

**Elaboración de microcápsulas por gelación iónica, como agentes protectoras de probióticos a base de kéfir artesanal frente a condiciones ácidas.**

**Stephanie Bedoya López  
Giada Tatiana Sánchez Montoya**

**Director (a)  
José Fernando Oñate Garzón. MSc.PHD**

**Codirector  
Yhors Alexander Ciro Monsalve PhD**

**Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Microbiología  
Cali, Colombia  
2024**

**Elaboración de microcápsulas por gelación iónica, como agentes protectoras de probióticos a base de kéfir artesanal frente a condiciones ácidas.**

**Stephanie Bedoya López.  
Giada Tatiana Sánchez Montoya.**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Microbiólogo.**

**Director.  
José Fernando Oñate Garzón. MSc.PhD.  
Codirector.  
Yhors Alexander Ciro Monsalve PhD.**

**Línea de Investigación:  
Semillero de investigación en biotecnología farmacéutica y enfermedades tropicales.  
Grupo de Investigación:  
QUIBIO.**

**Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de  
Microbiología  
Cali, Colombia 2024.**

## IMPACTOS

### Impactos que presentó el Trabajo de Grado

<b>IMPACTO</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>BENEFICIARIO(S)</b>
<b>Económico</b>	Producto innovador y de bajo costo, aportando beneficios en el microbiota intestinal	Consumidores de Cali (Cali – Valle del cauca)
<b>Responsabilidad social</b>		
<b>Científico</b>	Apropiación social del conocimiento, presentaciones en eventos: Participación en XVII Encuentro Interno De Investigación Formativa	Comunidad Científica
<b>Indicadores de Gestión</b>		
<b>Tecnológico</b>		
<b>Técnico</b>		
<b>Ambiental</b>		
<b>Social</b>	Participación en el semillero de biotecnología farmacéutica y enfermedades tropicales	Comunidad Científica
<b>Cultural</b>		

## **Elaboración de microcápsulas por gelación iónica, como agentes protectoras de probióticos a base de kéfir artesanal frente a condiciones ácidas.**

**Stephanie Bedoya López<sup>1</sup>, Giada Tatiana Sánchez Montoya<sup>2</sup>, José Fernando Oñate Garzón<sup>3</sup>, Yhors Alexander Ciro Monsalve<sup>4</sup>**

1. Estudiante de Microbiología. Universidad Santiago de Cali.  
Stephanie.bedoya00@usc.edu.co
2. Estudiante de Microbiología. Universidad Santiago de Cali.  
Giada.sanchez00@usc.edu.co
3. Director. PhD en Biología-Bioquímica. Profesor Titular. Universidad Santiago de Cali.  
Jose.onate00@usc.edu.co
4. Director. PhD. Profesor Titular. Universidad Santiago de Cali. Yhors.ciro00@usc.edu.co

### **RESUMEN**

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades adecuadas, proporcionan beneficios en la salud, interactuando con la flora intestinal ayudando a mantener un equilibrio intestinal apropiado. Sin embargo, los probióticos pueden ser sensibles a las condiciones ambientales adversas, por lo cual, se han implementado técnicas de microencapsulación para mantener su viabilidad. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto protector del método de microencapsulación. ¿Cómo? Mediante la técnica de gelación iónica con alginato de sodio, cloruro de calcio y recubrimiento con carboximetilcelulosa (CMC), aplicando una simulación in vitro en condiciones ácido gástricas. En cuanto a la metodología se llevó a cabo el aislamiento de bacterias ácido lácticas por medio de kéfir artesanal, luego se realizaron pruebas bioquímicas para obtener una caracterización precisa de las cepas probióticas adquiridas y por último se realizó la microencapsulación por el método de gelación iónica. Los resultados demostraron que las bacterias probióticas microencapsuladas fueron resistentes a la simulación in vitro en condiciones ácido gástricas, confirmando que dichas bacterias pudieron sobrevivir al entorno ácido en el que fueron sometidas, obteniendo una mayor concentración en comparación con las bacterias probióticas libres. De esta manera se puede concluir que las microcápsulas con bacterias ácido lácticas obtenidas del kéfir artesanal son una alternativa viable.

**Palabras clave:** *Kéfir, Microencapsulación, Probióticos, Viabilidad.*

## Preparation of microcapsules by ionic gelation, as protective agents for probiotics based on artisanal kefir against acidic conditions.

### ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that, when consumed in adequate quantities, provide health benefits, interacting with the intestinal flora, helping to maintain an appropriate intestinal balance. However, probiotics can be sensitive to adverse environmental conditions, which is why microencapsulation techniques have been implemented to maintain their viability. The objective of this study is to evaluate the protective effect of the microencapsulation method. As? Using the ionic gelation technique with sodium alginate, calcium chloride and coating with carboxymethylcellulose (CMC), applying an in vitro simulation under gastric acid conditions. Regarding the methodology, the isolation of lactic acid bacteria was carried out using artisanal kefir, then biochemical tests were carried out to obtain a precise characterization of the probiotic strains acquired and finally microencapsulation was carried out by the ionic gelation method. The results demonstrated that the microencapsulated probiotic bacteria were resistant to in vitro simulation in gastric acid conditions, confirming that these bacteria were able to survive the acidic environment in which they were subjected, obtaining a higher concentration compared to free probiotic bacteria. In this way, it can be concluded that microcapsules with lactic acid bacteria obtained from artisanal kefir are a viable alternative.

**Keywords:** *Kefir, Microencapsulation, Probiotics, Viability.*

### 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se conoce que el cuidado de la microbiota intestinal conlleva beneficios sobre la salud a nivel general [1], se suman las políticas del cambio donde las reformas de salud están enfocadas en la prevención de enfermedades [2], aumentando el consumo de alimentos ricos en fibra y bebidas fermentadas que se sabe contienen bacterias que estimulan la microbiota intestinal [3]. Estas bacterias están asociadas a los llamados "Probióticos" que, según la OMS, son "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor". Hay que tener en cuenta que no todas las bacterias ácido lácticas o fermentadoras son consideradas cepas probióticas, porque si bien hay un número reducido de cepas identificadas, estudiadas y evaluadas en condiciones gástricas que permiten ser identificadas como probióticos, aún existe un desconocimiento muy grande con las bacterias presentes en bebidas fermentadas como la kombucha, el jun y el kéfir con potencial probiótico [4]. De ahí la necesidad de realizar estudios de identificación o clasificación de bacterias, que complementen los estudios necesarios para la identificación de cepas que puedan ser consideradas "probióticos" no solo "bacterias ácido lácticas". Por eso, a lo largo de este informe verán la descripción de las bacterias aisladas del kéfir, como bacterias ácido lácticas (BAL) [5].

Entre las bebidas fermentadas el Kéfir es una de las destacadas con sus nódulos compuestos por péptidos bioactivos y polisacáridos, donde está confinada una compleja comunidad simbiótica de bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas (BAA) [6]. Además, las BAL contienen muchos estudios de identificación, evaluación y determinación de su viabilidad en almacenamiento y en entornos gástricos, la identificación y evaluación de sus cepas ya se ha estandarizado [7]. Ahora bien, la determinación de su viabilidad aún sigue en proceso de mejoramiento, debido a que las bacterias ácido lácticas son resistentes en ambientes ácidos, aun así, son muy sensibles a los cambios bruscos de temperatura, de oxígeno y de presión, por tanto, múltiples estudios presentan resultados insatisfactorios, poca viabilidad e incertidumbre que se traduce en un mal manejo de la información frente a bebidas fermentadas. Como propone (Ramírez Huaman, A. (2020).) se debe realizar investigaciones sobre el aislamiento y cuantificación de bacterias ácido lácticas en la microbiota de los granos de kéfir, debido a su importancia en el proceso de fermentación como en la inhibición de bacterias patógenas en la industria alimentaria y por consiguiente, promover el uso de bacterias del kéfir como suplementos funcionales para la microbiota intestinal [8].

Aunque la baja viabilidad es razón suficiente para desarrollar una protección de las cepas aisladas del kéfir, existe la necesidad de facilitar su uso como suplemento en otros alimentos que no sean bebidas fermentadas, debido a la poca tolerancia que puede tener el público a los olores y acidez de los productos. Por ende, Correia (2022) propuso la alternativa de microencapsular las BAL para así poder aislarlas y a su vez brindarle protección [9]. Existen muchos tipos de microencapsulación, tales como microencapsulación por electro pulverización, microencapsulación por pulverización de secado, microencapsulación por gelación iónica, microencapsulación por extrusión entre otros, no todos se encuentran aptos para usar con bacterias vivas. Por conocimiento de su eficiencia se usará en este estudio el método de microencapsulación por gelación iónica siendo una técnica eficiente y asequible donde se emplea el alginato de sodio y el cloruro de calcio para la formación de microcápsulas de gel que será el material de recubrimiento y protección de los probióticos. Dicho material de recubrimiento no es tóxico, es muy económico, además de ser utilizado en la cocina molecular [10]. Para darle una mayor estabilidad a las microcápsulas, se realizará un recubrimiento a las perlas de alginato, a causa de que su reacción con el cloruro de calcio, no es tan estable y tiende a ser porosa. El recubrimiento se genera con otro compuesto gelante como Quitosano, carboximetilcelulosa (CMC) o maltodextrina porque, de acuerdo con múltiples estudios, comprueban nivel de eficiencia [10]. Pero ¿puede realmente la microencapsulación mejorar la viabilidad de cepas probióticas del Kéfir artesanal en una simulación *in vitro* en condiciones ácido gástricas? Según lo descrito por Correia, H. J. D. A. (2022) las microcápsulas mejoran la viabilidad de las BAL extraídas del kéfir en su almacenamiento y según María Clara (2021) las BAL libres actúan como medio de ayuda, prevención y tratamiento para enfermedades del tracto gastrointestinal. Este estudio se encargará de evaluar el efecto de la microencapsulación por gelación iónica sobre la viabilidad de bacterias ácido lácticas aisladas del Kéfir artesanal, suspendidas dentro de una simulación *in vitro*, en condiciones ácido gástricas. También establecerá su viabilidad con bacterias ácido lácticas aisladas del kéfir, pero libres en condiciones ácido gástricas. Para complementar estudios anteriormente mencionados se hará el recubrimiento de las perlas de alginato de sodio con CMC, siendo este el único estudio no evaluado por Ordóñez, J.L (2018) y que sigue siendo no tóxico y económico.

## 2. METODOLOGIA.

El desarrollo de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Santiago de Cali en Cali valle. La metodología planteada busca evaluar el efecto protector de las microcápsulas elaboradas con la técnica de gelación iónica en bacterias ácido lácticas a base de kéfir artesanal, sometidas en una simulación *in vitro* en condiciones ácido gástricas, el kéfir usado en la metodología fue donado por "Probióticos Cali" un emprendimiento caleño encabezado por Stella, quien realiza diferentes fermentos que contienen bacterias ácido lácticas.

### 2.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir del kéfir artesanal

Se llevo a cabo el aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) por medio de donación de nódulos de kéfir artesanal. El kéfir se produce mediante la fermentación de leche con los llamados "granos o nódulos de kéfir". Estos nódulos son una combinación simbiótica de bacterias lácticas y levaduras, que forman una matriz gelatinosa similar a la coliflor. Los nódulos de kéfir son pequeños, duros, de forma irregular y de color blanco amarillento, con un diámetro que puede variar de 3 a 35 mm. Estos nódulos están compuestos por péptidos bioactivos y polisacáridos donde está confinada una compleja comunidad simbiótica de bacterias ácido-lácticas, levaduras y bacterias ácido-acéticas [14]. Se tomaron 10 gramos de nódulos de kéfir y se añadieron en 90ml de agua peptona, una vez esto se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y se sembró por superficie 0.1ml de las diluciones realizadas en medio sólido de agar Man, Rogosa, Sharpe (MRS), ya que es un medio de cultivo selectivo que proporciona nutrientes necesarios para un buen crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL), después se sembró en caldo MRS 1 ml de estas diluciones en 4 tubos de ensayo, debido a que son medios selectivos para BAL, donde se incubaron a 37°C por 72 horas. Todas las incubaciones se llevaron en anaerobiosis controlada ya que las bacterias ácido lácticas crecen con mayor comodidad, sin embargo, a pesar de su metabolismo anaerobio, son anaerobios tolerantes y en los medios de cultivos sólidos forman colonias en presencia de aire [12].

## **2.2 Pruebas bioquímicas a bacterias ácido lácticas obtenidas del kéfir.**

La caracterización bioquímica se realiza posterior a la inoculación en el medio de cultivo MRS y después se debe mirar como este afecta o no a las bacterias, ya que permite el desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido-lácticas. La proteasa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva, debido a que proporcionan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso brindan cofactores que promueven el desarrollo bacteriano y pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas, mientras que el agar es el agente solidificante [13].

La identificación y caracterización de las BAL aisladas de los nódulos de kéfir se realizó mediante el seguimiento del criterio del manual de Bergey de Bacteriología sistemática (Bergey, 1986).

### **2.2.1 Tinción gram**

Para la tinción de Gram, se seleccionó solo una colonia de cada aislado que se realizó previamente en agar MRS. Posteriormente en un portaobjeto se colocó una pequeña gota de agua destilada, con ayuda de un asa metálica estéril se tomó una pequeña muestra de colonia aislada en agar, se extendió y se fijó con ayuda de un mechero de bunsen. Los reactivos que se utilizaron fueron: cristal violeta durante un minuto, Lugol durante un minuto, alcohol o acetona al 70% durante 30 segundos y safranina durante 1 minuto respectivamente. Finalmente se secó el portaobjeto en el mechero de bunsen y se colocó encima un cubreobjeto, por último, se añadió una gota de aceite de inmersión y se observó en el microscopio con objetivo 100X.

El término bacterias ácido lácticas no se limita a un grupo de microorganismos estrictamente taxonómico, pero comprende una amplia gama de géneros filogenéticamente relacionados con bacterias Gram positivas con un gran número de características bioquímicas y ecológicas en común [15].

### **2.2.2 Motilidad.**

Esta prueba se realizó por medio de sulfuro indol para motilidad (SIM), donde se tomó una pequeña muestra de colonia con ayuda de un asa de punta estéril y fue inoculada en el centro del medio SIM, incubada a 35°C durante 24 horas. Esta prueba debe dar negativa debido a que las BAL no tienen motilidad, es decir, que no presentan la habilidad para moverse espontáneamente [16].

### **2.2.3 Prueba catalasa.**

En esta prueba se colocó en un portaobjeto una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3% y se colocó una pequeña parte de las colonias aisladas de agar MRS, por último, se observó las burbujas que se iban generando. En la literatura plantea que carecen de actividad respiratoria, ya que les falta la enzima citocromo catalasa. A pesar de su metabolismo anaerobio, son anaerobios tolerantes, por lo que en cultivos sólidos pueden formar colonias en presencia de aire sin ser tóxico para ellas [17].

### **2.2.4 Prueba de crecimiento en concentración de sal (NaCl).**

Entre las características fisiológicas más importantes para consideraciones taxonómicas se encuentra la resistencia a diferentes concentraciones de NaCl, para esta prueba se realizó la preparación de medio MRS con una concentración del 1%, 2,5% y 4% de NaCl, después se inoculó cada medio con bacterias previamente aisladas y se incubaron a 37°C durante 72 horas. Por otra parte, se realizó prueba de crecimiento en concentración de sal en bebida fermentada con kéfir, donde se preparó caldo MRS con un 1%, 2,5 y 4% de NaCl. Posteriormente se tomó 1 ml de muestra y se inoculó en 9 ml de cada una de las concentraciones de NaCl y se incubó a 37 °C de 48 a 72 horas [18].

### **2.2.5 Prueba citrato de Simmons.**

Esta prueba se realizó para determinar el uso de citrato como única fuente de carbono lo cual se esperó que diera negativa, ya que el metabolismo de los organismos en crecimiento libera sustancias alcalinas produciendo una reacción básica. Para esta prueba se tomó una colonia aislada y se sembró en medio de cultivo citrato de Simmons, donde fue incubada por 24 horas a una temperatura de 35°C [19].

### **2.2.6 Prueba hierro.**

En esta prueba se preparó medio de cultivo lisina hierro agar en tubos de ensayo, los cuales se inocularon con una colonia aislada y se incubó por 24 horas a una temperatura de 35°C. El resultado esperado indica que las BAL no aprovechan el hierro como nutriente, pero otros estudios más recientes explican más a fondo la importancia de las BAL las cuales son capaces de remover elementos inorgánicos como hierro total, favoreciendo el proceso de potabilización del agua utilizados como agente de biorremediación de aguas [20].

### **2.3 Preparación de los aislados obtenidos del kéfir para el proceso de microencapsulación.**

Una vez se obtuvo el aislamiento de la cepa ácido lácticas del kéfir, se tomó una colonia y se sembró en 10ml de caldo MRS, posteriormente se incubó a 37°C durante 18 horas, pasado este tiempo de crecimiento, se ejecutó por medio del espectrofotómetro la concentración alcanzando una densidad óptica de 0.849 a una longitud de onda de 625 nm, obteniendo una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Con esto obtenemos la concentración inicial antes de realizar el proceso de microencapsulación. Seguidamente se obtuvieron las bacterias del medio mediante centrifugación a 3000rpm por 30 minutos a 4°C y se enjuagaron dos veces con solución salina estéril al 0.9% para obtener el sedimento de bacterias ácidos lácticas y de esta manera tener las bacterias listas para crear la solución de alimentación, pero antes una parte del pellet de células se utilizó como células libres y la otra parte se sometió a microencapsulación [21].

### **2.4 Obtención de microcápsulas.**

Se prepararon microcápsulas de alginato de calcio recubiertas con CMC mediante el proceso de extrusión siguiendo la metodología propuesta por Silva de Farias et al. (2019) con algunas modificaciones [22], se realizaron los microencapsulados mediante el método de gelación iónica, utilizando soluciones previamente esterilizadas, donde primero fueron suspendidas y homogeneizadas la biomasa de las BAL ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) en 10 ml de alginato de sodio al 1%, esta fue nuestra solución de alimentación. La solución de alimentación se extruyó a través de una jeringa 24G  $\frac{3}{4}$ , a 100mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 1% y se mantuvo en agitación constante a 150 rpm durante 30 min, formando microcápsulas de gel [23].

Las microcápsulas de alginato de calcio se recolectaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante. Las microcápsulas se lavaron con agua peptona al 0,1% y se sumergieron en 100 mL de una solución de CMC al 2%, se mantuvo en agitación constante a 150 rpm durante 40 min. Las microcápsulas de alginato de calcio con CMC se recolectaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavaron con agua peptona 0,1% [24].

### **2.5 Simulación in vitro en condiciones ácido gástricas.**

En la ejecución de la simulación in vitro se evaluó tanto en bacterias libres como microencapsuladas por separado, el objetivo era evaluar la supervivencia de las bacterias tanto libres como microencapsuladas y compararlas, además poder identificar una liberación controlada de las bacterias en el intestino después de ser degradadas las microcápsulas por los ácidos [25]. Primero se realizó el sedimento con las bacterias libres, en la cual se suspendieron en 10 ml de solución salina al 0,9%, seguidamente se centrifugaron en (3000 rpm durante 30 min a 4°C) para recuperar el sedimento, luego fue suspendido en 1 tubo con 9ml de HCl al 0,1N durante 120min a 37°C, posteriormente para los microencapsulados las condiciones de incubación fueron las mismas, donde se inoculó en 1 tubo con 9ml de HCl al 0,1N durante 120 min a 37°C evaluando la prueba etapa gástrica, pasado este tiempo se centrifugaron las muestras a (3000 rpm durante 30 min a 4°C) y se descartó el sobrenadante [26].

### **2.6 Cuantificación de bacterias libres y microencapsuladas.**

Para el método de cuantificación se realizó tanto en bacterias libres como microencapsuladas, liberando el contenido bacteriano de los micro encapsuladas por medio de ruptura de cada microcápsula con una aguja estéril, donde luego fueron suspendidas en agua peptona para realizar diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , el cual fue inoculado 0.1µl de suspensión bacteriana en agar MRS por superficie e incubada a 37°C por 24 horas. Sin embargo, para la cuantificación de bacterias libres se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , partiendo del pellet que había quedado de la simulación in vitro en condiciones ácido gástricas realizada anteriormente, ejecutando la suspensión de 0.1µl en agar MRS de cada una de las diluciones por superficie e incubada a 37°C por 24 horas. Por último, se realizó un recuento de las placas para comprobar el efecto de las

microcápsulas en la simulación in vitro en condiciones ácido gástricas, este fue el único proceso que llevo un control positivo y uno negativo, ya que el método lo requiere para su validez [27].

## 2.7 Análisis de datos

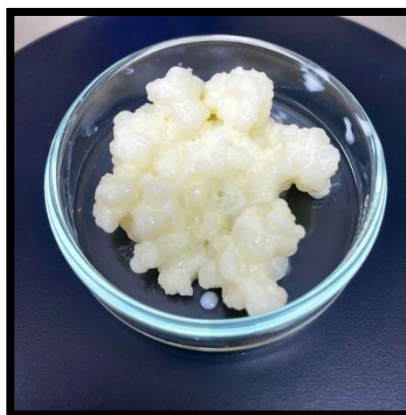
Los datos obtenidos de la concentración de las bacterias ácido lácticas microencapsuladas y libres después de haber pasado por la simulación in vitro en condiciones acidas fueron evaluadas mediante la aplicación de Excel, debido a que utiliza gráficos comparativos, el cual permite presentar datos relevantes de investigaciones.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Aislamiento de bacterias ácido-lácticas a partir del kéfir artesanal

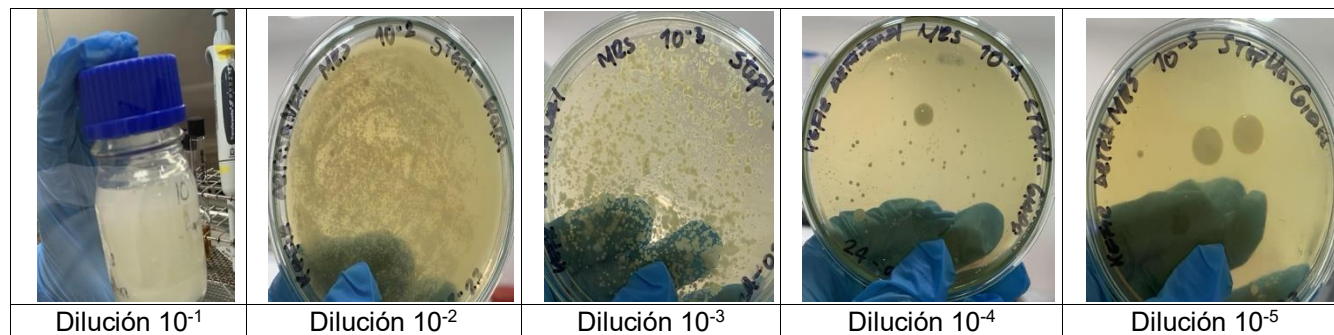
El kéfir tiene una comunidad muy grande de microorganismos y la distribución no es equitativa, las concentraciones de BAL son mucho mayores al de las levaduras según lo planteado por (Patel et al., 2022) [28]. Las BAL están en mayor concentración que las bacterias BAA lo cual es refutado por Rodríguez Mendoza (2023) [29]. El cual replicó el estudio y obtuvo un crecimiento mayor de BAA, después BAL y por último levaduras, esto se debe a las condiciones donde fueron extraídos los nódulos de kéfir, las condiciones de fermentación y la leche empleada.

En la **Figura 1** se observan los nódulos extraídos del kéfir artesanal, los gránulos de kéfir se encuentran cubiertos de un líquido viscoso llamado kefiran, este es un glucogalactano (polisacárido) soluble en agua producido por diferentes lactobacilos presentes en el kéfir y responsable del conjunto de beneficios del kéfir [30].



**Figura 1.** Aspecto de nódulos de Kéfir artesanal.

Se seleccionaron 10 gramos de estos nódulos de kéfir y se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  como se aprecia en la **Tabla 1**, se observaron colonias de color blanco, bordes regulares y cremosas con un crecimiento significativo, el cual es un indicativo de presencia de bacterias ácido lácticas.

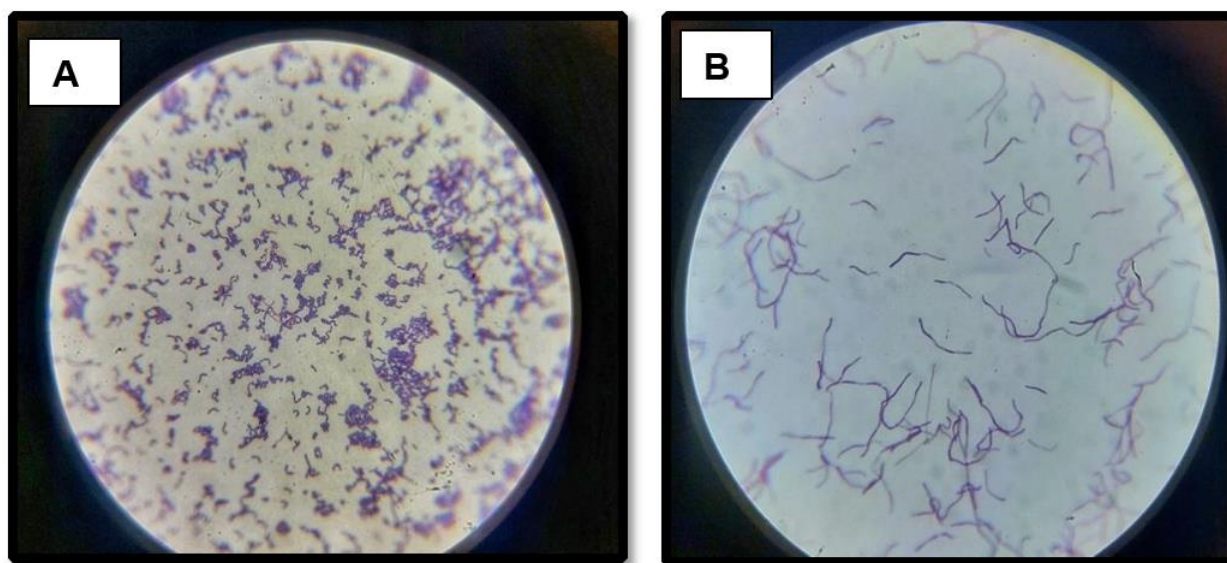


**Tabla 1.** Aislamiento mediante nódulos de kéfir artesanal en agar MRS.

Las bacterias que crecieron en este medio de cultivo pertenecen a las BAL, ya que si quisiéramos aislar las BAA usaríamos el medio GYC y las levaduras en el medio YGC, sin embargo, no todas las colonias eran iguales, claramente por la matriz o donde procedía la muestra. Estos resultados fueron comparados por tamaño, forma, margen, color, textura y elevación de las colonias con los aislados de Rodríguez Mendoza, E. (2023), el cual identifico sus colonias por la técnica MALDI-TOF pero también las clasifíco por su morfología. De acuerdo con esta investigación se realizó la comparación y teniendo en cuenta el medio de cultivo de crecimiento que se utilizó para este estudio, el cual está destinado para el crecimiento de BAL, podemos inferir que las bacterias aisladas son BAL [29].

### 3.2 Caracterización y confirmación de BAL obtenidas del kéfir artesanal.

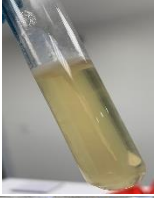




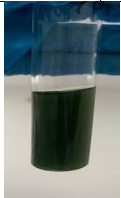

Después de la caracterización morfológica macroscópica pasamos a realizar la confirmación microscópica de los aislados, se realizó la caracterización de la cepa obtenida y diferentes pruebas bioquímicas confirmatorias para BAL. La identificación morfológica se realizó mediante tinción Gram como se muestra en la **Figura 2**, observando por medio del microscopio bacterias de color violeta, siendo una de las primeras características de las BAL. Además, con su forma alargada como bastón podemos confirmar que son bacilos, también se observa la ausencia de esporas y flagelos importantes características de las BAL. Estos mismos resultados los comparamos con el estudio de identificación realizado por Vanegas Mantilla (2014), la cual mostro las mismas características de tinción y morfología microscópica, aunque en un estudio más reciente realizado por Pasaribu (2022) comparan la caracterización microscópica de aislados de diversos nódulos de kéfir, los cuales presentaron un crecimiento de bacilos, pero también de cocos gran positivos. El cual infiere un nivel de contaminación de los diversos nódulos, teniendo esto en cuenta, podemos decir que nuestros aislados no presentan contaminación y tiene un mayor nivel de pureza [31].



**Figura 2.** Tinción gram de las cepas aisladas de nódulos de kéfir artesanal. **A:** Dilución  $10^{-4}$  observado con aumento 100x **B:** Dilución  $10^{-5}$  observado con aumento 100x

Luego de la caracterización de los aislados se procedió a realizar las pruebas bioquímicas, donde se obtuvieron los resultados característicos y confirmatorios de BAL como se aprecia en la **Tabla 2**, de acuerdo con los resultados obtenidos la movilidad es negativa, debido a que las BAL no tienen cola o flagelo que les permita desplazarse. Para la caracterización de probióticos es muy importante que tengan movilidad reducida o nula, ya que es una característica muy propia de las bacterias patógenas para poder reproducirse de una forma invasiva en el intestino. En el apartado **2** se evidencia catalasa negativa otra característica confirmatoria de BAL, ya que estas no presentan la enzima citocromo catalasa por lo cual carecen de una actividad respiratoria. En el apartado **3** observamos una de las características fisiológicas más importantes, dado que debe resistir a diferentes concentraciones de NaCl, de esta forma evaluamos la viabilidad de los aislados sometidos a un estrés osmótico, comparados con el estudio realizado por Huaranga Olave (2023) el cual fue más riguroso, ya que aumento las concentraciones de NaCl en 5%, 7% y 10 %, presentando un crecimiento microbiano de 4.15 y de 8.76 Log respectivamente, al 10% no tuvo un crecimiento significativo, este dato es muy importante debido a que en el procesamiento de algunos alimentos o en el recorrido intestinal se pueden enfrentar a un estrés por altas concentraciones de sales, sin embargo, Huaranga Olave (2023) hizo la comparación de la viabilidad con los

probióticos microencapsulados y los resultados de su viabilidad fueron 93%, 86% y 66% respectivamente aumentando la supervivencia de las bacterias ácido lácticas en el almacenamiento y tracto gastrointestinal. Para el apartado 4 notamos que el tubo no viro su color, ya que las bacterias ácido lácticas no usan el citrato como fuente de carbono. Por lo tanto, no liberan sustancias alcalinas que produzca una reacción básica y el medio no vira a azul. Por último, el apartado 5 nos muestra un resultado negativo, dado que el medio no cambio su color. El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los microorganismos, pero no para las BAL. Normalmente esta es una prueba de identificación presuntiva para microorganismos gran negativos, en este caso ya sabemos que son gran positivos.

No	Prueba bioquímica	Resultado	Análisis	Imagen	
1	Motilidad	Negativo	Solo se evidencio crecimiento en la parte inoculada y no se observó propagación en el medio.		
2	Catalasa	Negativo	Al momento de tener los microorganismos contacto con el peróxido de hidrogeno no se produjo burbujas, esto se debe por la ausencia de esta enzima catalasa.		
3	Crecimiento en concentración de sal (NaCl)	1%	Positivo	Tanto el caldo Mrs. como el agar Mrs. presentaron crecimiento en 1%, siendo las bacterias ácido lácticas tolerables a este compuesto químico.	
		2,5%	Positivo	Tanto el caldo Mrs. como el agar Mrs. presentaron crecimiento en 2.5%, siendo las bacterias ácido lácticas tolerables a este compuesto químico.	
		4%	Positivo	Se observo crecimiento en caldo Mrs. y no crecimiento en agar Mrs., sin embargo, no se descarta la posibilidad que sean estas bacterias tolerables a este compuesto en 4%.	
4	Citrato de Simmons	Negativo	No hubo viraje de color, ya que las bacterias ácido lácticas no consumen citrato como fuente de carbono.		
5	Hierro	Negativo	No hubo cambio de color, debido a que el hierro es un micronutriente esencial para los seres vivos a excepción de las bacterias ácido lácticas.		

**Tabla 2.** Caracterización bioquímica de aislamiento mediante nódulos de kéfir artesanal.

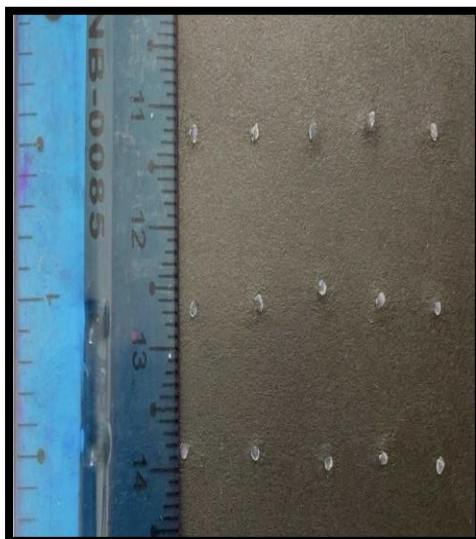
Después de haber realizado las pruebas de caracterización macroscópica, microscópicas de los aislados y haber realizado las pruebas bioquímicas podemos definir presuntivamente que los aislados presentes en los diversos ensayos son BAL y se prosigue con los análisis de microencapsulación y comparación de supervivencia en el sistema ácido gástrico in vitro.

### 3.3 Determinación de la morfología y viabilidad de las microcápsulas.

Durante el proceso de microencapsulación se obtuvieron 402 microcápsulas intactas presentando formas esféricas, con un diámetro entre 0,1 a 0.2 mm por microcápsula como se muestra en la **figura 3**, con una viabilidad de  $85 \times 10^7$  Ufc/ml equivalente al 85% de las bacterias microencapsuladas, se estima que por cada microcápsula hay  $2,11 \times 10^6$  Ufc/ml de BAL, siendo este método eficiente para la microencapsulación de BAL. De igual manera, Jantarathin et al. (2017) microencapsularon *L. acidophilus* TISTR 1338 con inulina, utilizando la técnica de extrusión, obteniendo que la efectividad de encapsulación mediante perlas de alginato-quitosano fue de  $90.40 \pm 1.53$  %, siendo estos datos similares a los obtenidos en este estudio [32].

En el proceso de la microencapsulación hay momentos donde se puede perder concentración de UFC, en el lavado, en los restos de la jeringa y en el pellet pegado a los tubos falcón. Sin embargo, no es una cantidad significativa que afecte el tratamiento con BAL o que represente un costo muy grande en materia prima, la protección que brindan las microcápsulas puede ser mayor que el porcentaje de bacterias perdidas en el almacenamiento y proceso del tracto gastro intestinal.

Según la estructura esférica y semi ovalada que presentan nuestras capsulas podemos inferir estabilidad y protección, a nuestro compuesto activo ( BALL). En el estudio realizado por Mariño Sarmiento (2023) realizaron el estudio del comportamiento de diversas capsulas, alginato, alginato con quitosano, maltodextrina y maltodextrina con quitosano, siendo el sistema con alginato el más eficiente y alginato con quitosano en segundo lugar, pero sin muchas diferencias significativas entre ellas. En nuestro caso pudimos experimentar con alginato y CMC como material de recubrimiento y pudimos evaluar su resistencia no en el almacenamiento, pero si en condiciones ácido gástricas in vitro.



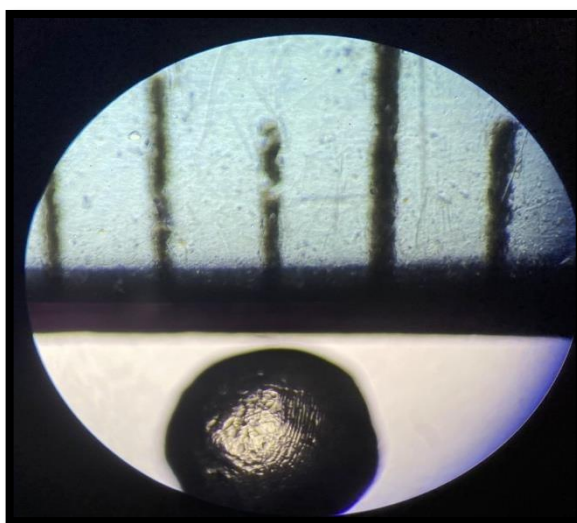
**Figura 3.** Medición de las microcápsulas obtenidas del método gelación iónica.

En la **Figura 3 y 4** se puede apreciar el resultado final de la técnica de gelación iónica durante el proceso de microencapsulación por extrusión y el recubrimiento con CMC, adquiriendo microcápsulas semi uniformes y redondas, evidenciando que el compuesto CMC mejora su forma, firmeza y dureza, mientras protege a las BAL. Sin embargo, al ser una técnica mecánica, la presión que se ejerce en la jeringa no es uniforme y más si se debe mantener una fuerza constante por un periodo largo de tiempo. El método es eficiente para una prueba en laboratorio, pero si se quiere llevar a una escala industrial se debe crear un método mas eficiente que no requiera esfuerzo humano o por lo menos que el esfuerzo mecánico sea automático.



**Figura 4.** Microcápsulas recubiertas con carboximetilcelulosa (CMC).

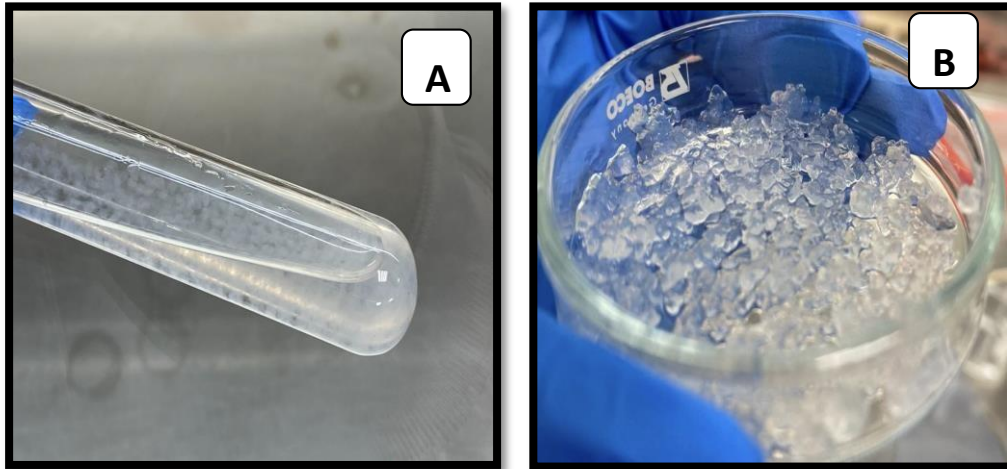
En la **Figura 5** por medio del microscopio óptico con un aumento de 100x se pudo observar el tamaño y la forma de una microcápsula, viendo una apariencia uniforme y lisa, sin observarse presencia de huecos alrededor de la esfera. Esto se puede ver referenciado por Rodríguez (2021) donde explica las diferentes morfologías de una capsula desde su irregularidad, su grosor y la diferencia entre una encapsulación con y sin recubrimiento [33].



**Figura 5.** Visualización de microcápsula por microscopio óptico en aumento 100x.

### **3.4 Simulación *in vitro* en condiciones ácido gástricas.**

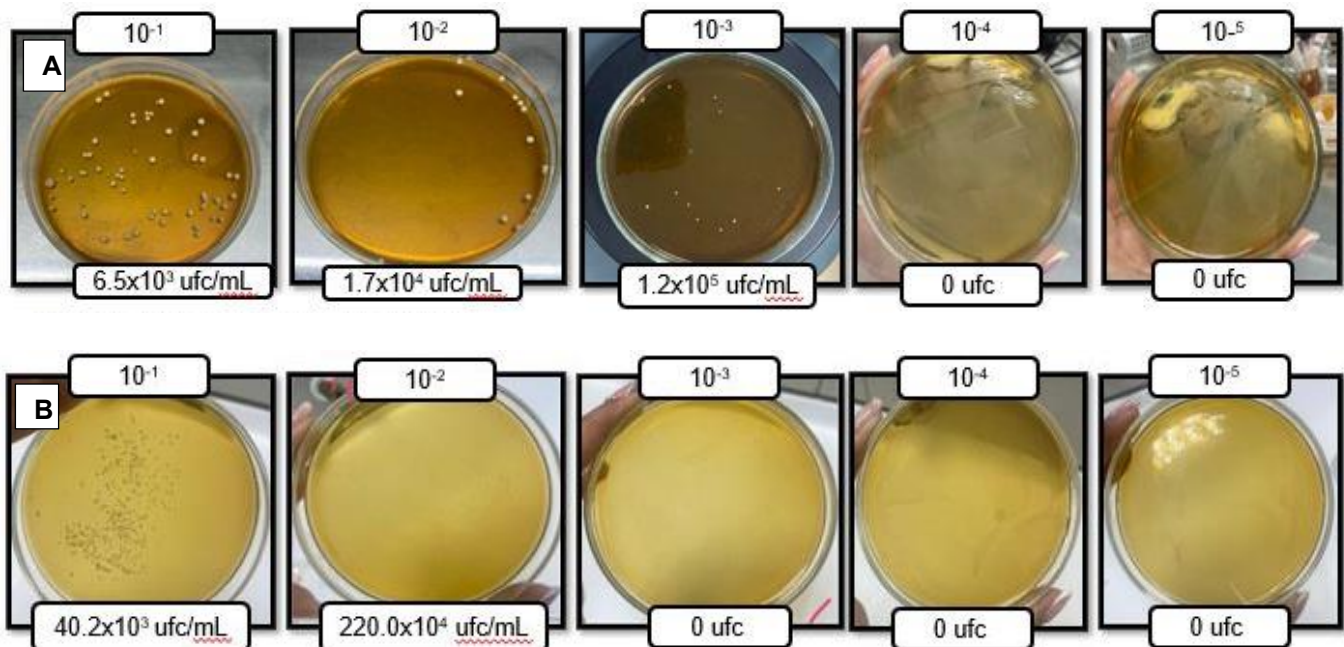
Los resultados de las microcápsulas sometidas a condiciones ácido gástricas se presentan en la **Figura 6** apartado **A** las microcápsulas en un tubo de ensayo con 9 ml de HCl al 0.1N y en el apartado **B** las microcápsulas después de la simulación *in vitro*, esto demuestra la resistencia de las microcápsulas las cuales no fueron degradadas, pero a su vez demuestran un problema porque no permiten una liberación controlada del compuesto activo en este caso en el intestino. Para que una microcápsula sea útil y eficiente debe tener un equilibrio entre la protección del compuesto activo y debe degradarse en el estomago para permitir una liberación controlada en el intestino. Las BAL siguen atrapadas en su mayoría dentro de las microcápsulas, sin embargo, se nota una disminución del tamaño y una irregularidad en la superficie de las capsulas pos-*in vitro*, esto se debe a que las microcápsulas son degradadas desde afuera hacia adentro, capa por capa va liberando las BAL dentro de ellas.



**Figura 6.** Microcápsulas sometidas a simulación in vitro con HCl al 0.1N. **A:** Capsulas sumergidas a ácido clorhídrico **B:** Microcápsulas obtenidas después del proceso la simulación in vitro en condiciones ácido gástricas.

### 3.5 Cuantificación de bacterias libres y micro encapsuladas.

De acuerdo con la **Figura 7** se puede apreciar el resultado de la cuantificación de bacterias libres y microencapsuladas, observando en el apartado **A** el resultado del crecimiento de las diluciones en la cuantificación de bacterias libres, donde solo se obtiene crecimiento en las diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  en el cual su conteo más grande fue de  $1.2 \times 10^5$ , esto infiere que el conteo bacteriano fue muy bajo. Por otro lado, en la cuantificación de bacterias micro encapsuladas como se observa en el apartado **B** hubo mayor conteo bacteriano, y teniendo en cuenta que no todas las bacterias fueron liberadas es una gran comparación, la mayoría de las bacterias siguen dentro de las microcápsulas, recubiertas por un gel que les impide obtener los nutrientes del medio, reproducirse y tener visibilidad por medio de una colonia. Aun así, solo presento crecimiento en las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , siendo su conteo más grande  $220.0 \times 10^4$ , evidenciando que no hubo un incremento como se esperaba en las bacterias microencapsuladas. Se puede considerar en la figura A y B el conteo de Ufc/ml de los resultados de la cuantificación de bacterias libres y microencapsuladas.



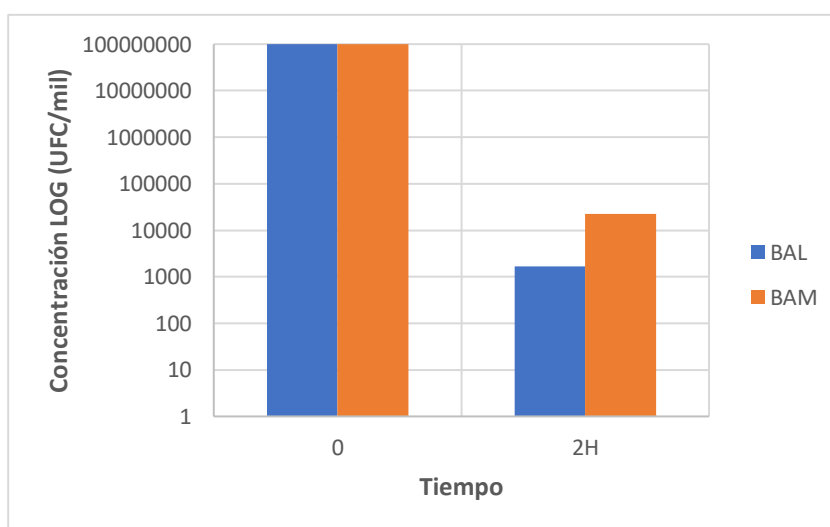
**Figura 7.** Cuantificación de bacterias libres y microencapsuladas luego de ser sometidas a simulación in vitro en condiciones ácido gástricas. **A:** crecimiento diluciones realizadas a bacterias ácido lácticas libres. **B:** crecimiento diluciones realizadas a bacterias ácido lácticas microencapsuladas.

De acuerdo con los resultados de la (**figura 7 apartado A**) se evidencia el poco crecimiento de las diluciones en las bacterias libres, considerando de esta manera que las bacterias libres pudieron verse afectadas por el estrés en el cual se sometieron por el ácido clorhídrico al momento de ser sometidas durante la simulación *in vitro* en condiciones ácido gástricas. Esto se debe a que el ácido clorhídrico proporciona un ambiente sumamente ácido, necesario para que la pepsina descomponga las proteínas, simulando la acidez del estómago que actúa como barrera contra las infecciones, pues elimina la mayoría de las bacterias así ellas sean resistentes a los entornos ácidos. Como resultado obtuvimos un crecimiento menor al 0.00012% de la concentración inicial, la cantidad que llega realmente al intestino es ínfima, no es significativo.

El poco crecimiento que se observa en la (**figura 7 apartado B**) de las diluciones con bacterias ácido lácticas microencapsuladas, se considera que se debe a que el método de liberación de las bacterias una vez estando microencapsuladas no fue el adecuado para este diseño, no se descarta la idea de que las bacterias quedaron retenidas en las microcápsulas y no pudieron liberarse del todo, sin embargo, se contempla que para un futuro se pueda controlar este proceso y mediante técnicas distintas de liberación obtener diluciones mayores y una mejor concentración. La cantidad que fue liberada de las capsulas después de la simulación *in vitro* corresponde al 0.0022%.

No obstante, de acuerdo con los resultados obtenidos se logra corroborar que el ensayo cumplió con un efecto protector de las BAL mediante la microencapsulación en comparación con bacterias libres, confirmando que estas bacterias microencapsuladas pudieron sobrevivir a la simulación *in vitro* en condiciones ácido gástricas. Obteniendo una mayor concentración en las bacterias ácido lácticas microencapsuladas, siendo este método prometedor, de bajo costo e innovador en el uso de probióticos de manera natural.

En la **Figura 8** se observa la comparación entre la concentración log (Ufc/ml) por el tiempo transcurrido de la simulación ácido gástrica *in vitro*, en el que se evidencian dos sistemas, el de las bacterias ácido lácticas libres (BAL) y el de las bacterias ácido lácticas microencapsuladas (BAM). Los sistemas inician con una concentración  $1 \times 10^8$  y posterior a la simulación *in vitro* en condiciones ácido gástricas observamos que el sistema BAL presenta una disminución drástica de su concentración con un valor de 17000 Ufc/ml obtenidas del conteo en placa de la **Figura 7**. En el sistema BAM encontramos una concentración de 2200000 Ufc/ml que corresponden a las bacterias ácido lácticas que fueron liberadas de sus microcápsulas por el método de ruptura descrito en la metodología, sin embargo, debido al método de ruptura empleado no todas las bacterias fueron liberadas y por lo tanto no fueron cuantificadas en las placas, existen métodos más efectivos que permiten liberar las bacterias una vez microencapsuladas para realizar una cuantificación más exacta; Esto nos demuestra la resistencia que presentaron las microcápsulas protegiendo el compuesto activo.



**Figura 8.** Grafica comparativa de la concentración antes y después de la técnica de simulación ácido gástrica *in vitro*. **BAL:** Bacterias ácido lácticas Libres **BAM:** Bacterias ácido lácticas Micro encapsuladas.

#### 4. CONCLUSIONES

Las bacterias ácido lácticas aisladas de kéfir artesanal microencapsuladas por la técnica de gelación iónica con alginato de calcio recubiertas con CMC por el método de extrusión mostraron una resistencia mayor a lo esperado en condiciones ácidas, sobrepasando las expectativas y lamentablemente no otorga una liberación controlada del compuesto activo.

La eficacia de este método puede depender de varios factores, como la formulación específica utilizada, las condiciones de procesamiento y las características de los aislados de bacterias ácido lácticas empleadas.

Cambiando el método de ruptura de las microcápsulas en ensayos a futuro, se espera obtener una concentración de su viabilidad más acertada, se propone una dilución por agitación de las microcápsulas, liberando las bacterias ácido lácticas de su materia encapsulante.

Las bacterias ácido lácticas libres no resisten concentraciones de NaCl mayores al 10% y tampoco simulaciones ácido gástricas in vitro, se debe seguir estudiando el uso de microcápsulas para potenciar el efecto de los probióticos y bacterias ácido lácticas en nuestra microbiota.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la universidad Santiago de Cali y al laboratorio de microbiología por permitir llevar a cabo esta investigación y reconocemos el buen gesto que tuvo la persona que nos donó el kéfir, el cual nos permitió que conociéramos más acerca de todos sus beneficios. Por último, agradecemos especialmente a los doctores José Fernando Oñate Garzón y Yhors Alexander Ciro Monsalve por creer desde el primer momento en este proyecto, por los recursos suministrados, el apoyo y toda la paciencia durante el desarrollo de esta investigación. Los autores han declarado que no hay conflicto de interés.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Zepeda, R. C., Portilla, C. J., & Lalanne, G. M. (2023). El cuidado de la salud intestinal como herramienta educativa. *Revista de la Innovación a la Práctica*, 2(2), 13-28.
- [2] Delgado-Noguera, M., & Campos-Bermúdez, L. V. (2023). La atención primaria en la reforma de salud del Gobierno de Gustavo Petro. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca*, 25(1).
- [3] Batista, M. C. M., de Jesus, K. A., & de Oliveira Freitas, F. M. N. (2021). Avaliação dos efeitos do Kefir na Microbiota Intestinal Evaluation of the effects of Kefir on the Intestinal Microbiota. *Brazilian Journal of Development*, 7(9), 93727-93744.
- [4] Slattery, C., Cotter, P. D. y W. O'Toole, P. (2019). Análisis de los beneficios para la salud que confieren las especies de *Lactobacillus* del kéfir. *Nutrientes*, 11 (6), 1252. MDPI AG. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.3390/nu11061252>.
- [5] Wu Wu, J. W. F. (2021). Caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de ensilados de piña como microorganismos con potencial probiótico y determinación de su aplicabilidad como cultivo bioprotector en leche agria.
- [6] Sebastián Domingo, J. J., & Sánchez Sánchez, C. (2020). El kéfir: tan desconocido como beneficioso para la salud (No. ART-2020-117452).
- [7] Salas Avendaño, X. A., & Torres Barja, I. R. Evaluación de la viabilidad de bacterias ácido-lácticas y levaduras; y composición nutricional del kéfir de leche durante su almacenamiento en refrigeración.
- [8] Ramirez Huaman, A. (2020). Actividad metabólica, viabilidad y exopolisacáridos de bacterias lácticas de granos de Kéfir liofilizado con potencial tecnológico en la región central.

- [9] Correia, H. J. D. A. (2022). Microencapsulação de kefir pela técnica de gelificação iônica para aplicação em alimentos.
- [10] Ortiz, N., Ochoa, LA., González, SM., Rutiaga, O., Gallegos, JA. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. *TecnoL.*, 24,(52), p. e1962.
- [11] ELABORACIÓN DE MICROENCAPSULADOS DE BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA MEJORAR LOS EFECTOS SALUDABLES DE LOS ALIMENTOS./ [Ordóñez, J.L.; Fernández-Díaz, C; Zuasti Sánchez, E.; Landi, M.M. Moreno-Rojas, J.M.; Pereira-Caro, G.]. – Córdoba. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2018. 1-21 .Formato digital (e-book) - (Alimentación y Salud; Acuicultura y Recursos Marinos)
- [12] Aguayo, L., & del Carmen, M. (2017). Aplicación de bacteriocinas para la bioprotección de alimentos.
- [13] Salas Avendaño, X. A., & Torres Barja, I. R. (2021) Evaluación de la viabilidad de bacterias ácido lácticas y levaduras; y composición nutricional del kéfir de leche durante su almacenamiento en refrigeración.
- [14] Salazar, E. J., Sánchez, J. D., & Giraldo, L. M. L. (2019). Características y beneficios del kéfir como probiótico: Una revisión para el mejoramiento de la salud. *Microciencia*, 8, 132-147.
- [15] Vanegas Mantilla, C. V. (2014). Obtención de bacterias ácido lácticas mediante aislamiento en el kéfir de leche, para la optimización en la síntesis de ácido láctico por fermentación.
- [16] Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Scielo. Recuperado el 12 de Enero del 2014, de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8>
- [17] Kavitha P., Sindhuja D y Banumathi M. (2016) Isolation and Biochemical Characterization of Lactobacillus species Isolated from Dahi. Departamento de Microbiología Srimad Andavan College, Tamilnadu, India. Pág. 1042-1049.
- [18] Huaranga Olave, A. V., & Choque Contreras, B. (2023). Resistencia de la bacteria prebiótica Lactobacillus plantarum ATCC 1407 microencapsulada y libre frente a condiciones de estrés simuladas relacionadas con la producción de alimentos.
- [19] Longoria Rodríguez, C. Estudio sobre la competencia y el antagonismo químico de los productos de fermentación de lactobacillus acidophilus en cultivos de escherichia coli.
- [20] Balboa Luna, C. M. (2021). Desarrollo de un consorcio de bacterias ácido lácticas para remoción de hierro total en aguas naturales para potabilización.
- [21] Frakolaki, G., Giannou, V., Kekos, D. y Tzia, C. (2021). Una revisión de las técnicas de microencapsulación para la incorporación de bacterias probióticas en alimentos funcionales. *Reseñas críticas en ciencia de los alimentos y nutrición*, 61 (9), 1515-1536. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1761773>
- [22] Silva de Farias, T. G., Leite, H. F. L., Montenegro, T. C. S., Costa, J. A. M., Mendonça, B. L. S., Stamford, T. M. A., Montenegro, T. L. S. (2019). Viabilities of Lactobacillus rhamnosus ASCC 290 and Lactobacillus casei ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. *LWT*, 100, 391-396.
- [23] Łętocha, Anna, Małgorzata Miastkowska y Elżbieta Sikora. 2022. "Preparación y Características de Micropartículas de Alginato para Aplicaciones Alimentarias, Farmacéuticas y Cosméticas" *Polímeros* 14, no. 18: 3834. <https://doi.org/10.3390/polym14183834>

- [24] Mariño Sarmiento, R., & Tucto Soto, E. H. (2023). Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 microencapsulado con polímeros y prebióticos frente a condiciones de pasteurización, congelación y refrigeración para su aplicación en alimentos. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/21612>
- [25] Thai, H., Thuy Nguyen, C., Thi Thach, L. et al. (2020) Caracterización de nanopartículas de quitosano/alginate/lovastatina e investigación de sus efectos tóxicos in vitro e in vivo . Representante científico 10 , 909. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57666-8>
- [26] Hernández-García, J. E., Sebastián-Frizzo, L., Rodríguez-Fernández, J. C., Valdez-Paneca, G., Virginia-Zbrun, M., & Calero-Herrera, I. (2019). Evaluación in vitro del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77. *Revista de Salud Animal*, 41(1).
- [27] Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Arshad, M. S., Khan, M. A., Saeed, M., ... & Anjum, F. M. (2020). Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1649.
- [28] Patel, S. H., Tan, J. P., Börner, R. A., Zhang, S. J. et al. (2022) "A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 80: 103084.
- [29] Rodríguez Mendoza, E. (2023). Aislamiento e identificación de la microbiota cultivable del kéfir de agua.
- [30] Lamas, MRL (2017). Arq. Manuel Fermín Villar Rubio Rector de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí Dr. en Arq. Anuar Abram Kasis Ariceaga Secretario General de la UASLP Arq. Mamá. Dolores Lastras Martínez.
- [31] Pasaribu, R. P., Zaidar, E., & Bulan, R. (2022). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Goat Milk Kefir and Coconut Milk Kefir.
- [32] Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeeikul, R. (2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 4(5), 6166-6172.
- [33] Rodríguez, G. A., & Orozco, F. J. E. (2021) Investigación Documental de Diseño de Doble Microencapsulación de Organismos Probióticos.