probiotics and prebiotics. *Int J Food Microbiol*, 149.
- Mohan, J., Arora, R., & Khalilullah, M. (1990). Preliminary observations on effect of *Lactobacillus sporogenes* on serum lipid levels in hypercholesterolemic patients. *The Indian journal of medical research*, 92, 431-432.
- Molin, G. (2001). Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 380s-385s.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., & da Cruz, A. G. (2011). Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of microbiology*, 61(3), 411-424.
- Monograph. (2002). *Lactobacillus sporogenes*. *Altern Med Rev*, 7(4), 340-342.

- Mortazavian, A., Ehsani, M., Azizi, A., Razavi, S., Mousavi, S., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J. (2008). Viability of calcium-alginate-microencapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during refrigerated storage and under simulated gastrointestinal conditions. *Australian Journal of Dairy Technology*, 63(1), 25.
- Mortazavian, A., Ehsani, M., Mousavi, S., Rezaei, K., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J. (2007). Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 123-127.
- Mortazavian, A., Khosrokhavar, R., Rastegar, H., & Mortazaei, G. (2010). Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic doogh (Iranian fermented milk drink). *Italian Journal of Food Science*, 22(1).
- Muthukumarasamy, P., & Holley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International journal of food microbiology*, 111(2), 164-169.
- Nakamura, L. K., Blumenstock, I., & Claus, D. (1988). Taxonomic Study of *Bacillus coagulans* Hammer 1915 with a Proposal for *Bacillus smithii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(1), 63-73.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(3), 548-572.
- Noorbakhsh, R., Yaghmaee, P., & Durance, T. (2013). Radiant energy under vacuum (REV) technology: A novel approach for producing probiotic enriched apple snacks. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1049-1056.
- Önneby, K., Pizzul, L., Bjerketorp, J., Mahlin, D., Håkansson, S., & Wessman, P. (2013). Effects of di- and polysaccharide formulations and storage conditions on survival of freeze-dried *Sphingobium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1399-1408.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., & Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9(1), 43-52.

- Ouwehand, A. C., Kurvinen, T., & Rissanen, P. (2004). Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an in vivo study. *International journal of food microbiology*, 95(1), 103-106.
- Panel, E. B. (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11), 3449.
- Prasad, J., McJarrow, P., & Gopal, P. (2003). Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and environmental microbiology*, 69(2), 917-925.
- Ranadheera, R., Baines, S., & Adams, M. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7.
- Rasic, J. L. (2003). *Microflora of the intestine probiotics*.
- Reid, A. A., Champagne, C., Gardner, N., Fustier, P., & Vuilleumard, J. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science*, 72(1).
- Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(9), 3763-3766.
- Riazi, S., Wirawan, R., Badmaev, V., & Chikindas, M. (2009). Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1370-1377.
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27(1), 1-11.
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1660s-1664s.
- Ross, R., Desmond, C., Fitzgerald, G., & Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1410-1417.
- Ross, R., Fitzgerald, G., Collins, K., & Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures--probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2), 71.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.

- Shah, N., & Ravla, R. (2004). Selling the cells in desserts. *Dairy industries international*, 69(1), 31-32.
- Salminen, S. (1996). Uniqueness of probiotic strains. *Newsletter-international dairy federation*, 18-18.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular Cloning 1.112–1.118. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanders, M., Morelli, L., & Tompkins, T. (2003). Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 101-110.
- Sanders, M. E. (1999). Probiotics. *Food technology*, 53(11), 67-77.
- Sarles, W., & Hammer, B. (1932). Observations on *Bacillus coagulans*. *Journal of bacteriology*, 23(4), 301.
- Schaeffer, A. B., & Fulton, M. D. (1933). A simplified method of staining endospores. *science*, 77(1990), 194-194.
- Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1255-1268.
- Spinosa, M. R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., & Oggioni, M. R. (2000). On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Research in microbiology*, 151(5), 361-368.
- Stanton, C., Coakley, M., Murphy, J. J., Fitzgerald, G. F., Devery, R., & Ross, R. P. (2002). Development of dairy-based functional foods. *Sci. Aliments*, 22, 439-447.
- Sudha, R., Chauhan, P., Dixit, K., Babu, S., & Jamil, K. (2010). Molecular typing and probiotic attributes of a new strain of *Bacillus coagulans*–Unique IS-2: a potential biotherapeutic agent. *Genetic Eng Biotechnol J*, 7, 1-20.
- Sun, W., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. *International journal of food microbiology*, 61(1), 17-25.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current issues in intestinal microbiology*, 5(1), 1-8.

- Tamime, A., Saarela, M., Sondergaard, A. K., Mistry, V., & Shah, N. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. *Probiotic dairy products*, 39-72.
- Tissier, H. (1907). *Traitement des infections intestinales par la methode de transformation de la flore bacterienne de l'intestin*. [S.l.]: [s.n.].
- Tripathi, M., & Giri, S. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.
- Tuohy, K., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney, A., & Gibson, G. (2007). Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1026-1032.
- Ventura, M., & Perozzi, G. (2011). Introduction to the special issue "Probiotic bacteria and human gut microbiota". *Genes Nutr*, 6(3), 203-204. doi:10.1007/s12263-011-0241-y
- Venturi, A., Gionchetti, P., Rizzello, F., Johansson, R., Zucconi, E., Brigidi, P., . . . Campieri, M. (1999). Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 13(8), 1103-1108.
- Wang, Y., & Gu, Q. (2010). Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Research in veterinary science*, 89(2), 163-167.
- Ward, P., & Roy, D. (2005). Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Le Lait*, 85(1-2), 23-32.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E. B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., .von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(10), 498-505.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44(4), 275-295. doi:10.1080/10408690490468489
- Yeung, P., Sanders, M., Kitts, C. L., Cano, R., & Tong, P. S. (2002). Species-specific identification of commercial probiotic strains. *Journal of Dairy Science*, 85(5), 1039-1051.

- Yk, L., & Salminen, S. (1995). The coming age of probiotics. 5. *Trends Food Sci Technol*, 6, 241-245.
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 6, 205-214.
- Zárate, G., Chaia, A. P., González, S., & Oliver, G. (2000). Viability and  $\beta$ -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1214-1221.
- Zhang, L., Huang, S., Ananingsih, V. K., Zhou, W., & Chen, X. D. (2014). A study on *Bifidobacterium lactis* Bb12 viability in bread during baking. *Journal of Food Engineering*, 122, 33-37.
- Zoellner, S., Cruz, A., Faria, J., Bolini, H., Moura, M., Carvalho, L., & Sant'ana, A. (2009). Whey beverage with acai pulp as a food carrier of probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 64(2), 177.