



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus*
encapsulado en esferas de quitosán-alginato incorporadas
en un yogurt bebible.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

FRIDA MIGUEL LEÓN LUGO

ASESORA: DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

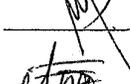
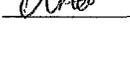
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, autoriza a la alumna:
Frida Miguel León Lugo
Con número de cuenta: **412066287** a presentar el: **Trabajo de Tesis**

Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus rhamnosus encapsulado en esferas de quitosán-alginato incorporadas en un yogurt bebible.

Bajo la asesoría del: **Dra. Susana Patricia Miranda Castro**
Para obtener el título de la carrera: **Ingeniería en Alimentos**

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA Y FECHA
PRESIDENTE	<u>I.Q. Guadalupe Franco Rodríguez</u>	 4-IV-16
VOCAL	<u>Dra. Susana Patricia Miranda Castro</u>	 6-V-2016
SECRETARIO	<u>I.A. Miriam Álvarez Velasco</u>	 5/IV/16
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. María Guadalupe Amaya León</u>	 5/IV/16
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza</u>	 8/04/16

Atentamente notificamos su participación en la revisión y evaluación del trabajo para que en un plazo no mayor a 30 días hábiles emita su VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Mex. a 30 de Marzo de 2016.

M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
JEFE DEL DEPARTAMENTO

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

A la vida por darme una segunda oportunidad.

A mis padres y hermana por su amor y apoyo incondicional, por animarme y creer en mí, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de ser parte de la máxima casa de estudios de México.

A la Dra. Susana Patricia Miranda Castro, por compartir su experiencia y por el apoyo durante la realización de este proyecto.

A mis amigos dentro de la Universidad, la vida es más bonita estando con personas como ustedes.

A Yareli, Karla y Mireya, gracias por estar en los buenos y malos momentos.

A Alfredo gracias por todo.

“Los sueños parecen al principio imposibles, luego improbables, y luego, cuando nos comprometemos, se vuelven inevitables”

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO I. ANTECEDENTES	4
1.1 Alimentos funcionales	4
1.1.1 Productos lácteos funcionales	5
1.1.2 Yogurt	6
1.1.3 Proceso de elaboración del yogurt	7
1.2 Probióticos	8
1.2.1 Características generales	8
1.2.2 Bacterias ácido lácticas	9
1.2.2.1 <i>Lactobacillus casei</i>	9
1.2.2.1.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001	10
1.2.3 Crecimiento bacteriano	12
1.2.4 Efecto de los probióticos en la salud	13
1.2.5 Prebióticos	15
1.2.5.1 Inulina	15
1.2.6 Simbióticos	16
1.2.7 Microflora del intestino humano	17
1.2.8 Funciones de la microbiota	18
1.3 Microencapsulación	18
1.4.1 Técnicas de encapsulación	19
1.3.1.1 Gelificación iónica	20
1.3.2 Materiales encapsulantes	21
1.3.2.1 Hidrocoloides	21
1.3.2.2 Estructura de los hidrocoloides	22

1.3.2.2.1 Algintato	24
1.3.2.2.2 Generalidades del alginato	24
1.3.2.2.3 Aplicaciones	25
1.3.2.2.4 Quitosán	25
1.3.2.2.5 Generalidades del quitosán	25
1.3.2.2.6 Aplicaciones	27
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	28
2.1 Cuadro metodológico	28
2.2 Objetivos	29
2.3 Descripción del cuadro metodológico	30
CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lácteos funcionales.	5
Figura 2. Queso cheddar.	11
Figura 3. Curva de crecimiento bacteriano.	12
Figura 4. Interacciones intercatenarias entre secuencias de conformación regular (a) doble hélice (b) haz dobles hélices, (c) caja de huevos (Nieto et. al 2014).	23
Figura 5. Cadena de alginato (Krasaekoopt, 2012).	24
Figura 6. Estructura del quitosán (a) unidad de N-acetilglucosamina (b) unidad de glucosamina (Peniche et. al 2003).	26
Figura 7. Rehidratación de medio de cultivo MRS.	31
Figura 8. Esterilizadora ALL AMERICAN.	30
Figura 9. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sembrado en forma masiva.	31
Figura 10. Matraces incubados con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	32
Figura 11. Caldo MRS filtrado.	33
Figura 12. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en MRS.	36
Figura 13. Biomasa.	35
Figura 14. Formación de esferas.	36
Figura 15. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> encapsulado.	37
Figura 16. Programa ImageJ.	38
Figura 17. Potenciómetro HORIZON.	38
Figura 18. Contador de colonias.	40
Figura 19. UFC de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en MRS obtenidas en un periodo de 27 días.	41
Figura 20. Curva de crecimiento <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	42
Figura 21. Crecimiento exponencial de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	43
Figura 22. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> liofilizado.	44
Figura 23. Esferas analizadas para el método de esfericidad.	44
Figura 24. Pérdida de agua de las esferas en condiciones de refrigeración.	47
Figura 25. Viabilidad de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> encapsulado en esferas de quitosán/alginato incorporadas en un yogurt bebible.	48
Figura 26. Colonia de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en MRS.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Los principales efectos saludables de cepas del grupo <i>Lactobacillus casei</i> .	10
Tabla 2. Beneficios terapéuticos del tratamiento probiótico.	14
Tabla 3. Técnicas y procesos usados para la encapsulación de probióticos.	19
Tabla 4. Resultados de la curva de crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	42
Tabla 5. Análisis de área, perímetro y circularidad en esferas.	45
Tabla 6. Valores de pH.	45
Tabla 7. Análisis de parámetros estadísticos para sinéresis.	46
Tabla 8. Porcentajes de sinéresis.	46
Tabla 9. Viabilidad de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en un periodo de 27 días.	48

RESUMEN

Se desarrollaron esferas de quitosán con alginato conteniendo *Lactobacillus rhamnosus*, incorporándole inulina como agente prebiótico para asegurar su supervivencia de tal manera que llegue una cantidad adecuada al intestino y así se pueda ejercer un beneficio en la salud del consumidor. Por lo cual se elaboraron las esferas partiendo de concentraciones ya reportadas que fueron incorporadas en un yogurt bebible bajo condiciones de refrigeración a 12°C y 85% HR. Se procedió con la evaluación de su viabilidad donde su supervivencia fue ascendente con el paso del tiempo, comenzando con una concentración de 2.4×10^{10} UFC/g y terminando con una de 152×10^{10} UFC/g en un periodo de 27 días.

INTRODUCCIÓN

La industria de los alimentos funcionales ha tenido un considerable incremento a partir de 1990, entre los más representativos se encuentran los productos lácteos, tales como leches fermentadas y quesos frescos, estos alimentos se encuentran asociados a los probióticos que, tras la ingestión de ciertas cantidades, ejercen beneficios para la salud del consumidor más allá de la nutrición básica.

Los efectos promotores de la salud de estas bacterias van desde el alivio de molestias gastrointestinales, reducción de la intolerancia a la lactosa, la reducción nivel de colesterol, la actividad anti-cancerígena, la propiedad anti-tumor, la reducción de los síntomas alérgicos, la estimulación del sistema inmune y prevención de la diarrea, entre otros. Sin embargo, a fin de ejercer los impactos beneficiosos para la salud, el nivel de probióticos en productos alimenticios que sirven como sistemas de suministro tiene que ser alta, lo que sugiere nivel mínimo de células probiótico vivo debe ser de al menos 10^6 a 10^7 UFC/g antes de su consumo (Chaikham, 2015).

Está bien documentado que la combinación simbiótica de prebióticos con cepas probióticas promueve la colonización en el tracto intestinal para inhibir el crecimiento de patógenos humanos o animales (Soukoulis et. al 2014). Además, la inclusión de los probióticos en matrices de alimentos puede ayudar en mantener su viabilidad durante la digestión humana, donde en los últimos años la microencapsulación ha recibido cada vez más atención creciente en la última década, lo que resulta en un gran número de aplicaciones en la industria, la agricultura, la medicina, la farmacia y la biotecnología (Peniche, 2003).

Entre muchos polisacáridos naturales y biocompatibles es importante destacar el uso potencial de los alginatos, que es un polímero que se encuentra en las paredes celulares de las algas marrones, así como algunas células bacterianas y son los más conocidos por sus capacidades gelificantes. Sin embargo, otro biopolímero con gran interés es el quitosán, que se produce principalmente a partir de la quitina que se encuentra en los exoesqueletos de los crustáceos principalmente. Debido a la naturaleza policatiónica del

quitosán y la naturaleza polianiónica en el alginato en solución acuosa, los dos polímeros cargados son capaces de formar espontáneamente complejos de polielectrolito (PEC) cuando se mezclan (Sibaja et. al 2015)

La encapsulación con alginato-quitosán se puede producir por diferentes métodos uno de ellos es conocido como gelificación iónica y es una técnica donde el alginato se pone en contacto con iones de calcio que junto con la solución de quitosán forma un gel de forma instantánea.

Por lo tanto en el presente proyecto se elaboraron esferas de quitosán-alginato para la encapsulación del *Lactobacillus rhamnosus* incorporadas en un yogurt bebible para evaluar su viabilidad durante su almacenamiento.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1 Alimentos funcionales

El arduo trabajo que en materia de salud y nutrición se realiza en México ha tenido avances significativos; sin embargo falta mucho por resolver de los problemas actuales que aquejan a la población. En México se enfrentan grandes problemas; por una parte la tasa de desnutrición, aunque ha disminuido en los últimos años, sigue siendo muy alta. Además de ello la pobreza y el desconocimiento o falta de información son factores que dificultan cualquier tipo de mejora. En materia de alimentos industrializados, los consumidores en los últimos años han mostrado un marcado interés hacia ciertos alimentos, que además de su contenido nutritivo básico aporten beneficios a sus funciones fisiológicas (Ramírez, 2010).

El concepto de prevención en la nutrición es el que dio lugar al nacimiento de los alimentos funcionales, los cuales fueron autorizados en 1990 después del informe del Comité de Estudio de los Alimentos Funcionales. En el caso del International Food Information Council, los alimentos funcionales se definen como “aquellos alimentos que proveen un beneficio a la salud más allá de la nutrición básica”. En el documento emitido por la *American Dietetic Association* los alimentos funcionales son definidos como “aquellos que incluyen algún alimento modificado enriquecido o fortificado, que puede producir un beneficio sobre la salud, además de su tradicional función nutritiva, todo ello dentro de una dieta regular y en los niveles que generalmente se consumen” (Ramírez, 2010).

Los alimentos funcionales en México. México está trabajando en evaluar la posibilidad de un marco de referencia que permita plasmar en los productos, lineamientos nutrimentales o saludables con estricto apego a criterios científicamente sustentados. De igual manera se estudia el efecto de las posibles adecuaciones a la Ley General de Salud Vigente, a sus reglamentos y a normas oficiales vigentes (Ramírez, 2010).

En la actualidad la información que deben contener las etiquetas de los productos alimenticios que se expenden en México está regulada por varias normas oficiales, las cuales se refieren específicamente a etiquetado y que entraron en vigor a partir de 1996;

por ende, todos los alimentos y bebidas no alcohólicas que se elaboran y comercializan en México están relacionados con una o varias normas (Ramírez, 2010).

Esta tendencia de contribuir con productos alimenticios a las necesidades nutricionales ha crecido de manera sustancial hasta nuestros días. Podemos observar como la industria de alimentos ha diversificados alternativas que intentan brindar opciones para solucionar problemas de nutrición, tanto por exceso, como por déficit de nutrimentos, tratando de contribuir dentro de sus posibilidades a la solución de ambas situaciones y con ellos busca el crecimiento del sector de alimentos que se adecuen a las recomendaciones dietéticas (Ramírez, 2010).

1.1.1 Productos lácteos funcionales

Muchos de los productos elaborados tradicionalmente por la industria láctea pueden considerarse como alimentos con funcionalidad fisiológica. Se sabe desde hace mucho tiempo que los productos lácteos como la leche líquida, el queso, el yogur y muchos otros productos son excelentes fuentes de varias vitaminas y minerales importantes, como la riboflavina, el fosforo y el calcio (Mazza, 2000).

Los científicos han estudiado los efectos beneficiosos para la salud de los productos lácteos fermentados como el yogurt, kéfir o varios otros tipos de leches fermentadas. En este tipo de productos la funcionalidad fisiológica está ligada a las bacterias lácteas y los productos metabólicos que resultan de su interacción con el medio lácteo (Mazza, 2000).



Figura 1. Lácteos funcionales.

1.1.2 Yogurt

El yogurt es uno de los productos de leche fermentada popular conocido por miles de años y ha tenido mucha atención en pocos años con la llegada de los probióticos en los productos lácteos. El ácido láctico producido por la fermentación de la lactosa actúa sobre la proteína de leche para dar yogurt sus características de textura y sabor. Al ser nutricionalmente rica en proteínas, calcio, riboflavina, vitamina B6 y vitamina B12, el yogurt se considera que tiene más beneficios nutricionales que la leche. Tiene una larga historia de usos medicinales en particular, para una variedad de enfermedades gastrointestinales y diarrea donde en los últimos años, el yogurt se ha utilizado como un vehículo para las bacterias probióticas (Ashraf, 2011).

De acuerdo a la NOM-181-SCFI-2010 el yogurt es el producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH.

Según la FAO/OMS (1977) el yogurt es una leche coagulada obtenida por fermentación láctica acida, producida por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, de la leche pasteurizada o concentrada con o sin adiciones (de leche en polvo, etc.). Los microorganismos del producto final deben ser viables y abundantes.

El yogurt es una leche fermentada obtenida por multiplicación en la leche de dos bacterias lácticas específicas asociados: estas bacterias lácticas se cultivan en leche previamente pasteurizada con el fin de eliminar total o parcialmente la flora microbiana preexistentes. Después de la fermentación, el yogurt se enfría a una temperatura comprendida entre 1 y 10°C, excluyendo cualquier otro tratamiento térmico. En este momento ya está listo para su consumo (Luquet, 1993).

La fabricación del yogurt incluye varias etapas: la preparación y tratamiento de leche, el desarrollo de la fermentación, la detención de la fermentación y el envasado (Luquet, 1993).

1.1.3 Proceso de elaboración del yogurt

Preparación y tratamiento de la leche

El extracto seco de la leche de partida es un factor importante en la fabricación, pues condiciona la consistencia y viscosidad del producto. Para elevar el extracto seco de la leche se puede proceder de diversas maneras, aunque las dos más utilizadas son la de añadir leche en polvo o concentrarla. Si se utiliza leche en polvo desnatada, la adición debe realizarse a una concentración del 2 al 3% para aumentar el contenido de sólidos totales que contribuyen con la consistencia final del yogurt (Luquet, 1993).

La leche enriquecida se somete a continuación a un tratamiento térmico, siendo el más utilizado la pasteurización a 90-95°C (con un tiempo de residencia en la cámara de 3 a 5 minutos). Este tratamiento tiene por objeto la destrucción de gérmenes patógenos y de gran parte de la flora banal original, favoreciendo el crecimiento de la flora láctica específica, en particular el *Streptococcus thermophilus*. Además causa un tercer efecto, el de favorecer la precipitación de una fracción de las proteínas del lactosuero, lo que implica una mejor retención de agua y una mejora de la consistencia (Luquet, 1993).

Desarrollo de la fermentación

Esta etapa generalmente llamada fase de acidificación, es la etapa característica de la fabricación del yogurt, y se puede descomponer en fase de siembra y fase de incubación (Luquet, 1993).

La siembra consiste en la inoculación de los fermentos específicos del yogurt, el *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, debe hacerse a una concentración lo suficientemente elevada para asegurar una acidificación correcta. La cantidad mínima de siembra varía según a vitalidad de los cultivos entre 0.5 y 1%, y el valor máximo se sitúa alrededor del 5-7%; no deben sobrepasarse estos valores, ya que si no el aporte del ácido láctico y de leche cuajada puede llegar a ser demasiado importante, e incluso la acidificación puede ser demasiado rápida (Luquet, 1993).

La fase de incubación corresponde al desarrollo de la acidez en el yogur, y depende de dos factores, la temperatura y la duración. La temperatura debe elegirse próxima a la

óptima del *Lactobacillus bulgaricus* (47-50°C) ya que es preferible que los *Streptococcus thermophilus* aseguren el comienzo de la fermentación láctica (Luquet, 1993).

Detención de la fermentación

Cuando la acidificación alcanza un cierto valor (70-80°D en el caso de los yogures tradicionales, 100-120°D en los yogures batidos), hay que bloquear el proceso inhibiendo el desarrollo de las bacterias lácticas, para lo que se debe disminuir considerablemente la temperatura (Luquet, 1993).

Envasado

Los yogures se envasan generalmente en dos tipos de recipientes los vasos de vidrio y los de plástico. En el llenado y dosificación de los vasos, pueden añadirse aromas, pulpa o frutas bajo la protección bacteriológica por aire filtrado en vitrinas de flujo laminar (Luquet, 1993).

1.2 Probióticos

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales (FAO Y OMS 2006).

1.2.1 Características generales

La mayoría de los expertos están de acuerdo en que, en principio, un probiótico es una preparación o producto que contiene un determinado cultivo o una mezcla de cultivos de microbios vivos que, cuando se ingieren en cantidades suficientes, ejerce efectos beneficiosos en la salud más allá de la nutrición básica, modificando la microflora gastrointestinal (Greenfield, 2009).

Debido a sus beneficios para la salud percibida, los probióticos han sido incorporados en una gama de productos lácteos, incluyendo yogures, quesos semiduros y duros, helados, leche en polvo y postres lácteos congelados. Sin embargo, todavía hay varios problemas con respecto a la baja viabilidad de bacterias probióticas en los alimentos lácteos. La microencapsulación de bacterias probióticas puede ser utilizado para mejorar

la viabilidad durante el procesamiento, y también para la administración dirigida en el tracto gastrointestinal (Anal y Singh, 2007).

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor. (FAO y OMS, 2006).

1.2.2 Bacterias ácido lácticas

En este grupo se incluye una clasificación funcional de bacterias no patógenas, no toxigénicas, Gram positivas, fermentativas, que se asocian a la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles para fermentación de los alimentos. En este grupo se incluyen las especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus thermophilus*. Dado que el género *Bifidobacterium* no se asocia con fermentación de alimentos y es taxonómicamente diferente de otras bacterias ácido lácticas (BAL), habitualmente no se les agrupa como un miembro de las BAL (World Gastroenterology Organisation, 2011).

El desarrollo de las BAL tiene lugar a valores de pH entre 4.5 y 6, deteniéndose su actividad a un pH entre 3.2 y 3.8, aunque con rendimientos de ácido láctico diferentes según sean homofermentativas o heterofermentativas (Ramírez y Ulloa, 2011).

Las BAL son los más importantes microorganismos probióticos típicamente asociados con el tracto gastrointestinal humano. Algunos de los más conocidos que se utilizan como probióticos son *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* etc. (Anal y Singh, 2007).

1.2.2.1 *Lactobacillus casei*

La taxonomía del grupo *L. casei* se ha debatido durante mucho tiempo, principalmente debido a la falta de diferenciación, incluso mediante técnicas moleculares, entre la mayoría de *L. casei* y cepas de *Lactobacillus paracasei*. La nomenclatura actualmente aceptado y división taxonómica de *L. casei* del grupo es el siguiente:

(1) *L. casei* (cepa de tipo: ATCC 393); (2) *L. paracasei* subsp. *paracasei* (cepa de tipo: ATCC 25302) y *L. paracasei* subsp. *tolerans* (cepa de tipo: ATCC 25599); y (3) *Lactobacillus rhamnosus* (cepa de tipo: ATCC 25599) (Gobbetti y Minervini, 2014).

Tabla 1. Los principales efectos saludables de cepas del grupo *Lactobacillus casei*.

Cepa	Efecto
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	La modulación de la función inmune Protección contra la diabetes mellitus Protección contra Salmonella resistente a múltiples medicamentos
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lcr35	Prevención del asma antiinflamatoria Efecto sobre las células epiteliales intestinales
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	La reducción de la duración de las infecciones respiratorias Protección de función de barrera en las células epiteliales intestinales Reducción potencial de incidencia de enfermedades
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001	Atenuación de alergia
<i>Lactobacillus paracasei</i> F19	Disminución de almacenamiento de grasa La atenuación de la lesión hepática
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	Propiedades antiartitricas
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	La inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> en biopelículas de saliva La modulación de la función inmune Protección contra la ocratoxina
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Inhibición de <i>Helicobacter pylori</i> Modulación del microbioma intestinal

Fuente: Gobbetti y Minervini, 2014.

1.2.2.1.1 *Lactobacillus rhamnosus* HN001

Contrariamente a la mayoría de los probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (también llamado DR20) es una cepa que fue aislada en Nueva Zelanda a partir de queso Cheddar. Estudios *in vitro* y en modelos animales han mostrado su capacidad de interferir con microorganismos patógenos tales como *salmonella* o *E. coli* enterotoxigénico y su presencia a nivel fecal ha sido confirmada en voluntarios sanos luego de ser consumido

en un producto lácteo. Sin embargo, la mayoría de la información disponible sobre los efectos de esta cepa en humanos se refiere a su capacidad de reforzar las defensas del individuo, más particularmente en sujetos con inmunosupresión leve (Cáceres y Gotteland, 2010).



Figura 2. Queso cheddar.

Recientemente se realizó un ensayo clínico en 382 pre-escolares de Santiago para evaluar el efecto protector del consumo de HN001 frente a episodios de infección respiratoria aguda durante los meses de invierno en el año 2006. Si bien no se observaron cambios en la incidencia, duración e intensidad de los episodios de infección respiratoria, se observó en un subgrupo de niños, una mayor concentración de inmunoglobulinas-A secretoras en las deposiciones, indicando la capacidad de esta cepa de estimular el sistema inmune local. Finalmente la administración de HN001 a madres con antecedentes de atopía durante el periodo de gestación y luego a los lactantes durante 6 meses resultó en una menor prevalencia de eczema comparado con aquellos que recibieron el placebo (Cáceres y Gotteland, 2010).

HOWARU® Rhamnosus es una cepa probiótica que está clínicamente probado como un medio seguro y eficaz para mantener el sistema inmunológico del cuerpo.

Morfología

Bacilos Gram positivos de longitudes variadas, que se producen comúnmente en cadenas cortas.

Áreas de aplicación

- Bebidas
- Confitería

- Lácteos
- Suplementos dietéticos
- Postres congelados (DUPONT, 2013).

1.2.3 Crecimiento bacteriano

El crecimiento de una población se estudia analizando la curva de crecimiento de un cultivo microbiano. Cuando los microorganismos se cultivan en medio líquido, crecen normalmente en un cultivo discontinuo o sistema cerrado, es decir, se incuban en un recipiente cerrado al que no se añade más cantidad de medio que la inicial; en consecuencia, las concentraciones de nutrientes disminuyen y las de residuos aumentan. Se puede representar el crecimiento de los microorganismos que se multiplican por fisión binaria como el logaritmo del número de celular frente al tiempo de incubación. La curva resultante tiene 4 fases diferentes (Prescott et. al 1999).

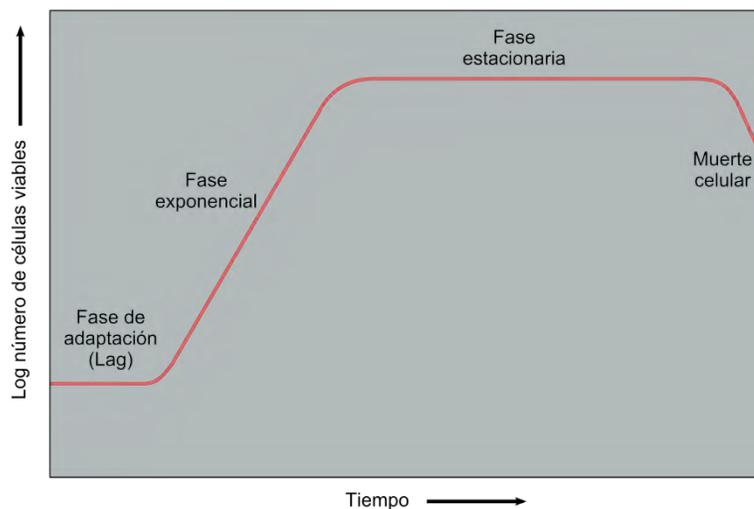


Figura 3. Curva de crecimiento bacteriano.

Fase de latencia: cuando se introducen microorganismos en un medio de cultivo fresco, normalmente no se produce un aumento inmediato del número de celular o de masa, y por ello, este periodo se denomina fase de latencia. La duración de esta fase varía considerablemente según la condición de los microorganismos y la naturaleza del medio. Por otra parte cuando se transfiere un cultivo en fase de crecimiento exponencial vigoroso a un medio nuevo de la misma composición, la fase de latencia se acorta o no se produce (Prescott et. al 1999).

Fase exponencial: durante la fase exponencial o logarítmica, los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, el tipo de medio y las condiciones en las que crecen. La velocidad de crecimiento es constante durante la fase exponencial, es decir, los microorganismos se dividen y duplican en número a intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente (Prescott et. al 1999).

Fase estacionaria: finalmente, el crecimiento de la población cesa y la curva de crecimiento se vuelve horizontal. El tamaño final de la población depende de la disponibilidad de nutrientes o a que se acumula algún producto metabólico tóxico, y otros factores, así como del tipo de microorganismo que se cultive. En la fase estacionaria el número total de microorganismos viables permanece constante (Prescott et. al 1999).

Fase de muerte: Si la incubación continúa después de que se alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero lo más probable es que mueran. (Brock et. al 1987). Cambios ambientales perjudiciales, como privación de nutrientes y acumulación de residuos tóxicos, originan la disminución del número de células viables, hecho que caracteriza la fase de muerte (Prescott et. al 1999).

1.2.4 Efecto de los probióticos en la salud

Tanto la investigación publicada como las observaciones clínicas han contribuido a la siguiente lista de supuestas acciones de los probióticos que fomentan la salud:

- Mantenimiento del equilibrio entre microorganismos patógenos y no patógenos (en especial tras el tratamiento antibiótico).
- Menor exposición sistémica a exposición antigénica/ descenso de la sensibilización alérgica (los niños no alérgicos presentan concentraciones superiores de lactobacilos que los niños con alergias).
- Mejora de la función inmunitaria local (aumento de la actividad del tejido linfoide asociado al intestino, así como de los valores de la inmunoglobulina A [IgA] y del interferón) y quizá sistémica.
- Descenso de la inflamación intestinal y mejora de la integridad de la mucosa (normalización de la permeabilidad intestinal).

- Posibles efectos quimiopreventivos del cáncer (Greenfield, 2009).

El objetivo del uso de probióticos es prevenir y, en ocasiones, tratar enfermedades específicas, y probablemente su función reside en optimizar la actividad del sistema inmunitario cuando la flora intestinal no lo logra. El tratamiento sostenido con un número adecuado de microorganismos específicamente seleccionados puede alterar de forma transitoria la flora intestinal, propiciando así la salud y el bienestar del huésped. La investigación apoya el uso de probióticos para prevenir y tratar una serie de enfermedades y destaca su potencial aplicación terapéutica en muchos otros ámbitos clínicos (Greenfield, 2009).

Tabla 2. Beneficios terapéuticos del tratamiento probiótico.

Patologías en las que los probióticos han demostrado beneficios.	Diarreas(víricas): tratamiento y prevención de diarreas víricas Prevención de diarreas asociadas a antibióticos Eccema
Patologías en las que los datos sugieren beneficios por parte de los probióticos.	Alergias alimentarias Enfermedad inflamatoria intestinal Intolerancia a la lactosa Tratamiento de infecciones recidivantes por <i>Clostridium difficile</i>
Patologías en las que la terapia con probióticos ha dado resultados prometedores.	Rinitis alérgica Asma Trastorno de déficit de atención Autismo Cólicos Prevención de cáncer de colon Fibrosis quística Dislipidemia Hepatopatía Artritis reumatoide Diarrea del viajero/enteritis bacteriana Aumento de la respuesta inmunitaria a vacunas Infecciones del tracto genitourinario

Fuente: Greenfield, 2009.

Las dosis diarias empleadas son muy amplias, de 1 a 20.000 millones de UFC (unidades formadoras de colonias), pero las recomendaciones tienden hacia 1 a 10.000 millones de UFC en lactantes y hacia 10.000 a 20.000 millones de UFC en niños mayores y adultos. Para lograr y mantener un efecto terapéutico, deben administrarse los probióticos repetidas veces para asegurar un nivel de población suficiente y constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, se dispone de pocos datos en cuanto a la duración adecuada del tratamiento de diferentes patologías clínicas (Greenfield, 2009).

El nivel de recomendación actual para las bacterias probióticas es $\geq 10^6$ UFC/g de un producto. Sin embargo, los estudios han demostrado baja viabilidad de los probióticos en los preparativos de mercado. La necesidad de controlar la supervivencia de organismos probióticos en productos fermentados a menudo se ha descuidado, con el resultado de que un número de productos llegar al mercado que contiene baja concentración de bacterias viables (Ashraf y Shah, 2011).

En México son pocas las compañías que comercializan cultivos probióticos, y en la especificación que proporciona el fabricante solo hace mención del tipo de microorganismo presente, pero no la proporción en la que se encuentran; su uso se restringe únicamente a la elaboración de leches fermentadas. En referencia a productos probióticos elaborados en México, el cultivo que utilizan lo reciben directamente de Japón o de proveedores europeos. A nivel de pequeños fabricantes se adquieren como cultivos liofilizados que son distribuidos por varias empresas (Ramírez, 2010).

1.2.5 Prebióticos

Los prebióticos, que también se conocen como «potenciadores probióticos» o «alimentos del colon», son nutrientes no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de uno o más microorganismos del colon, los cuales actúan para promover la salud y el bienestar del huésped. Los prebióticos desarrollados hasta el momento son principalmente oligosacáridos no digeribles, que de forma tradicional se han utilizado para añadir fibra a los alimentos sin añadir volumen (Greenfield, 2009).

1.2.5.1 Inulina

La inulina es un carbohidrato de almacenamiento presente en muchas plantas, vegetales, frutas y cereales y por tanto forma parte de nuestra dieta diaria. A nivel

industrial, la inulina se obtiene de la raíz de la achicoria y se usa como ingrediente en los alimentos, ofreciendo ventajas tecnológicas e importantes beneficios a la salud (Madrigal y Sangronis, 2007).

La propiedad de la inulina más extensivamente estudiada es su comportamiento como prebiótico, definido por su capacidad selectiva de estimular el crecimiento, donde estudios *in vivo* muestran que solo 4 g de inulina o de sus compuestos relacionados diarios son efectivas para incrementar el número de bacterias beneficiosas en el colon (bifidobacterias y lactobacilos), con la consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales (ejemplo: *E. coli* y bacterias de la especie *Clostridium spp.*). Entre otras propiedades a la salud de la inulina, se mencionan: el refuerzo de las funciones inmunológicas (ante cáncer o tumores), el aumento de la biodisponibilidad de minerales, la mejora del metabolismo de las grasas y de la respuesta glicémica (Madrigal y Sangronis, 2007).

La inulina está constituida por moléculas de fructosa, siendo el término “fructanos” usado para denominar este tipo de compuesto. Los fructanos por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y de animales, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso, colón). De esta manera, este tipo de compuestos se comportan como fibra dietética (Madrigal y Sangronis, 2007).

1.2.6 Simbióticos

Un simbiótico reúne en un solo producto características de prebiótico y de probiótico, mejorando, en teoría, las probabilidades de que los microorganismos vivos se implanten en el tracto gastrointestinal. En teoría, la combinación debe mejorar la supervivencia microbiana durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal superior, estimular selectivamente el metabolismo y el crecimiento de los microbios beneficiosos dentro del suplemento, así como en el tracto gastrointestinal (Greenfield, 2009).

1.2.7 Microflora del intestino humano

El término «microflora» o «microbiota» hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado. El tubo digestivo del ser humano alberga una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, pero también hongos, virus y protozoos, que se han adaptado a la vida en las superficies mucosas o en la luz del intestino desde hace milenios. Buena parte de los microorganismos que habitan el intestino humano se llaman nativos o indígenas porque habitan permanentemente el tracto gastrointestinal. De hecho, el individuo nace completamente estéril y adquiere su colonización microbiana inmediatamente después del nacimiento, fundamentalmente de la madre y del entorno ambiental inicial. Otras bacterias son microorganismos en tránsito, porque habitan temporalmente a la luz o las mucosas y después desaparecen. Estas bacterias se ingieren continuamente del ambiente (fundamentalmente a través de comidas y bebidas, etc.). El conjunto conforma el ecosistema microbiano del intestino, una colectividad de seres vivos con interdependencia y mutualismo entre las especies que lo constituyen (Guarner, 2011).

Las bacterias viven normalmente en el cuerpo humano (así como en el de los animales superiores y los insectos), incluido el aparato digestivo, donde existen más de 400 especies bacterianas: más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas cuyo número es diez veces superior al de las células de los tejidos que constituyen el cuerpo humano. El estómago contiene normalmente pocas bacterias (10³ unidades formadoras de colonias por ml de jugo gástrico), mientras que la concentración bacteriana aumenta a lo largo del intestino hasta llegar a una concentración final en el colon de 10¹² bacterias/g. La colonización bacteriana del intestino comienza con el nacimiento, ya que los recién nacidos permanecen en un medio estéril hasta que comienza el parto, y continúa durante toda la vida, con cambios notables en función de la edad. Las bacterias, que forman la denominada microflora intestinal residente, no suelen tener efectos nocivos agudos, y se ha demostrado que algunas de ellas son necesarias para mantener el bienestar de su huésped (FAO y OMS 2006).

1.2.8 Funciones de la microbiota

A partir de datos experimentales obtenidos mediante estudios en animales con colonización intestinal controlada, se han identificado tres funciones primarias de la microbiota intestinal: a) funciones de nutrición y metabolismo, como resultado de la actividad bioquímica de la microbiota, que incluyen recuperación de energía en forma de ácidos grasos de cadena corta, producción de vitaminas y efectos favorables sobre la absorción de calcio y hierro en el colon; b) funciones de protección, previniendo la invasión de agentes infecciosos o el sobrecrecimiento de especies residentes con potencial patógeno, y c) funciones tróficas sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal, y sobre el desarrollo y modulación del sistema inmune (Guarner, 2011).

La flora residente en el tubo digestivo protege de la invasión de microorganismos patógenos por el llamado “efecto barrera”. Esta propiedad de la flora es muy relevante para la prevención de patologías infecciosas en el huésped. El efecto barrera es consecuencia del hecho de que la flora residente ocupa los nichos ecológicos accesibles y administra, consume y agota todos los recursos. Hay una resistencia a la colonización por bacterias exógenas y también se impide el sobrecrecimiento de especies oportunistas que residen en el colon pero su crecimiento está controlado por el equilibrio de otras especies (Ortega et. al 2002).

1.3 Microencapsulación

Se define como una tecnología de empaquetar sólidos, líquidos o materiales gaseosos en cápsulas miniatura, selladas, que pueden soltar sus volúmenes a las proporciones controladas bajo influencias de condiciones específicas (Anal y Singh, 2007).

El material atrapado es más a menudo en forma de partículas (sólido o líquido) y se conoce como el material del núcleo o de la fase interna. El material que forma el recubrimiento se conoce como material de apoyo, encapsulante, material de la pared, vehículo o recubrimiento de membrana. Hay muchos beneficios de la microencapsulación de bacterias probióticas como son:

- Protección de bacteriófagos

- Aumento de la supervivencia durante la liofilización y congelación
- Una mayor estabilidad durante el almacenamiento
- Aumento de la supervivencia después de la exposición a la solución gástrica (Krasaekoopt y Bhandari, 2012).

1.4.1 Técnicas de encapsulación

Hay una gran cantidad de técnicas de microencapsulación que se puede aplicar para el atrapamiento de bacterias probióticas. Estos se pueden clasificar en dos categorías como métodos físicos (tales como secado por pulverización y secado por congelación) y métodos químicos (tales como el método de atrapamiento del hidrocoloide). Los métodos físicos implican con la conversión de líquido en la matriz inmóvil sólido como polvo seco, mientras que, los métodos químicos se refieren a la formación de matriz de un hidrocoloide a través de reacción química. Los probióticos encapsulados por métodos físicos son liberados por la rehidratación mientras que los probióticos encapsulados en matriz de gel por métodos químicos son liberados sólo cuando la matriz de gel se rompe debido a cambios en el pH o condición iónica (Krasaekoopt y Bhandari, 2012).

Tabla 3. Técnicas y procesos usados para la encapsulación de probióticos.

Técnica de microencapsulación	Tipos de materiales para el revestimiento	Principales pasos en el proceso
Secado por pulverización	Polímeros solubles en agua	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación de las soluciones que incluyen los microorganismos. 2. La atomización de la alimentación en aerosol. 3. El secado de pulverización (evaporación de la humedad). 4. Separación del producto seco.
Secado por congelación	Ceras, ácidos grasos, polímeros solubles e insolubles en agua.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación de las soluciones que contienen núcleo (por ejemplo, probióticos). 2. Solidificación por congelación de los materiales fundido en materiales no disolventes. 3. La eliminación de los materiales no disolventes mediante técnicas de sorción, extracción o evaporación.
Recubrimiento de lecho	Polímeros insolubles y	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación de soluciones de recubrimiento. 2. Fluidización de partículas del centro.

fluidizado/suspensión neumática	solubles en agua, lípidos, ceras	3. Recubrimiento de partículas del centro con soluciones protectoras.
Extrusión	Polímeros solubles e insolubles en agua	1. Preparación de materiales de solución de recubrimiento. 2. La dispersión del material encapsulado. 3. Enfriamiento del centro a través del líquido deshidratante.
Coacervación/técnica de separación de fase	Polímeros solubles en agua	1. El material de núcleo se dispersa en una solución de polímero de recubrimiento. 2. Mezclado físico de los materiales de revestimiento y núcleo en la fase de vehículo. 3. Aumento en la rigidez del recubrimiento mediante técnicas de reticulación o de desolvatación térmica, para formar microcápsulas autosostenibles.
Método electrostático	Polímeros con cargas opuestas	1. Mezcla de materiales de núcleo y revestimiento. 2. Extrusión de mezclas de materiales de núcleo-revestimiento en soluciones con cargas opuestas. 3. Liofilización o secado al horno de microcápsulas/microesferas/esferas.

Fuente: Anal y Singh, 2007.

1.3.1.1 Gelificación iónica

El método de gelificación iónica tiene varias ventajas tales como el uso de soluciones acuosas, la preparación de partículas de pequeño tamaño, el control del tamaño de partícula por la variación de parámetros tales como las concentraciones de quitosán, y la posibilidad de la encapsulación de un rango grande de moléculas (Hassani et. al 2015).

El sistema más común es el entrecruzamiento de alginatos con iones de calcio. Los alginatos son polímeros de ácido manurónico y gulurónico, solubles en agua a temperatura ambiente que gelifican en presencia de ciertos iones polivalentes. En general una solución de alginato se deja gotear en una solución de CaCl_2 obteniéndose en tiempos cortos, bolillas esféricas de tamaño controlado y homogéneo. Es un método que presenta gran flexibilidad, pues alginatos de distinto peso molecular y distinta composición química (distintas proporciones de ácidos gulurónico y manurónico) rinden geles de muy buenas características químicas y físicas. El requerimiento de Ca^{+2} depende de la composición química del gel. La concentración de CaCl_2 en la mezcla de gelificación puede variar entre

0,05 y 2 %. El rango de temperaturas de operación va desde 0 hasta 80°C. Las bolillas que se obtienen presentan diámetros entre 0,1 y 5 mm. Este sistema puede someterse a un secado parcial, con lo que el tamaño disminuye y aumenta la estabilidad mecánica sin variación en la porosidad. La desventaja que presenta es la inestabilidad frente a ciertos agentes capaces de secuestrar iones Ca^{+2} (p. ej.: fosfatos). Los puntos destacables de este método son:

- Reversibilidad de la gelificación: obliga a tomar precauciones en cuanto a la composición del medio a utilizar, principalmente pH y presencia de agentes que puedan secuestrar a los contraiones por precipitación o por formación de complejos.
- Buena estabilidad mecánica respecto al empaquetado en columna y a la agitación. Formación de bolillas regulares, y con tamaño controlado.
- Formación de redes macroporosas, que se conserva aún después del secado parcial.
- Alta capacidad de carga sin pérdida de estabilidad mecánica, pero con pérdida de eficiencia debido a resistencias difusionales.
- Rendimientos de actividad catalítica de entre 80 y 100% en condiciones de reacción controladas.
- Método suave, que permite que las células mantengan viabilidad y estabilidad. (Departamento de Ciencia y Tecnología, 2005).

1.3.2 Materiales encapsulantes

Hay varios tipos de materiales de matriz utilizados para la encapsulación de probióticos por métodos físicos y químicos. Polímeros, tal como alginato, goma de gelano, xantana, carragenina, y recientemente se utilizan proteínas como materiales de encapsulación (Krasaekoopt y Bhandari, 2012).

1.3.2.1 Hidrocoloides

Los hidrocoloides son un grupo diverso de polímeros de cadena larga que son fácilmente dispersos, total o parcialmente solubles, y con tendencia a hincharse en el agua. Cambian las propiedades físicas de la solución para formar geles, o habilitar engrosamiento, emulsificación, recubrimiento y estabilización la presencia de muchos grupos hidroxilo aumenta notablemente su afinidad por el agua vinculante haciéndolos hidrófila (Li y Nie, 2015).

Los hidrocoloides tienen una espléndida gama de propiedades funcionales y funcionan como agentes espesantes, agentes gelificantes, agentes espumantes, recubrimientos comestibles, emulsionantes, estabilizadores, etc. La razón principal para el uso extensivo de hidrocoloides en la industria alimentaria es su capacidad para unirse con agua y modificar las propiedades de los ingredientes alimentarios (Li y Nie, 2015).

1.3.2.2 Estructura de los hidrocoloides

Se puede formar un gel en presencia de un monómero que polimeriza, o mediante la presencia de biopolímeros que evolucionan de un estado sol a un estado de gel por un cambio químico o térmico (Nieto et. al 2014).

Se encuentran los geles termorreversibles que se pueden formar tras cambios de temperatura sin necesidad de catalizadores. En ese caso, un biopolímero (generalmente un polisacárido), una vez que está disuelto en agua, cambia su estructura desde el estado líquido a una sustancia sólida (gel) al disminuir la temperatura por debajo de un valor crítico en el que se produce un aumento claro de viscosidad, la cual se denomina “temperatura de gelificación”.

Las moléculas de los polisacáridos pueden ser lineales perfectas, ramificadas o ramificadas lineales. El grado de ramificación afecta a sus propiedades físicas, como son la solubilidad en agua, viscosidad, y comportamiento de gelificación, los polisacáridos ramificados son más solubles que los lineales perfectos; de los polisacáridos lineales perfectos, y los ramificados, se encuentran los ramificados lineales, que combinan las propiedades de los anteriores presentando alta viscosidad debido a la longitud de las cadenas, y gran solubilidad por presentar muchas ramificaciones cortas (Nieto et. al 2014). Se podrían dividir los polisacáridos en dos grandes grupos: gelificantes y no gelificantes. A su vez, los polisacáridos gelificantes, se dividen en gelificantes térmicos y químicos.

a) Los térmicos son aquéllos que bajo ciertos cambios de temperatura, una vez disueltos, pasan del estado líquido (sol) al estado sólido (gel). A su vez, se pueden dividir en dos grupos, según gelifiquen al calentar, como los derivados de las celulosas y almidones, o al enfriar, como los derivados del agar-agar (agarosa, agar), carragenato, inulina, etc.

b) Gelificantes químicos, en los que la gelificación se produce debido a la presencia de ciertas sustancias que, por atracción electrostática, hace que se unan las cadenas de polisacárido dando lugar a una estructura tridimensional (gel) (Nieto et. al 2014).

Los geles son redes que contienen agua y que presentan comportamiento de sólido, cuyas características de resistencia a la rotura, dependencia con la concentración, y rigidez dependen de la estructura de los hidrocoloides. En general, la formación de un gel consiste en las interacciones entre cadenas. Existen diferentes formas de interacción de las secuencias regulares de las cadenas existentes entre sí (como son la doble hélice y haz de dobles hélices del carragenato, y agaroides), cintas lineales estiradas (como es la denominada “caja de huevos” del alginato), o incluso otros empaquetamientos como son las cadenas estiradas con forma de cinta que presentan las gomas, o las interacciones entre conformaciones en cinta helicoidales y estiradas resultantes de la mezcla de varios polisacáridos en disolución, (por ejemplo, mezcla de carragenato y goma de garrofin) (Nieto et. al 2014).

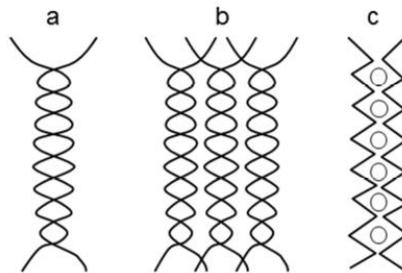


Figura 4. Interacciones intercatenarias entre secuencias de conformación regular (a) doble hélice (b) haz dobles hélices, (c) caja de huevos (Nieto et. al 2014).

De igual forma, existen otros polisacáridos que no gelifican (como las gomas), por lo que sus aplicaciones principales son como espesantes y estabilizantes. Sin embargo, es bien conocido que la combinación de éstos con otros polisacáridos que sí gelifican, presenta un efecto de sinergia, como es el caso de la goma de garrofin con el agar o con el carragenato, que dan lugar a geles con mayor fuerza de gel y elasticidad (Nieto et. al 2014).

1.3.2.2.1 Algintato

El alginato se informó por el químico británico E. C. Stanford en 1881. El alginato un polisacárido aniónico e hidrófilo, es uno de los materiales naturales biosintetizados más abundantes que se derivan principalmente de dos fuentes, plantas marinas, es decir, algas marrones (40% de materia seca) y las bacterias. Comercialmente, las especies de alginatos se derivan principalmente de las algas pardas, incluido *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. Los alginatos aislados de bacterias tales como las especies de *Azotobacter* y *Pseudomonas* no suelen ser económicamente viables para aplicaciones comerciales y están limitadas a estudios de investigación en pequeña escala (Zia et. al 2015).

1.3.2.2.2 Generalidades del alginato

En la forma estructural, el alginato contiene bloques lineales de (1 → 4) ácido β-D-manurónico (M) y de ácido α-L-gulurónico (G). Por lo general, los bloques se componen de tres diferentes formas de segmentos de polímero: residuos G consecutivos, residuos M consecutivos y alternando residuos de MG. La composición de copolímero, secuencia y pesos moleculares varían con el origen y especies que producen el copolímero (Zia et. al 2015).

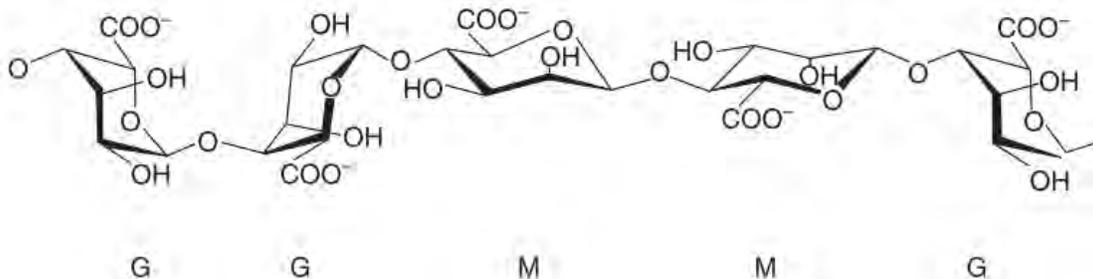


Figura 5. Cadena de alginato (Krasaekoopt, 2012).

El uso de alginato como material de apoyo en la microencapsulación usando el método químico se basa en su capacidad para formar un gel estable al calor fuerte, que se puede desarrollar y configurar a temperatura ambiente (Krasaekoopt y Bhandari, 2012).

1.3.2.2.3 Aplicaciones

El alginato forma un gel sólido bajo las condiciones de manipulación suaves que permite que sea utilizado para atrapar las células en perlas y formas. Curiosamente la encapsulación de células de algunos tipos de perlas de alginato puede en realidad aumentar la supervivencia celular y el crecimiento. Además, el alginato ha sido explorado para su uso en el hígado, los nervios, el corazón y la ingeniería de tejidos de cartílago. Farmacéutica, de alimentos (como añadido) y técnica aplicaciones (como en la pasta de impresión para la industria textil) son parte cuantitativa del mercado de alginatos (Zia et. al 2015).

1.3.2.2.4 Quitosán

Alrededor del 45% de los mariscos procesados consta de camarones, la pérdida de que se compone de exoesqueleto y cefalotórax, este último se ha convertido en un problema para el medio ambiente. Estos residuos representan el 50-70% del peso de la materia prima; sin embargo, contiene componentes valiosos, tales como proteínas y quitina. La quitina, al lado de la celulosa, es el segundo polisacárido más común en la tierra, con una producción anual de aproximadamente desde 10^{10} hasta 10^{12} toneladas. La quitina normalmente está aislada de los exoesqueletos de los crustáceos, moluscos, insectos y ciertos hongos (Sagheer et. al 2009).

Debido a la quitina tiene una estructura compacta, que es insoluble en la mayoría de los disolventes, se le efectúan modificaciones químicas. El derivado más común es el quitosán, derivado por desacetilación parcial de la quitina. Cuando el grado de desacetilación (DDA) alcanza un porcentaje superior al 50%, el quitosán se vuelve soluble en soluciones acuosas ácidas y se comporta como un polielectrolito catiónico (Sagheer et. al 2009).

1.3.2.2.5 Generalidades del quitosán

El quitosán es un polisacárido catiónico lineal compuesto esencialmente de β (1 \rightarrow 4) vinculada unidades de glucosamina junto con cierta proporción de unidades de N-acetilglucosamina. Por lo general, se obtiene por desacetilación de la quitina extensa, un homopolímero de la b (1 \rightarrow 4) vinculado N-acetil-D-glucosamina, presente en las conchas

de crustáceos, moluscos, las paredes celulares de los hongos, y la cutícula de los insectos (Peniche et. al 2003).

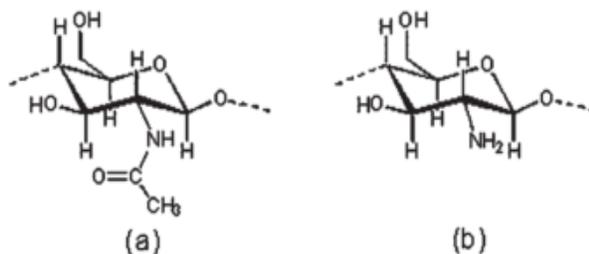


Figura 6. Estructura del quitosán (a) unidad de N-acetilglucosamina (b) unidad de glucosamina (Peniche et. al 2003).

El quitosán está ganando importancia en el campo de la alimentación y farmacéutica debido a su carácter catiónico polimérico único, buena biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad. Las propiedades de quitosán varían de acuerdo con su fuente. Los términos quitina y quitosán no se refieren a compuestos específicos, sino a dos tipos de copolímeros, que contienen los dos residuos de monómeros anhidro-N-acetil-D-glucosamina y anhidro-D-glucosamina, respectivamente. La quitina es uno de los polimeros más abundantes en la tierra (Anal y Singh, 2007).

Varias técnicas para extraer quitina a partir de diferentes fuentes han sido reportadas. El método más común se conoce como el procedimiento químico. El método químico para el aislamiento de la quitina a partir de la biomasa de los caparzones de los crustáceos que implica varios pasos principales: eliminación de la materia inorgánica (carbonato de calcio) en medio ácido diluido (desmineralización), y por lo general se lleva a cabo la desmineralización mediante el uso de HCl. Seguido de la extracción de la materia de proteínas en medio alcalino (desproteínización), y se realiza tradicionalmente mediante el tratamiento de los residuos de los caparzones con soluciones acuosas de NaOH o KOH. La eficacia de la desproteínización alcalino depende de la temperatura de proceso, la concentración de álcali, y la relación de su solución a las conchas. La quitina es convertida en quitosán industrialmente más aplicable (Sagheer et. al 2009).

Una modificación estructural de la quitina a menudo se realiza por hidrólisis alcalina. Es soluble en medio ácido acuoso debido a la presencia de grupos amino (Sagheer et. al 2009).

1.3.2.2.6 Aplicaciones

Dado el gran número de trabajos que existen sobre este material es conveniente realizar una clasificación por área sobre las aplicaciones que se le han ido dando. A continuación se presentan algunas de ellas.

Química analítica: aplicaciones cromatográficas, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, etc.

Biomedicina: membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, etc.

Agricultura y ganadería: recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, en formulación de pesticidas, etc.

Cosméticos: espumas de afeitar, cremas para la piel y el cuerpo.

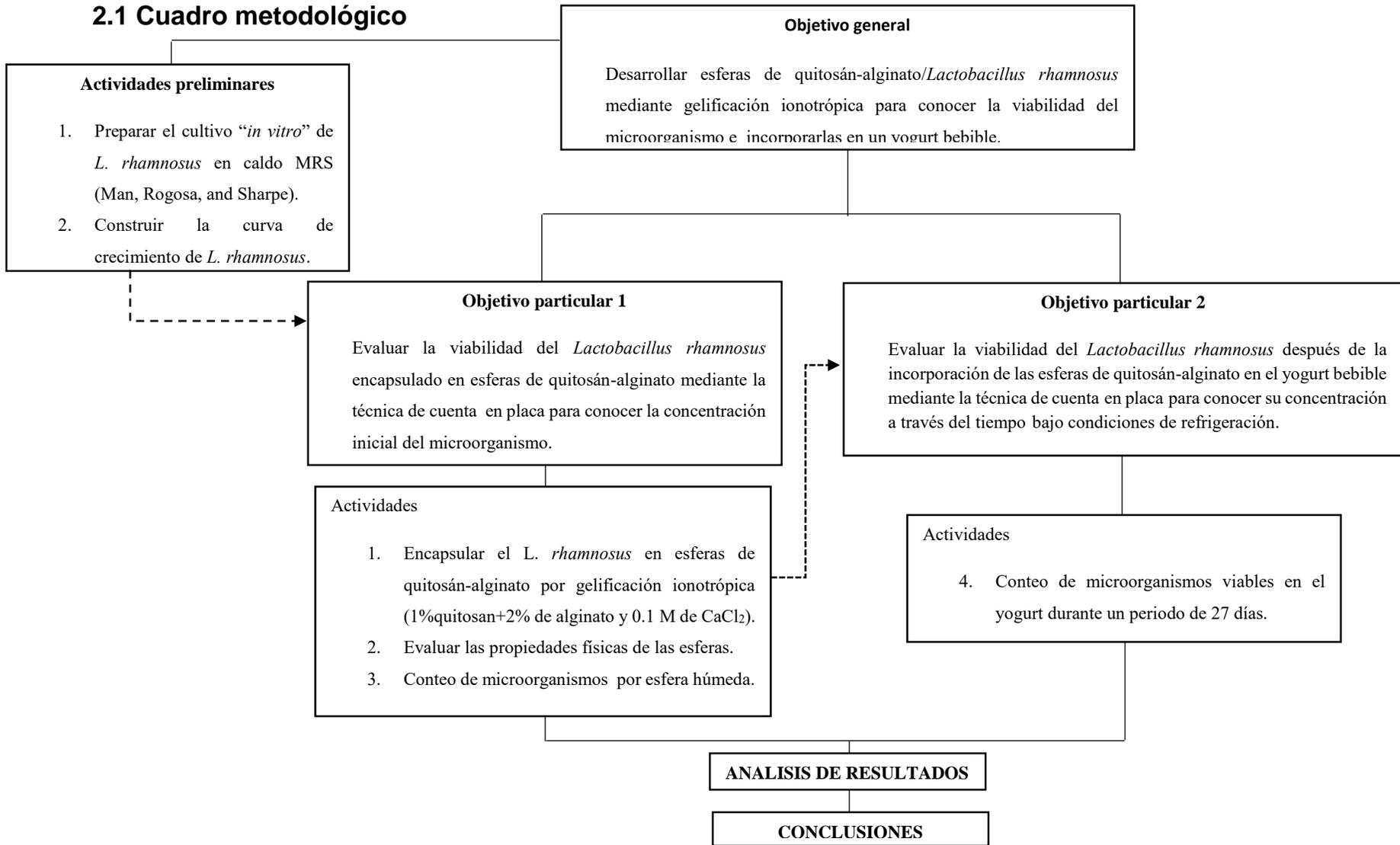
Dietéticos: adelgazantes (existe una amplia variedad de productos comerciales que ofrecen el polímero como atrapado de grasas en el estómago).

Industria: del papel, textil, alimentaria (soporte para inmovilización de enzimas en la producción de maltosa, espesante en alimentos, agente de oxidación controlada, agente preservante).

Tratamiento de agua: agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua, agentes filtrantes para piscinas y spas, remociones de metales, remoción de surfactantes, etc. (Lárez, 2003).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Cuadro metodológico



2.2 Objetivos

Objetivo general

Desarrollar esferas de quitosán- alginato- *Lactobacillus rhamnosus* mediante gelificación ionotrópica e incorporarlas en un yogurt bebible para conocer la viabilidad del microorganismo en el producto final.

Actividades preliminares

1. Preparar el cultivo “*in vitro*” de *Lactobacillus rhamnosus* en caldo MRS (Man, Rogosa, and Sharpe).
2. Construir la curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*.

Objetivo particular 1

Evaluar la viabilidad del *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado en esferas de quitosán-alginato mediante la técnica de cuenta en placa para conocer la concentración inicial del microorganismo.

Objetivo particular 2

Evaluar la viabilidad del *Lactobacillus rhamnosus* después de la incorporación de las esferas de quitosán-alginato en el yogurt bebible mediante la técnica de cuenta en placa para conocer su concentración a través del tiempo bajo condiciones de refrigeración.

2.3 Descripción del cuadro metodológico

Actividad 1

Preparación de caldo MRS

Material

Vidrio de reloj
Probeta 1 L
Vaso de precipitado 2L
2 Matraces Erlenmeyer 1L
Espátula
Barra magnética de agitación

Equipo

Agitador magnético (THERMO SCIENTIFIC Mod. Cimarec)
Esterilizadora (ALL AMERICAN Mod. 25x)
Balanza digital (Ohaus Mod. Scout-pro)

Reactivo

Medio de cultivo MRS

De acuerdo a las instrucciones del envase se rehidrataron 55 g del medio cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) se disolvieron en 1 litro de agua destilada, se dejó reposar 10 minutos, se homogeneizó la mezcla y se pasó a matraces Erlenmeyer, los cuales se esterilizaron a 121°C por 15 min.



Figura 7. Rehidratación de medio de cultivo MRS.



Figura 8. Esterilizadora ALL AMERICAN.

Preparación de agar MRS

Material

Vidrio de reloj
Espátula
Probeta 1 L
Vaso de precipitado 2L
2 Matraces Erlenmeyer 1L
Cajas Petri estériles

Equipo

Agitador magnético (THERMO SCIENTIFIC Mod. Cimarec)
Esterilizadora (ALL AMERICAN Mod. 25x)
Balanza digital (Ohaus Mod. Scout-pro)
Incubadora (Blue M Lindberg Mod. GI 200A)

Reactivos

Agar bacteriológico
Medio de cultivo MRS

Se agregaron 15 ml de agar bacteriológico a un litro de medio de cultivo MRS, se homogenizó la mezcla y se distribuyó en matraces para su esterilización a 121°C durante 15 minutos, el contenido fue vertido en cajas Petri, las cuales fueron incubadas para verificar su esterilidad y posteriormente se guardaron en el refrigerador para los posteriores análisis.

Preparación del inóculo

Material

Mecheros Bunsen
Cajas Petri con MRS
Matraz Erlenmeyer 250 ml
Asa bacteriológica
Varillas de vidrio
Portaobjetos y cubreobjetos

Muestra bacteriana

Lactobacillus rhamnosus (DUPONT)

Equipo

Incubadora (Blue M Lindberg Mod. GI 200A)
Microscopio

Reactivos

Cristal violeta
Lugol
Alcohol-acetona
Safranina
Aceite de inmersión
Solución salina 0.85%

Se partió de un cultivo puro liofilizado de *Lactobacillus rhamnosus* el cual fue hidratado con solución salina fisiológica y sembrado en caja Petri con agar MRS. Se verificó su pureza con la tinción de Gram en la caja y fue sembrado en forma masiva. Posteriormente después de 2 días de incubación el crecimiento del microorganismo fue recolectado haciendo un raspado en la caja, agregando caldo de cultivo MRS y transfiriendo esta suspensión a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón con 100 ml de medio líquido (caldo MRS) siendo incubados a 37°C durante 16 horas (Liew et. al 2005).



Figura 9. *Lactobacillus rhamnosus* sembrado en forma masiva.

Actividad 2

Curva de crecimiento del *L. rhamnosus*

Material

Medio de cultivo MRS
Probeta 1 L
Vaso de precipitado 2L
Matraces Erlenmeyer 250 ml
Espátula
Vidrio de reloj
Tubos de ensayo 100 ml
Jeringas estériles
Gradilla
Barra magnética de agitación
Membranas de papel filtro (0.22 μm)
Filtros de membrana microbiológica

Equipo

Agitador magnético (THERMO SCIENTIFIC Mod. Cimarec)
Esterilizadora (ALL AMERICAN Mod. 25x)
Balanza digital (Ohaus Mod. Scout-pro)
Incubadora (Blue M Lindberg Mod. GI 200A)
Estufa

Se prepararon 11 matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de caldo MRS, en cada matraz se incorporaron 5 ml de inóculo, y se incubó durante 18 h a 37°C, se enumeraron los matraces de 1 al 11. Cada 2 horas el contenido de un matraz se filtró y se puso a secar a 60°C en estufa a peso seco para evaluar el peso de las células. Posteriormente los datos obtenidos se graficaron en función del tiempo.



Figura 10. Matraces incubados con *Lactobacillus rhamnosus*.



Figura 11. Caldo MRS filtrado.

Una vez que se obtuvo la gráfica se prosiguió con el cálculo de la velocidad de crecimiento específico en la fase exponencial la cual puede ser descrita por la ecuación:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Donde x = la concentración de biomasa microbiano

t = tiempo (h)

μ = tasa de crecimiento específico (h^{-1})

Integrando la ecuación se tiene

$$x_t = x_0 e^{\mu t}$$

Donde x_0 = la concentración de masa inicial

x_t = la concentración de masa después de un intervalo de tiempo

En consideración de los logaritmos naturales la ecuación se convierte en

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t$$

Por lo tanto, una gráfica del logaritmo natural de la concentración de biomasa en función del tiempo debe producir una línea recta, la pendiente de lo que equivaldría a μ (Stanbury, et.al 1995).

ACTIVIDAD 3

Preparación de las soluciones

Material

Espátula
Probeta 200 ml
Vidrio de reloj
4 vasos de precipitado 200 ml
Barra magnética de agitación

Equipo

Agitador magnético (THERMO SCIENTIFIC Mod. Cimarec)
Potenciómetro (HORIZON Modelo: 5997-20)
Balanza digital (Ohaus Mod. Scout-pro)

Reactivos

Quitosán
Alginato
NaOH
CaCl₂

Para la preparación de la solución de alginato al 2%, se pesaron 2 g de alginato (Keltone de alto peso molecular), el cual se disolvió en 100 ml agua destilada mediante un agitador magnético (Gaserod et. al 1998).

Para la preparación de la solución de quitosán al 1%, se pesó 1g de quitosán para 100ml de agua destilada, a la solución se le agregó 1 ml de ácido acético glacial para disolver mediante un agitador magnético. Posteriormente se procedió a ajustar el pH requerido a 5 el cual se ajustó con la adición de una solución de NaOH al 12% con ayuda del potenciómetro. (Krasaekoopt et. al 2006).

Se preparó una solución de CaCl₂ al 0.1 M. De la cual se incorporaron 40ml de solución a la solución de quitosán.

Preparación del microorganismo

Obtención de la Biomasa

Material

Medio de cultivo MRS
Agar bacteriológico
Probeta 1 L
Vaso de precipitado 2L
2 Matraces Erlenmeyer 1L
Cajas Petri con MRS
Espátula
Barra magnética de agitación

Equipo

Termoagitador (THERMO SCIENTIFIC Mod. Cimarec)
Esterilizadora (ALL AMERICAN Mod. 25x)
Balanza digital (Ohaus Mod. Scout-pro)
Incubadora (Blue M Lindberg Mod. GI 200A)
Centrifuga (Biofuge primo R).
Vortex

Material

Vidrio de reloj

11 Tubos de centrifuga estériles

Vaso de precipitado 200 ml

Para preparar el inóculo se incubó el microorganismo, en dos matraces que contenían 500 ml de caldo MRS cada uno.

La recuperación del microorganismo para su posterior inoculación en las mezclas con los agentes encapsulantes, se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Guevara (2009). El caldo MRS se colocó en una incubadora por un lapso de 8 horas a 37°C para obtener la población óptima, de acuerdo a lo observado en la curva de crecimiento. Una vez pasadas las horas de incubación, los 1000 ml de caldo se vertieron y distribuyeron en tubos de centrifuga estériles (50 ml de caldo en cada tubo aproximadamente), para su posterior centrifugación a 3,000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga.

Mediante decantación se retiró el sobrenadante de cada uno de los tubos de centrifuga, desechándolo. Para la resuspensión del microorganismo, se añadió un volumen conocido (1 ml) de agua destilada estéril en cada uno de los tubos, los cuales fueron agitados mediante un vortex hasta su total disolución.



Figura 12. *Lactobacillus rhamnosus* en MRS.



Figura 13. Biomasa.

Encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* en esferas de quitosán-alginato

Material

Aguja estéril
Mecheros Bunsen
Barra magnética de agitación

Equipo

Termoagitador (THERMO SCIENTIFIC Mod. Cimarec)

Soluciones

Quitosán 1%
Alginato 2%
CaCl₂ 0.1 M

En un estudio previo en este mismo laboratorio Garduño (2011), elaboró esferas de quitosán-alginato a diferentes concentraciones las cuales fueron sometidas a condiciones gastrointestinales *in vitro*, donde reportó las mejores condiciones utilizando 1% quitosán-2% alginato + 0.05M CaCl₂, concentraciones que se tomaron como referencia para el presente estudio; sin embargo el único valor que se cambió fue la concentración del CaCl₂ para que las esferas mostraran mayor rigidez aumentándolo a 0.1M.

Una vez esterilizada las soluciones de alginato y de quitosán (conteniendo CaCl₂). La biomasa se incorporó a la solución de alginato en condiciones estériles y se homogenizó. La formación de esferas se llevó a cabo por medio de la técnica de gelificación iónica en la cual la solución de alginato/*Lactobacillus rhamnosus* se goteó dentro de la solución de quitosán/CaCl₂ a una distancia de 15 cm. aproximadamente empleando una aguja hipodérmica con 0.8 mm de diámetro interno. Las esferas se dejaron en reposo dentro de la solución durante media hora, se lavaron con agua estéril para eliminar residuos de iones de calcio y células que no quedaron atrapadas.



Figura 14. Formación de esferas.

Las gotitas formaron las esferas de gel instantáneamente, atrapando las células en una red tridimensional. El éxito de la técnica de encapsulación gel de alginato es debido al ambiente suave que proporciona para el material atrapado, de bajo costo, sencillez, biocompatibilidad con las células bacterianas y presenta la liberación de células atrapadas dentro del intestino (Krasaekoopt, y Bhandari 2012).



Figura 15. *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado.

Actividad 4

Evaluación de propiedades físicas de la esfera

Método esfericidad

Material

Soporte universal
Pinzas de soporte
Regla
Cámara fotográfica

Programa

Image J

Es un método en el cual se tomaron fotos a las esferas obtenidas durante la encapsulación, se importaron al programa ImageJ, donde se proyecta el área de esta, calculando así el área real de la muestra (durante la experimentación se empleó la misma cámara a la misma distancia entre ellas).

En la figura 16 se muestra el programa ImageJ que se utilizó para el método de esfericidad

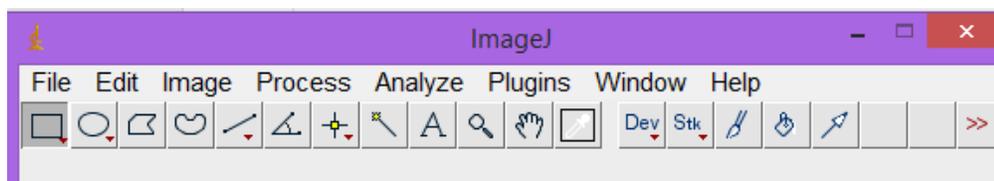


Figura 16. Programa ImageJ.

El programa ImageJ se programó de acuerdo a la escala siguiente. Unidad de longitud en milímetros y una distancia en pixeles de 29.6/1 mm.

Del programa ImageJ se obtuvieron los siguientes datos:

- Área: es calibrada en milímetros cuadrados
- Perímetro: la longitud de la frontera
- Circularidad: el parámetro que cuantifica esta propiedad se define utilizando la siguiente formula:

$$C = \frac{4\pi A}{p^2}; \text{ donde un valor de 1 indica un circulo perfecto.}$$

De cada parámetro se efectuó una repetición y se obtuvo la media aritmética, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Determinación de pH

Material

Vaso de precipitado 50 ml

Equipo

Potenciómetro (HORIZON Modelo: 5997-20)



Figura 17. Potenciómetro HORIZON.

Se determinó el pH de la solución antes de su encapsulamiento y una vez que las esferas estuvieron incorporadas en el yogurt por medio de un potenciómetro.

Evaluación de sinéresis

Material

Cajas Petri de vidrio
Papel parafilm

Equipo

Balanza analítica

La sinéresis se calculó mediante el volumen de líquido que exudaron de las esferas, esto se evaluó durante 12 días. Donde se pesaron 5 g de esferas en cajas Petri selladas y se mantuvieron en refrigeración.

El porcentaje de sinéresis se calculó mediante la siguiente ecuación

$$S = \frac{M_2}{M_1} \times 100$$

Donde:

M_1 = Peso inicial de la muestra

M_2 = Peso inicial de la muestra menos el peso final de la muestra

S = Porcentaje de sinéresis

Actividad 5

Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado en esferas de quitosán-alginato

Material

Mecheros Bunsen
Mortero de porcelana
Coladera
Asa bacteriológica
10 tubos de ensayo de 100 ml
Cajas Petri con MRS
Gradilla
Vaso de precipitado 500 ml

Equipo

Incubadora (Blue M Lindberg Mod. GI 200A)
Contador de colonias

Soluciones

Solución salina 0.85%
Alcohol inflamable

Una vez encapsuladas las esferas se procedió a determinar las unidades formadoras de colonias como se describe a continuación:

Se obtuvo 1g de la muestra de las esferas en condiciones de esterilidad que posteriormente se colocaron en un mortero previamente esterilizado para moler las esferas y después se incorporaron en el primer tubo de ensayo que contenía 10 ml de solución salina al 0.85%. Se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-10} en tubos de solución salina, de las últimas dos diluciones se tomó 1ml y se sembraron en placas de agar MRS extendiendo perfectamente la muestra sobre la superficie utilizando una varilla de vidrio estéril (en forma de escuadra o “L”) haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio cuidando en todo momento la esterilidad del proceso. Las placas así obtenidas se incubaron en posición invertida a 37°C por 42 horas. Pasado este tiempo se contó el número de colonias presentes en cada muestra y se determinó así las UFC/g.



Figura 18. Contador de colonias.



Figura 19. UFC de *Lactobacillus rhamnosus* en MRS obtenidas en un periodo de 27 días.

La selección de las cajas que se toman en cuenta para los cálculos es muy importante para la confiabilidad de los resultados; a continuación se especifican las reglas generales para seleccionarlas, pero conviene enfatizar que la selección de cajas obedece a criterios:

- Lógicos (elegir las que están en rango)
- Estadísticos (considerar los duplicados y el mayor número posible de datos)
- Funcionales (a falta de datos representativos, tomar los mejores disponibles)

(Camacho et. al 2009).

CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*

Se realizó la curva de crecimiento del microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* con el fin de conocer el tiempo en donde se encuentra la mayor población bacteriana del microorganismo, donde se sabe que en la fase estacionaria es cuando se obtiene mayor actividad del microorganismo. Se obtuvieron 11 datos en un estudio de 18 horas A 37°C, el cultivo realizado con MRS arrojó los siguientes resultados:

Tabla 4. Resultados de la curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus*.

Tiempo(h)	Biomasa (g/ml)	Ln(biomasa)
0	0.007	-4.9618
2	0.0091	-4.6995
3.5	0.0093	-4.6777
5	0.0104	-4.5659
6.5	0.0131	-4.3351
8	0.0142	-4.2545
9.5	0.0153	-4.1799
11	0.0142	-4.2545
13	0.015	-4.1997
15	0.0149	-4.2064
17	0.0151	-4.1931

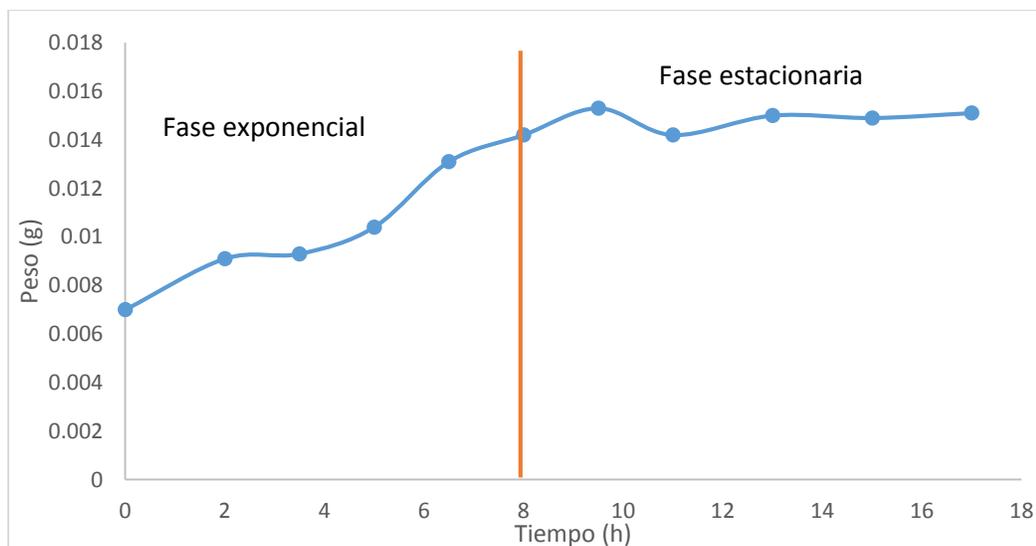


Figura 20. Curva de crecimiento *Lactobacillus rhamnosus*.

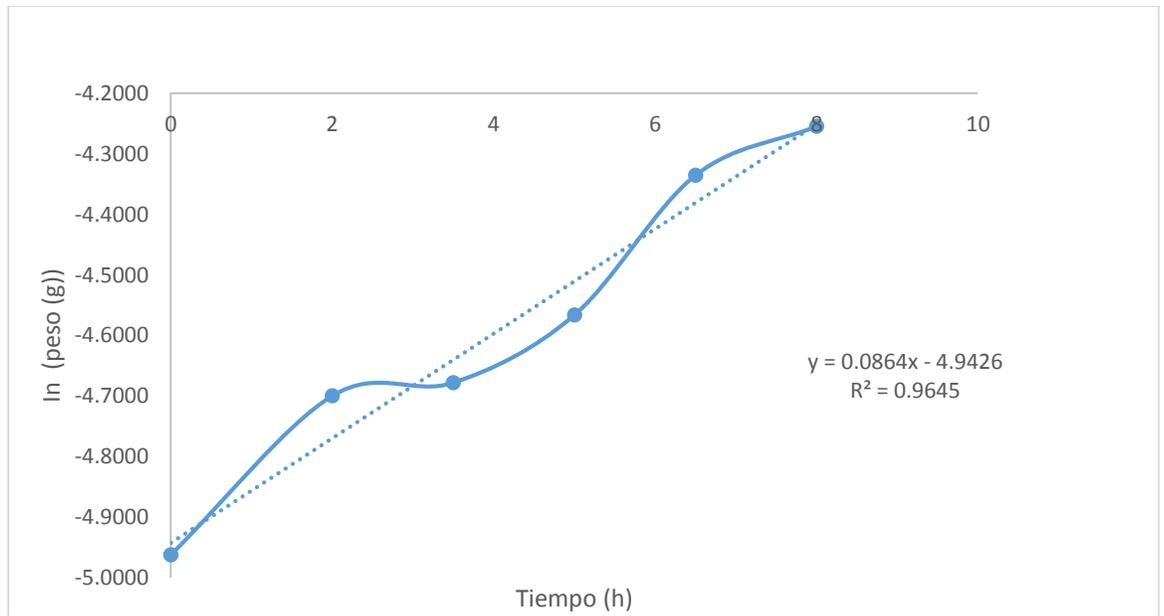


Figura 21. Crecimiento exponencial de *Lactobacillus rhamnosus*.

La velocidad específica de crecimiento (μ) corresponde con el valor de la pendiente en la gráfica del Ln g/ml vs tiempo

$$\mu = 0.0864 \text{ h}^{-1}$$

En la figura 20 se puede observar que a partir de las 8 horas se encuentra el inicio de la fase estacionaria, lo que muestra un resultado acorde a lo reportado por Montes (2013) quien evaluó el efecto del uso de inulina y fructo-oligosacárido como material pared en la encapsulación mediante secado por aspersión de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*, desarrollando la fermentación para la curva de crecimiento con agitación lenta (50 rpm) y temperatura constante de 37°C durante 12 horas y determinó el inicio de la fase estacionaria a las 7 horas para el *L. rhamnosus* empleando caldo MRS.

Por lo cual se incubó el microorganismo durante un tiempo de 8 horas para su posterior inoculación en las mezclas con los agentes encapsulantes para la formación de esferas.

TINCIÓN GRAM

Se realizó una tinción de Gram del *Lactobacillus rhamnosus* HOWARU® liofilizado para tener así un parámetro de comparación con las colonias obtenidas durante la experimentación.

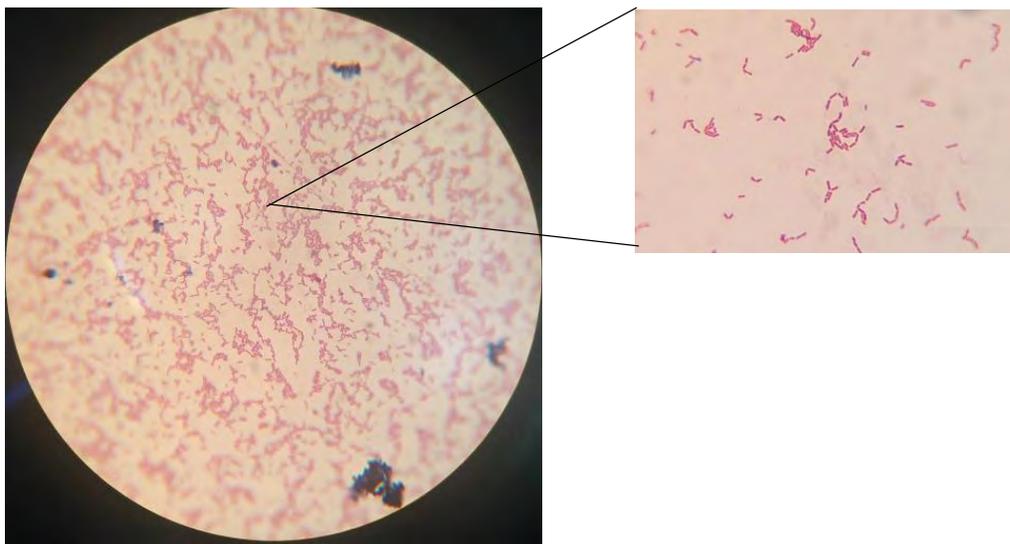


Figura 22. *Lactobacillus rhamnosus* liofilizado.

Evaluación de propiedades físicas en las esferas

Método de esfericidad

Una vez obtenidas las esferas de quitosán/alginate se evaluó la esfericidad para 5 esferas. En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos en el programa ImageJ, de cada parámetro se obtuvo la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.



Figura 23. Esferas analizadas para el método de esfericidad.

Tabla 5. Análisis de área, perímetro y circularidad en esferas.

Esfera	Diámetro(mm)	Área	Perímetro	Circularidad
1	2.8315	6.2970	9.3250	0.9100
2	3.2247	8.1670	10.7650	0.8856
3	3.2520	8.3060	10.8170	0.8920
4	2.8513	6.3850	9.5040	0.8883
5	3.1077	7.5850	10.3310	0.8931
x	3.0534	7.348	10.1484	0.8938
DE	0.2011	0.9587	0.6989	0.0095
CV	0.0659	0.1305	0.0689	0.0107

El área promedio de las 5 esferas fue de 7.348 mm² valores que dependieron del diámetro de la aguja utilizada, y se muestra que las esferas tuvieron una circularidad de 0.89 lo que nos indica que las esferas que se obtuvieron fueron uniformes.

pH

En el cuadro se muestran los diferentes valores de pH para las muestras de la solución a encapsular y de la solución en la que se mantuvieron las esferas incorporadas durante su período de vida.

Tabla 6. Valores de pH.

	pH
Solución de CaCl₂+Qitosán	5.2
Alginato+inulina+<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7.2
Yogurt	4-4.2
Esferas	5

Los valores de pH a lo largo del almacenamiento del producto se mantuvieron constantes con un pH de 4, donde el *Lactobacillus rhamnosus* fue tolerante y se mantuvo viable, además se comprueba que no hubo un cambio en el gel formado por las esferas de alginato/quitosán debido a que no estuvieron expuestas a variaciones de pH ya que por

debajo de pH 2 y por encima de pH 6 el alginato pierde viscosidad y resistencia de gel rápidamente.

Saarela et al. (2004), estudiaron si los tratamientos con ácido o calor mejoran la supervivencia de la fase estacionaria de los probióticos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Determinaron la viabilidad de distintas bacterias ácido lácticas frente a un pH ácido, *L. rhamnosus* exhibió un pequeño crecimiento a pH 4,0; mientras que a pH 3,5 no presentó crecimiento, siendo el pH 2,5 levemente letal.

Sinéresis de esferas

Los resultados de la sinéresis se muestran en la siguiente tabla a partir de los cuales se graficó la media de 3 muestras estudiadas para visualizar mejor la pérdida de peso.

Tabla 7. Análisis de parámetros estadísticos para sinéresis.

	Caja 1 (g)	Caja 2 (g)	Caja 3 (g)	X	DE	CV
Día 0	5.0278	5.0504	5.0367	5.0383	0.0114	0.0023
Día 1	3.9991	4.1053	4.1053	4.0699	0.0613	0.0151
Día 3	3.7970	3.8914	3.9067	3.8650	0.0594	0.0154
Día 6	3.6154	3.6752	3.7463	3.6790	0.0655	0.0178
Día 8	3.5600	3.4809	3.4560	3.4990	0.0543	0.0155

Tabla 8. Porcentajes de sinéresis.

Día 1	19.22
Día 3	23.28
Día 6	26.98
Día 8	30.55
Día 12	36.24

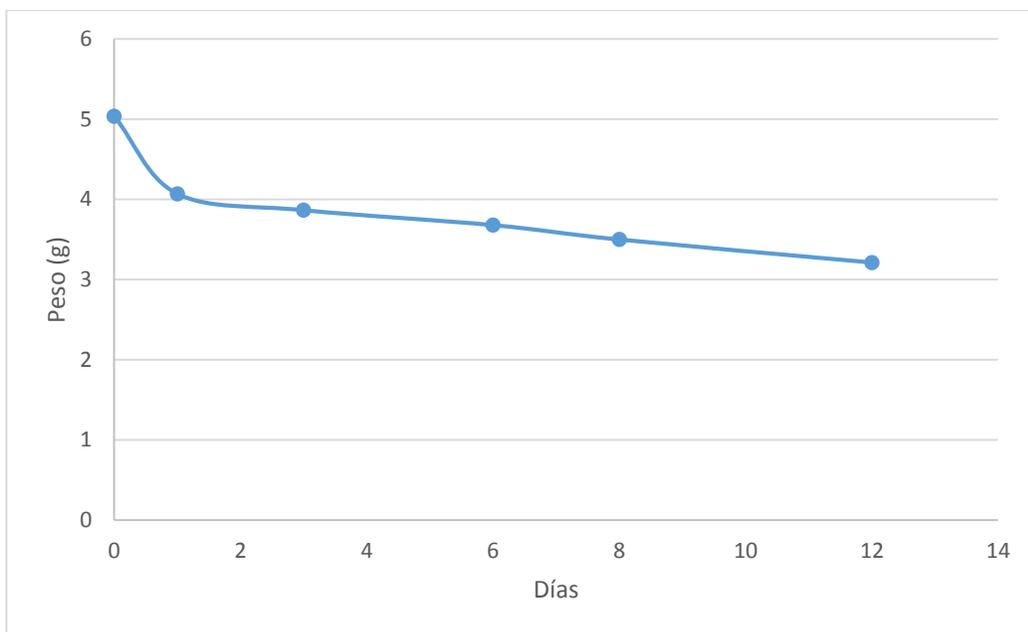


Figura 24. Pérdida de agua de las esferas en condiciones de refrigeración.

Podemos observar con los datos obtenidos que con el transcurso del tiempo el agua contenida en las esferas de alginato se evaporó de manera proporcional al tiempo transcurrido, al paso de 12 días el agua liberada de las esferas fue de 36% disminuyendo por tanto el volumen de la esfera, por tal motivo se recomienda incrementar el tiempo de reposo de las esferas dentro de la solución (quitosán+CaCl₂) para fortalecer la esfera o bien aumentar la concentración de CaCl₂ para así incrementar los enlaces de iones de calcio de tal manera que se favorecerá la capacidad de retención de moléculas de agua de las esferas.

Viabilidad del *Lactobacillus rhamnosus* por gramo de esferas

Se realizó el conteo de microorganismos atrapados por gramo de esferas para comparar contra los microorganismos que sobrevivieron a través del tiempo en condiciones de refrigeración a 12°C y con 85% HR.

A continuación se muestra el conteo de microorganismos por esferas para cada una de las concentraciones, se realizó por duplicado y se muestran los promedios.

Tabla 9. Viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* en un periodo de 27 días.

Día	UFC/g
1	2.4^{10}
3	3.7^{10}
7	5.4^{10}
11	4.75^{10}
14	14.9^{10}
17	35^{10}
24	152^{10}
27	425^{10}

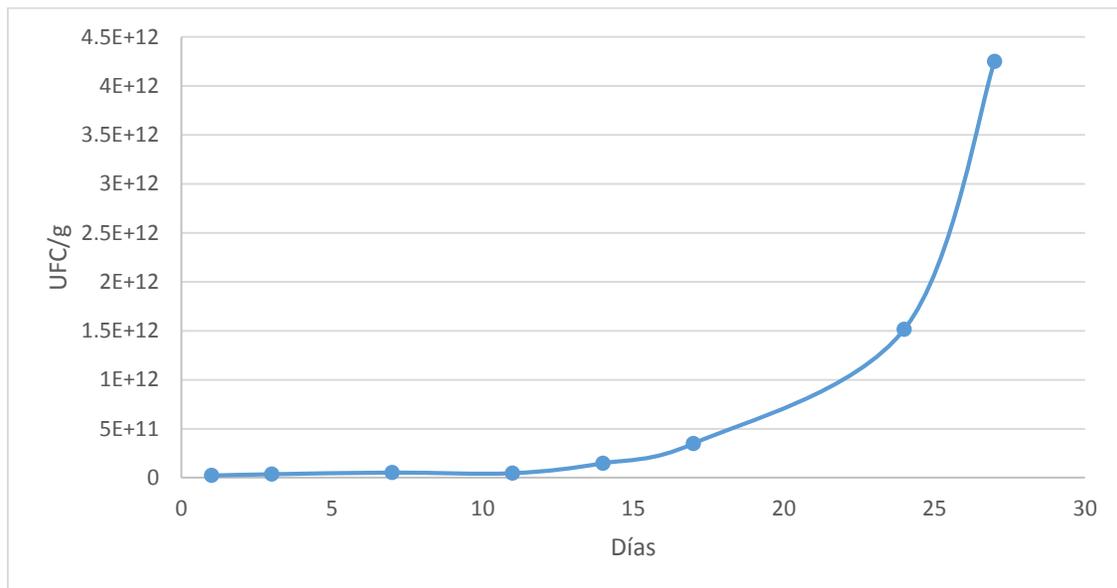


Figura 25. Viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado en esferas de quitosán/alginate incorporadas en un yogurt bebible.

Con los datos obtenidos en un período de 27 días se ha podido comprobar que la encapsulación de agentes probióticos asegura la viabilidad del microorganismo, así mismo con la incorporación de inulina y quitosán como agente prebióticos se favoreció su desarrollo comenzando con 2.4×10^{10} UFC/g en el primer día y al cabo de 23 días se obtuvo un máximo crecimiento con 425×10^{10} UFC/g.

Krasaekoopt, Bhandari y Deeth (2006), evaluaron la supervivencia de probióticos encapsulados en esferas de alginato recubiertas de quitosán en comparación con células libres durante el almacenamiento, tratados en pasteurización UHT y pasteurización convencional. Ellos utilizaron *L. acidophilus* 547, *L. casei* 01 y *B. bifidum* para este estudio. La supervivencia de las bacterias encapsuladas fue mejor que las que se encontraban libres durante su almacenamiento; donde hubo una disminución de alrededor de 1 ciclo de registro durante un período de 4 semanas para las células encapsuladas y 2 ciclos de registro para las células libres. En contraste en este estudio tras la encapsulación del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* aumento la supervivencia de la cepa hasta 2 ciclos logarítmicos, debido a que además de que se encontraban las esferas recubiertas de quitosán estaba incorporado un agente prebiótico.

Montes (2013) realizó un trabajo de investigación sobre el efecto de la microencapsulación mediante secado por aspersion y liofilización sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469 al adicionar agentes prebióticos en la formulación, bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, donde se observó que existen diferencias en la viabilidad de los microorganismos microencapsulados con y sin agentes prebióticos, evidenciando para *L. rhamnosus* mayor porcentaje de viabilidad en el tiempo comenzando a descender después del día 49, y también nos muestra que el tratamiento utilizando como prebiótico de inulina arrojó el mayor porcentaje de supervivencia después de 14 semanas de almacenamiento. Por tanto se sabe que la inulina es un buen estimulante de crecimiento principalmente para el *Lactobacillus rhamnosus*.

En este caso es posible afirmar que el uso de agentes prebióticos tiene un efecto protector al favorecer la supervivencia de los microorganismos durante su almacenamiento.

La figura 25 muestra la tinción de Gram de una colonia contenida en una caja Petri de MRS con el microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* a 20 días de haber sido incorporadas las esferas en el yogurt.

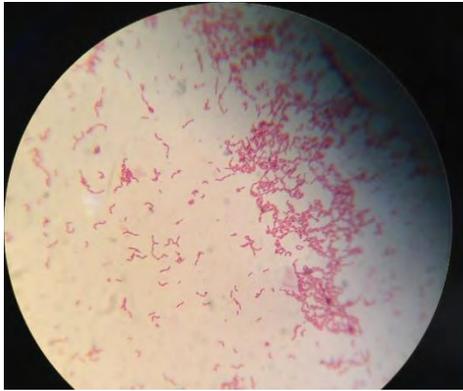


Figura 26. Colonia de *Lactobacillus rhamnosus* en MRS.

De esta manera se pudo comprobar que la cepa se mantuvo sin contaminación alguna durante toda la experimentación.

CONCLUSIONES

Hoy en día los cultivos probióticos poseen gran importancia a nivel mundial, debido a que mediante numerosos estudios se ha logrado demostrar que poseen diversos efectos benéficos para el ser humano, tales como el favorecimiento del equilibrio de la microflora intestinal, estimulación del sistema inmune, competencia contra patógenos, entre otros.

La encapsulación de los probióticos se ha utilizado en muchos productos alimenticios tales como yogurt, queso, postres y jugos de frutas ya que promueven el concepto de una barrera física que ofrece una mejor protección de los probióticos de manera segura durante su exposición a las condiciones gastrointestinales.

Se obtuvo la formación de esferas bajo las concentraciones ya establecidas (quitosán 1% + alginato 2% y CaCl_2 al 0.1M), las cuales conservaron sus dimensiones durante su almacenamiento una vez incorporadas en el yogurt. La combinación de los polímeros quitosán-alginato junto con los iones de calcio permitió una buena estabilidad de las esferas en el medio líquido que se encontraban, sin embargo, al evaluar la sinéresis de las esferas, por sí solas se pudo observar una notable pérdida de peso, por lo que se recomienda que para futuros estudios se tendrían que dejar reposar por mayor tiempo las esferas en la solución (quitosán+ CaCl_2) o aumentar la concentración de las mismas soluciones para aumentar su estabilidad y lograr que disminuya el porcentaje de sinéresis.

Las cápsulas formadas junto con la incorporación de un prebiótico (inulina), lograron estimular el crecimiento del *Lactobacillus rhamnosus*, en comparación a una exposición libre del microorganismo bajo las mismas condiciones de acuerdo con lo que reportan Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, donde aseguran se disminuye la viabilidad del mismo.

Las esferas contenidas dentro del yogurt no se vieron afectadas debido a que no estuvieron expuestas a tratamientos prolongados de calor ni variaciones extremas de pH para que se provocara una degradación de la membrana o del gel formado.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se confirma que el uso de quitosán-alginato es viable para tener cápsulas más estables y resistentes junto con la adición de CaCl_2 , además tanto el agente prebiótico como el pH fueron favorables para el crecimiento del *Lactobacillus rhamnosus* durante su almacenamiento.

El yogurt con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* cuenta con la viabilidad suficiente 4.25^{12} UFC/g para ser un producto funcional debido a que cumple y supera las UFC requeridas por la NOM-181 la cual indica el yogurt deberá contener como mínimo 10^6 UFC/g en cultivos alternativos adicionales que permanecieron viables y abundantes hasta la fecha de caducidad del producto para así ejercer un beneficio en la salud del consumidor.

REFERENCIAS

- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in micro encapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), 240–251.
- Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S., & Elsabee, M. Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 410–419.
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp.* in yoghurt - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 94–208.
- Brock, D. T., Smith W. D., Madigan, T. M. (1987). *Microbiología* (4a ed.). México: Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Cáceres R, P., & Gotteland R, M. (2010). Alimentos Probióticos En Chile: ¿Qué Cepas Y Qué Propiedades Saludables? *Revista Chilena de Nutrición*, 37(1), 97–109.
- Camacho, A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- Chaikham, P. (2015). Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. *Food Bioscience*, 12, 61–66.
- FAO Y OMS. (2006). Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO Alimentación y Nutrición no. 85 Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Garduño B. E., (2011). Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* en esferas de quitosán-alginato sometidas a condiciones gastro-intestinales *in vitro*, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gaserod, O., Smidsrod, O., & Skjak-Braek, G. (1998). Microcapsules of alginate-chitosan - I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*, 19(20), 1815–1825.

- Greenfield, R. H. (2009). Prescripción de probióticos. En D. Rakel. *Medicina integrativa* (Segunda ed, Cap.104 pp. 1076–1083). Elsevier Inc.
- Gobbetti, M., & Minervini, F. (2014). *Lactobacillus* | *Lactobacillus casei*. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Ed, Vol. 2). Elsevier.
- Guarner, F. (2011). Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterología Y Hepatología*, 34(3), 147–154.
- Hassani, S., Laouini, a., Fessi, H., & Charcosset, C. (2015). Preparation of chitosan–TPP nanoparticles using microengineered membranes – Effect of parameters and encapsulation of tacrine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482, 34–43.
- Krasaekoopt, W., & Bhandari, B. (2012). Properties and applications of different probiotic delivery systems. *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, 541–594.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. C. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 39(2), 177–183.
- Lárez Velásquez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(2), 91–109.
- Li, J.-M., & Nie, S.-P. (2015). The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids*. 53, 1-16.
- Liew, S. L., Ariff, a. B., Raha, a. R., & Ho, Y. W. (2005). Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 137–142.
- Luquet F.M. (1993). Leche y productos lácteos: vaca, oveja y cabra. Tomo II: los productos lacteos, transformación y tecnología. España: Acribia.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 57(4), 387–396.

- Mazza, G. (2000). Alimentos funcionales, aspectos bioquímicos y de procesado, 355-357 Editorial Acribia, España.
- Montes Ramírez, L. M. (2013). Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Nieto, I. M., Santacruz I., Moreno, R. (2014). Consolidación de materiales cerámicos por gelificación de polisacáridos, 34(1), 2–27.
- Ortega, R. M., Marcos, A., Aranceta J., Mateos, J.A., Requejo A.M., Serra L. (2002). *Alimentos funcionales Probióticos*. España: Panamericana.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein, D. A. (1999). *Microbiología*. (4a ed.). España: McGraw-Hill Interamericana.
- Ramírez Ramírez, J. C., & Ulloa, P. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente, Año 2(7)*, 16.
- Ramírez Zermeño, R. & Pérez Bejarano, J. (2010). *Alimentos funcionales principios y nuevos productos*, México: Trillas.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering, 116(2)*, 369–381.
- Rolim, F. R. L., dos Santos, K. M. O., de Barcelos, S. C., do Egito, A. S., Ribeiro, T. S., da Conceição, M. L.... Queiroga, R. D. C. R. D. E. (2015). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. *LWT - Food Science and Technology, 63(2)*, 807–813.
- Saarela, M., Rantala, M., Hallamaa, K., Nohynek, L., Virkajärvi, I., & Mättö, J. (2004). Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology, 96(6)*, 1205–1214.
- Sibaja, B., Culbertson, E., Marshall, P., Boy, R., Broughton, R. M., Aguilar, A., ... Auad, M. L. (2015). Preparation of alginate – chitosan fibers with potential biomedical applications, 134, 598–608.

- Soukoulis, C., Behboudi-jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. D. (2014). Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films, *159*, 302–308.
- Stanbury, F., Whitaker, A., Hall, S. (1995). Principles of Fermentation Technology. 2th ed. Oxford, Inglaterra: Butterworth Heinemann.
- Zia, K. M., Zia, F., Zuber, M., Rehman, S., & Ahmad, M. N. (2015). International Journal of Biological Macromolecules Alginate based polyurethanes : A review of recent advances and perspective, *79*, 377–387.

REFERENCIAS DE INTERNET

- Departamento de Ciencia y Tecnología. (2005). Trabajo Practico: Biocatalizadores inmovilizados. Recuperado de <http://bioprocesos.unq.edu.ar/biopro%20ii/celulas%20inmovilizadas%20tp.pdf>
- DUPONT. (2013). *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS HN001™*. Recuperado de <http://www.danisco.com/product-range/probiotics/howarur-premium-probiotics/howarur-rhamnosus-probiotics/>
- World Gastroenterology Organisation. (2011). Probióticos y prebióticos. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Recuperado de www.Worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html
- Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010. Recuperado de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010