

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

PROTECCIÓN DE *Lactobacillus rhamnosus* EN CÁPSULAS DE
ALGINATO DE CENTRO LÍQUIDO

T E S I S

que para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

P R E S E N T A

I.A. Jazmín Gabriela Reyes Ocampo

Director

Eduardo Jaime Vernon Carter

México, D.F.

25 de Febrero de 2010

La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo.

México D.F. a 25 de Febrero del 2010.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis.
“PROTECCIÓN DE *Lactobacillus rhamnosus* EN CÁPSULAS DE ALGINATO DE
CENTRO LÍQUIDO”

Que presentó
Jazmín Gabriela Reyes Ocampo

Comité Tutorial:

Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter
Asesora: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros
Asesora: M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz

Jurado:

Presidente: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Secretario: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Vocal: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

Vocal: Dra. Diana Jacqueline Pimentel González

Dedicatoria especial a:

*Aure y Mario por no perder nunca la fe en mí aun cuando yo la había perdido
y sobre todo, por todo el amor.*

Nei y Omar mis hermanos, por su comprensión y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS.

A CONACyT, por el parcial financiamiento a este proyecto a través del convenio U-45992-Z y por el apoyo brindado a través de la beca del Posgrado en Biotecnología de Universidad Autónoma Metropolitana.

Al Dr. Jaime Vernon Carter, por su apoyo, confianza y paciencia.

A mis sinodales por sus acertados comentarios en la revisión de este documento.

A mis compañeros del laboratorio T-166 por su ayuda, compañía y enseñanzas.

A Carmen por brindarme su amistad, ser mi cómplice y hacer mis ratos difíciles más sencillos.

A Diana y Ofelia, por guiarme en el camino correcto, por sus consejos y por compartir conmigo su experiencia y afecto.

A las amigas que me adoptaron, que me cuidan y me cuidaran siempre: Ariana, Francis, Iris, Inés y Rosa Iris.

A Temo por aparecer en el momento justo.

A todas aquellas personas que me brindaron su apoyo en algún momento aunque hayan estado de paso por mi vida.

A todos ustedes, *GRACIAS*.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Microorganismos probióticos	8
2.2 Beneficios a la salud asociados al consumo de probióticos.....	9
2.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	10
2.4 Vehículos para el consumo de microorganismos probióticos	11
2.5 Condiciones gastrointestinales y sobrevivencia de probióticos.....	12
2.6 Métodos de encapsulamiento de microorganismos probióticos en hidrocoloides.	13
2.7 Encapsulamiento por la técnica de extrusión.....	14
2.8 Agentes secuestrantes	15
2.9 Propiedades texturales.	16
2.9.1 Características primarias.....	17
2.9.2 Características secundarias.....	17
2.10 Métodos de medición instrumental de textura	17
2.11 Análisis de perfil de textura (APT)	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. HIPÓTESIS	22

6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1	Elaboración de cápsulas de alginato por el método de extrusión modificado	23
6.2	Caracterización de las cápsulas de centro líquido obtenidas.....	24
6.3	Condiciones de cultivo de <i>Lb. rhamnosus</i> en caldo MRS: obtención de la curva de crecimiento.....	24
6.4	Obtención de células de <i>Lb. rhamnosus</i> a microencapsular.....	25
6.5	Encapsulación de <i>Lb. rhamnosus</i> por el método de extrusión modificado.....	25
6.6	Efecto del proceso de encapsulamiento de <i>Lb. rhamnosus</i>	26
6.7	Eficiencia de encapsulación.....	26
6.8	Enumeración de <i>Lb. rhamnosus</i> entrampado en cápsulas de alginato de centro líquido.....	26
6.9	Evaluación de la viabilidad de <i>Lb. rhamnosus</i> encapsulado durante el almacenamiento.....	27
6.10	Sobrevivencia de <i>Lb. rhamnosus</i> en condiciones gastrointestinales simuladas.....	27
6.10.1	Enumeración de <i>Lb. rhamnosus</i> en pH ácido.....	27
6.10.2	Enumeración de <i>Lb. rhamnosus</i> en sales biliares de porcino.....	27
6.11	Propiedades texturales: Análisis de perfil de textura instrumental (APT).....	28
6.12	Microestructura de las cápsulas de centro líquido con <i>Lb. rhamnosus</i> entrampado.....	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
7.1	Elaboración de cápsulas de centro líquido.....	30
7.2	Cinética de crecimiento de <i>Lb. rhamnosus</i>	34
7.3	Efecto del proceso de encapsulamiento en la viabilidad de <i>Lb. rhamnosus</i>	36
7.4	Evaluación de la viabilidad de <i>Lb. rhamnosus</i> encapsulado durante el almacenamiento.....	37
7.5	Evaluación de la sobrevivencia en condiciones gastrointestinales simuladas.....	39

7.6	Propiedades texturales: Análisis de perfil de textura instrumental (APT).....	41
7.7	Microestructura de las cápsulas de centro líquido con <i>Lb. rhamnosus</i> atrapado...	43
8.	CONCLUSIONES	46
9.	PERSPECTIVAS	47
10.	BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Curva Fuerza-Tiempo del APT. Fuente: Bourne, 2002	19
Fig. 2	Cinética de crecimiento de <i>Lb. rhamnosus</i>	35
Fig. 3	Determinación de viabilidad durante el proceso de encapsulamiento.	36
Fig. 4	Cinética de almacenamiento de <i>Lb. rhamnosus</i>	39
Fig. 5	Sobrevivencia de las bacterias libres, cápsulas de centro sólido y cápsulas de centro líquido, bajo condiciones de pH ácido y sales biliares.	40
Fig. 6	Análisis de perfil de textura	41
Fig. 7	Micrografías de cápsulas de centro sólido: a) Pared de la cápsula, b) Centro de la cápsula, microscopía en condiciones de bajo vacío, c) centro de la cápsula microscopía en condiciones de alto vacío.....	44
Fig. 8	Micrografías de cápsulas de centro Líquido: a) Pared de la cápsula, b) Centro de la cápsula, microscopía en condiciones de bajo vacío, c) Centro de la cápsula microscopía en condiciones de alto vacío.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Microorganismos probióticos adicionados a derivados lácteos	12
<i>Tabla 2.</i> Características de algunos métodos de encapsulación de probióticos	14
<i>Tabla 3.</i> Tratamientos para la elaboración de cápsulas de alginato de centro líquido.	23
<i>Tabla 4.</i> Diámetro promedio y grosor de pared de cápsulas de centro líquido	31
<i>Tabla 5.</i> Parámetros cinéticos de la cinética de crecimiento de <i>Lb. rhamnosus</i>	35
<i>Tabla 6.</i> Eficiencia encapsulación	37
<i>Tabla 7.</i> Propiedades texturales de las cápsulas de centro sólido y líquido con <i>Lb. rhamnosus</i> atrapado	42

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped, siendo uno de estos microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* (Reid y col., 2003). Sin embargo, muchos estudios muestran que los probióticos tienen una baja viabilidad en productos lácteos, durante su almacenamiento y bajo condiciones gastrointestinales simuladas (Rao y col., 1989).

El uso de métodos de encapsulamiento empleando hidrocoloides como materiales de pared ha aumentado recientemente en la industria alimentaria, ya que mediante la microencapsulación se puede brindar protección a los microorganismos probióticos. La microencapsulación por extrusión es uno de los métodos más usados por su alta simplicidad y bajo costo; comúnmente se utilizan mezclas de alginato de sodio con un exceso de iones Ca^{++} , lo que conlleva a la gelificación total del alginato, produciéndose cápsulas completamente geladas con diámetros entre 1-4 mm y de textura rígida, lo que genera cierto grado de rechazo por parte de los consumidores. Para evitar esto, se buscó controlar la gelación del alginato de sodio mediante el uso de un secuestrador. Los secuestradores forman complejos quelados con iones metálicos polivalentes, en este caso con los iones Ca^{++} . Aquí utilizamos citrato de sodio, con el cual se limitó la reacción entre el alginato de sodio y los iones Ca^{++} , siendo posible el obtener cápsulas de centro líquido esféricas, con un diámetro promedio de $1.88 \pm 0.42 \text{ mm}$.

Se desarrollaron varias formulaciones que proporcionaron cápsulas de centro líquido, pero para este trabajo se eligió el tratamiento que brindó la cápsula con el menor diámetro y máximo centro líquido, de manera que se pudiera maximizar el número de células de *Lb. rhamnosus* a ser atrapadas. Resultó ser aquella donde se utilizaron las siguientes concentraciones: 1.0% p/v alginato de calcio, 0.08% p/v cloruro de calcio y 0.02% p/v de sodio. Las cápsulas de centro líquido resultantes tuvieron $1.37 \pm 0.25 \text{ mm}$ de diámetro y un grosor de pared $0.27 \pm 0.1 \text{ mm}$.

Lb. rhamnosus fue cultivado en caldo MRS, cosechado en la fase exponencial tardía de su crecimiento ($11.34 \log_{10} \text{ ufc ml}^{-1}$) y atrapado en cápsulas de centro líquido. La viabilidad de las células fue evaluada a través del proceso de encapsulamiento, durante el almacenamiento, y en condiciones gastrointestinales simuladas de manera secuencial, primero a pH 2.3 con ácido clorhídrico (HCl) y luego en la presencia de sales biliares de porcino al 0.3% p/v, comparando los resultados con aquellos obtenidos de cápsulas de centro sólido y con un control usando bacterias libres. También se evaluaron las características texturales de las cápsulas mediante un análisis de perfil de textura.

En las cápsulas de centro líquido el proceso de encapsulamiento provocó una disminución en la viabilidad de una concentración inicial de $11.34 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ a una concentración de $8.54 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$; mientras que en almacenamiento (evaluado por 25 días), produjo una disminución de células, que sin embargo, estuvo por arriba de la concentración mínima de ingesta recomendada ($6 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$). En condiciones gastrointestinales simuladas (pH ácido y sales biliares de porcino), la viabilidad de *Lb. rhamnosus* disminuyó de un número inicial de células de $8.54 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ a una concentración final de células de $7 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$.

Las cápsulas de centro líquido tuvieron una dureza significativamente menor, pero una cohesividad significativamente mayor, que las cápsulas de centro sólido. Estos dos parámetros texturales parecen estar íntimamente ligados a la percepción sensorial de los microencapsulados por parte de los consumidores. Una menor dureza y una mayor cohesividad resultan en una mejor aceptación. Una microestructura más relajada y abierta contribuyó a una menor dureza de los microencapsulados.

Se concluyó que es posible obtener cápsulas de centro líquido que protegen al microorganismo durante el proceso de encapsulación y bajo condiciones gastrointestinales simuladas, pero una protección superior durante el almacenamiento que las microcápsulas de centro sólido.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that when administered in adequate quantities may confer a health benefit to the host. *Lactobacillus rhamnosus* is considered a probiotic microorganism (Reid y col., 2003). Nevertheless, many studies show that probiotics possess low viability in dairy products, during storage, and under simulated gastrointestinal conditions (Rao, 1989).

The use of encapsulation methods using hydrocolloids as wall materials has increased in recent years in the food industry, seeking to protect the probiotic microorganisms. Microencapsulation by extrusion is one of the most widely used techniques because of its simplicity and low cost. Commonly mixtures of sodium alginate with an excess of Ca^{++} ions are used, so that a complete gelation of the hydrocolloid is achieved, resulting in the formation of solid beads that display diameters between 1-4 mm and exhibit a rigid texture, usually causing a certain degree of rejection by the consumers. The use of sequestrants has been proposed, in order to remedy this. Sequestrants form chelate complexes with polyvalent metal ions, in this case Ca^{++} ions. In this work sodium citrate was employed and the reaction between the sodium alginate and Ca^{++} ions was controlled, and liquid center spherical capsules with an average diameter of $1.88 \pm 0.42 \text{ mm}$ were obtained.

Several formulations were developed that provided capsules with liquid center, but the results reported were obtained with the treatment that produced the capsule with the smallest diameter, but with the larger liquid center was, so as to maximize the number of entrapped. This formulation was: sodium alginate 1.0 % p/v, chloride of calcium 0.08 % p/v and sodium citrate 0.02 % p/v, which yielded liquid center capsules with a diameter of $1.37 \pm 0.25 \text{ mm}$ and wall thickness $0.27 \pm 0.1 \text{ mm}$.

Lb. rhamnosus was grown in MRS culture, harvested in the exponential late growth phase ($11.34 \log_{10} \text{ ufc ml}^{-1}$), and entrapped in liquid center capsules. Cells viability was evaluated through the microencapsulation process, during storage, and under sequential simulated gastrointestinal conditions, first at pH 2.3 with chloridic acid, and afterwards, in the presence of pork biliar salts at 0.3 % w/v. These results were compared to the viability

results obtained with solid center capsules and with a control of free cells. The textural characteristics of the beads was also evaluated using Texture Profile Analysis.

In the liquid center capsules, the encapsulation process produced a viability decrease in the liquid center capsules of initial concentration of $11.34 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ at final concentration of $8.54 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$, while during the 25 days storage period viability was significantly decreased, but the viable cells count was above the recommended minimum intake concentration ($6.0 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$). Under simulated gastrointestinal conditions the initial number of cells decreased from $8.54 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ to a final cell count of $7 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$.

The textural properties of the liquid center capsules had a significantly lower hardness, but significantly higher cohesiveness, than the solid center capsules. Both of these textural characteristics seem to be closely related to the sensory perception by consumers. A lower hardness and higher cohesiveness usually result in a better acceptance. A more relaxed and open structure contributed to a lower hardness in the capsules.

It was concluded that the liquid center capsules offer the microorganism a protection during the microencapsulation process and when subjected to simulated gastrointestinal conditions, but better protection during storage, than the solid center capsules.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el enfoque de la nutrición está experimentando un cambio, por lo que la prioridad en investigación hoy en día se ubica en la relación entre la alimentación y las enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles. Los consumidores están cada vez más conscientes de su autocuidado y buscan en el mercado aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar pues reciben abundante información acerca de las propiedades de los alimentos, en especial de aquellos alimentos que ejercen una acción benéfica sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Estos alimentos, que promueven la salud, han sido denominados alimentos funcionales. Son alimentos con la característica particular de que algunos de sus componentes afectan las funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico más allá de su valor nutritivo tradicional (Diplock y col., 1999).

Entre los alimentos funcionales se encuentran aquellos productos adicionados con microorganismos probióticos. Los productos adicionados con microorganismos probióticos son considerados como alimentos funcionales, los microorganismos probióticos se definen como “microorganismos vivos los cuales, cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped” (Reid y col., 2003). Uno de estos microorganismos es *Lb. rhamnosus* que es una bacteria anaerobia facultativa, heterofermentativa que produce ácido láctico y etanol bajo condiciones anaerobias (Narayanan y col., 2004), cuya evidencia permite afirmar que actúa como agente probiótico debido a sus mecanismos de inhibición del crecimiento y adhesión de patógenos a nivel intestinal (McCracken y Gaskins, 1999). Sin embargo, el número de bacterias viables disminuye durante el procesamiento y debido a condiciones de almacenamiento del alimento que las contiene, así mismo después de su ingesta a través del paso gastrointestinal (GI) debido a la acción de jugos gástricos y sales biliares. Para solucionar esta situación, algunas técnicas de protección se han utilizado, la microencapsulación ha

sido reconocida como una alternativa para aumentar la resistencia del microorganismo a ambientes ácidos, durante su almacenaje y al transitar por la extensión GI (Anal y Singh, 2007).

La microencapsulación es un proceso en que las células se retienen dentro de una matriz o membrana semipermeable, con un diámetro que varía entre micras y milímetros. Para su elaboración se emplean algunos polímeros de calidad alimenticia como los alginatos (Krasaekoopt y col., 2003). Los beneficios asociados a la microencapsulación son protección de las células contra bacteriófagos (Steenon y col., 1987), incremento de la sobrevivencia (Sung, 1997), aumento del tiempo de vida de anaquel y estabilidad durante el almacenamiento (Kebary y col., 1998).

La extrusión es una de las técnicas de microencapsulación aplicadas a probióticos e incrementa la sobrevivencia de bacterias probióticas en un 80-95%, además es un método fácil, simple y de bajo costo (Kebary y col., 1998). El material de soporte usado para la extrusión es el alginato de sodio (Alg-Na). Para elaborar las cápsulas, las células se mezclan con una dispersión de Alg-Na, y la mezcla se gotea en una disolución endurecedora de cationes multivalentes (normalmente en forma de cloruro de calcio, CaCl_2) formando un gel unido iónicamente, alginato de calcio (Alg-Ca).

Mezclas de alginato hidratado con iones de calcio son de rápida gelificación al momento de formar cápsulas con microorganismos en su interior, una herramienta para controlar la reacción del alginato/calcio, se da mediante agentes secuestrantes. El secuestro de iones es un fenómeno en que la precipitación de un catión metálico se impide por la formación de un complejo del catión-secuestrador. El Citrato de sodio se ha usado tradicionalmente en la industria alimenticia para secuestrar eficazmente iones de Calcio y permite el control exitoso de la gelación de Alg-Na en Alg-Ca, permitiendo durante el encapsulamiento la formación de cápsulas de centro líquido (Irani y Callis, 1962).

Las cápsulas obtenidas al controlar la gelación del Alg-Na en Alg-Ca cambiarán las propiedades texturales del producto que los contenga, por lo que es necesaria la medición objetiva de estas propiedades a través de pruebas mecánicas como lo es el análisis de perfil de textura (APT). Estas características surgen del arreglo macro y microestructural de sus

componentes, este arreglo está relacionado con la deformación, la desintegración y el flujo del material bajo una fuerza, y se miden objetivamente a través de funciones de masa, tiempo y distancia (Lobato y col., 2000).

En base a lo anterior este trabajo propone controlar la gelación del alginato mediante la adición de un secuestrador de iones calcio para la elaboración de cápsulas de alginato de centro líquido que mantengan la viabilidad de *Lb. rhamnosus*, durante su almacenamiento, lo protejan en condiciones gastrointestinales simuladas y mejoren sus características texturales comparadas con cápsulas de centro sólido.

2. ANTECEDENTES

2.1 Microorganismos probióticos

El consumo de probióticos se remonta a miles de años atrás y los trabajos de Metchnikoff, fueron la primera prueba de la habilidad de los lactobacilos de transformar lactosa en ácido láctico, y que dicha acidez mantendría un ambiente hostil para las bacterias patógenas, y que los beneficios del consumo de los mismos se veía reflejado en la longevidad de las personas que consumían estos lactobacilos en leches fermentadas (Metchnikoff, E., 1908). Con estos antecedentes los probióticos fueron definidos por Fuller (1992) como microorganismos vivos que cuando son ingeridos tienen efectos benéficos. Por otra parte, han sido definidos como "microorganismos vivos que transitan en el tracto gastrointestinal y generan beneficios a la salud del consumidor" (Tannock y col, 2000). Estas definiciones coinciden en que las bacterias probióticas deben estar vivas para conferir beneficios a la salud (Kailasapathy y Chin, 2000).

Recientemente los probióticos por consenso internacional, han sido definidos como "microorganismos vivos los cuales, cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped" (Reid y col., 2003). Los principales microorganismos probióticos usados comúnmente son los pertenecientes al género de *Lactobacillus* y *Bifidobacteriu*, otro microorganismo identificado como probiótico es *Sacharomyces boularddi* la única levadura probiótica (Tamime y col., 2005). Sin embargo, las bacterias ácido lácticas son las más comúnmente usadas como probióticos.

Es así como, algunas bacterias ácido lácticas del género de los *Lactobacillus* son consideradas probióticas y también son las iniciadoras más comunes de la fermentación ya que crecen naturalmente en la leche, además durante las últimas dos décadas y debido a los beneficios recibidos, las bacterias probióticas son cada vez más incluidas en yogures y leches fermentadas. Las bacterias ácido lácticas son microorganismos gram-positivos, no esporulados, anaerobios facultativos o aerotolerantes, ácido tolerantes y estrictamente fermentativos, siendo el ácido láctico el principal producto de la fermentación de los azúcares (Axelsson, 1998).

Un microorganismo probiótico debe poseer algunas características, entre ellas es que deben ser capaces de llegar vivos a su sitio de acción, es decir, deben sobrevivir a través del tracto gastrointestinal (tolerancia a la acidez del estómago y sales biliares durante su paso por el tracto GI) (Mattila-Sandholm, 1999; Gardiner y col., 2002).

Los microorganismos probióticos también deben ser capaces de llegar vivos a su sitio de acción, ser capaces de colonizar la mucosa intestinal, deben carecer de patogenicidad y toxicidad, y ser resistentes a antibióticos. Algunos aspectos funcionales incluyen la inmunomodulación (modular la respuesta inmune del hospedero), propiedades antagonistas a través de la exclusión competitiva y propiedades antimutagénicas (van der Wielen y col., 2002). Algunos aspectos tecnológicos que se deben considerar de un microorganismo probiótico son: que proporcione buenas propiedades sensoriales, resistencia a fagos, viabilidad durante el procesamiento y estabilidad durante el almacenamiento (Morgensen y Friis, 1997).

2.2 Beneficios a la salud asociados al consumo de probióticos

Es importante mencionar que los beneficios que el consumo de probióticos brindan, dependen en primer lugar de que éstos sean sumamente viables en el producto donde se incluirán, que sobrevivan durante su procesamiento y en condiciones de almacenamiento, en segundo lugar éstos se deben ingerir en las cantidades adecuadas alcanzando el número adecuado de microorganismos que permitan ejercer resistencia sobre otros microorganismos patógenos, este equilibrio se logra mediante la generación de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos, metabolitos como peróxido de hidrógeno y diacetilo, entre otros (Tamime y col., 1995).

Varios son los efectos benéficos atribuidos a las bacterias probióticas, se listan a continuación:

- Modulación de la flora intestinal
- Modulación de la respuesta inmune

- Disminución de la actividad enzimática fecal
- Alivio del estreñimiento
- Incremento en el contenido fecal de ácidos grasos.
- Reducción, prevención y tratamiento de varias enfermedades asociadas a la diarrea:

Diarrea asociada al consumo de antibióticos

Diarrea infecciosa (diarrea aguda viral, la diarrea del viajero)

- Tratamiento y prevención de las alergias
- Efectos positivos sobre el cáncer cervical (Saarela y col., 2000).

Por desgracia debido a las condiciones sumamente ácidas del estómago y sales biliares en el intestino delgado, el alcanzar el número de células adecuado para llegar al equilibrio antes mencionado representa un gran problema. En Japón, se ha desarrollado un estándar en el cuál se requiere un mínimo de 10^7 unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo viables presentes en productos lácteos (Robinson, 1987), mientras que en algunos países latinoamericanos se estableció un contenido mínimo de 10^6 ufc g^{-1} de bifidobacterias para leches fermentadas (Pagano, 1998), y de 10^6 ufc g^{-1} de bacterias probióticas en yogur sugerido por Kurman y Rasic (1991).

2.3 *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus es una bacteria anaerobia facultativa, heterofermentativa que produce ácido láctico y etanol bajo condiciones anaerobias (Narayanan y col., 2004). Armuzzi y col. (2001), en un estudio para la erradicación de la infección causada por *Helicobacter pylori*, causante de la gastritis crónica y del incremento de los riesgos de la úlcera péptica y cáncer gástrico, encontraron que el uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) como terapia probiótica en conjunto con un tratamiento de erradicación a partir de antibióticos, redujo la inflamación, disturbios de sabor y diarrea. *Lb. rhamnosus* muestra una actividad protectora contra infecciones asociadas a *Escherichia coli*, por su efecto

inhibitorio contra la colonización de esta cepa entero-tóxica (cepa O157:H7), demostrando que el número de células de *E. coli* se redujo, debido a las moléculas secretadas en el medio por la bacteria probiótica, que le confieren una acción sinergista del ácido láctico y sustancias proteínicas producidas por *Lb. rhamnosus* (Myllyluoma y col., 2005).

Algunos reportes han mostrado que *Lb. rhamnosus* es un agente probiótico para el tratamiento y prevención de infecciones urogenitales en mujeres, mediante mecanismos de inhibición del crecimiento y adhesión de patógenos, dando evidencia de inmunomodulación por probióticos (McCracken y Gaskins, 1999; Reid, 1999; Reid, 2001).

2.4 Vehículos para el consumo de microorganismos probióticos

Durante las últimas dos décadas han surgido los llamados alimentos funcionales, considerados como aquellos que, además de aportar los nutrientes recomendados, ejercen efectos benéficos sobre una o más funciones del organismo, fomentan la salud y reducen el riesgo a contraer enfermedades (Functional Food Science in Europe, 1998). Japón fue el primer país en introducir en el etiquetado de sus productos el término de “alimento funcional” a finales de la década de 1980, y en estos momentos sus productos representan el 50% del mercado mundial (Stanton y col., 2001).

Los alimentos adicionados con microorganismos probióticos constituyen uno de los subgrupos más destacados dentro de los alimentos funcionales. Las principales bacterias probióticas *Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium spp.* han sido tradicionalmente utilizadas en diversas fermentaciones alimentarias. Hoy en día, los yogures y leches fermentadas constituyen los principales vehículos para el aporte de probióticos, ya que, además de las propiedades funcionales de las bacterias inoculadas, estos alimentos tienen gran aceptación en los distintos sectores de la población y son fáciles de digerir.

Los probióticos han sido incorporados en diferentes alimentos para su comercialización, los más comunes son los productos lácteos como yogures (Picot y Lacroix, 2004), leche

pasteurizada, fórmulas lácteas (Tamime y col., 1995), y quesos (Godward y Kailasapathy, 2003), pero además se comercializan los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas (ver Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos probióticos adicionados a derivados lácteos

Cepa probiótica	Tipo de producto	Nombre comercial	País
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Bebida probiótica, yogur	Chamyto, Nestlé	Suiza
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Yogur bebible, queso fresco	SanCor Nestlé	Europa
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Yogur dietético, bebida probiótica	LC1, Nestlé Yoplait	América
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Bebida probiótica	Yakult	Japón
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Queso fresco	Bioqueso Ilolay Vita	España
<i>Bifidus essensis</i>	Yogur bebible	Bio-Fibra	Europa
<i>Bifidus</i> BB y BL	Leche en polvo para bebés	Nestum, Nestlé	
<i>Lactobacillus lactis</i> L1A	Yogur	Essum AB	Suecia

Holzapfel y col. 2001, Shah, 2007.

Sin embargo el número de bacterias viables disminuye durante el procesamiento y debido a las condiciones de almacenaje del alimento que las contiene; además tienen poca tolerancia a la exposición a ambientes sumamente ácidos y aireados (Muthukumarasamy, y col., 2006),

2.5 Condiciones gastrointestinales y sobrevivencia de probióticos

El aparato digestivo se extiende desde la boca hasta el ano, su función consiste en recibir los alimentos, fraccionarlos en sus nutrientes (digestión), absorber dichos nutrientes hacia el flujo sanguíneo y eliminar del organismo los restos no digeribles de los alimentos.

En el estómago los alimentos que tienen contenido proteínico se digieren mediante la secreción de aproximadamente 2.5 l de jugos gástricos al día donde el pH se encuentra entre 1.5 a 3.5, esta condición representa un importante mecanismo de defensa. De acuerdo a algunos estudios sobre el efecto del pH gástrico reportan que los microorganismos se enfrentan a estrés por alta acidez a pH entre 1 y 2 por 3 h (Carteris, y col., 1998, Fernández, y col., 2003).

En el intestino delgado se lleva a cabo la digestión enzimática y la absorción de nutrientes, los factores más importantes que influyen sobre la viabilidad de microorganismos probióticos son la motilidad intestinal y el efecto inhibitorio de las sales biliares. Las sales biliares son una compleja solución acuosa de componentes orgánicos e inorgánicos secretados por el hígado. La resistencia a esta condición es uno de los criterios principales para la selección de microorganismo probióticos, cada especie tiene variaciones respecto a la tolerancia a sales biliares (Gopal, y col., 2001)

Después de la ingestión de bacterias probióticas a través del paso GI la viabilidad de los microorganismos disminuye debido a la acción de jugos gástricos, enzimas digestivas y sales biliares del intestino delgado por lo tanto, se demerita su funcionalidad al no proporcionar la concentración de microorganismos mínima recomendada (Anal y Singh, 2007).

2.6 Métodos de encapsulamiento de microorganismos probióticos en hidrocoloides

Una alternativa para mantener la viabilidad de los probióticos en su paso por el tracto intestinal y durante el almacenamiento, es la inmovilización de las bacterias en una matriz protectora o también llamada microencapsulación. La microencapsulación es un proceso en que las células se retienen dentro de una matriz o membrana, donde una microcápsula consiste en una membrana semipermeable, esférica, ligera, y fuerte que rodea un centro sólido/líquido, con un diámetro que varía entre micras a milímetros. Para su elaboración con estas tecnologías se emplean algunos biopolímeros de calidad alimenticia como el alginato, el quitosano, la carboximetilcelulosa, carragenina, grenetina y pectina principalmente (Krasaekoopt y col., 2003).

La protección de probióticos por encapsulamiento en hidrocoloides ha sido estudiada para mejorar la viabilidad en productos alimenticios. Y se ha propuesto para procesos fermentativos lácteos, además la inclusión de células por microencapsulación otorga beneficios adicionales: protección de las células dentro de las cápsulas contra bacteriófagos (Stenson y col., 1987), incremento de la sobrevivencia durante la liofilización y congelamiento (Sung, 1997), aumento del tiempo de vida de anaquel y estabilidad durante el almacenamiento (Kebary y col., 1998).

La elección de la técnica de encapsulación aplicadas a probióticos dependerán de factores como: simplicidad, tamaño de la partícula y costo (Tabla 2). Por ello, son clasificadas en dos grupos, dependiendo del método usado para formar las cápsulas: extrusión (método de goteo) y técnicas de emulsionamiento, ambos incrementan la sobrevivencia de bacterias probióticas de un 80-95% (Kebary y col., 1998).

Tabla 2. Características de algunos métodos de encapsulación de probióticos

Método	Extrusión	Emulsionamiento	Secado por Aspersión
Simplicidad	Alta	Baja	Baja
Costo	Bajo	Alto	Alto
Sobrevivencia de microorganismos	80-95%	80-95%	<70%
Tamaño de cápsula	2-5 mm	25µm-2mm	10µm

Kebary, 1998; Krasaekoopt, 2003.

2.7 Encapsulamiento por la técnica de extrusión

La extrusión es la forma más vieja y común utilizada para formar cápsulas utilizando hidrocoloides (King, 1995). Este método es muy popular debido a que es fácil, simple, de bajo costo, que garantiza alta retención de células viables. El material de soporte usado para la extrusión es el Alg-Na que es un heteropolisacárido de ácido D-mannurónico y L-gulurónico extraído de varias especies de algas (Draget, 2000). Las propiedades funcionales

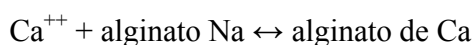
del Alg-Na están fuertemente relacionadas con la composición y secuencia de ácido L-gulurónico y D-mannurónico. Cationes divalentes como el Ca^{++} se unen preferencialmente por el polímero de ácido L-gulurónico. La longitud del polímero de ácido D-mannurónico es su mayor rasgo estructural y contribuye a la formación de un gel (Hoefer, 2004, Krasaekoopt, y col. 2004).

Para formar las cápsulas, las células se mezclan en una dispersión con Alg-Na, y la mezcla se gotea en una disolución endurecedora de cationes divalentes (normalmente en forma de cloruro de calcio, CaCl_2). Las gotas forman las esferas de gel instantáneamente, entrapando las células en una red tridimensional de Alg-Ca unido iónicamente. Las concentraciones de Alg-Na para formar el gel varían; Jankowski y col. (1997) usaron una concentración de 0.6% p/v para formar un gel con 0.3 M CaCl_2 . Otros autores usan concentraciones de alginato de 1–2% y 0.05–1.5 M CaCl_2 . El tamaño de las cápsulas es aproximadamente 2–5mm de diámetro. El tamaño y esfericidad de la cápsula dependen principalmente de la viscosidad de la dispersión del Alg-Na y la distancia entre la jeringa y la disolución colectora de CaCl_2 . Conforme aumenta la concentración y la viscosidad del Alg-Na, el tamaño de las cápsulas disminuye. El diámetro de orificio de la jeringa es otro factor importante que regula el tamaño de la gota (Smidsrød y Skjak-Braek, 1990). La composición del alginato también influye en el tamaño de la cuenta; cápsulas pequeñas son el resultado de alginatos con baja proporción de ácido gulurónico (Martinsen y col., 1989).

2.8 Agentes secuestrantes

Mezclas de alginato hidratado con iones de calcio son de muy rápida gelificación, lo equivalente a mezclar dos líquidos para una consolidación epoxi. Las variables que permiten regular la reacción gelación de Alg-Na en presencia de iones Ca^+ son: agentes secuestrantes, temperatura, proporciones de solubilidad de las sales de Ca, pH y varias combinaciones de estas variables son los medios de control más usados.

Polifosfato de sodio y citrato de sodio se han usado tradicionalmente en la industria alimenticia para secuestrar eficazmente iones de calcio y de magnesio. El secuestro es un fenómeno en que la precipitación de un catión metálico se impide por la formación de un complejo del catión-secuestrador (Irani y Callis, 1962). Según Van Waser y Callis (1958), la cantidad de Ca^{++} necesaria para producir la gelación de alginato se relaciona directamente con la solubilidad y longitud de la cadena del secuestrador de fosfato usado. Así, en este caso la cantidad de Ca^{++} necesaria para formar el precipitado aniónico apenas discernible, es dependiente del equilibrio de dos reacciones competitivas:



El control exitoso durante el tiempo de la reacción es uno de las ventajas de la técnica de secuestro de iones.

2.9 Propiedades texturales.

Las propiedades texturales de un material, son un grupo de características físicas que surgen del arreglo macro y microestructural de sus componentes, este arreglo está relacionado con la deformación, la desintegración y el flujo del material bajo una fuerza, y se miden objetivamente a través de funciones de masa, tiempo y distancia (Lobato y col., 2000).

- a) Atributos geométricos son aquellos relacionados con la forma o la orientación de las partículas del alimento, como por ejemplo: granulosis, cristalinidad, porosidad y fibrosidad, entre otros.
- b) Atributos de composición aparentemente indican la presencia de algún componente del alimento, como serían la humedad, la grasosidad, harinosidad, etc (Anzaldúa, 1994).
- c) Atributos mecánicos son aquellos que indican el comportamiento mecánico del alimento ante la deformación, y pueden a su vez, dividirse en primarios y

secundarios: Los primarios son los que se correlacionan con una propiedad mecánica tal como la fuerza, deformación o energía, mientras que los secundarios son el resultado de la combinación de características primarias.

2.9.1 Características primarias

- **Dureza:** Fuerza necesaria para alcanzar una deformación determinada.
- **Cohesividad:** Grado máximo de deformación de un material antes de romperse.
- **Viscosidad:** Resistencia de un líquido a fluir cuando se aplica una fuerza.
- **Elasticidad:** Proporción a la que un material deformado regresa a su condición inicial después de retirar la fuerza deformante.
- **Adhesividad:** Trabajo necesario para vencer las fuerzas de atracción entre la superficie del alimento y la superficie de los otros materiales con el que el alimento entre en contacto.

2.9.2 Características secundarias

- **Fracturabilidad:** Fuerza con la cual se fractura un material. Relacionada con los parámetros de dureza y cohesividad.
- **Masticabilidad:** Energía requerida para masticar un alimento hasta que esté listo para ser deglutido (como una combinación de dureza, cohesividad y elasticidad).
- **Gomosidad:** Energía requerida para desintegrar un alimento semisólido a un estado listo para deglutirlo (como una combinación de alta adhesividad y baja dureza) (Szczesniak, 1998)

2.10 **Métodos de medición instrumental de textura**

La importancia de las pruebas sensoriales radica directamente de los consumidores; sin embargo, su aplicación requiere del entrenamiento de un panel de jueces, y representa un costo elevado (Porkony y col., 1984). Por el contrario, la determinación instrumental de las características texturales de los alimentos, es de carácter objetivo y presenta ventajas tales como reproducibilidad por la obtención de datos con dimensiones físicas concretas, capacidad

de medición y determinación solamente de las características texturales del alimento (Aguilera y Stanley, 1990).

La medición instrumental de la textura fue propuesta para superar los inconvenientes y limitantes de la evaluación sensorial (Anzaldúa, 1994). El equipo para analizar textura es un instrumento multifuncional, como es el caso del texturómetro TA-XT2i. Aparato de alta sensibilidad que genera resultados reproducibles (Ramírez, 2002). El analizador de textura TA-XT2i comprende un brazo vertical movable, en el cual se coloca una celda de carga con un rango de medición de hasta 5 k, y una resolución de ± 0.1 g. La velocidad de prueba se define en un rango de 0.1 a 10 mm s⁻¹. Durante el procedimiento, pueden determinarse la longitud de la trayectoria y la velocidad de compresión (Cordes y col., 1994).

2.11 Análisis de perfil de textura (APT)

El Análisis instrumental de Perfil de Textura (APT) es un análisis ampliamente utilizado, debido a que a partir de curvas de fuerza-tiempo se obtienen ocho características texturales, cinco primarias y tres calculadas o secundarias, que han mostrado buena correlación con los atributos sensoriales de textura respectivos, esto es posible porque en el APT se imitan las condiciones a las que se somete al alimento durante su ingestión, donde una muestra de alimento es sometida a compresión en dos ciclos consecutivos (Bourne, 2002).

El APT efectuado con el texturómetro, arroja una curva fuerza-tiempo donde se observa que la fuerza aumenta hasta que ocurre un rompimiento en la estructura del material que está siendo analizado, marcado por una caída en la magnitud de la fuerza (ver Fig.1). La altura de este pico representa la fracturabilidad (F1).

El rompimiento del material continúa con un incremento de fuerza, hasta que termina una primera compresión y comienza el retorno. La máxima altura de esta parte de la curva corresponde a la dureza (F2) de la muestra. Con el retorno, la fuerza disminuye a cero y aparece una fuerza de tensión originada por la adhesividad (A3), hasta que la placa superior se desprende de la muestra y la fuerza llega nuevamente a cero. A partir de este punto

comienza el segundo ciclo de compresión. La primera sección transcurre a fuerza cero porque el producto no se recupera totalmente, cuando la placa entra en contacto por segunda vez con el alimento, la fuerza se eleva de nuevo en una curva continua hasta que el recorrido se completa y comienza de nuevo el retorno.

La recuperación entre el primero y el segundo ciclo es una medida de la elasticidad ($L2/L1$). La cohesividad es la relación de las áreas de trabajo efectuado por la máquina en el segundo y en el primer ciclo (cohesividad = $A2/A1-1$). La gomosidad es igual a la dureza por la cohesividad, y es una función de fuerza (gomosidad = $(F2) A2/A1-1$). Masticabilidad es igual a la dureza por la cohesividad por la elasticidad y es una función de trabajo (masticabilidad = $(F2)(A2/A1-1)$ (elasticidad) (Szczesniak, 1998).

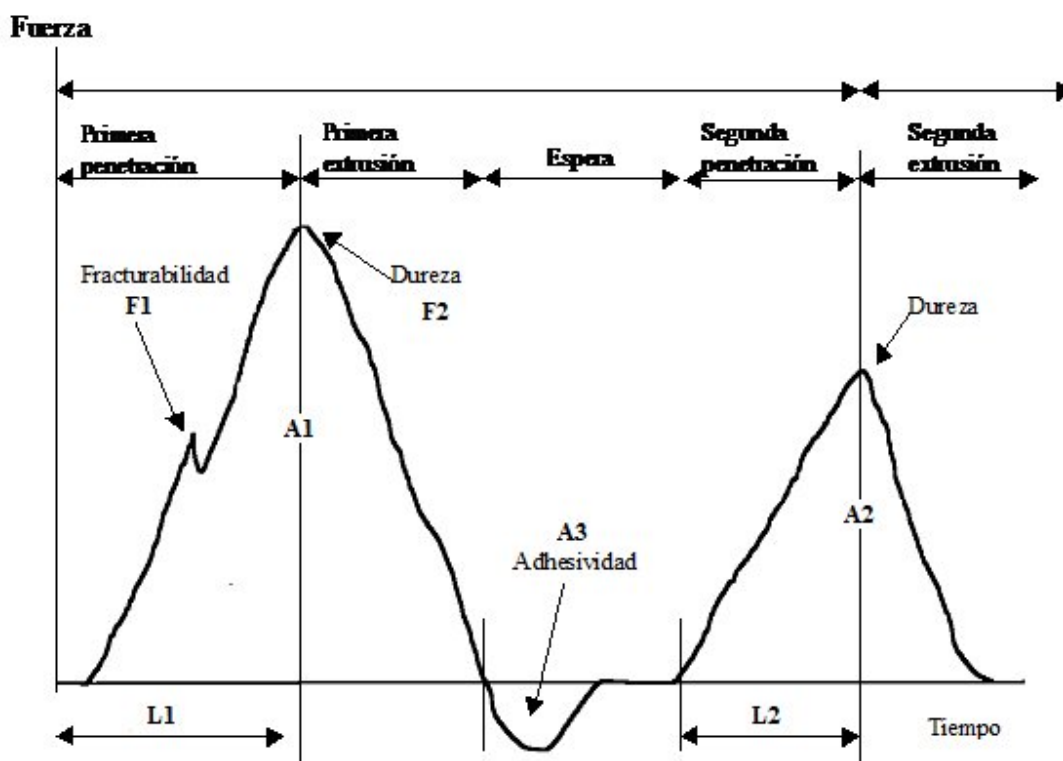


Fig. 1 Curva Fuerza-Tiempo del APT. Fuente: Bourne, 2002

3. JUSTIFICACIÓN

El incremento de enfermedades gastrointestinales por factores como una mala alimentación, tratamientos con antibióticos y estrés debido a la vida sedentaria actual, ha llevado a la investigación biotecnológica a profundizar en el estudio de medios y procesos que permitan mejorar y aumentar la flora microbiana en los seres humanos. Las bacterias probióticas han mostrado tener un efecto benéfico en la reducción de las enfermedades de tipo gastrointestinal interviniendo por ejemplo en la reducción de problemas como intolerancia a la lactosa e incluso están relacionadas con la estimulación del sistema inmunológico. Sin embargo, la mayoría de los alimentos incorporados con probióticos tienen problemas para mantener la cantidad mínima recomendada de microorganismos en un alimento ($\log_{10} \text{ufc g}^{-1}$), para ejercer eficazmente su función en el organismo. Uno de los procesos cuyo objetivo es permitir la sobrevivencia de estos microorganismos es la encapsulación de bacterias probióticas para que mediante el consumo de estos encapsulados se contribuya a la salud, mejorando la digestión y aumentando la microflora natural.

En la industria alimentaria se utilizan diversos métodos de encapsulamiento como es el método de extrusión; sin embargo las cápsulas producidas presentan la desventaja de que son rígidas lo que las hace perceptibles por los consumidores. Por lo se propone encapsular a *Lb. rhamnosus* por el método de extrusión para obtener cápsulas de centro líquido mediante el uso de un secuestrador de iones Ca^{++} , de manera que permita mantener su viabilidad durante el almacenamiento, asegurar que el microorganismo sobreviva a través del tracto digestivo para que lleguen viables hasta su sitio de acción (el colon) y que el centro líquido confiera características texturales deseables para su aceptación sensorial por los consumidores.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener cápsulas de alginato de centro líquido que mantengan la viabilidad de *Lb. rhamnosus*, durante su almacenamiento, lo protejan en condiciones gastrointestinales simuladas y mejoren sus características texturales comparadas con cápsulas de centro sólido.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer las concentraciones adecuadas de Alg-Na, CaCl₂ y Cit-Na para crear cápsulas de centro líquido.
- Evaluar la viabilidad de *Lb. rhamnosus* encapsulado en cápsulas de centro líquido durante el almacenamiento.
- Evaluar la viabilidad de *Lb. rhamnosus* encapsulado al someterlo a condiciones gastrointestinales simuladas.
- Evaluar las propiedades texturales de las cápsulas de centro líquido.

5. HIPÓTESIS

La elaboración de cápsulas de alginato de centro líquido, permitirá mantener la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* durante el almacenamiento y protegerlo bajo condiciones gastrointestinales simuladas; presentando características texturales diferentes a las cápsulas de alginato de centro sólido.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Elaboración de cápsulas de alginato por el método de extrusión modificado

Se elaboraron cápsulas de alginato de calcio de centro líquido (Alg-Ca) mediante la adición de un secuestrador de iones (citrato de sodio, Cit-Na 99.93% de pureza, J.T. Baker); por el método de extrusión modificado basados en Krasaekoopt y col. (2003) y Muthukumarasamy y col. (2006). A temperatura ambiente se hizo gotear una dispersión acuosa de alginato de sodio (Alg-Na, 60.5% ácido gulurónico, Grindsted, Danisco) pasteurizado a 63°C durante 30 min, en volúmenes de 50 ml (usando una bomba peristáltica Cole-Parmer, Di=1 mm, Flujo aprox. 3 ml/min), dentro de 100 ml de disolución de cloruro de calcio (CaCl₂, 91% pureza, J.T. Baker), agitada a velocidad constante de 100 rpm, colocada en un matraz kitasato con una inclinación de 45°.

Las cápsulas se elaboraron manteniendo fija la concentración de 1% p/v de Alg-Na y variando las concentraciones CaCl₂ y la concentración de Cit-Na (Jankowski y col., 1997), de acuerdo a los tratamientos que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos para la elaboración de cápsulas de alginato de centro líquido.

Tratamiento	CaCl ₂ (% p/v)	Cit-Na (% p/v)
1	0.02	0.2
2	0.02	0.4
3	0.02	0.6
4	0.05	0.2
5	0.05	0.4
6	0.05	0.6
7	0.08	0.2
8	0.08	0.4
9	0.08	0.6
10	0.1	0.2
11	0.1	0.4
12	0.1	0.6

Las cápsulas obtenidas fueron filtradas (en malla de acero inoxidable de 0.19 mm de diámetro), lavadas con solución fisiológica de cloruro de sodio 0.08% p/v estéril, a 20°C por 3 min, después fueron sumergidas en una dispersión 0.3% p/v de Alg-Na durante 5 min, una vez transcurrido este tiempo las cápsulas fueron filtradas y lavadas con solución fisiológica, después almacenadas en solución fisiológica a 4°C ± 0.5°C durante 12 h después de este tiempo se procedió a caracterizar las cápsulas como se describe en el apartado siguiente.

6.2 Caracterización de las cápsulas de centro líquido obtenidas.

Para determinar el tamaño, morfología y grosor de pared de las cápsulas, se midió el diámetro de veinte cápsulas por medio de un micrómetro (Starrett, No. 436-1 IN, México) después de 1 día de elaboradas para cada tratamiento y se calculó el diámetro medio y la desviación estándar.

Se observó la forma de las cápsulas cortadas por la mitad sumergidas en metanol (99.8% de pureza, J.T. Baker) por 3 min para endurecer la pared de la cápsula, en un microscopio óptico con contraste de fases Olympus BX45 (Olympus Optical Co. LTD, Japón) y se tomaron microfotografías de las cápsulas de forma aleatoria a una amplificación de 4× con una cámara digital Camedia C-3030 (Olympus Optical Co. LTD, Japón). Éstas se analizaron con el software Motic Images Plus, 2.0, (Motic China Group Co., Ltd.), se determinó el grosor de pared tomando 3 puntos del diámetro exterior e interior donde la diferencia de ellas denominado para este fin “grosor de pared” se reportó. Los resultados para los parámetros fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc. an IBM Company, Chicago Illinois, 2006).

6.3 Condiciones de cultivo de *Lb. rhamnosus* en caldo MRS: obtención de la curva de crecimiento.

Se determinó la curva de crecimiento de *Lb. rhamnosus* proporcionado en forma liofilizada por HOLDBAC™ (DANISCO, Niebüll, Alemania). El cultivo se activo hidratando con 1% p/v de inóculo usando como medio de cultivo caldo de Man, Rogosa y Sharpe (de Man y col. 1960), BD DIFCO Beton Dickinson and Company Sparks, EUA) (55g/L) estéril

(121°C, 15min), y fue incubado a $37\pm 2^\circ\text{C}$ en una estufa de incubación (Blue M., Electric Company, Illinois, EUA) por 36 horas sin agitación y sin control de pH (Song y col., 2003, Sandoval-Castilla y col., 2009). El microorganismo se subcultivó en las mismas condiciones usando 1% v/v de inóculo (200 μl) de solución proveniente de la primera activación en 20 ml de caldo MRS fresco, para obtener los parámetros cinéticos del microorganismo, con la finalidad de localizar la etapa final de la fase logarítmica para cosechar las células y encapsular. Además se midió el pH durante la cinética (Pimentel-González, 2009). Todos los experimentos se realizaron por duplicado

Los datos experimentales obtenidos de la curva de crecimiento se analizaron mediante el software GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) ajustándose al modelo de Gompertz descrito por la siguiente ecuación:

$$Y = (N_0 + C * \exp(-\exp(2.718 * \mu / C) * (\lambda - X) + 1)))$$

Donde: N_0 , número inicial de microorganismos; C , diferencia entre concentración inicial y final de microorganismos; μ , velocidad específica de crecimiento; λ , fase de latencia.

6.4 Obtención de células de *Lb. rhamnosus* a microencapsular.

Las bacterias fueron cosechadas durante la fase exponencial tardía y centrifugadas a 15000 rpm por 10 min en una centrífuga minispin plus (Eppendorf Centrifuge Type 22331, Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). El sobrenadante fue desechado y las células concentradas fueron diluidas en 5 ml de caldo MRS fresco y estéril, obteniendo una concentración celular de $11.34 \log_{10} \text{ufc ml}^{-1}$, de acuerdo al método descrito por Pimentel-González y col., (2009).

6.5 Encapsulación de *Lb. rhamnosus* por el método de extrusión modificado.

Se prepararon las cápsulas con 1% v/v de inóculo con el método de extrusión modificado descrito anteriormente en el punto 6.1 a partir de dispersiones pasteurizadas de 1% p/v de

Alg-Na y 0.08 % p/v CaCl₂, tanto en cápsulas geladas completamente, denominadas como cápsulas de centro sólido y en las cápsulas elaboradas adicionando a la formulación anterior 0.02% p/v de Cit-Na, denominadas cápsulas de centro líquido.

6.6 Efecto del proceso de encapsulamiento de *Lb. rhamnosus*.

Se realizó conteo en placa de ufc usando agar MRS en 3 etapas del proceso de encapsulamiento para verificar si existe diferencia en el número de ufc inicial y final durante la elaboración de las cápsulas. Tomando muestras de la dispersión de Alg-Na con el concentrado celular antes de extraer, después del bombeo, y al final de los lavados a las cápsulas elaboradas. Todas las placas fueron incubadas a 35±2°C durante 48 h, realizando el conteo de las colonias formadas en cada caso (Ravula y Shah, 1998; Corcoran y col., 2004)

6.7 Eficiencia de encapsulación.

La eficiencia del entrapamiento se expresa como el porcentaje de células viables entrapadas por la técnica de extrusión. Este parámetro fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de entrapamiento} = A/B \times 100$$

Donde, A=ufc de *Lb. rhamnosus* g⁻¹de cápsulas y B= ufc de *Lb rhamnosus* g⁻¹de la dispersión del biopolímero antes del encapsulamiento (Reid, 2005).

6.8 Enumeración de *Lb. rhamnosus* atrapado en cápsulas de alginato de centro líquido.

Un gramo de cápsula se sumergió en una solución de Cit-Na al 0.5% p/v por 1 min, inmediatamente después de sumergir en ésta solución se trituraron en un mortero estéril para liberar las células de *Lb. rhamnosus*; se agregaron 9 ml de agua peptonada al 1 % p/v con peptona (DIBICO S.A. de C.V., México) y a partir de esta dilución se hicieron diluciones decimales necesarias para hacer el recuento de ufc de *Lb.rhamnosus* en placa

con agar MRS, a $35\pm 2^\circ$ C durante 48 h de incubación. Los experimentos fueron hechos por duplicado.

6.9 Evaluación de la viabilidad de *Lb. rhamnosus* encapsulado durante el almacenamiento

Después de 1 día de preparadas, 10g de cápsulas por cada 50 ml de solución fisiológica de cada tratamiento se almacenaron en envases estériles, junto con un control de bacterias libres por 5 repeticiones, a condiciones de refrigeración (4° C) su viabilidad fue determinada por 25 días en intervalos de 5 días. Las cápsulas fueron removidas de la solución vía filtración, se realizó la enumeración de células viables como se mencionó anteriormente en la sección 6.7.

6.10 Sobrevivencia de *Lb. rhamnosus* en condiciones gastrointestinales simuladas.

6.10.1 Enumeración de *Lb. rhamnosus* en pH ácido.

Se preparó una solución 0.1% p/v de agua peptonada acidificada con HCl 0.1N de, cuyo pH se ajustó a 2.3, se esterilizó (121° C por 15 min).

Colocando por separado 1 g de cápsulas de cada tratamiento en 10 ml de la solución de agua peptonada acidificada durante 2h incubadas a 37° C con agitación de 100 rpm (Hughes y Hoover, 1995) y posteriormente se cuantificó viabilidad.

6.10.2 Enumeración de *Lb. rhamnosus* en sales biliares de porcino.

Para evaluar la tolerancia a sales biliares, las cápsulas sometidas a pH ácido se decantaron de la solución de agua peptonada acidificada, 1 g de estas cápsulas fueron colocadas en 10 ml de una solución estéril de caldo MRS con 0.3 % p/v de sales biliares de porcino (B8631, Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri) para cada tratamiento, durante 24 horas incubadas a 37° C con agitación de 100 rpm (Diaz-Rojas y col., 2004).

Al final se efectuaron muestreos de las cápsulas en cada proceso es decir des pues someter las cápsulas a pH ácido como en sales biliares, de las cápsulas decantadas se tomo 1 g de

cápsulas y a estas se les realizó el conteo de células viables en agar MRS como se describe en la sección 6.7. Todos los tratamientos: cápsulas de centro líquido y cápsulas de centro sólido, incluyendo el control de bacterias libres, fueron sometidos a las mismas condiciones y realizados por duplicado (Sheu y Marshall, 1993).

6.11 Propiedades texturales: Análisis de perfil de textura instrumental (APT).

Las cápsulas se sometieron a un análisis de perfil de textura (Bourne, 2002) aplicando una doble compresión en un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems, Texture Technologies Corp., White Plains, New York) equipado con una sonda cilíndrica de aluminio de 35 mm de diámetro, con una celda de carga de 25 k. Cada medición se realizó a 30 g de cápsulas contenidas en una caja petri, aplicando dos ciclos de compresión de 30%, a una velocidad de prueba de 0.5 mm s^{-1} , a temperatura ambiente ($20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) por triplicado. A partir de las curvas de fuerza-tiempo se determinaron las características texturales de: dureza, cohesividad, elasticidad, y masticabilidad para cada tratamiento (Artignan y col., 1997).

6.12 Microestructura de las cápsulas de centro líquido con *Lb. rhamnosus* entrampado.

La microestructura de las cápsulas se observó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Las muestras de cada tratamiento de cápsulas, después de ser partidas por la mitad; se montaron en soportes de aluminio y se cubrieron con una capa fina de barniz de plata, se utilizó un microscopio electrónico (JEOL Scanning Electron Microscope JMS-035, Jeol Ltd., Akishima, Japón), operado en condiciones de bajo vacío a 20 KV usando ampliificaciones de 200X.

Por otra parte se tomaron muestras de cápsulas que se fijaron en una disolución de glutaraldehído al 2% v/v en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) durante 6 h; se deshidrataron en disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (50, 60, 70, 80,

90 y 100% v/v) permaneciendo 30 min en cada una y se colocaron en acetona por 1 h. Posteriormente las muestras fueron cortadas por la mitad y secadas a punto crítico en un CPA II Technics Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, EUA); se montaron en soportes de aluminio y se cubrieron con una capa fina de oro en un Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). Y observadas al microscopio electrónico operado a condiciones de alto vacío y 20 KV, se usó para observar cada muestra ampliaciones de 5000X (Sandoval-Castilla y col., 2009).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Elaboración de cápsulas de centro líquido.

Se obtuvieron cápsulas sin bacterias de Alg-Ca esferoidales con un diámetro exterior promedio de $1.88 \pm 0.42\text{mm}$, Díaz-Rojas, y col. (2004) reportan que la gelación con alginato sin presencia de otro biopolímero contribuye a la formación de cápsulas más esféricas pues la interacción entre el calcio y la proporción de ácido gulurónico presente es mayor, comparado con cápsulas elaboradas con mezclas de alginato y pectina que pierden su esfericidad, debido a que la estabilidad mecánica de la red de Alg-Ca es menor, ya que el mecanismo de gelificación del Alg-Na se lleva a cabo entre grupos carboxilos con las valencias primarias y grupos carboxilos con valencias secundarias. Grant y col. (1973) proponen que existe una cavidad que actúa como un sitio de unión para Ca^{++} entre dos residuos del ácido gulurónico que contiene el alginato, produciendo una estructura tridimensional. En esta estructura el calcio interactúa con los grupos carboxilo y con los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo. Después de la gelificación las moléculas de agua son físicamente atrapadas en la matriz de alginato.

En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos al calcular el diámetro y grosor de pared de las cápsulas.

Tabla 4. Diámetro promedio y grosor de pared de cápsulas de centro líquido

Tratamiento	CaCl ₂ (%p/v)	Cit-Na (% p/v)	diámetro promedio (mm)	grosor de pared (mm)
1	0.02	0.2	SFC	SFC
2	0.02	0.4	SFC	SFC
3	0.02	0.6	SFC	SFC
4	0.05	0.2	1.72± 0.17 ^c	0.44± 0.02 ^c
5	0.05	0.4	1.45± 0.05 ^{a,b}	0.49± 0.04 ^{c,d}
6	0.05	0.6	1.54± 0.02 ^b	0.37± 0.2 ^b
7	0.08	0.2	1.37± 0.25 ^a	0.27± 0.01 ^a
8	0.08	0.4	1.90± 0.00 ^d	0.53± 0.11 ^{d,e}
9	0.08	0.6	1.79± 0.11 ^{c,d}	0.69± 0.09 ^e
10	0.1	0.2	2.39± 0.19 ^e	0.70± 0.08 ^f
11	0.1	0.4	2.37± 0.20 ^e	0.73± 0.02 ^f
12	0.1	0.6	2.44± 0.13 ^e	0.94± 0.04 ^f

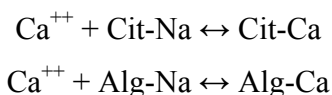
Superíndices iguales indican que pertenecen al mismo grupo y no difieren significativamente, de acuerdo a la prueba de Tukey (p=0.05).

SFC= sin formación de cápsula.

En los tratamientos 1, 2 y 3 no se formaron cápsulas, esto fue debido a que estructuralmente la cantidad de calcio comparada con la cantidad de Alg-Na presente es notoriamente menor, por lo que a concentraciones menores de 0.035% p/v de CaCl₂ la mezcla se comporta como un gel tixotrópico, los fluidos con esta característica muestran una forma estable en estado de reposo y se tornan fluidos al ser agitados, por encima de esos niveles de CaCl₂ se forman geles rígidos o precipitados (Bennett, 1989).

Además de que la gelación del Alg-Na en Alg-Ca está directamente relacionada con la cantidad de iones Ca⁺⁺ disponibles y con la cantidad de secuestrador catiónico (Cit-Na) que

limita la gelación secuestrando parte del ion Ca^{++} es así que se busca el equilibrio de dos reacciones en competencia:



Cuando se adicionó el agente secuestrante, la gelación del Alg-Na con el calcio se efectuó lentamente, debido a que el calcio presente no está totalmente disponible para formar Alg-Ca, por ello en los tratamientos que no fueron estables, el gel que estaba en formación no era aun lo suficientemente fuerte para resistir la baja agitación (Monshipouri y Price 1995). Las propiedades mecánicas y las fuerzas iónicas durante la elaboración de las cápsulas en presencia del agente secuestrante son controladas por ambas reacciones en busca del equilibrio, por lo cual las uniones con alginato al formarse la pared de las cápsulas se dan en un arreglo estructural uniforme (Monshipouri y Price, 1995) formándose una pared estable de gel homogéneo y rígido.

De tal forma que se verificó si existían diferencias significativas en el grosor de pared entre tratamientos, observando que el tratamiento que tiene el menor grosor de pared promedio se obtuvo en el tratamiento formulado con 1% Alg-Na, 0.08% p/v CaCl_2 y 0.2% de Cit-Na con un grosor de pared promedio de 0.27 mm. Esto se decidió debido a que el encapsulamiento por sí mismo puede causar tensión extra y presiones físicas a las células. Por ejemplo, Stewart y Robertson (1989) estudiaron el encapsulamiento en alginato de células de *Escherichia coli* y observaron que cuando las células fueron estresadas físicamente, la porosidad de la cápsula disminuyó, la forma de células se distorsionó, el tamaño celular se redujo y se dio la pérdida de agua de las células encapsuladas debido a la compresión generada por el entrapamiento. También, con el tiempo se reduce considerablemente la porosidad de las cápsulas (Cassidy y col., 1996).

Considerando las limitaciones del método de extrusión respecto al tamaño de las cápsulas que se obtienen se determinó si existen diferencias significativas entre los tratamientos

respecto al diámetro de las cápsulas, ubicando este tratamiento seleccionado dentro de los tratamientos con menor tamaño de cápsula, con una significancia de $p=0.05$.

El tamaño de las cápsulas es además un factor importante en cuanto a sobrevivencia de probióticos; por ejemplo, en un estudio donde se evaluó la viabilidad de *Lactobacillus bulgaricus* en cápsulas de Alg-Ca que tenían un intervalo de tamaño entre 30 a 102 μm , concluyeron que un diámetro de 30 μm era deseable, porque cápsulas más grandes causan la aspereza de textura en el producto que los contiene, pero que cápsulas pequeñas no proporcionaron la protección suficiente para las bacterias (Adhikari y col., 2003).

Por otra parte, Hansen y col. (2002), encontraron que las cápsulas de alginato deben tener un diámetro de al menos 100 μm para prevenir una reducción de la viabilidad de *Bifidobacterium* en jugos gástricos simulados. Por lo tanto, los microorganismos probióticos deben ser atrapados dentro de una gama limitada de tamaños para su incorporación en alimentos y reducir al mínimo problemas asociados con la viabilidad de célula y la textura de alimentos. Muthukumarasamy y col. (2006) encontraron que cápsulas de alginato con un diámetro entre 2 a 4 mm hechas por la técnica de extrusión son capaces de proteger mejor a *Lactobacillus reuteri* que cápsulas más pequeñas elaboradas por el método de emulsiónamiento (200-1000 μm). Lee y Heo (2000) encontraron que *Bifidobacterium longum* después de ser sometido a condiciones GI simuladas tiene una viabilidad directamente proporcional al tamaño de la cápsula en intervalos de diámetro entre 1 a 2.6 mm.

Así, las cápsulas de centro líquido obtenidas parecen ser lo suficientemente grandes para alcanzar una buena carga celular (1.37 ± 0.25 mm de diámetro exterior), pero no son suficientemente pequeñas para ser impercetibles. Anal y Singh (2007), mencionan que cápsulas pequeñas limitan a tener baja viabilidad; y cuando se producen cápsulas grandes, las propiedades texturales sensoriales de productos alimenticios a los que son añadidos pueden ser afectados negativamente. Sin embargo el centro líquido presente en el

tratamiento seleccionado confiere características texturales que pueden mejorar la aceptabilidad de las cápsulas por el consumidor con respecto a las cápsulas de centro sólido.

Un factor importante a considerar son las modificaciones realizadas al método de extrusión de Krasaekoopt y col. (2003) y de Muthukumarasamy y col. (2006) que se describen en la sección 7.1, ya que el método tradicional considera solamente gotear la dispersión de Alg-Na en CaCl_2 y decantar las cápsulas obtenidas. Si bien como ya se mencionó se observaron los efectos que provoca la adición de Cit-Na, pero un factor importante a considerar al final de la extrusión son la adición al método de lavados a las cápsulas en solución fisiológica después de filtrar y al final ya que con estos permitieron eliminar los Ca^{++} presentes en las cápsulas, mientras que el Alg-Na al 0.3% p/v hizo reaccionar el calcio que aún pudiese encontrarse en la superficie de las cápsulas. Con estos lavados se aseguro que el centro líquido de las cápsulas se mantiene a través del tiempo.

7.2 Cinética de crecimiento de *Lb. rhamnosus*.

A partir del cultivo de *Lb rhamnosus* activado y crecido en caldo MRS (concentración inicial, $3.3 \log_{10} \text{ ufc ml}^{-1}$) se obtuvo la cinética de crecimiento microbiano, donde se observa la acidificación del medio, causando la variación del pH de 6.4 ± 0.1 a 3.7 ± 0.1 (Fig. 3).

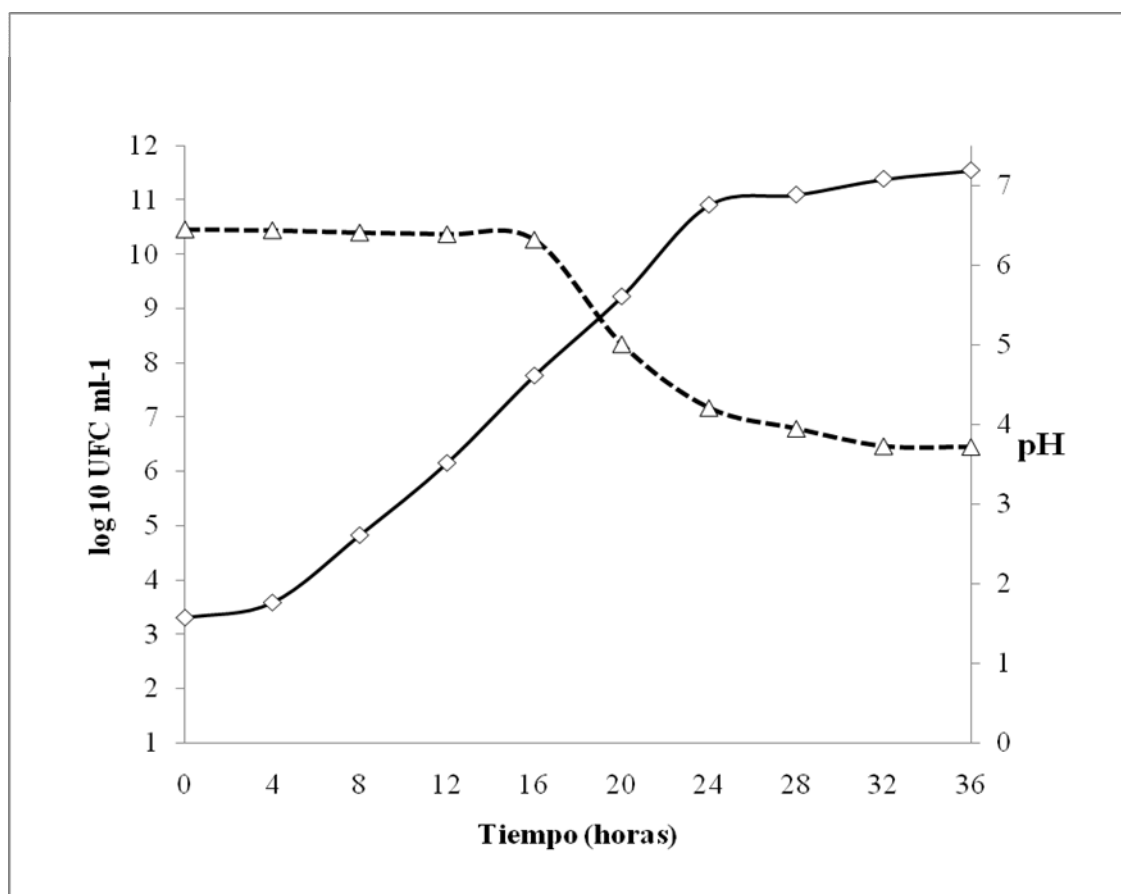


Fig. 2 Cinética de crecimiento de *Lb. rhamnosus*.

Obteniendo los parámetros cinéticos ajustados al modelo de Gompertz (ver tabla 5), similar a una curva sigmoide que describe el crecimiento bacteriano.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de la cinética de crecimiento de *Lb. rhamnosus*

Parámetros de ajuste	Caldo MRS
N_0 (\log_{10} ufc ml ⁻¹)	3.442
C (\log_{10} ufc ml ⁻¹)	8.219
μ (h ⁻¹)	0.4868
λ (h)	6.346

R^2	0.989
-------	-------

Así, se cosecharon las células al final de la fase exponencial aproximadamente a las 28h con una concentración de células de $11.34 \log_{10} \text{ ufc ml}^{-1}$ para incluirlas en las cápsulas del tratamiento con Alg-Na 1% p/v, CaCl_2 0.08% p/v y Cit-Na 0.2% p/v seleccionado.

7.3 Efecto del proceso de encapsulamiento en la viabilidad de *Lb. rhamnosus*

Se evaluó la viabilidad durante el proceso de encapsulamiento esquematizado en la Fig. 4

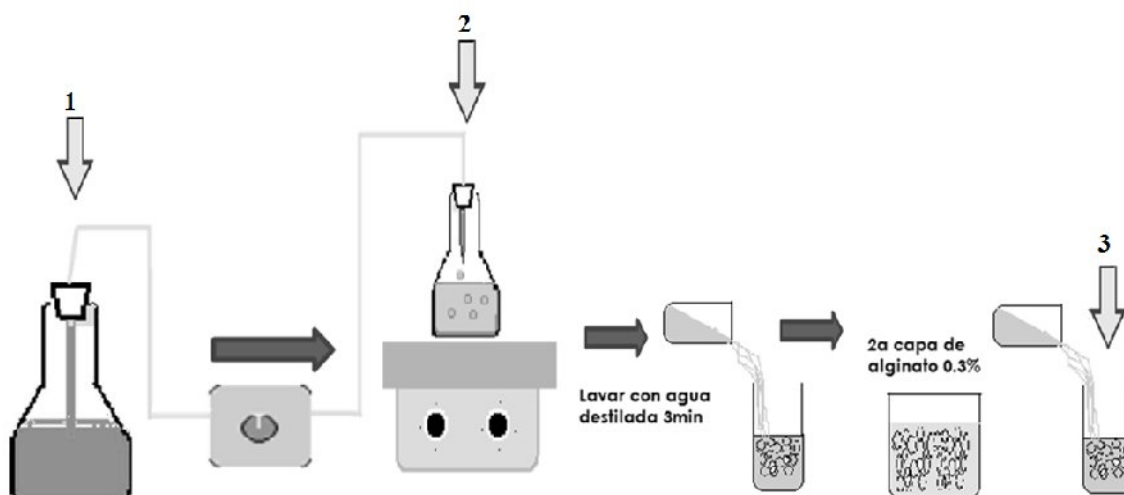


Fig. 3 Determinación de viabilidad durante el proceso de encapsulamiento.

Durante el proceso de encapsulación se presentó una gran pérdida de células ocasionada en gran parte por el proceso de encapsulamiento, por lo que para la posterior aplicación del método de extrusión y las modificaciones realizadas al método, es importante considerar ésta pérdida de microorganismos.

Es así, que de una concentración inicial de $11.34 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ en la dispersión del biopolímero se dio una pérdida de $1.7 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ durante el bombeo y la extrusión del Alg-Na esto posiblemente se debió al estrés que recibe el microorganismo al ser bombeado además Reid y col (2005) atribuyen estas pérdidas a la disolución en CaCl_2 (2). Las siguientes pérdidas se atribuyen a las modificaciones al método: a los lavados y el

sumergimiento en Alg-Na para reaccionar el excedente de iones Ca^{++} , en esta etapa del proceso hubo una menor pérdida de células que fue de aproximadamente menos $1 \log_{10} \text{ufc g}^{-1}$ (3). Mostrando una pérdida total de 2.7 unidades logarítmicas durante el proceso completo, como resultado del estrés por adaptación de las células durante la preparación de las cápsulas de centro líquido. Sin embargo, la técnica de extrusión permite encapsular las células de *Lb. rhamnosus* a temperatura ambiente y gracias a la característica ionotrópica del alginato este gelifica únicamente en presencia de iones Ca^{++} , sin exponer a las bacterias a temperaturas elevadas, ni a agitación extrema; condiciones que pueden afectar la viabilidad de las células, como es el caso de otros métodos de encapsulación como: el secado por aspersión y el emulsionamiento.

Además, al calcular la eficiencia del encapsulado pudimos evidenciar que ésta se mantiene a pesar de la presencia del cit-Na en la formulación es decir no provoca ningún efecto significativo sobre la eficiencia del encapsulado entre las cápsulas de centro líquido y las cápsulas de centro sólido (tabla 6).

Tabla 6. Eficiencia encapsulación

Cápsulas	Eficiencia (%)
centro sólido	74.08±7.8 ^a
centro líquido	70.05±7.4 ^a

Superíndices iguales dentro de la misma columna indican que las medias no difieren significativamente ($p < 0.05$) con t-student

7.4 Evaluación de la viabilidad de *Lb. rhamnosus* encapsulado durante el almacenamiento

Se realizó la cinética de almacenamiento donde la viabilidad de las cápsulas de centro líquido después de 25 días se redujo significativamente. Sin embargo, estuvo por arriba de la concentración mínima de ingesta recomendada ($6 \log_{10} \text{ufc g}^{-1}$). Puede observarse que a partir del día 15 y hasta el día 25 la cantidad de microorganismos para bacterias libres. (2.4

\log_{10} ufc g^{-1}) y cápsulas de centro sólido ($4.51 \log_{10}$ ufc g^{-1}) son significativamente menores.

La disminución acelerada de la viabilidad después del día 15 en la cinética de almacenamiento puede ser debida y descrita por diversos autores como “sobreacidificación” o “acidificación post producción” esto es por el contenido de ácido creciente en el medio durante el almacenamiento (Shah y Jelen, 1990). Así, los resultados implican que las cápsulas de centro sólido mantienen una mejor sobrevivencia de *Lb. rhamnosus* en comparación con bacterias libres y cápsulas de centro sólido. Además algunos autores demostraron el efecto protector ejercido por el encapsulamiento de probióticos cuando son expuestos a condiciones adversas como pH ácido equiparando sus resultados con los de este trabajo que la sobrevivencia es considerablemente más alta en los microencapsulados obtenidos que en células control no atrapadas (Lian y col., 2003; Picot y Lacroix, 2004; Pimentel-González y col., 2009).

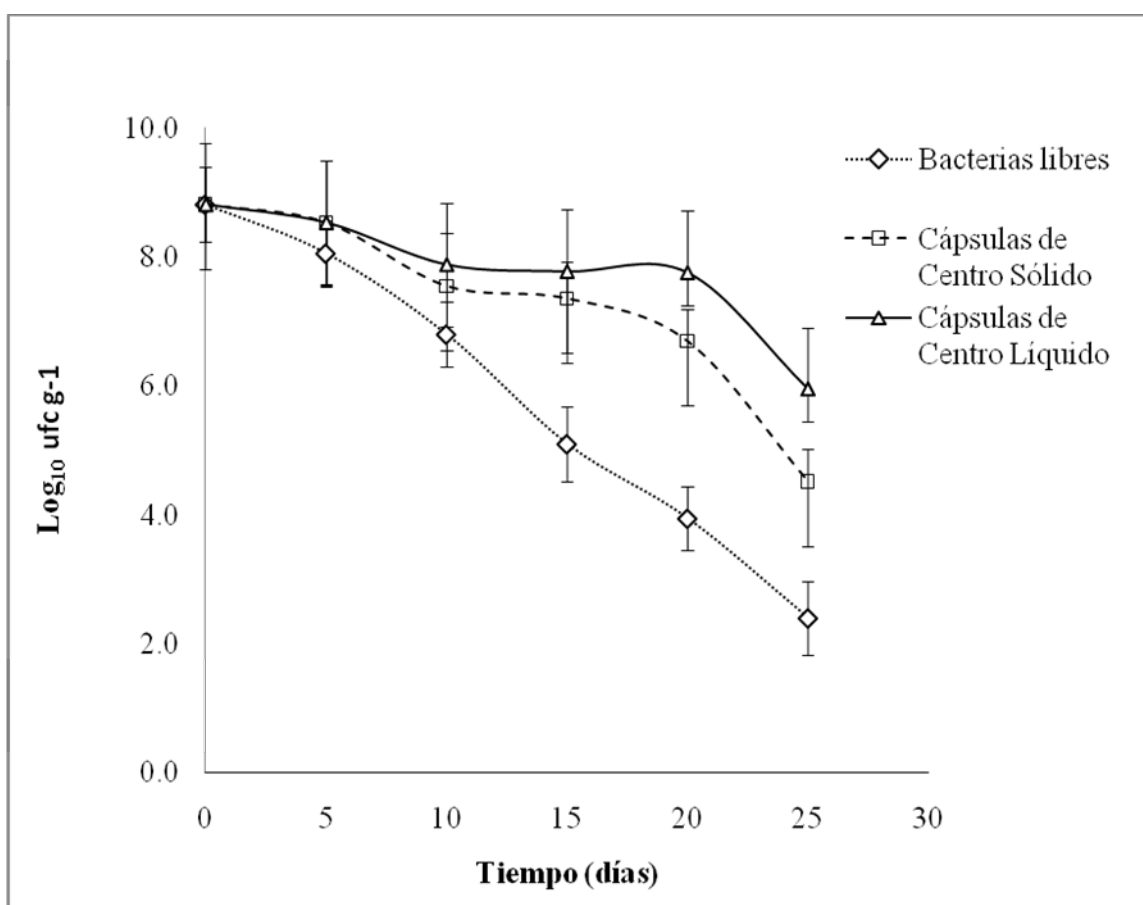


Fig. 4 Cinética de almacenamiento de *Lb. rhamnosus*

7.5 Evaluación de la sobrevivencia en condiciones gastrointestinales simuladas

En la fig. 6, se muestra que al realizar la evaluación de la sobrevivencia *Lb. rhamnosus* en condiciones gastrointestinales simuladas, la sobrevivencia de las células decrece en todos los casos al final de la exposición. Donde, las bacterias libres muestran una disminución más evidente mostrando la menor viabilidad con $5.78 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ al final de las condiciones GI simuladas mientras que las células entrampadas en ambos casos: cápsulas de centro líquido ($7.6 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$) o cápsulas de centro sólido ($7 \log_{10} \text{ ufc ml}^{-1}$) muestran un grado de protección mayor. Este efecto puede ser debido a que la matriz de inmovilización en este caso el alginato protegió a las bacterias lácticas entrampadas en el medio que se encontraron, tanto en la estructura completamente gelada de las cápsulas de centro sólido como en la pared que se formó en las cápsulas de centro líquido Sin embargo,

al comparar la viabilidad de las cápsulas de centro sólido, la viabilidad de las cápsulas de centro líquido y bacterias libres al final de la exposición a sales biliares se observa que en esta etapa se provoca la mayor disminución en la viabilidad de las bacterias.

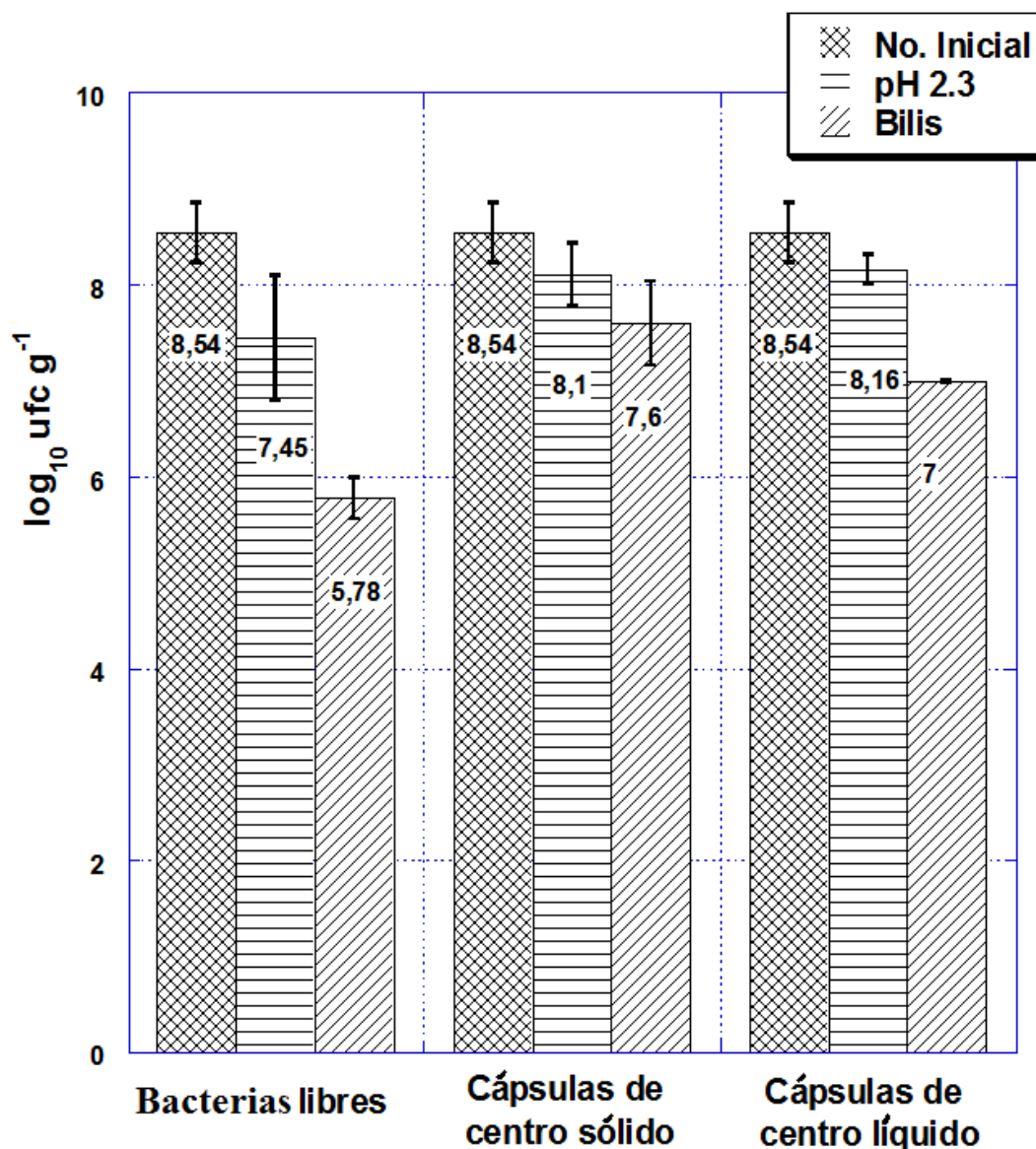


Fig. 5 Sobrevivencia de las bacterias libres, cápsulas de centro sólido y cápsulas de centro líquido, bajo condiciones de pH ácido y sales biliares.

Después de someter las cápsulas a pH ácido y bilis, el contenido de células viables de $7.6 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ es mayor en cápsulas de centro sólido comparado con cápsulas de centro

líquido $7.0 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$. Sin embargo, al final la degradación de las cápsulas de centro líquido fue completa por lo que el conteo de células viables tuvo que medirse en la solución de bilis que las contenía, lo anterior puede implicar que las células de *Lb. rhamnosus* de las cápsulas de centro sólido no se liberen al pasar por el tracto gastrointestinal, por lo que una cantidad importante de bacterias se desecharía y no se liberarían en el colon.

7.6 Propiedades texturales: Análisis de perfil de textura instrumental (APT)

El análisis de perfil de textura realizado a las cápsulas de centro líquido y cápsulas de centro sólido, sirve para simular la compresión que ocurre al morder un alimento, en la Fig. 7 se muestra el APT realizado las cápsulas de centro líquido y cápsulas de centro sólido, en el que una primera compresión por el texturómetro simula la fuerza máxima ejercida y representa la dureza de las cápsulas.

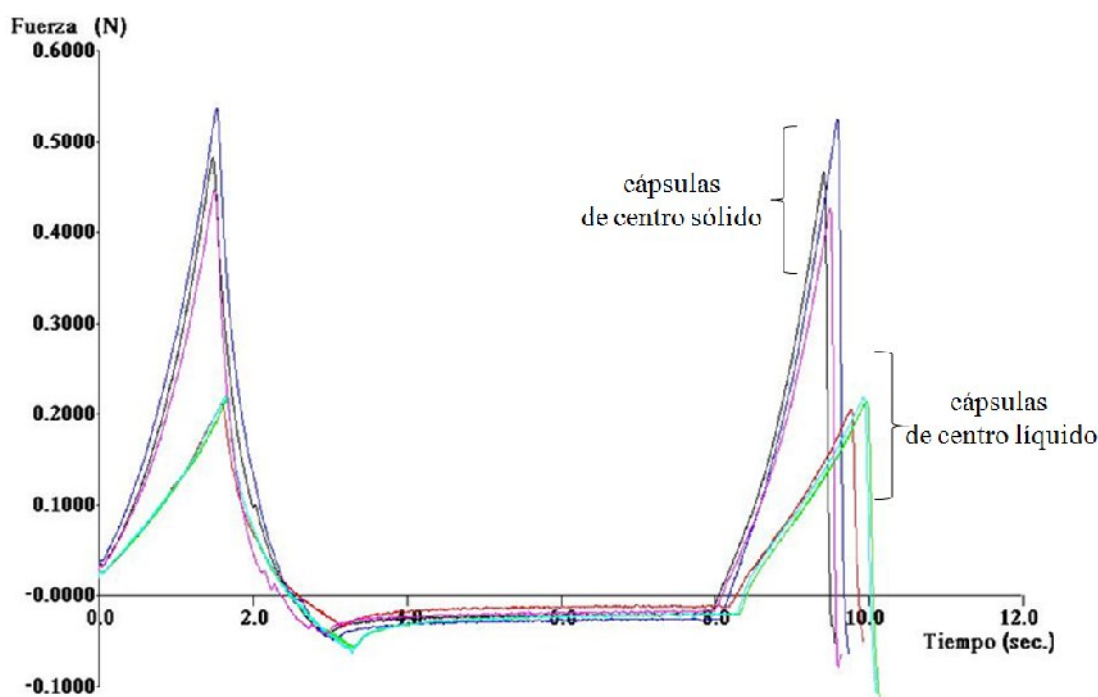


Fig. 6 Análisis de perfil de textura

Tabla 7. Propiedades texturales de las cápsulas de centro sólido y líquido con *Lb. rhamnosus* entrampado.

CÁPSULAS	DUREZA (N)	COHESIVIDAD (adimensional)	ELASTICIDAD (mm)	MASTICABILIDAD (N*mm)
centro sólido	0.49±0.04 ^a	0.65±0.05 ^a	0.929± 0.119 ^a	0.29±0.05 ^a
centro líquido	0.21±0.00 ^b	0.78±0.05 ^b	0.997± 0.004 ^a	0.17±0.01 ^b

Diferentes superíndices dentro de la misma columna indican medias que difieren significativamente ($p < 0.05$) con t-student

En la tabla 7, se muestran las propiedades texturales obtenidas, donde al comparar los resultados de dureza de las cápsulas de centro sólido (0.49 ± 0.04 N), ésta es similar a la dureza medida en cápsulas elaboradas por Sandoval-Castilla y col., (2009), con alginato al 0.5% p/v (0.45 ± 0.01 N) y en mezclas de alginato 0.05% con pectina al 1, 2, 3% p/v la dureza es notoriamente superior en todos los casos, obteniendo durezas de 0.68, 0.76, 2.08N respectivamente. Estos resultados brindan evidencia de que las cápsulas elaboradas únicamente con alginato son más suaves, que las elaboradas con mezclas de alginato y pectina.

Ahora bien, al observar la dureza de las cápsulas de centro líquido (0.21 ± 0.02 N) ésta es significativamente diferente y menor que en cápsulas de centro sólido La cohesividad por otro lado es mayor en cápsulas de centro líquido (0.78 ± 0.05) este puede ser un indicativo de que las cápsulas de centro líquido tienen mayor capacidad de deformación antes de romperse durante la ingesta. La elasticidad en estos casos es comparable, es decir la proporción a la que vuelven ambos tipos de cápsulas a su condición inicial es similar.

La masticabilidad está directamente relacionada con la energía que requerimos para deglutir un alimento. Las cápsulas de centro líquido (0.17 ± 0.01 N) tienen una masticabilidad significativamente menor a las cápsulas de centro sólido (0.29 ± 0.05 N). Esto

puede estar directamente relacionado con la aceptación de los consumidores del producto, ya que sensorialmente representa el trabajo necesario para fragmentar el alimento (Sandoval-Castilla, 2009).

7.7 Microestructura de las cápsulas de centro líquido con *Lb. rhamnosus* atrapado.

Mediante la microscopía electrónica de barrido pudimos observar que la estructura de ambos tipos de cápsulas se hace más densa hacia la pared de las cápsulas y más abierta hacia el centro de las cápsulas, similar a las observaciones publicadas por Allan-Wojtas y col. 2008.

En las cápsulas de centro sólido por ejemplo; que se muestran en la Fig. 8 *a,b*), se observó una estructura más cerrada desde el centro hasta la pared de la cápsula, el Calcio en este caso migró al interior de la gota de alginato más rápidamente y formó una red de alginato que atrapó las bacterias en su estructura (ver Fig. 9 *c*).

Al observar la estructura de las cápsulas de centro líquido, se aprecia que en la pared de la cápsula se dio la formación de un gel homogéneo externo y hacia el interior esta estructura se hace más abierta y desorganizada debido a que al principio la concentración de Alg-Na en el interior es más alta y el Cit-Na limita la entrada de iones Ca^{++} (ver Fig. 9. *a,b*).

Mediante microscopía de alto vacío (Fig.9. *c*) se observa que las bacterias se encuentran separadas o distribuidas en grupos a lo largo de la cápsula adheridas en la red abierta que se formó, donde las bacterias al parecer tenían menos limitaciones de espacio.

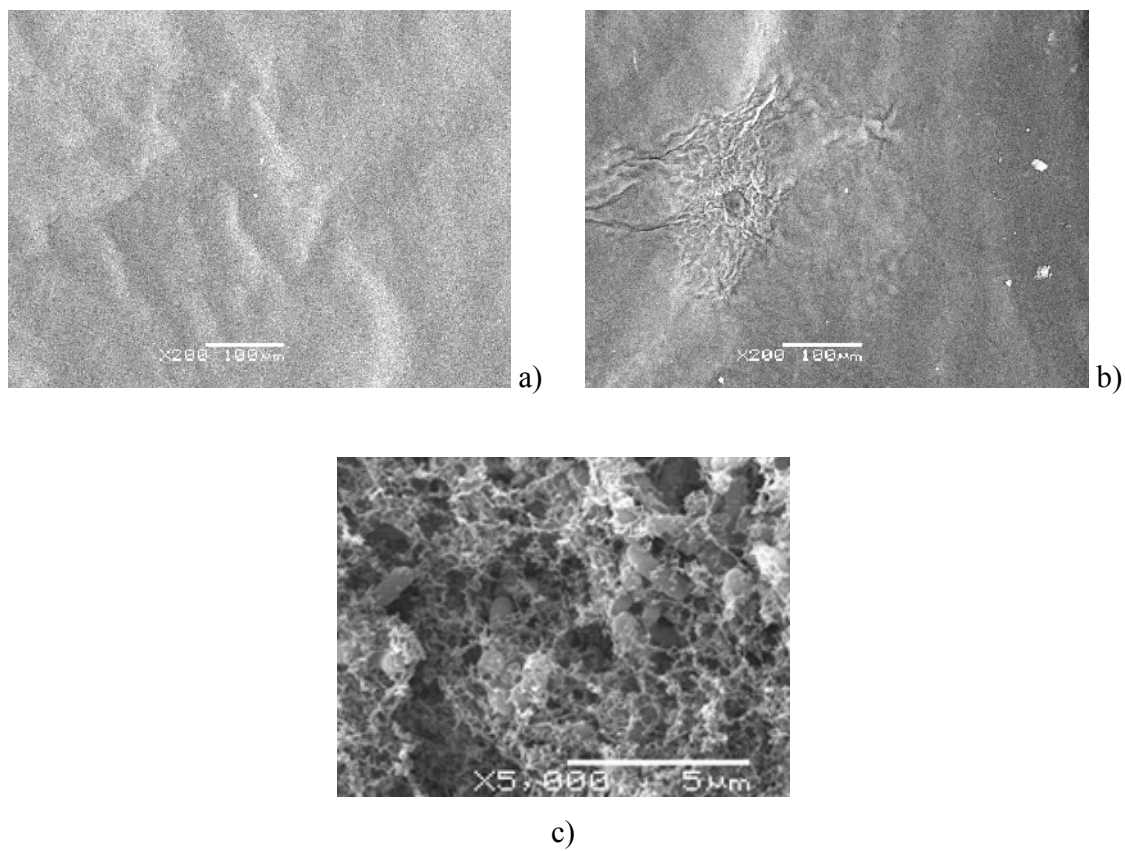


Fig. 7 Micrografías de cápsulas de centro sólido: a) Pared de la cápsula, b) Centro de la cápsula, microscopía en condiciones de bajo vacío, c) centro de la cápsula microscopía en condiciones de alto vacío.

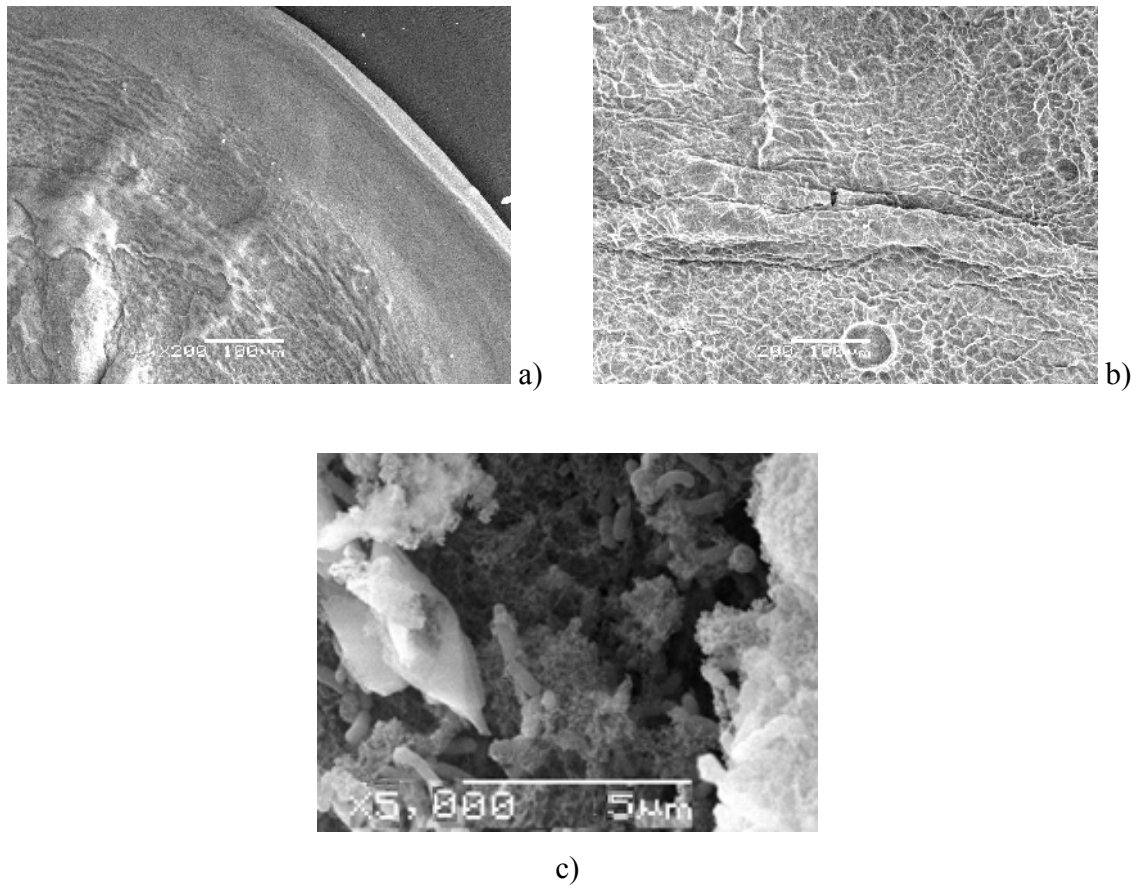


Fig. 8 Micrografías de cápsulas de centro Líquido: a) Pared de la cápsula, b) Centro de la cápsula, microscopía en condiciones de bajo vacío, c) Centro de la cápsula microscopía en condiciones de alto vacío.

8. CONCLUSIONES

La adición de citrato de sodio como secuestrador de iones calcio en la formulación para elaborar cápsulas de alginato, permitió desarrollar una nueva metodología para la elaboración de cápsulas de alginato de centro líquido; modificando el método de extrusión, donde los resultados indican que es posible establecer un equilibrio entre las concentraciones de cloruro de calcio y citrato de sodio para de esta manera obtener cápsulas de centro líquido con el menor tamaño y grosor de pared adecuados que permitieron entrapar en su interior a *Lb. rhamnosus* y que no tiene un efecto significativo sobre la eficiencia de entrapamiento.

En condiciones de almacenamiento el centro líquido de las cápsulas repercutió en la viabilidad *Lb. rhamnosus* después de 25 días de almacenamiento dentro de la cantidad mínima recomendada de microorganismos por gramo de alimento ($6 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$).

La sobrevivencia a pH ácido y a sales biliares de *Lb. rhamnosus* encapsulado disminuyó en todos los casos, sin embargo las cápsulas de centro sólido y cápsulas de centro líquido con *Lb. rhamnosus* entrapado mantienen una viabilidad de $7 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ después de ser sometidas a estas condiciones confirmando que la encapsulación por el método de extrusión y por el método de extrusión modificado proporciona un nivel de protección comparable.

La presencia del centro líquido en las cápsulas con *Lb. rhamnosus* entrapado repercutió, en sus propiedades texturales. Donde la dureza y masticabilidad son significativamente menores comparadas con las cápsulas de centro sólido.

9. PERSPECTIVAS

El encapsulamiento de *Lactobacillus rhamnosus* en cápsulas de centro líquido brinda características texturales diferentes a las de cápsulas de centro sólido como menor dureza y mayor cohesividad que fueron evaluadas mediante un APT sin embargo, sería importante incluir las cápsulas en un alimento, para evaluar si estas diferencias texturales aportaran alguna ventaja sobre las cápsulas de centro sólido, desde el punto de vista sensorial, repercutiendo en la aceptación por parte de los consumidores.

Probar la adición de un agente prebiótico o medio de cultivo en la formulación de las cápsulas de centro líquido, para evaluar la viabilidad del *Lactobacillus rhamnosus*, estudiar si éste puede potenciar el crecimiento del microorganismo dentro de la cápsula y al momento de liberarse en el colon.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera J. M. y Stanley D. W. (1990). Microstructural principles of food processing & engineering. Applied Food Science Series. Applied Science. Elsevier. p. 343.

Allan-Wojtas P., Truelstrup Hansen, L. y Paulson, A.T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*.41(1):101-108

Anal A.K. y Singh H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18:240-251.

Anzaldúa M. A. (1994). La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica. Zaragoza, España : Acribia. p. 198.

Armuzzi A., Cremonini, F., Bartolozzi, F., Canducci, F., Candelli, M., Ojetti, V., Cammarota, G., Anti, M., De Lorenzo, A., Pola, P., Gasbarrini, G., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A. (2001). The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 15:163-169.

Adhikari, K., Mustapha, A. y Grün, I. U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, 68: 275–280.

Artignan, J. M., Corrieu, G., y Lacroix, C. (1997). Rheology of pure and mixed kappa-carrageenan gels in lactic acid fermentation conditions. *Journal of Texture Studies*. 28:47–70.

Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. Nueva York, 2ª Edición, (1):1-72.

Bennett A. (1989). Alginate gels. Patente: Kelco International, London. p. 1

Bourne, M. C. Food texture and viscosity: Concept and measurement (2nd ed.) 2002. New York, NY: Academic Press. p. 148

- Carteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. y Collins, J. K.** (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotics *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5):759-768
- Cassidy MS., Lee H. y and Trevors J.T.** (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review *Journal of Industrial Microbiology* . 16:79-101.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., y Jones, M.** (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27–35.
- Corcoran, B.M., Ross, R.P. Fitzgerald G.F. y Stanton C.** (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal Applied Microbiology*. 96:1024–1039
- Cordes, D., Kleinebudde, P. y Muller, B.W.** (1994). Determination of the consistency of semisolid preparations using the texture analyzer. *Pharmazie* 49(23):1-11.
- de Man, J.C., Rogosa, M, y Sharpe, M.E.** (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23:130-135.
- Díaz-Rojas, E.I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., Valdez, M. A., Ribaudó, M.** (2004). Linseed pectin: Gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*. 18:293–304.
- Diplock, AT., Aggett, PJ., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, EB. y Roberfroid, M.** (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal Nutrition*. 81: S1- S27.
- Draget, K.I.** (2000). Alginates. En: *Handbook of Hydrocolloids*. Phillips, G.O. y Williams, P. A. (ed.) Woodhead Publishing, Cambridge, Inglaterra. pp. 379-396.
- Gonzalez-Flores, T., Gonzalez-Burgos, A., Guerrero-Legarreta, I. y Zamudio-Maya, M.** (2003). Evaluación de la actividad probiótica in-vitro de bacterias ácido lácticas aisladas de sustratos nativos del estado de Yucatán. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta Jalisco, México.
- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J. y Gill, H.S.** (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their

antagonist activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3):207-216.

Fernández, M. R., Boris, S. y Barbés C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 94(3):449-455.

Functional Food Science in Europe. (1998). *British Journal of Nutrition*, 80(1):S1-S193.

Fuller R. (1992). *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman & Hall.

Gardiner, G.E., Ross, R.P., Kelly, P.M. y Stanton, C. (2002). Microbiology of therapeutic milks. En Robinson R.K. (ed.), *Dairy microbiology Handbook*, 3a ed. John Wiley & Sons Inc., Nueva York. 431-478.

Grant, G.T., Morris, E.R. and Rees, D.A. (1973). Biological interaction between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS* 32:195

Godward G. y Kailasapathy K. (2003a). Viability and survival of free, encapsulated probiotic bacteria in Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*. 58:624-627.

Hansen, L.T., Allan-Wojtas, P.M., Jin, Y. L., y Paulson, A.T. (2002). Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19:35-45.

Hoefler, A.C. (2004). *Hydrocolloids: Practical guides for the food industry*. Ed American Association of Cereal Chemists, USA.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. y Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73:365S-373S.

Hughes, D.B. y Hoover, D.G. (1995) Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal Dairy Science*. 78: 268-276

Irani R.R. y Callis, C.F. (1962). Calcium and magnesium sequestration by sodium and potassium polyphosphates. *Journal of American Oil Chemists Society*. 39:156-159

Jankowski T., Zielinska, M. y Wysłowska, A. (1997). Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnology Techniques*. 11(1): 31-34.

- Kailasapathy. K. y Chin J.** (2000) Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* Immunol. Cell Biology. 78:80-88.
- Kebary K. M. K., Hussein S. A. y Badawi, R. M.** (1998). Improving viability of Bifidobacteria and their effect on frozen ice milk. Egyptian Journal of Dairy Science. 26(2):319-337.
- King A. H.** (1995). Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. En: Encapsulation and controlled release of food ingredients. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius (ed.), Washington DC: American Chemical Society. 213-220.
- Krasaekoopt W., Bhandari B. y Deeth H.** (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal. 13:3-13.
- Krasaekoopt W., Bhandari B. y Deeth H.** (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survival of microencapsulated probiotic bacteria. International Dairy Journal. 14(8):737-743.
- Kurman J. y Rasic, J.L.** (1991). The health potential of products containing bifidobacteria. En Robinson R.K. (ed.), *Therapeutic properties of fermented milks*, Londres: Elsevier Application Food Science Series. 117-158.
- Lee, K.Y., Heo, T.R.** (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Applied Environmental Microbiology. 66:869– 873.
- Lian, W.C., Hsiao, H.C. y Chou, C.C.** (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. International Journal of Food Microbiology. 86:293–301.
- Lobato Calleros C., Aguirre Mandujano E. y Vernon Carter E.J.** (2000). Viscoelastic properties of white fresh cheese filled with sodium caseinate. Journal Texture Studies. 31:379-390.
- Martinsen A., Skjak-Braek, C. y Smidsrød, O.** 1989. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. Biotechnology and Bioengineering. 33(1):79-89.

- Mattila-Sandholm T., Mättö J. y Saarela M.** (1999). Lactic acid bacteria with health claims-interference and interactions with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*. 9:25-35.
- McCracken V.J. y Gaskins, H. R.** (1999). Probiotics and the immune system. En Tannock. G.W. (ed.), *Probiotics: A critical Review*. Wyomondham: Horizon Scientific Press. 85-111.
- Metchnikoff, E.** (1908). *Optimistic studies* New York: Putman's Sons, 161-183.
- Monshipouri M. y Price, R.R.** (1995). Emulsification preparation of calcium alginate beads in the presence of sequesterant. *Journal of Microencapsulation*. 12(3):255-262.
- Morgensen G. y Friis, M.** (1997) *L. casei* 431FA strategic probiotic strain from Chr.Hansen A/S. *The World of Ingredients*, 41-42.
- Muthukumarasamy P., Allan, P. W. y Holley, A. R.** (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*. 71(1):20-24.
- Myllyluoma E., Veijola, L. Ahlroos, T., Tynkkynen, S., Kankuri, E., Vapaatalo, H. Rautelin, H., Korpela R.** (2005). Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy a placebo- controlled, double-blind randomized pilot study. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*. 21:1263-1272.
- Narayanan N., Roychoudhury, P.K. y Srivastava A.** (2004). Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of (L+) lactic acid. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7:72-84.
- Pagano J.C.** (1998) Nueva Legislación del Mercosur para leches fermentadas. *Industria Lechera*. 713:8-13.
- Picot A. y Lacroix, C.** (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based. *International Dairy Journal*. 14:505-515.
- Pimentel-González D.J. Campos-Montiel R.G. , Lobato-Calleros C., Pedroza-Islas R.** (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 42:292-297.

- Porkony J., Davidek, J., y Doviasova, S.** (1984). Comparison of sensory analysis and rotational rheometry in the texture evaluation of margarines. *Journal Texture Studies*. 15:395-406.
- Ramírez S. C.** (2002). Microestructura y textura de queso imitación tipo Manchego incorporado con aceite de canola y emulsificantes de bajo peso molecular. Tesis de licenciatura. Chapingo, México.
- Rao A. V. Shivnarain, N., y Maharaj, I.** (1989) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Journal of Canadian Institute on Food Science and Technology*. 22: 345-349.
- Ravula, R. R., y Shah, N. P.** (1998). Viability of probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *Food Australia*, 50(3): 136–139.
- Reid G.** (1999) Potential preventive strategies and therapies in urinary tract infection *World Journal Urology*. 17:359-363.
- Reid G.** (2001). Probiotics agents to protect the urogenital tract against infection *American Journal Clinical Nutricion*. 73:437S-443S
- Reid G., Sebulsky, M. y McCormick, J.K.** (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(4):658-672.
- Reid A.A., Vuilleumard, J.C. Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E. y Champagne, C.P.** (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*. 22(6):603-619.
- Robinson R.K.** (1987). Survival of *Lactobcillus acidophilus* in fermented products. *Suid Afrikaanse Tydskrif Vir Suiwelkunde*.19(1):25-27.
- Saarela, M., Morgensen, G., Fondén, R., Matö, J., y Mattila-Sandholm, T.** (2000) Probiotic bacteria: Safety, funcional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 84:197-215.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H.S., Alvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter E.J.** Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt *Food Research International*. 2009.

- Shah, N.P. y Jelen, P.** (1990). Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *Journal of Food Science*. 55:506–509.
- Shah, N. P.** (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17(11):1262-1277.
- Sheu, T. Y., y Marshall, R. T.** (1993). Micro-encapsulation of Lactobacilli in calcium 591 alginate gels. *Journal of Food Science*, 83:894–907
- Smidsrød O. y Skjak-Braek G.** (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnology* 8:71–78.
- Song, S.H., Cho, Y.H. y Park, J.** (2003). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using a microporous glass membrane emulsification system. *Journal Food Science* 68(1): 195-200.
- Stanton, G., Gardiner, H., Meehan, K, Collins, G., Fitzgerald, PB., Lynch., Ross RP.** (2001). Market potential for probiotics. *American Journal Clinical Nutrition*. 73:S476-S483.
- Stenson L. R., Klaenhammer, T. R. y Swaisgood, H. E.** (1987). Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci are protected from bacteriophages. *Journal of Dairy Science*. 70 (6):1121–1127.
- Stewart PS. y Robertson, CR.** (1989). Microbial growth in a fixed volume: studies with entrapped *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 30:34-40.
- Sung H. H.** (1997). Enhancing survival of lactic acid bacteria in ice cream by natural encapsulation. *Dissertation Abstracts International*. 13(9):5407.
- Szczesniak, A.S.** (1998). Objective measurements of food texture. *Journal Food Science* 28:410-420.
- Tamime A.Y. Saarela, M., Korslund Søndergaard, A., Mistry, V.V y Shah, N.P.** (2005). Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. En: Tamime, A.Y. (ed.). *Probiotic dairy products*. Blackwell Publishing, Oxford p. 39-72.
- Tamime A.Y., Marshall V.M.E. y Robinson, R.K** (1995). Microbiological and technological aspects of fermented milks by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*. 62:157-187.

Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Smart, J. y Gopal, P.K. (2000) Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *App. Environ. Microbiol.* 66:2778-2588.

van der Wielen, P.W., Lipman, L.J., van Knapen, F. y Biesterveld, S. (2002). Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispantus* and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. *Applied and Environmental Microbiology.* 68:555-559.

Van Waser, J.P. y Callis, C.F. (1958). Metal complexing by phosphates. *Chemical Reviews.* 58:1011-1046.

México D.F. a 25 de Febrero del 2010.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis.
“PROTECCIÓN DE *Lactobacillus rhamnosus* EN CÁPSULAS DE ALGINATO DE
CENTRO LÍQUIDO”

Que presentó
Jazmín Gabriela Reyes Ocampo

Comité Tutorial:


Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

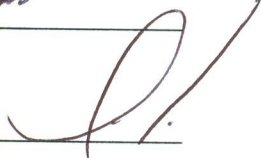
Asesora: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

Asesora: M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz

Jurado:

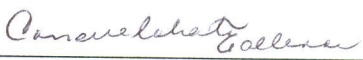
Presidente: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero





Secretario: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Vocal: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros



Vocal: Dra. Diana Jacqueline Pimentel González