



## Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: [www.riit.com.mx](http://www.riit.com.mx)

### Viabilidad de bacterias ácido lácticas encapsuladas en un embutido de *Pleurotus ostreatus* Viability of encapsulated lactic acid bacteria in a *Pleurotus ostreatus* sausage

**Briones-Domínguez, E.J., Velázquez-López, A.A., Gómez-Cruz, L.A., Vela-Gutiérrez, G.**

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Funcionales. Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente 1150, Ciudad Universitaria. Col. Lajas Maciel, C.P. 29000, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.  
[gilber.vela@unicach.mx](mailto:gilber.vela@unicach.mx); [alfredo.gomez@unicach.mx](mailto:alfredo.gomez@unicach.mx); [arturo.velazquez@unicach.mx](mailto:arturo.velazquez@unicach.mx); [esme\\_bd@hotmail.com](mailto:esme_bd@hotmail.com)

**Innovación tecnológica:** las bacterias ácido lácticas (BAL) encapsuladas en un embutido.

**Área de aplicación industrial:** alimentos funcionales, alimentación saludable.

Recibido: 30 junio 2020

Aceptado: 20 octubre 2020

#### Abstract

Among functional foods, probiotics have been highlighted as beneficial to health, playing an important role in the immune, digestive and respiratory functions of individuals, as well as contributing significantly to the reduction of infectious diseases in children and adults (FAO, 2001). *Pleurotus ostreatus* mushroom contains 35% (dry base) of digestible protein,  $\beta$ -1,3-1,6 and  $\alpha$ -1,3-glucan used as prebiotics. The objective of this research was to evaluate the viability of *Lactobacillus casei* and *L. plantarum* encapsulated in a *Pleurotus ostreatus* sausage as a functional food. The strains used were reactivated, and their growth kinetics were estimated. The two strains (*L. casei* and *L. plantarum*) presented the exponential growth phase between 4 and 13 hours, the biomass was quantified from 0.338 to 1.794 and 0.308 to 2.322 g/L, respectively. They were encapsulated using malanga starch through the extrusion technique in alkaline medium, then added to the sausage. The viability of the strains was obtained by plate count (NOM-110-SSA1-1994) with MRS agar (Difco®), a growth of  $108 \times 10^6$  CFU/g in the sausage with *L. plantatum* and  $25 \times 10^6$  CFU/g for the *L. casei* in the third week of storage at  $5 \pm 1$  °C. According to the color variables (CIELab) measured during storage, the EF2 sausage with encapsulated *Lactobacillus casei* showed greater stability, and better sensory characteristics after the second week, even better than the EF4 sausage made with pork. According to the nutrient content and the presence of lactic acid bacteria ( $>1 \times 10^6$  CFU/g), higher than those established by the Mexican Official Standard,

the processed sausages can be considered as functional foods. These products represent a viable alternative for people with limited meat consumption, and with high potential for the functional food industry with the presence of prebiotics and probiotics.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pleurotus ostreatus*, lactic acid bacteria, functional food.

## Resumen

Entre los alimentos funcionales han destacado los probióticos, los cuales son benéficos para la salud, ya que desempeñan un papel importante en las funciones inmunitarias, digestivas y respiratorias de las personas, además de contribuir de forma significativa a aliviar las enfermedades infecciosas en los niños y personas adultas (FAO, 2001). La seta *Pleurotus ostreatus* contiene 35% (base seca) de proteína digerible,  $\beta$ -1,3-1,6 y  $\alpha$ -1,3-glucano utilizados como prebióticos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la viabilidad de *Lactobacillus casei* y *L. plantarum* encapsulados en almidón dentro de un embutido de *Pleurotus ostreatus* como un alimento funcional. Se reactivaron las cepas utilizadas, y se estimó su cinética de crecimiento. Las dos cepas (*L. casei* y *L. plantarum*) presentaron la fase de crecimiento exponencial entre las 4 y 13 h, la biomasa se cuantificó de 0.338 a 1.794 y 0.308 a 2.322 g/L, respectivamente. Se encapsularon utilizando almidón de malanga a través de la técnica de extrusión en medio alcalino, después se adicionaron al embutido. La viabilidad de las cepas se obtuvo por recuento en placas (NOM-110-SSA1-1994) con agar MRS (Difco®), se obtuvo un crecimiento de  $108 \times 10^6$  UFC/g en el embutido con *L. plantatum* y  $25 \times 10^6$  UFC/g para el que contiene *L. casei* en la tercera semana de almacenamiento a  $5 \pm 1$  °C. De acuerdo a las variables de color (CIELab) medidas durante el almacenamiento, el embutido formulación 2 (EF2) con *Lactobacillus casei* encapsulados presentó mayor estabilidad, y mejores características sensoriales después de la segunda semana, incluso mejores al embutido control (EF4), elaborado con carne de puerco. Según el contenido de nutrientes y la presencia de bacterias ácido lácticas ( $>1 \times 10^6$  UFC/g), superiores a las establecidas por la Norma Oficial Mexicana, los embutidos elaborados pueden ser considerados como alimentos funcionales. Estos productos representan una alternativa viable para personas con limitaciones de consumo de carne, y con altos potenciales para la industria de alimentos funcionales con presencia de prebióticos y probióticos.

**Palabras clave:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pleurotus ostreatus*, bacterias ácido lácticas, alimento funcional.

## 1. Introducción

El problema de escasas de alimento y la búsqueda de nuevas fuentes de nutrientes probablemente son retos que enfrentarán las futuras generaciones frente al crecimiento de la población. Una alternativa a estos problemas de alimentación, es el uso de alimentos funcionales (1). En la década de los treinta, el Dr. Minoru Shirota inicia en Japón la investigación y desarrollo de una leche

fermentada, con fines de prevención de enfermedades gastrointestinales y desde entonces la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció programas de enriquecimiento de alimentos para luchar contra la desnutrición en zonas desfavorecidas (2). Entre los alimentos funcionales han destacado los probióticos, los cuales son benéficos para la salud, debido a que desempeñan papeles importantes en las

funciones inmunitarias, digestiva y respiratoria de las personas, además pueden contribuir de forma significativa a aliviar enfermedades infecciosas en los niños y personas adultas (3). Las bacterias ácido lácticas (BAL), entre las cuales se encuentra la especie *Lactobacillus*, han sido utilizadas para la conservación de alimentos por fermentación, presentan doble función: actuando como agentes para el proceso fermentativo de alimentos, reduciendo el pH e impidiendo el crecimiento de bacterias patógenas, y confiriendo algunos beneficios para la salud, como el incremento de la peristalsis intestinal y aumentando la absorción de nutrientes. En general, los beneficios de las BAL dependen de la presencia de cepas viables, las cuáles, al ser consumidas en cantidades adecuadas ( $>1 \times 10^6$  UFC/g o ml) confieren beneficios para la salud del huésped. Las BAL se administran principalmente a través de leches fermentadas o yogures (4), además de ser utilizados en la industria láctea (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, y *L. gasseri*) (5), son agregados en la industria cárnica para la fermentación de embutidos (4), estos últimos son un medio que permiten el crecimiento de los microorganismos (5). En ocasiones para aumentar la viabilidad de las BAL se utilizan diversas metodologías, una de ellas es la encapsulación, existen varios tipos de materiales de revestimiento para la encapsulación de probióticos, se incluyen principalmente polisacáridos, oligosacáridos, lípidos y proteínas, dentro de los polisacáridos más utilizados se encuentra el alginato de sodio (6); compatible con casi todos los métodos de encapsulación, el alginato es un heteropolisacárido lineal compuesto por ácido D-manurónico y L-gulurónico. La encapsulación por extrusión es la técnica más estudiada y antigua para producir capsulas de polisacáridos como el alginato, debido a su bajo costo y simplicidad (7). Consiste en preparar una mezcla de

hidrocoloide y los microorganismos, la mezcla se coloca en una jeringa estéril, se dejar caer en la solución de iones divalentes por gotas hasta que gelifican. México es uno de los países más consumidores de productos cárnicos, ocupando el quinto lugar a nivel mundial, durante el 2019 el consumo de carne de bovino fue de 1.9 millones de toneladas,; mientras que el consumo de carne de res per cápita fue de 8.8 kg anuales (8). La carne de bovino es una gran fuente de proteínas, hierro, zinc, vitamina B y de otros nutrientes que conforman una dieta semisaludable; sin embargo, existe la preocupación por su alto contenido graso; por ejemplo, la carne molida regular contiene 25 % de grasa, su ingesta se ha asociado con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, aumento del colesterol total, gota y ciertos tipos de cáncer (9). En el mercado existen opciones de cortes de carne bovina de alta calidad con bajo contenido graso, pero debido a su precio actual, relativamente alto en comparación con otros cárnicos, no son accesibles para personas con bajos recursos económicos (8). No obstante, los productos derivados cárnicos son los más consumidos en México; por ejemplo, la producción de embutidos fue 862 mil toneladas con un valor de la producción de 28 mil millones de pesos (10).

El cultivo y producción de hongos comestibles emerge como una alternativa de alto valor biológico, económico y ecológico. La seta *Pleurotus ostreatus* es considerada como complemento alimenticio de alto valor nutricional, debido a que presenta el doble del contenido proteico que los vegetales, posee elevado contenido de vitaminas (tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), cobalamina (B12), entre otras y actúa como buena fuente de calcio y fósforo (11). Se ha utilizado para la elaboración de salchichas como alternativa de carne, por sus ventajas naturales que presenta: buen contenido de proteína, poseen pared quitinosa que puede actuar como una fuente de fibra dietética, alto

contenido de vitamina B y bajo contenido de grasa (12); *P. ostreatus* representa un alimento con 350 calorías comparado con la carne roja, que solo contiene 150 calorías o el pescado que contiene 101, su contenido de proteína oscila entre 17 y 42 % en peso seco, fibra entre 24 y 32 %, y minerales entre el 4 y 10 % (13). También tiene la capacidad de hinchamiento, de absorber agua, probablemente por su estructura esponjosa (14). En comparación con otros productos, esta capacidad de hinchamiento es similar a la encontrada en fibra de cereales, además contiene  $\beta$ -glucano, se ha demostrado que tiene efectos positivos en la reducción del colesterol, propiedades inmunológicas y antitumorales (15). Estas características son de gran interés tecnológico (16) ya que la presencia de  $\beta$ -glucano en hongos y levaduras son utilizadas como enriquecimiento de panes sin gluten (15) y la adición en yogures para la viabilidad de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* (Bb12) (17). La malanga es una planta herbácea suculenta, con una altura de 1 a 3 m, sin tallo aéreo, también conocida como Ocumo chino, Taro o Dashen, es considerada una de las especies de raíces y tubérculos con gran potencial en las zonas tropicales, mediante el uso de tecnologías sencillas, es posible aprovechar su tallo subterráneo (cormos) para la obtención de almidón que sirve para la elaboración de diferentes productos alimenticios. La malanga contiene alrededor del 80% de almidón, la cual podría reemplazar a otras materias primas convencionales como el maíz, yuca y papa, el uso de almidones de especies nativas aumentara el margen de beneficios de quienes lo producen y lo transforman, para su uso industrial (18). El objetivo de este trabajo fue evaluar la encapsulación con almidón de malanga de *L. casei* y *plantarum* incorporados a un embutido de *P. ostreatus*, mediante la viabilidad de las bacterias y la vida de anaquel del producto.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Material biológico

Cormos de malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) provenientes del municipio de San Fernando, Chiapas, México, utilizados para la extracción del almidón.

Suero de leche dulce (pH 6.5) obtenido a partir de queso fresco en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Funcionales (LIDPF) de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Las cepas utilizadas fueron *L. casei* y *L. plantarum*, aisladas por Velázquez *et al.* (30) y conservadas en el LIDPF; además de la seta de *P. ostreatus*, obtenida en el mercado local de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Otros insumos utilizados: mezcla de chiles secos, especias, vinagre de manzana, grasa vegetal, chile pimienta (*Capsicum anuum*), tripa artificial.

### 2.2. Métodos

#### 2.1 Extracción de almidon

Los cormos de malanga (*X. sagittifolium*) se lavaron con una solución desinfectante (100 ppm); se redujo su tamaño en rodajas de 0.5 cm espesor, posteriormente se adicionaron a una solución de ácido cítrico 0.1 M para evitar el oscurecimiento, después se trituró en una licuadora (Oster®). El triturado se filtró con un lienzo y el residuo sólido se lavó varias veces con agua potable para retirar todo el almidón. La solución se dejó reposar durante 24 horas, el almidón sedimentado se separó por decantación, la pasta resultante se secó a 60 °C en un horno de convección (TERLAB®) durante tres horas, el almidón se almacenó en bolsas de plástico selladas al vacío hasta su uso.

## 2.2. Reactivación de la cepa

Las cepas (*L. plantarum* y *L. casei*) se reactivaron en tubos con medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (BD Difco®). Para tal efecto se inocularon 100 µL de cultivo de cada cepa en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo MRS cada uno, se incubaron durante ocho h (tiempo en que se alcanza la fase exponencial) a 37 °C.

## 2.3. Cinética de crecimiento

Las cepas se inocularon en tubos con tapón de rosca con 5 mL de suero de leche dulce pasteurizado (7%), se incubaron a  $37 \pm 1$  °C (VELAB®); se tomó 1 mL de cultivo microbiano de cada tubo de ensayo cada dos h durante 24 h, se monitoreó la absorbancia a 600 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Velab®, VE-5100UV), cada lectura se realizó por triplicado.

## 2.4. Obtención del pellet celular

Durante la fase exponencial (8 h de incubación), se tomaron 10 mL caldo de cultivo y se centrifugó a 7000 rpm, a 4 °C por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con una solución de NaCl al 85%; subsecuentemente se suspendió en una solución salina de peptona (PS) (19).

## 2.5. Preparación de la matriz encapsulante

Se preparó la matriz encapsulante con almidón de malanga (extraído en el LIDPF) y alginato de sodio (Golden Bell®) en una relación 4:1 (p/p), disueltos en 10 ml suero de leche dulce (previamente pasteurizado) hasta conseguir una mezcla homogénea. En una jeringa se colocó la matriz encapsulante y las cepas (pellet celular,  $1 \times 10^8$  UFC/mL), posteriormente por goteo o extrusión se adicionó a una solución de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M) a 7 °C. Una vez formadas las cápsulas se dejaron endurecer en la solución de Ca durante 1 h; transcurrido el tiempo se filtró en condiciones de esterilidad. Las perlas se conservaron en cajas petri estériles hasta su uso o bien en una solución tampón de fosfatos (PBS) a 4 °C.

La viabilidad de las cepas encapsuladas se midió a través de la técnica de vaciado en placa. A cada embutido se le analizó tres áreas (laterales y centro); las muestras se colocaron en caldo MRS y se incubaron por 24 horas; posteriormente, 1 mL del caldo se colocó en una caja Petri con agar MRS, estas se incubaron a  $37 \pm 1$  °C por 48 horas, pasado el tiempo se midieron las UFC/mL.

## 2.6. Elaboración del embutido

Para la elaboración del embutido se realizó una mezcla del hongo *Pleurotus ostreatus* (limpio y desinfectado) con el resto de los ingredientes. Para este estudio se elaboraron 4 muestras de embutidos como se describe en la tabla 1.

**Tabla 1.** Cantidad (%) de los ingredientes utilizados en la elaboración de los embutidos.

Tratamiento	Pleorutus	Sal	Mezcla de chiles	Agua de chiles	Especias	Vinagre	Lactobacillus
EF1	54.87	2.27	5.84	30.78	1.24	5	<i>L. casei</i> (sin encapsular)
EF2	54.87	2.27	5.84	30.78	1.24	5	<i>L. casei</i> (encapsulado)
EF3	54.87	2.27	5.84	30.78	1.24	5	<i>L. plantarum</i> (encapsulado)
EF4	54.87*	2.27	5.84	30.78	1.24	5	-

EF1: Formulación del embutido 1 con tripa natural. EF2: Formulación del embutido 2 con tripa artificial. EF3: Formulación del embutido 3 con tripa artificial. EF4: Formulación del embutido control.

\*Sustituido por carne de puerco.

Se mezclaron de manera envolvente los encapsulados probióticos, posteriormente la

mezcla fue introducida de manera artesanal en tripa artificial (figura 1).



Figura 1. Embutido elaborado con *Pleorotus ostreatus*.

## 2.7. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas (BAL) en el embutido

El recuento de BAL se realizó durante las tres semanas de almacenamiento a 8 °C. Para medir la viabilidad de las BAL se pesaron 10 g de cada embutido, se agregaron 90 mL de solución de fosfatos (solución stock o madre) estéril, se homogenizó. Se tomó 1 mL y se adicionó a un tubo con 9 mL de solución stock estéril. Se realizaron diluciones seriadas

$10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Se tomó 1 ml de cada dilución y se inoculó en cajas petri con agar MRS a través de la técnica de vaciado en placa, se incubaron a  $37 \pm 1$  °C durante 12 h, posteriormente se realizó el conteo de colonias (Numak®), para obtener las unidades formadoras de colonia (UFC/g) de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994.

## 2.8. Análisis químico proximal y

## microbiológico

Se determinó la humedad, cenizas, grasa cruda, proteína cruda y fibra cruda del embutido, mediante análisis químico proximal, utilizando los métodos publicados por la AOAC (20).

Se muestrearon individualmente los tres tratamientos (EF1, EF2, y EF3), así como el control (EF4), para determinar la presencia de coliformes totales y fecales, tomando como referencia la NOM-093-SSA1-1994 (21) para asegurar la higiene y la calidad del producto.

### 2.9. Determinación de color

El color fue determinado en el exterior de los embutidos durante tres semanas de almacenamiento a una temperatura de 8 °C, se utilizó un espectrofotocolorímetro de reflectancia (560 nm) (KONICA MINOLTA, CM-600d), se midieron los ejes L\*(luminosidad), a\* (índice de rojos y verdes) y b\* (índice de amarillos y azules) con la finalidad de observar algún cambio significativo en el color de los cuatro embutidos formulados durante su almacenamiento.

### 3.0. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey considerando una  $p < 0.05$  utilizando el programa Minitab® versión 17.0 para Windows 10.

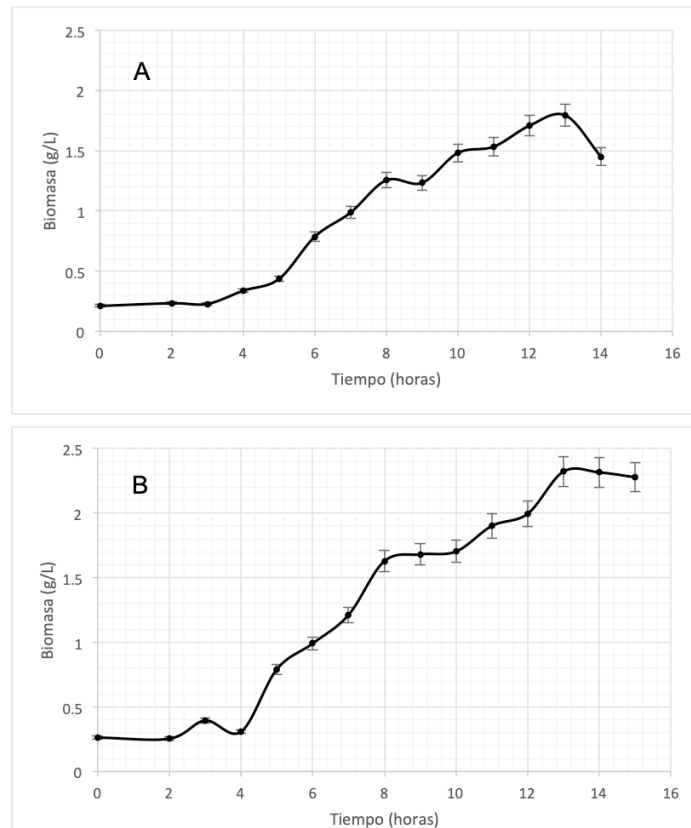
## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Cinética de crecimiento

En la figura 2, se muestra la curva de crecimiento de las cepas de *L. casei* y *L.*

*plantarum*. Respecto a *L. casei* (figura 2A) se observa que la fase exponencial inició alrededor de la 4 h (0.338 g/L) y finalizó a las 13 h (1.794 g/L); estos resultados son similares con los encontrados por Jurado *et al.* (22), quienes utilizaron medio MRS, alcanzando el máximo crecimiento entre 6 y 7 h (biomasa desarrollada), generándose además cambios en el pH (5 y 6) debido al ácido láctico. En la figura 2B se muestra el inicio de la fase de crecimiento de *L. plantarum* alrededor de las 4 h (0.308 g/L) y finaliza a la 13 h (2.322 g/L). Jurado *et al.*, (22), mencionan que *L. plantarum* es una especie importante en la fermentación de productos vegetales. Flores (23) menciona que *L. plantarum* obtiene una baja tasa de crecimiento celular en presencia de sustratos adecuados para la producción de algunos exopolisacáridos, mediante una ruta metabólica más compleja (24); sin embargo, en este proyecto se utilizaron medios de cultivos óptimos para el crecimiento de *L. plantarum*. En la fase exponencial de las bacterias se desarrollan diversos compuestos con algunas actividades específicas, algunos de estos sintetizados por bacterias ácido lácticas; estos tienen diversas estructuras y funciones, generalmente presentan actividad antimicrobiana contra patógenos alimenticios y patógenos gastrointestinales (25).

El inicio de la fase exponencial de *L. plantarum* se presentó entre 4 y 5 h en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe); existen reportes (26; 27; 28) que indican el efecto adverso de *L. plantarum* sobre bacterias patógenas debido a la producción de sustancias antimicrobianas como la plantaricina durante su crecimiento. La diferencia entre las fases exponenciales se debe al tipo de cepa y al sustrato de crecimiento (29).



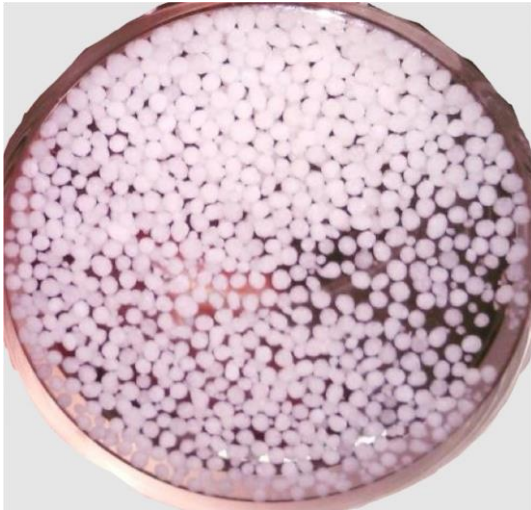
**Figura 2.** Cinética de crecimiento de *L. casei* (A) y *L. plantarum* (B) en medio MRS.

### 3.2. Encapsulación

Para la encapsulación realizada se utilizó almidón de malanga como gelificante, resultando encapsulados esféricos de 0.3 mm; además, es necesario que las cepas se encuentren en la fase exponencial, para que la concentración de bacterias sea mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. En la figura 3, se puede observar la encapsulación de forma esférica (observada con microscopio estereoscópico a 2X); se observa que las esferas pueden ser usadas eficientemente para la preparación de cultivos iniciadores de bacterias con alta viabilidad y vida de anaquel, estas pueden ser directamente ingeridas en los productos que se adicionan. Las bacterias encapsuladas presentaron una viabilidad adecuada, un crecimiento mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/mL, debido a la presencia de lactosuero, este subproducto de la industria quesera que mayormente no se aprovecha (19); el lactosuero contiene

lactosa, que es utilizada por las bacterias ácido lácticas, a través del proceso de oxidoreducción para la obtención de energía química. La encapsulación incrementa la viabilidad de los probióticos durante el paso por el tracto gastrointestinal en presencia de condiciones enzimáticas, cambios de temperatura, sales biliares y acidez (30). Debido a los problemas de viabilidad y funcionalidad que presentan los probióticos (31), la industria de alimento ha optado por la encapsulación de bacterias, además, se ha demostrado que la técnica de extrusión no causa daño celular por lo que se mantiene la viabilidad de los probióticos, además puede realizarse bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, no utiliza solventes tóxicos (32).





**Figura 3.** Esferas de alginato-almidón con cepas de *Lactobacillus casei*.

### 3.3. Viabilidad de las BAL encapsuladas en el embutido

Las encapsulaciones realizadas con lactosuero, alginato de sodio y almidón de malanga presentaron un diámetro de 3 mm, una de las características destacadas del almidón de malanga es el tamaño de su gránulo (1-5  $\mu\text{m}$ ), factor principal que permite la estabilización de las encapsulaciones;

además, le confiere protección a las bacterias encapsuladas (33). El uso del almidón de malanga, es por su fácil obtención de los cormos, y proveerle valor agregado al cultivo de malanga.

En la tabla 2, se muestran los resultados de la viabilidad de las bacterias presentes en los embutidos EF1, EF2 y EF3. El recuento de BAL se realizó durante las tres semanas de almacenamiento a 8 °C (34) y se observa que las cepas encapsuladas mostraron un crecimiento mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/g (35) y puede observarse un incremento paulatino durante las tres semanas de almacenamiento por lo que pueden ser considerados como alimento probiótico. Además, siendo el alimento EF2 el que mayor cantidad de UFC presenta durante ese periodo. A diferencia del embutido EF1 (tripa natural) el cual se observó que en el transcurso de la segunda semana la cubierta comenzó a desintegrarse, presentando además olores desagradables, y para la tercera semana se degradó por completo (datos no mostrados); probablemente, se deba a la producción de ácido láctico por el *L. casei* (36,39).

**Tabla 2.** Viabilidad de probióticos en las formulaciones de chorizo.

Dilución	EF1 con <i>L. casei</i> sin encapsular (UFC/g)			EF2 con <i>L. casei</i> encapsulado (UFC/g)			EF3 con <i>L. plantarum</i> encapsulado (UFC/g)		
	Semanas			Semanas			Semanas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
$10^{-1}$	I	I	I	I	I	I	I	I	I
$10^{-2}$	I	I	I	I	I	I	I	I	I
$10^{-3}$	18	I	I	37	I	I	I	I	I
$10^{-4}$	8	I	I	12	I	I	280	I	I
$10^{-5}$	4	66	78	2	361	286	50	138	.
$10^{-6}$	3	11	25	2	278	94	15	58	108

I: Incontable (cantidad superior a  $1 \times 10^6$  UFC/g).

Se observó en EF1 (*L. casei* sin encapsular) almacenado a  $5 \pm 1$  °C alta viabilidad de las BAL, sin embargo, la tripa presentó pérdida de textura y síntomas de fermentación del producto. El almacenamiento de productos de esta naturaleza a  $5 \pm 1$  °C es un método

aceptable pero no el ideal para conservación bacteriana debido al contenido de humedad de los productos (37), no es recomendado manejar tiempos largos de almacenamiento para embutidos con tripa natural (38). Los resultados presentados en el embutido se

atribuyen a la actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas (BAL), que ocasionan el deterioro externo, alteración de olor, de coloración, acumulación de gas, exceso de exudado y presencia de viscosidad en la superficie, características similares reportadas por Buelvas (39) en la evaluación de embutidos de marca comercial, que presentaron mayores recuentos de bacterias ácido lácticas, teniendo el mismo comportamiento tales como el deterioro de tripa, olores a fermentación y viscosidad en las condiciones de refrigeración a 6 °C. Buelvas *et al.* (39) mencionaron que el incremento de las BAL libres es más prominente, sin importar su lugar de almacenamiento, debido a que 15 días de almacenamiento superan el límite crítico de crecimiento para las BAL, que provoca un descenso hasta pH 5, por la actividad metabólica de estas bacterias las cuales generan grandes cantidades de ácido láctico, alcanzando su máximo en las superficies del producto en jamones, salchichas entre otro tipo de embutidos artesanales.

En la tabla 2, se puede observar que en la primera y segunda semana la muestra EF2 alcanzó un crecimiento de  $2 \times 10^6$  y de  $278 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente, mientras que en la tercera semana de almacenamiento disminuyó a  $94 \times 10^6$  UFC/g, siendo este último superior a  $10^6$  UFC/g, cantidad establecida por la NOM-181-SCFI-2010 (38) para ser considerado un producto probiótico (40). A diferencia de EF1, la formulación EF2 permaneció con características aceptables hasta la segunda semana de almacenamiento. A partir de la tercera semana presentó viscosidad en la superficie, alteraciones de olor y coloración. Este embutido presentó mayor estabilidad en el color y mayor incremento de las bacterias, efecto proporcionado por el encapsulamiento de la cepa de *L. casei*. Rodríguez *et al.* (41) reportó que *L. casei* encapsulado por liofilización en alginato de calcio no alcanzó los niveles

recomendados por la FDA (2002) después de 30 días de almacenamiento a 22 °C, debido a que el proceso de liofilización disminuye notablemente la actividad de agua y la humedad en los encapsulados, resultados concordantes a los aquí obtenidos, ya que se observó que en la tercera semana disminuye la cantidad de bacterias; sin embargo la liofilización es un proceso de secado a bajas temperaturas manteniendo la viabilidad de las bacterias restantes dentro de los encapsulados. Cabe mencionar la viabilidad de *Lactobacillus* en EF2 se tomó al quinceavo día de almacenamiento a  $5 \pm 1$  °C, en comparación con el embutido EF4 que obtuvo 7 días de vida de anaquel (datos no mostrados). Por otro lado, Rodríguez *et al.* (41) mencionan que la viabilidad se da por la sobrevivencia con baja actividad de agua en las cápsulas de alginato de calcio que varía entre 0.180 a 0.230, ya que esto proporciona la estabilidad a las cápsulas y evitan reacciones bioquímicas por parte de las cepas (41; 42), además en estas encapsulaciones las bacterias sobrevivieron debido al contenido de lactosuero dentro de las mismas. Chaikham (43) publicó que *Lactobacillus casei* puede prolongar su vida de anaquel hasta 30 días de almacenamiento a 4 °C encapsulados con alginato y extractos de plantas, como extractos de flores de anacardo y extractos de té verde las cuales fueron añadidas a jugos y yogurt.

Respecto al producto EF3, la viabilidad de *L. plantarum* encapsulados durante el almacenamiento, presentaron un crecimiento mayor a lo establecido en la NOM-181-SCFI-2010 (35); en la primera semana se observó un crecimiento de  $15 \times 10^6$  UFC/g, durante la segunda semana fue de  $58 \times 10^6$  UFC/g y en la tercera semana se observó mayor crecimiento ( $108 \times 10^6$  UFC/g), valor permisible para ser considerado un alimento probiótico. *L. plantarum*, presentó un crecimiento óptimo hasta la segunda semana, no obstante, se adaptó durante las tres semanas de

almacenamiento, esto se debe a los componentes del suero de leche que aportan fuentes de carbono, nitrógeno, azúcares simples que estimulan el crecimiento de los *Lactobacillus* (44). Los productos que contienen bacterias probióticas, deben almacenarse en refrigeración para mantener su viabilidad. El periodo de vida útil para estos productos es más corto que en productos sin probióticos. Sin embargo, la formulación EF3 tuvo una vida de anaquel favorable hasta la tercera semana, sin presencia de viscosidad exterior, textura, olor, coloración visual aceptable, seguro como consecuencia de la producción de plantaricina por *L. plantarum* que tiene un efecto bioconservante (45), esta sustancia inhibe el crecimiento de bacterias patógenas como *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus agalactiae* y *Flexibacter* sp. y tiene una alta resistencia a diferentes antibióticos principalmente carbenicilina, tetraciclina, cloranfenicol y florfenicol. Lo que se deduce que *L. plantarum* puede ser un potencial sustituto de los antimicrobianos sintéticos (46). Otras investigaciones demuestran que la plantaricina también inhibe el crecimiento de bacterias que atacan a alimentos refrigerados; también puede ser un conservador natural similar al utilizado en las industrias, ya que el tiempo de vida útil resulta de 15 días (46). Betancourt (47) mencionó que *L. plantarum* produce ácidos orgánicos como: ácido cítrico, succínico, propiónico y láctico, este último en una concentración de 48.29 g/L, compuestos que están asociados con la actividad antagónica frente a microorganismos patógenos. El método de encapsulación es una buena alternativa para la viabilidad de los probióticos (41; 48), entre ellos se encuentra *L. plantarum* donde indica que sobreviven seis semanas de almacenamiento en jugos de naranja y manzana refrigerados a 4 °C alcanzando  $10^6$  UFC/mL, mientras que los probióticos sin encapsular perdieron su viabilidad dentro a las cinco semanas de vida útil (41; 38). Dicho dato se relaciona con la

evaluación de EF3 en esta investigación, donde se observa que *L. plantarum* va en aumento cada semana, teniendo en cuenta que el sustrato no era el ideal logró adaptarse y prolongar la biomasa con mayor rapidez.

Por otro lado; el suero de leche contiene una buena cantidad de proteínas y lactosa (5%) que puede ser fermentado (49) por bacterias lácticas para producir ácido láctico, utilizable en otros procesos y así disminuir el impacto ambiental que este residuo produce (50). Al inocular el suero de leche con lactobacilos se prolonga su estabilidad aeróbica y potencia la temperatura ambiente hasta por 24 h. El *L. plantarum* y *L. casei* convierte la mayor parte de la glucosa en ácido láctico. Generalmente actúan bajo la ruta metabólica de Embden-Meyerhof (glucólisis) donde se producen dos moléculas de ácido láctico a partir de cada molécula de glucosa (30).

### 3.4. Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de la formulación EF2 (*L. casei* encapsulados) y EF3 (*L. plantarum* encapsulados) se muestra en la tabla 3, el resto de las formulaciones (EF1 y EF4) no se les realizó la prueba ya que presentaron reacciones adversas (inflado y contaminación). Se observa que EF2 y EF3 poseen mayor concentración de carbohidratos y fibra, debido a la presencia de *P. ostreatus* el cual contiene  $\beta$ -glucanos, un tipo de carbohidrato, además en la tabla se aprecia que ambos productos poseen una concentración baja de proteína, esto debido a la pasteurización de los insumos y materia prima utilizado en la elaboración del embutido. La proteína de origen animal (huevos, leche, carne y pescados) es más completa que la de origen fúngico (hongos comestibles). Sin embargo, *P. ostreatus* es un hongo comestible que posee polisacáridos, fenoles, lactonas y es rico en B-glucanos, además posee bajo contenido en grasas

saturadas (51).

**Tabla 3.** Composición química proximal de dos embutidos con *Lactobacillus* encapsulados con almidón de malanga.

Parámetro	EF2 con <i>L. casei</i> (%)	EF3 con <i>L. plantarum</i> (%)
Humedad	88.46±0.036 <sup>a</sup>	84.59±0.035 <sup>b</sup>
Cenizas	0.5± 0.021 <sup>a</sup>	0.58±0.040 <sup>b</sup>
Grasa	0.19±0.015 <sub>a</sub>	2.61±0.075 <sup>b</sup>
Proteína	0.11±0.020 <sub>a</sub>	0.39±0.065 <sup>b</sup>
Fibra cruda	4.89±0.058 <sup>a</sup>	6.60±0.051 <sup>b</sup>
Carbohidratos	6.97±0.053 <sup>a</sup>	6.04±0.049 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes en cada fila indican diferencia significativa entre los tratamientos (p<0.05, ANOVA).

En la tabla 3, se observa que existe diferencias estadísticas (p<0.05) en el contenido de proteína en los dos embutidos, EF1 y EF4 se descartaron debido a la corta vida de anaquel que presentaron (6 días); mientras que en el contenido de fibra se puede observar una diferencia estadística, mayor para el embutido EF3, probablemente se deba a la adición de *L. plantarum* y su producción de metabolitos debido al contenido de β-glucanos en el embutido (52). Se puede apreciar también un alto contenido de grasa en la formulación EF3, esto se debe al aceite vegetal añadido, este componente combinado con el resto de los ingredientes pueden ser una alternativa de alimento funcional. Los datos de ambas formulaciones se relacionan con los reportados por Lazo (53), quien desarrolló un embutido de champiñones y en su análisis químico proximal reportó un contenido de ceniza del 0.047%, humedad 77.843%, fibra 5.277%, grasa 0.158% y proteína 0.26%; la diferencia entre los embutidos EF2 y EF3, y el elaborado por Lazo (53) es el contenido de proteína

(0.10%). Según Cortés *et al.* (54) el *Pleurotus ostreatus* puede alcanzar un 30.71% de proteína (base seca) (55), se observa que los productos elaborados tienen bajo contenido de proteína debido a que durante la elaboración de los embutidos el hongo paso por un proceso térmico el cual podría ser la causa de la desnaturalización de las mismas.

### 3.5. Evaluación microbiológica

Los coliformes totales y fecales se evaluaron mediante análisis microbiológicos en ambas formulaciones (EF2 y EF3); de acuerdo con el método publicado en la NOM-093-SSA1-1994 sobre las prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos. Los resultados de coliformes totales de EF2 y EF3 fue 5 UFC/g, valor por debajo del límite establecido en la NOM, además de la ausencia de coliformes fecales; lo anterior indica que, ambos embutidos son inocuos y aptos para consumo, de acuerdo a lo establecido en la norma referida.

**Tabla 4.** Análisis microbiológico de Formulación EF2 y EF3.

Determinaciones	Valor Máximo NOM-093- SSA1-1994	Resultado UFC/mlde (EF2)	Resultado UFC/ mlde (EF3)
Coliformes totales NOM-113-SSA1-1994	50 UFC/ml.	5 UFC/ml	No desarrollo de coliformes por ml
Coliformes Fecales NOM-210-SSA1-2014	Negativo	Negativo	Negativo

La ausencia de coliformes totales y fecales en ambas formulaciones se debe, además de las buenas prácticas sanitarias realizadas durante la elaboración del producto, a la presencia de ácido láctico producido por *L. casei*, quienes son bacterias homofermentativas, que sintetizan ácido láctico superior al 80%, equivalente a 30.21 g/L, el cual podría contribuir a disminuir el pH del medio a 5.94 y 5.57 cuando la bacteria se encuentra en la fase estacionaria, lo que no permite el crecimiento de bacterias patógenas como *E. coli* (56); en la formulación EF3, probablemente se deba a que *L. plantarum* durante la fase exponencial empieza a producir plantaricina, que provee efectos bactericidas en bacterias gram positivas y negativas, el efecto bactericida producido por ésta BAL se detiene cuando llega a la fase estacionaria; la plantaricina, tiene una prometedora aplicación al ser activa frente a bacterias gram negativas, a diferencia de la mayoría de bacteriocinas reportadas (39).

### 3.6. Medición de color en los embutidos

#### 3.6.1. Luminosidad (L\*)

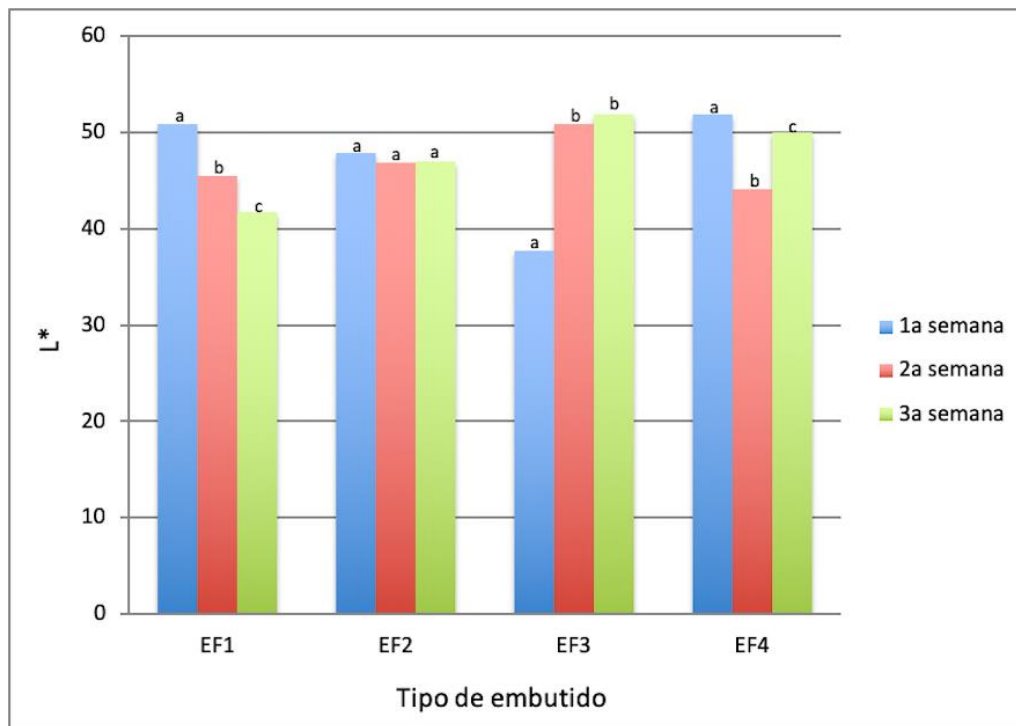
En la figura 4, se puede apreciar el seguimiento del parámetro L\* para los tres embutidos formulados con *Pleurotus ostreatus* (EF1, EF2, EF3) y el formulado de carne de cerdo (EF4). En la figura 3, se observa que el embutido EF1 presenta valores de luminosidad (L\* = 50.92) sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al formulado con carne de puerco (EF4), sin embargo, el

parámetro L\* del formulado con *P. ostreatus* desciende drásticamente durante el almacenamiento, lo que indica que el embutido va adquiriendo un color gris, debido a que la presencia de las BAL en los embutidos disminuye el pH, consecuentemente ocurre la inhibición de microbiota patógena, desnaturalizando algunas proteínas, causando cambios de coloración (57); seguido de la formulación EF2 (47.88) y EF3 (37.69). Los tres embutidos con *Pleurotus ostreatus*, durante su almacenamiento, presentan valores de L\* superiores a 37.0, muy similar a los reportado por Tipán (58), quien evaluó un embutido a base de champiñón (*Agaricus bisporus*), indicando que los parámetros de L\* se encuentra entre 31.76 - 40.42; por lo que se puede asumir que, la adición de bacterias probióticas no afecta el color durante ese periodo de almacenamiento. Se pudo constatar que el embutido EF2 no presentó cambios significativos en los valores de L\* durante el almacenamiento, además que los valores fueron muy cercanos a los presentados por la formulación a base de carne de cerdo.

Los valores de L\* (cercanos a 50) están asociados con la humedad o grasa presente en el interior del embutido, además, afectan directamente la luminosidad, también se puede atribuir a la naturaleza y cantidad del chile presente en el alimento (59; 56). Las BAL encapsuladas producen metabolitos primarios como ácidos orgánicos los cuales modifican el pH y la acidez, ocasionando

inactivación de enzimas responsables del oscurecimiento tales como la

polifenoloxidas (PPO) y lipoxigenasa (LOX).



**Figura 4.** Valores de *Luminosidad* ( $L^*$ ) de los cuatro embutidos durante el almacenamiento.  
\*Letras diferentes entre la semana del mismo tratamiento indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA).

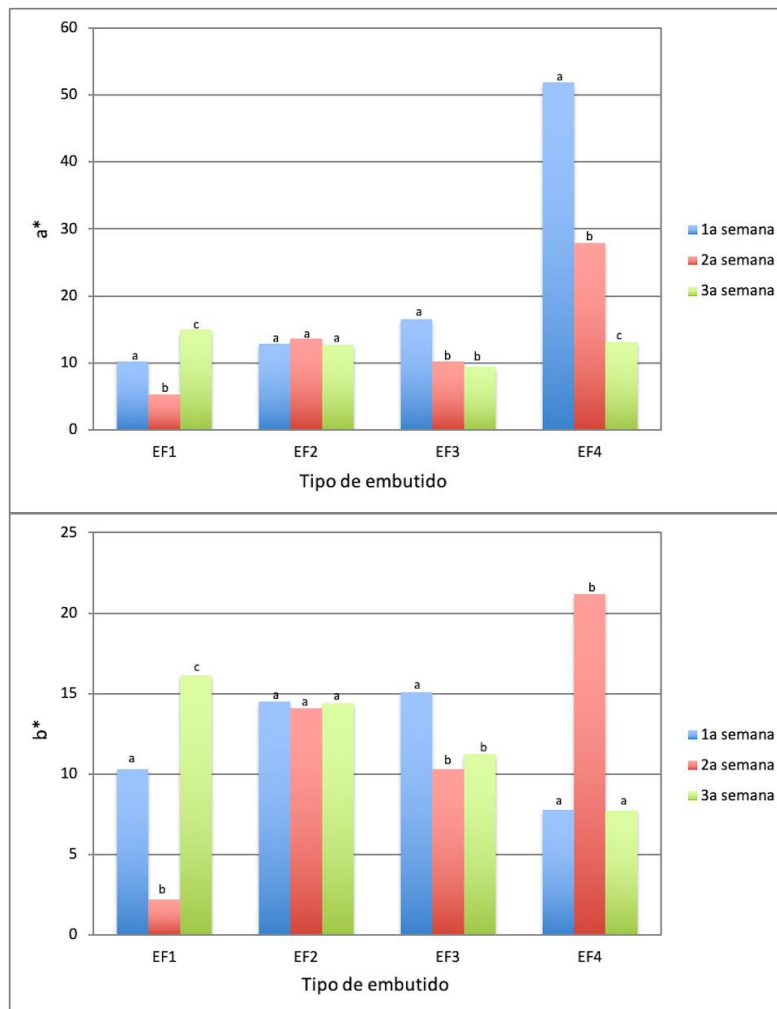
### 3.6.2. Valores de $a^*$ y $b^*$

En la figura 5A se muestran los valores de  $a^*$ , variable relacionada al color rojo (valores positivos) y verde (valores negativos), donde se aprecia que los embutidos elaborados con el hongo *P. ostreatus* presentan valores durante el almacenamiento por debajo de 20.0, mientras que el elaborado de carne de puerco (EF4) la primera y segunda semana presentó valores de 51.84 y 27.86, respectivamente. El embutido EF2, muestra valores menores de 14.0, sin embargo, no presenta cambios significativos durante las tres semanas de almacenamiento ( $p > 0.05$ ), condición que no se observa en los embutidos EF1, EF3 y EF4, que muestran grandes diferencias ( $p < 0.05$ ) mientras transcurre el tiempo de almacenamiento. Los cambios que se observan en los embutidos durante el almacenamiento, probablemente se deba a la

coloración proporcionada por los ingredientes usados, ya que conforme transcurre el almacenamiento tiende a estabilizarse debido a la presencia de BAL y sus metabolitos que actúan como conservadores naturales, para los embutidos a base del hongo, caso que no ocurre para EF4. Respecto a los valores de  $b^*$  (figura 5B) se observa que la mayoría de los embutidos presentan valores diversos, con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) durante su almacenamiento, incluyendo al elaborado con carne de cerdo (EF4). El embutido EF2 mostró valores de 15.0, sin evidenciar cambios significativos, lo que indica que fue el único embutido que mostró mayor estabilidad, de acuerdo con los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , esto probablemente se deba a que en su formulación se adicionó la cepa de *L. casei* encapsulada, a diferencia de EF1 que se

adicionó la cepa sin encapsular. Por el otro lado en EF3 se adicionó *L. plantarum*

encapsulado.



**Figura 5.** Valores de  $a^*$  (A) y  $b^*$  (B) de los cuatro embutidos durante el almacenamiento.  
\*Letras diferentes entre la semana del mismo tratamiento indican diferencias significativas (p < 0.05, ANOVA).

#### 4. Conclusiones

El almidón de malanga utilizado como gelificante y la técnica de encapsulación son útiles para la protección de los *Lactobacillus* contra factores extrínsecos, lo que permite prolongar la viabilidad de los probióticos.

En la formulación EF2 se obtuvo un incremento de  $94 \times 10^6$  UFC/mL de *L. casei* encapsulados, considerado como alimento probiótico con base a la NOM-181-SCFI-2010. El uso del lactosuero como sustrato en

el embutido EF3 con *Lactobacillus plantarum*, generó una prolongada fase exponencial, alcanzando su máximo crecimiento a la tercera semana ( $108 \times 10^6$  UFC/g), además los probióticos son liberados por la pared permeable.

Se obtuvieron dos embutidos tipo chorizo de *Pleurotus ostreatus* con bacterias ácido lácticas encapsuladas, de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-181-SCFI-2010), estos productos alimenticios pueden ser considerados como

probióticos o alimentos funcionales, que pueden presentar una alternativa viable de proteínas y compuestos bioactivos provenientes del lactosuero y *P. ostreatus*, así como de los metabolizados por las BAL utilizadas.

## 5. Agradecimientos

A los técnicos académicos de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por el apoyo brindado en el desarrollo del proyecto.

## 6. Referencias

- Anesto, J.B. y De Las Cagigas, A. “Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa”, *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 16(1), 2002, 63-68.
- Coronado, M., Salvador, H., Rey, L. “Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana”. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 2015, 206-212.
- FAO. “Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación”, 2001. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>.
- De Vuyst, L., Falony, G., Leroy, F. “Probiotic in fermented sausages”, *Meat science*, 80, 2008, 75-78.
- Del Castillo, R., López, A., San, F., Palou, E. “Viabilidad de un microorganismo probiótico en un producto cárnico fermentado tipo salami”, *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 2009, 111-120.
- Parra, R. “Revisión: Microencapsulación de Alimentos”, *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 2010, 5669-5684.
- Zhang, Z., Zhang, R., Chen, L., Tong, Q., and McClements, D. J. “Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract”, *European Polymer Journal*, 72, 2015, 698–716.
- SAGARPA. *Panorama Agroalimentario (Carne de bovino) Sectorial, Dirección de investigación y Evaluación Económica*. FIRA. 2019. Obtenido de: <https://www.inforural.com.mx/panorama-agroalimentario-de-la-carne-de-bovino-2019/>.
- Petermann, F., Leiva, A., Martínez, M.A., Durán, E., Labraña, A.M., Garrido, A., Morales, C.C. “Consumo de carnes rojas y su asociación con mortalidad”, *Revista Chilena de Nutrición*, 25(3), 2018, 293-295.
- Alvarado, J., Puente, A., Rubio, M., Villareal, F. 2017. *La cadena de valor de embutidos y otras conservas de carne de cerdo en México, Comisión económica para América Latina y el Caribe, Naciones Unidas*, primera edición, 24-28.
- Bazán, D., Salas, N., Cornejo, O., Osorio, A., Bravo, M., Becerra, E., Carhuanchu, H., Aguirre, R. “Estudio del valor nutricional y propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de *Pleurotus ostreatus*”, *Revista Peruana de Ingeniería Química*, 7(2), 2004, 40-44.
- Pineda, J., Ramos, L., Soto, C. “Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: Una revisión”, *ICIDA, sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, 48(2), 2014, 13-23.
- Deepalakshmi, K. Mirunalini, S. “*Pleurotus ostreatus*: An Oyster Mushroom with Nutritional and Medicinal Properties”, *Journal of Biochemical Technology*, 5, 2014, 718-726.
- Ruivola, M.B., Hernández, A., Díaz, R., Niño, Z. “Desarrollo de una formulación de salchicha saludable empleando al hongo



*Pleurotus ostreatus* como sustituto de la carne de cerdo”, *Revista de Investigación Talentos Volumen III*, 1, 2016, 36-41.

15. Ronda, F., Rodríguez de la Calle, M., Pando, V. 2012. *Enriquecimiento de pan sin gluten con B-glucanos extraídos del hongo Pleurotus ostreatus*, Palencia: Universidad de Valladolid, Ingeniería agrícola y forestal, Tecnología de alimentos.

16. Ruilova, M., Hernández, A., Díaz, R., Niño, Z. “Desarrollo de una formulación de salchicha saludable empleando al hongo pleurotus ostreatus como sustituto de la carne de cerdo”, *Revista de Investigación Talentos*, 3(1), 2016, 1-10.

17. Uriza, P.J. 2012. *Evaluación de la inclusión de los betaglucanos de Ganoderma lucidum en yogur*. Universidad Nacional de Colombia. Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

18. Torres, A., Montero, P., Duran, M. “Propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*)”, *Revista Lasallista de Investigación*, 10(2), 2013, 52-61.

19. Papagianni, M., Anastasiadou, S. “Encapsulation of *Pediococcus acidilactici* cells in corn and olive oil microcapsules emulsified by peptides and stabilized with xanthan in oil-in-water emulsions: Studies on cell viability under gastro-intestinal simulating conditions”, *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6), 2009, 514–522.

20. A.O.A.C. 1984. *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist*. E.U.A., Washington, D.C., 14a Ed.

21. Norma oficial mexicana NOM-093-SSA1-1994, bienes y servicios. *Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos*.

22. Jurado, H., Orbez, A., Mesias, L.

“Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas mediante química sanguínea, inmunohistoquímica y microscopia electrónica en *Cavia porcellus*”, *Artículos de Investigación Científica y tecnológica*, 15(2), 2017, 11-21.

23. Florez, W.A.M. “Estudio genético preliminar de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (EPS)”, *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 3(2), 2005, 12.18.

24. Sánchez, J. 2005. *Potencial biotecnológico de bacterias ácido lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacárido*. Universidad de Oviedo, Tesis de Doctorado.

25. Lin, T., Pan, T. “Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102”, *Journal of Microbiology*, 52(3), 2019, 409-417.

26. Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoya, O., Gutiérrez, P. “Aislamiento d *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina”, *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), 2009, 75-82.

27. Jurado, H., Orbes, A., Mesias, L. “Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas mediante química sanguínea, inmunohistoquímica y microscopia electrónica en *Cavia porcellus*”, *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 2017, 11-21.

28. Vera, R., Ormaza, J., Muñoz, J., Arteaga, F., Sánchez, L. “Cepas de *Lactobacillus plantarum* con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos”, *Revista de Salud Animal*, 40(2), 2018, 1-12.

29. Mousavi, Z. y Mousavi, M. “The effect of fermentation by *Lactobacillus plantarum* on

- the physicochemical and functional properties of liquorice root extract”, *Food Science and Technology*, 105, 2019, 164-168.
30. Velázquez, A.A., Covatzen, D., Toledo, M., Vela, G. “Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco”, *Ciencia UAT*, 13(1), 2018, 1-12.
31. FAO. “Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación”. *Estudio FAO Alimentación y nutrición*. 85, 2002, 1-29.
32. Serna, L., Vallejo, V. “Probiotic encapsulation”, *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 2013, 4743-4753.
33. Singla, D., Singh, A., Dhull, S. B., Kumar, P., Malik, T., Kumar, P. “Taro starch: Isolation, morphology, modification and novel applications concern - A review”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 2020, 1283-1290.
34. Norma Oficial Mexicana, NOM-092-SSA1-1994, *Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*.
35. Norma Oficial Mexicana, NOM-181-SCFI-2010. *Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba*.
36. Carnicer, R., Infante, D., Roselló, E., Bartolomé, R. “Efecto de la ingesta de leche fermentada con *Lactobacillus casei* DN-114 001 sobre la flora intestinal”, *Anuales de Pediatría*, 65(5), 2006, 448-453.
37. Camacho, M.I., Serrat, M., Orberá, T., Rodríguez, S. “Evaluación de dos métodos de conservación para *Kluveromyces marxianus* CCEBI 2011 en la Colección de cultivos del CEBI”, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34 (2), 2014, 91-96.
38. Hleap, J., Velasco, V.A. “Parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento de salchichas elaboradas a partir de tilapia roja (*Oreochromis sp.*)”, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(1), 2011, 42-50.
39. Buelvas, S., Patño, J. H., Restrepo, C.E. “Effect of the cold chain on the growth of acid-lactic bacteria, on the physical-chemical quality and on the alteration of vacuum packed sliced cooked ham”, *Revista Lasallista de Investigación*, 9(2), 2012, 55-64.
40. Vela, G., Castro, M., Caballero, A., Ballinas, E. “Bebida probiótica de lactosuero adicionada con pulpa de mango y almendras sensorialmente aceptable por adultos mayores”, *ReCiTeIA*, 11(2), 2011, 1-20.
41. Rodríguez, Y., Rojas, A., Rodríguez, S. “Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias”, *Revista Biosalud*, 15(2), 2016, 106-115.
42. Chan, L. W., Lim, L. T., Heng, P. W. “Microencapsulation of oils using sodium alginate”, *Journal Microencapsulation*, 17(6), 2000, 757-766.
43. Chaikham, P. “Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage”, *Food Bioscience*, 12, 2015, 61–66.
44. Ramírez, J; Rosas, P.; Velázquez, M, Ulloa, J., Arce, F. “Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud”, *Revista fuente*, 2(7), 2011, 1-16.
45. Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoya, O., Gutiérrez, P. “Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina”, *VITAE, Revista de la facultad de química farmacéutica*, 16(1), 2009, 75-82.
46. Salejda, A., Olszńska, A., Janiewicz, U., Krasnowska, G. “Effects on Quality

Properties of Pork Sausages Enriched with Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.)”, *Journal of Food Quality*, 1, 2017, 1-7.

47. Betancourt, S., Ayala, A., Ramírez, C. “Efecto del proceso de fermentación con bacterias ácido lácticas sobre propiedades reológicas de masas de maíz QPM”, *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 17(2), 2014, 503-511.

48. López, S., Fernández, S., Armenta, R., García, A., Moreno, S., Vázquez, L., Clamont, G. “Caracterización del co-encapsulamiento de *Lactobacillus plantarum* y ácidos grasos omega-3 en una matriz de alginato-pectina”, *Biocencia*, 21(2), 2018, 38-46.

49. Vázquez, S., Crosa, M.J., Rey, F., Lopretti, M. “Viabilidad del uso de suero de queserías como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2”, *Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay*, 10(4), 2009, 12-16.

50. Gallego, D. y Cuenca, J. 1988. *Análisis de tres alternativas para la separación de las proteínas del suero lácteo proveniente de queserías*, Medellín, Universidad Nacional de Colombia.

51. Zhong, L., Ma, N., Wu, Y., Zhao, L., Ma, G., Pei, F., & Hu, Q. “Characterization and functional evaluation of oat protein isolate *Pleurotus ostreatus*  $\beta$ -glucan conjugates formed via Maillard reaction”, *Food Hydrocolloids*, 87, 2019, 459-469.

52. Marroquín, D., Lecona, C.A., Ruíz, N., Ocampo, P., Rodas, J., Gonzales, C., Gonzalez, M. Gordillo, L. “Análisis bromatológico de frutos de chile “siete caldos” (*Capsicum annuum*) cultivados en condiciones de cielo abierto y casa sombra”, *Agroproductividad*, 10(9), 2017, 34-40.

53. Lazo, A. 2015. *Desarrollo de un chorizo elaborado de champiñón.*, Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos,

Universidad Autónoma Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, Tesis de Licenciatura.

54. Cortés, R. García, S. y Suárez, M. “Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C”, *VITAE, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 14, 2007, 16-24.

55. Zhai, F., y Han, J. “Decomposition of asparagus old stalks by *Pleurotus spp.* Under mushroom-growing conditions”, *Scientia Horticulturae*, 231, 2018, 11-14.

56. Revilla, I., Vivar, A.M. “The effect of different paprika types on the ripening process and quality of dry sausages”, *International Journal of Food Science and Technology*, 40(4), 2005, 411-417.

57. Bañon, S., Martínez, A., López, A. “Maduración de chorizo y salchichón de chato murciano con diferentes cultivos iniciadores (Bacterias Ácido Lácticas y Estafilococos). *Annual veterinaria*, 27, 2011, 101-118.

58. Tipán, A., Ushiña, V. 2012. *Elaboración de un embutido vegetal, a partir de 2 variedades de champiñón (agaricus bisporus), champiñón blanco y portabelo, mediante la utilización de dos pre-tratamientos*, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Latacunga, Ecuador, Tesis Ingeniero Agroindustrial.

59. Cruz-Bacab, L., Baeza-Mendoza, L., Martínez-Molina, I. “Evaluación sensorial de embutido tipo chorizo a base de carne de conejo”, *Abanico Veterinario*, 8 (1), 2017, 102-111.