



EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA DEL PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS CASEI* ATCC334 EN FORMA LIBRE Y MICROENCAPSULADO ADICIONADO A UNA CREMA ÁCIDA BAJA EN GRASA DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN Y EN CONDICIONES SIMULADAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Evaluation of survival of probiotic *Lactobacillus casei* ATCC334 free and microencapsulated added to a low fat sour cream during refrigerated storage and under simulated gastrointestinal conditions.

**Murúa-Pagola Beneranda,
Sánchez-Alaniz Rocío,
Castaño-Tostado Eduardo y
Amaya-Llano Silvia Lorena ***

*Facultad de Química de la
Universidad Autónoma de Querétaro*

***Correo para Correspondencia:**
samayal@uaq.mx

*Fecha de recepción: 31/08/2015
Fecha de aceptación: 09/02/2016*

Resumen:

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la microencapsulación del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC334 mediante secado por aspersión en una matriz polimérica formada por una mezcla de almidón alto en amilosa fosfatado y concentrado de proteína de suero (CPS), en la sobrevivencia del probiótico adicionado a una crema ácida reducida en grasa a lo largo de su almacenamiento en el alimento en su forma encapsulada y forma libre durante 28 días a 4°C y la sobrevivencia del microorganismo en condiciones gastrointestinales simuladas después del almacenamiento (TGI). La viabilidad de *L. casei* fue determinada en agar MRS adicionado con vancomicina. La crema elaborada se dividió en 3 tratamientos: control (sin probiótico), células de *L. casei* libres y células encapsuladas. Las células mostraron una alta tasa de sobrevivencia durante el proceso de microencapsulación registrando pérdidas

de 0.2 a 0.4 ciclos logarítmicos. Los conteos tanto de células microencapsuladas como libres no mostraron diferencia estadística significativa entre el inicio y término del período de almacenamiento a 4°C. Las células de ambos tratamientos mostraron una alta tasa de sobrevivencia durante su exposición al jugo gástrico artificial (pH 2.0), pero disminuyeron drásticamente su viabilidad al ser expuestas a condiciones intestinales simuladas (pH 8.0). Las células libres mostraron un mayor efecto adverso durante las 4 horas de exposición al jugo intestinal. La reducción de la viabilidad del probiótico durante el ensayo de TGI fue de 3.28 y 2.4 ciclos logarítmicos en células libres y encapsuladas respectivamente, observándose el efecto protector de la microencapsulación, siendo estadísticamente diferentes.

Palabras clave:

Probióticos, *Lactobacillus casei*, microencapsulación, secado por aspersión

Abstract:

The aim of this work was to study the effect of microencapsulation of probiotic *Lactobacillus casei* ATCC334 by means of spray drying within a polymeric matrix containing phosphorylated high amylose maize starch and whey protein concentrate (WPC), on survival of probiotic added to a low fat sour cream compared with survival of free cells during storage during 28 days at 4°C and during exposition to simulated gastrointestinal conditions after storage (GIT). Viability of *L. casei* was determined using MRS agar added with vancomycin. The manufactured sour cream was divided into three sets. One set was used as a control (without probiotic), the second one was added with free probiotic cells and the last one was added with microencapsulated cells. The cells showed a high rate of survival during microencapsulation with a decrease of 0.2 to 0.4 logarithmic cycles. Cell counts of free and microencapsulated cells, showed no statistical differences between initial and final counts during the storage period at 4°C. Cells of both treatments showed high survival rates during exposure to artificial gastric juice (pH 2.0), but they were affected by change of pH when they were exposed to intestinal simulated juice (pH 8.0) resulting in a drastic decrease of cell population, being free cells the most affected during exposure to artificial intestinal juice for 4 hours. Cell counts decreased 3.23 and 2.4 logarithmic cycles during GTI for free and microencapsulated probiotic respectively, showing the protective effect of microencapsulation, being statistically different.

Key words:

Probiotics, *Lactobacillus casei*, microencapsulation, spray drying

I. Introducción

La incorporación de bacterias de origen intestinal en la dieta humana corresponde a los efectos benéficos que estas bacterias confieren al

metabolismo intestinal, lo cual ha dado lugar a la aparición de una nueva generación de alimentos catalogados como funcionales. Los alimentos funcionales pueden ser definidos como aquellos que pueden proveer un beneficio a la salud más allá del provisto por los nutrientes tradicionales que éstos contienen. Tales alimentos pueden contener uno o una combinación de componentes que tienen efectos celulares o fisiológicos deseables en el cuerpo. En los últimos años los alimentos funcionales han tenido una creciente demanda. La FAO (Organización de Alimentos y Agronomía de las Naciones Unidas) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) recomiendan la descripción de probióticos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada, confieren beneficios en la salud del huésped” (Ross y col. 2005). La eficiencia de las bacterias probióticas depende de la cantidad y de la viabilidad que estos microorganismos mantengan durante el almacenamiento, vida de anaquel del producto al que se adicionan y su sobrevivencia en el tracto intestinal. (Kailasapathy y Chin, 2000: 80).

Se ha sugerido que los alimentos probióticos deben contener al menos 10^6 microorganismos vivos por g o mL de producto al momento del consumo para producir beneficios terapéuticos (Shah, 2000: 894). Durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, las bacterias probióticas son expuestas a diferentes factores como estrés oxidativo, temperatura, cambios de acidez y temperatura entre otros que comprometen su viabilidad. La viabilidad de los probióticos disminuye rápidamente en productos lácteos fermentados almacenados a temperaturas superiores a la de refrigeración. Además, durante su paso por el tracto gastrointestinal, los probióticos son adversamente afectados por la acción de enzimas como pepsina y bajos pH en el estómago, así como al antagonismo asociado con la actividad antimicrobiana de las sales bilia-

res y enzimas proteolíticas predominantes en el intestino (Tripathi y Giri, 2014: 227) (El-Salam y El-Shibiny, 2015: 394).

El yogurt y productos relacionados han sido utilizados como el vehículo más popular para la incorporación de organismos probióticos (Sultana y col., 2000). Muchos estudios han mostrado una pobre viabilidad de probióticos en yogurt y leches fermentadas. Shah y Lankputhra (1997: 349) reportaron también una baja sobrevivencia de probióticos en postres de leche congelados. Se han llevado a cabo varias acciones para mejorar la tasa de sobrevivencia de microorganismos probióticos durante el almacenamiento de los cultivos iniciadores deshidratados y en alimentos, tales como la adición de promotores del crecimiento, manipulación de las condiciones de fermentación y almacenamiento de los productos probióticos, así como la selección cuidadosa de cultivos interrelacionados y resistentes al ácido y sales biliares (Shah y col., 2000). La estabilización de probióticos por acarreadores puede incrementar la sobrevivencia de estos microorganismos en productos probióticos durante el procesamiento del alimento y tránsito por el tracto gastrointestinal (Goderska y col., 2003). Desde el punto de vista microbiológico la microencapsulación se define como el proceso de atrapar y rodear células de microorganismos, cubriéndolas con los materiales apropiados con el fin de segregar las células del ambiente que las rodea para reducir el daño o pérdida de la viabilidad celular, de forma que resulte en la liberación de las células en el medio intestinal en el mejor estado fisiológico posible (Sultana y col., 2000) (Kraeskoop y col., 2003). Entre los materiales más utilizados para la encapsulación de probióticos se encuentran polisacáridos (tal como alginato, carragenina gomas de xantana y gelana, pectina y quitosano), proteínas (de leche, de soya, zeína y gelatina) y lípidos (Serna-Cock y Vallejo Castillo,

2013: 4743) (El-Salam y El-Shibiny, 2015: 396). La elección del material encapsulante es el mayor elemento de éxito en la microencapsulación de probióticos y su uso en alimentos funcionales. Para la incorporación de bacterias probióticas inmovilizadas en productos alimenticios son deseables preparaciones secas de microcápsulas insolubles en agua con tamaño de partícula bajo ($<100\mu\text{m}$) y controlado. Los cultivos con estas características tienen mayor estabilidad y su manejo y almacenamiento es más fácil, además de tener bajo impacto sobre las características sensoriales del producto, especialmente la textura (Picot y Lacroix, 2003b: 2693). La dificultad técnica y el alto costo del proceso son factores limitantes importantes para la aplicación a gran escala de las tecnologías de microencapsulación, particularmente de grado alimenticio. Se han reportado varios métodos para la encapsulación de bacterias probióticas, como son: emulsión, extrusión, coacervación y secado por aspersión.

El secado por aspersión, es el método más utilizado para la microencapsulación en la industria de los alimentos, es económico y flexible, y produce productos de buena calidad. Este proceso puede ser operado en una base continua, es de fácil escalamiento y de bajo costo. (Mortazavian y col, 2007). El secado por aspersión es un método en el que una suspensión acuosa conteniendo el material activo sensible y el material de cobertura son atomizados en una corriente de aire caliente. La producción de microcápsulas con un reducido tamaño de partícula y distribución homogénea puede ser considerada una ventaja del método de secado por aspersión para microencapsulación de bacterias en comparación con los métodos de extrusión o emulsión, sin embargo, la principal desventaja de la técnica de secado es la pérdida de viabilidad durante el proceso debido a la deshidratación e inactivación térmica de las células (Ivanovska y col., 2012).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la microencapsulación de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC334) mediante secado por aspersión en matrices poliméricas, formadas por una mezcla de almidón alto en amilosa fosfatado y concentrado de proteína de suero (CPS), y el comportamiento del probiótico incorporado en crema ácida reducida en grasa a lo largo de su almacenamiento en el alimento en su forma encapsulada y su forma libre durante 28 días a 4°C y durante su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.

II. Metodología

Materiales

El almidón alto en amilosa fue adquirido de Cargill, U.S.A. El concentrado de proteína de suero (80%) fue provisto por IMSA, S.A. de C.V. de México.

Activación de la cepa y conteo de microorganismos

Un cultivo liofilizado de *Lactobacillus casei* ATCC334 se activó mediante una transferencia en 3 mL de caldo MRS bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 h. El conteo de células se realizó por medio del método de siembra de extensión por superficie en agar MRS (BD Difco). Se llevaron a cabo diluciones decimales de las muestras en una solución de peptona al 1%. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C durante 48 h en jarras anaeróbicas utilizando sobres generadores de dióxido de carbono (BD GasPak*EZ Anaerobe Container System, USA). Para el conteo de células de *L. casei* adicionadas en crema, el agar MRS fue adicionado de 5 mg/L de vancomicina (MRS-v), después de la esterilización del medio a temperatura de 40°C.

Preparación de la cepa para su microencapsulación

La cepa probiótica activada fue inoculada en 100 mL de caldo MRS e incubada a 37°C durante 18 h para obtener aproximadamente 10^9 UFC/mL en fase logarítmica tardía. Las bacterias se recuperaron del medio mediante centrifugación a 6000 rpm por 3 min y se lavaron dos veces en solución salina estéril al 0.085%.

Microencapsulación de células de *Lactobacillus casei*

Se prepararon suspensiones acuosas de los materiales encapsulantes, compuestas de 20% de concentrado de proteína de suero (CPS) y 80% de almidón alto en amilosa fosfatado por método convencional de acuerdo a lo reportado por Lim y Seib (1993: 137), con un grado de sustitución de 0.02, para la muestra en estudio (80AAM20CPS) y 100% de CPS para la muestra control para el ensayo de TGI (contenido de sólidos de 8%). Las soluciones se homogenizaron durante 5 min en un homogeneizador a velocidad media; el pH fue ajustado a 7.0 con una solución de NaOH al 5%. Las suspensiones fueron calentadas a baño María (Termobañero Felisa) durante 10 min a 80°C. En cada suspensión del material matriz se dispersaron aproximadamente 10^9 UFC/mL de células del probiótico. Antes de la microencapsulación por secado por aspersión se tomaron muestras de 1 mL de suspensión para determinar la concentración de bacterias antes del proceso de secado. La microencapsulación se llevó a cabo en un secador por aspersión de laboratorio marca Büchi, Modelo B-290. Las condiciones de operación del secador fueron las siguientes: temperatura de aire de entrada 160°C, capacidad de bomba de alimentación 50% y capacidad de bomba de aspiración 95%. La temperatura del aire de salida osciló entre $56 \pm 2^\circ\text{C}$. Las cápsulas se recuperaron del vaso colector del producto del secador con una espátula estéril y se almacenaron en frascos

de vidrio estériles cerrados herméticamente y en refrigeración a 4°C para estudios posteriores.

Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* después del proceso de secado por aspersión.

Se suspendieron por triplicado 0.5 g de cápsulas en tubos con 4.5 mL de diluyente de peptona al 0.1%. Las suspensiones fueron homogeneizadas en un vortex (Thermolyne, tipo 37600 Mixer, USA) a velocidad máxima durante 1 min. Diluciones adecuadas de las muestras fueron sembradas en agar MRS-v e incubadas con las condiciones descritas en conteo de microorganismos.

Caracterización fisicoquímica de las cápsulas obtenidas por secado por aspersión

El contenido de humedad de las microcápsulas se determinó gravimétricamente mediante secado en estufa con circulación forzada a 105°C durante 24 h (método AA-15 A de la AACC de acuerdo a lo reportado por Behboudi-Jobbehdar y col. (2013).

Las microcápsulas fueron observadas con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6390LV, a bajo vacío, 10 kV y 16 kV y magnificaciones desde 1,000 hasta 6,500x. Las muestras fueron adheridas sobre cinta de grafito.

Formulación y evaluación de crema ácida reducida en grasa

Se formuló una crema con un contenido de grasa de 15% partiendo de leche y crema entera de vaca. Los sólidos totales fueron ajustados a 27% mediante la adición de leche en polvo descremada. Se utilizaron algunos aditivos para obtener una consistencia similar a una crema comercial reducida en grasa con un pH de 4.5 de acuerdo a las cantidades permitidas por la norma oficial mexicana (NOM-185-SSA1-2002), tales como goma guar, monoglicéridos, fosfato

monocálcico, ácido cítrico y ácido ascórbico en proporciones de 0.75, 0.5, 0.3, 0.3 y 0.05 gr/100 g de crema. La crema preparada fue homogeneizada a 65°C en un homogeneizador de una válvula (Petribiasi, Italia) y pasteurizada a 80°C durante 30 segundos en baño María. De la crema total obtenida se separaron tres lotes que representaron los siguientes tratamientos: muestra control (sin células), muestra adicionada de células libres y muestra adicionada de células microencapsuladas de *Lactobacillus casei*.

Evaluación de la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* en muestras de crema almacenadas a 4°C.

Las muestras de crema de los tres tratamientos fueron almacenadas en frascos de vidrio estériles de 125 mL con tapa de aluminio, herméticamente cerrados a una temperatura de refrigeración de 4°C. Se determinó la viabilidad de las células de las muestras con células libres y encapsuladas cada semana durante 28 días.

Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Se evaluó *in vitro* las sobrevivencias de las células encapsuladas y en su forma libre adicionadas a la crema reducida en grasa, en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, de acuerdo a lo reportado por Charteris y col. (1998) con algunas modificaciones. Para la exposición de las muestras a condiciones gástricas simuladas se adicionaron 10 mL de saliva artificial y 80 mL de jugo gástrico simulado a 10 g de la muestra de crema con probióticos, se homogenizaron las muestras manualmente por 1 minuto y fueron colocadas a 37°C durante 2 h. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos y las células fueron resuspendidas en jugo intestinal artificial e incubadas a 37°C durante 4 horas.

Diseño y análisis estadístico de datos experimentales

Para el experimento de secado por aspersión y evaluación del material encapsulante, se utilizó un diseño de un factor con dos niveles. Para el experimento de sobrevivencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal del microorganismo, se utilizó un diseño unifactorial con dos niveles (células libres y cápsulas) con mediciones repetidas durante el tiempo de almacenamiento. Para su aplicación las muestras fueron aleatorizadas. Se analizaron los datos mediante un análisis de varianza, comparando las medias utilizando la prueba de Tukey con el programa JMP versión 5.0.1.

III. Resultados y Discusión

Microencapsulación mediante secado por aspersión de células viables de *Lactobacillus casei* ATCC 334

La viabilidad de la bacteria una vez finalizado el proceso de microencapsulación fue ligeramente mayor utilizando el CPS como matriz encapsulante comparado con el 80AAM20CPS, registrándose pérdidas en la viabilidad de 0.20 y 0.48 ciclos logarítmicos con cada material respectivamente, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los resultados obtenidos muestran una mayor sobrevivencia a los reportados por Ivanoska y col. (2012), quienes observaron una pérdida de viabilidad de células de *L. casei* de 1.2 ciclos logarítmicos por gramo cuando utilizaron la técnica de secado por aspersión con alginato de sodio y

fructooligosacáridos como materiales encapsulantes.

La temperatura de salida del aire del secador en este estudio fue de $56 \pm 2^\circ\text{C}$. Ananta y col. (2005) reportaron que la tasa de sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* después de su microencapsulación mediante secado por aspersión fue inversamente proporcional a la temperatura del aire de salida. Las temperaturas de salida registradas en este estudio favorecieron una alta sobrevivencia de *L. casei*, aunque bajas temperaturas del aire de salida resultaron en mayores contenidos de humedad en los productos del secado. Los polvos obtenidos con ambos materiales encapsulantes exhibieron un contenido de humedad de 7%, lo que dificultó su incorporación y dispersión en la crema, por lo que se tuvo que recurrir al uso de un homogeneizador. Ananta y col. (2005) reportaron que valores de humedad en el polvo obtenido mediante secado por aspersión, menores a 5% y un rango de actividad de agua de 0.15 a 0.3 es recomendable para evitar problemas de aglomeración durante el transporte y almacenamiento del polvo. En la Figura 1 se muestran las microfotografías de las microcápsulas de 80AAM20CPS a diferentes magnificaciones. En la Figura 2 se muestran las microfotografías de las microcápsulas de CPS. Algunas de las cápsulas observadas mostraron superficie esférica y lisa y otras cápsulas presentaron indentaciones o concavidades por efecto del secado debido a la alta velocidad de difusión de las moléculas de agua hacia el exterior. El tamaño promedio de partículas observadas fue de 7-10 micrómetros.

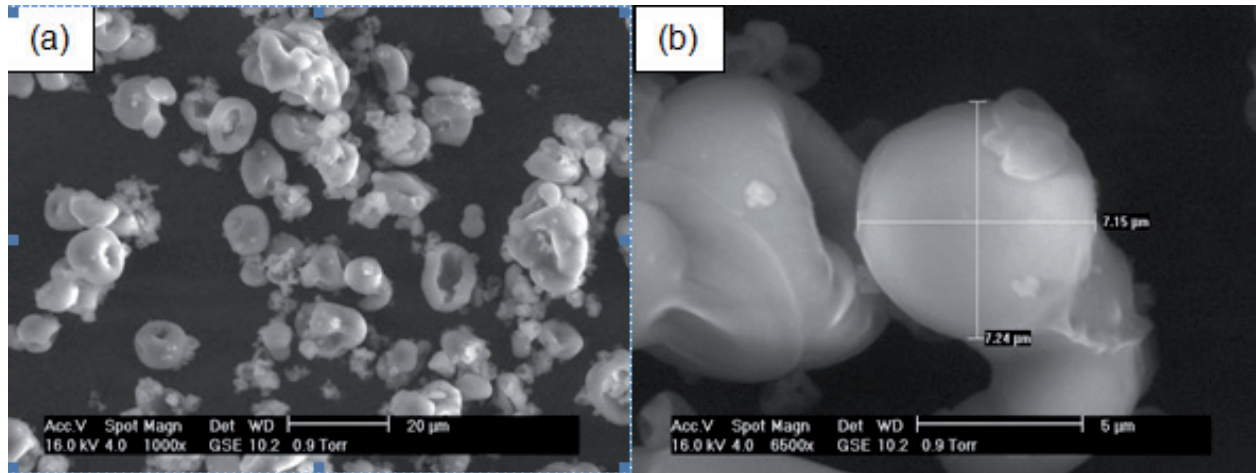


Figura 1. Micrografía de microcápsulas de *L. casei* encapsulado en 80AAM20CPS a una magnificación de (a) 1000x y (b) 6500x.

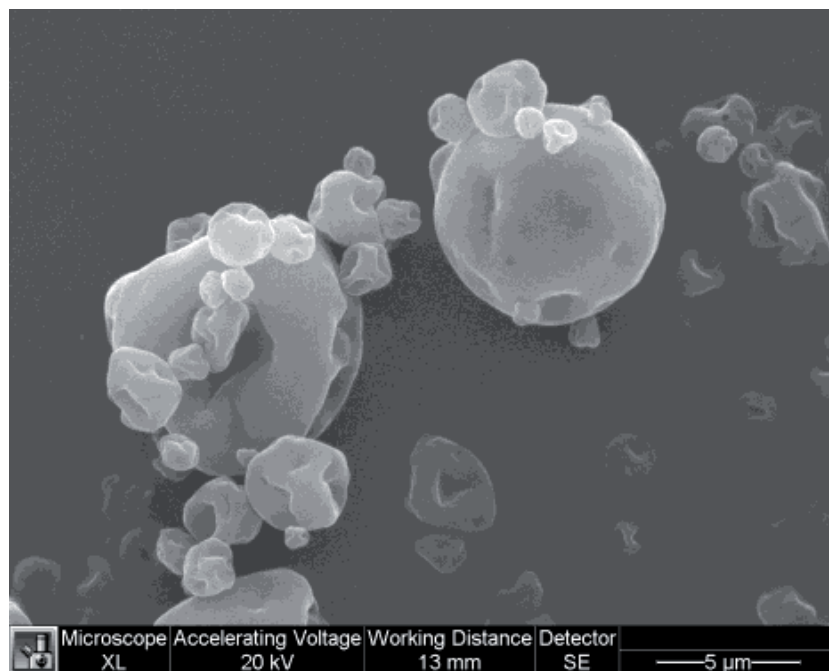
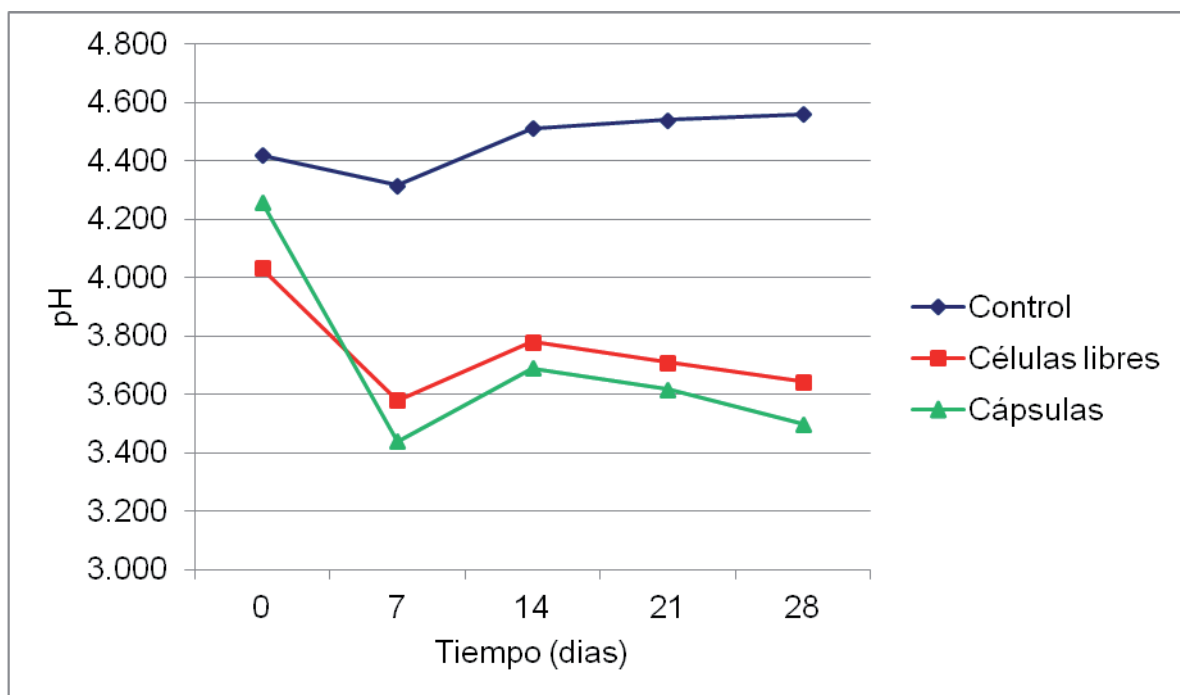


Figura 2. Microfotografía de microcápsulas de *L. casei* encapsulado en concentrado de proteína de suero a una magnificación de 1000x

Evaluación de la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* encapsulado en 80AA-M20CPS y en su forma libre en crema durante un período de almacenamiento de 4 semanas a 4°C

La crema ácida reducida en grasa se caracterizó obteniéndose los siguientes valores: porcentaje de grasa de 14%, sólidos totales 26.71%, humedad 73.28% y pH de 4.48. Los valores citados an-

teriormente fueron ajustados para la obtención de una crema similar a un control comercial. Se prepararon tres lotes con la finalidad de monitorear el cambio de pH de la crema sin la adición de probióticos y adicionando de células del probiótico libres y microencapsuladas. En la Gráfica 1 se muestran los resultados de los cambios de pH durante el tiempo de almacenamiento de los tres tratamientos en refrigeración.



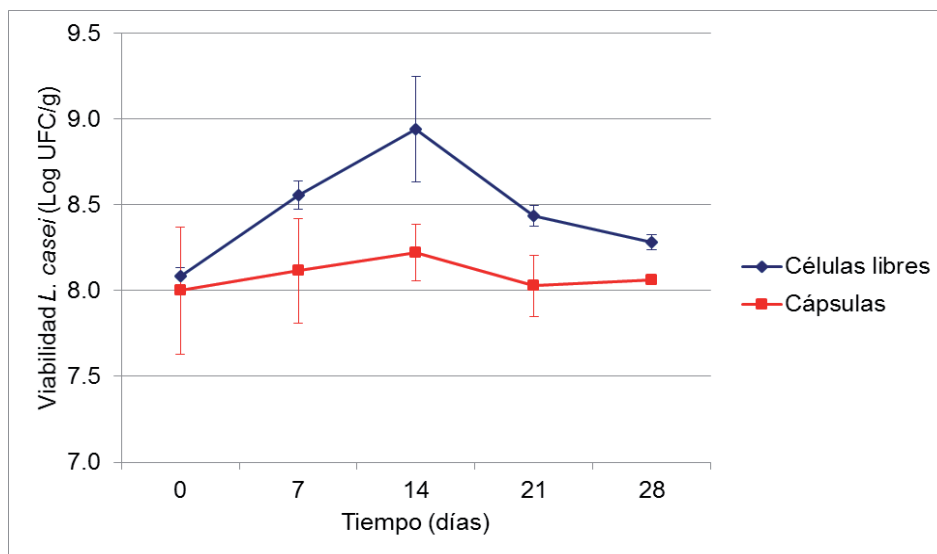
Gráfica 1. Valores de pH de muestras de crema ácida reducida en grasa, control (sin adición de células), células de *L. casei* libres y encapsuladas en 80AAM20CPS almacenadas durante 28 días a 4°C

Para el control, el valor de pH ajustado después de la pasteurización de la crema se mantuvo prácticamente sin cambios (cerca de 4.5). En los tratamientos adicionados de células el valor de pH descendió drásticamente a los 7 días de almacenamiento a valores cercanos a 3.5 y se mantuvo en equilibrio a partir de entonces sin cambios significativos hasta el final de este período. De acuerdo a lo reportado por Vergara (2007), los probióticos producen numerosas sustancias microbianas específicas, como peróxido de hidrógeno y ácido láctico. Champagne y col. (2005) reportaron que específicamente *L. casei* es más ácido tolerante que otras especies y que la capacidad de acidificación puede continuar durante el almacenamiento en frío, un fenómeno llamado “sobre-acidificación” con la resultante disminución del pH del medio.

Fahimdanesh y col. (2012) evaluaron el cambio de pH en mayonesa durante el almacenamiento a 4°C por 30 días y reportaron que en este alimento el valor de pH no fue afectado significativamente por la adición de células de *L. casei*, pues tanto para células libres como encapsuladas, la disminución de pH de 4.10 a 4.02 fue similar al control.

La resistencia a pH extremos es intrínseca de cada especie de bacterias. Kailasapathy y Masondole (2005:252) reportaron pérdidas significativas en la sobrevivencia de *L. acidophilus* en su forma libre y encapsulada en yogurt; dicha disminución en la viabilidad se atribuyó al bajo valor de pH (< 4.5) y a la post-acidificación. Vergara (2007) reportó la sobrevivencia de una cepa de *L. casei* en jugo de pera durante 23 días de almacenamiento, observando una disminución en la población de casi un ciclo logarítmico al final del período, atribuible a un incremento en la acidez de la muestra (diferencia de 0.4 unidades de pH al inicio y final del almacenamiento). Los resultados de este trabajo mostraron que los cambios de pH no tuvieron un efecto significativo en la viabilidad de *L. casei* en crema tanto de células libres como encapsuladas durante el período de almacenamiento.

En la Gráfica 2 se muestran los resultados de la viabilidad del probiótico a lo largo del período de almacenamiento.



Gráfica 2. Viabilidad *L. casei* microencapsulado en 80AAM20CPS y sin encapsular en crema ácida reducida en grasa durante su almacenamiento a 4°C por 28 días.

Las células libres mostraron un incremento de la población de casi un ciclo logarítmico a los 14 días de almacenamiento, mientras que para las células encapsuladas la población se mantuvo más constante. Al final del período de almacenamiento, la población inicial y final en ambos tratamientos no mostró diferencias estadísticas significativas. Después de 4 semanas de almacenamiento, los conteos de células de *L. casei* para células libres mostraron un ligero incremento de 0.21 ciclos logarítmicos, mientras que las células microencapsuladas se mantuvieron constantes, por lo que se concluyó que la matriz de crema ácida fue favorable para mantener la viabilidad de las células de *L. casei*.

Champagne y col. (2005) reportaron que la estabilidad de los probióticos durante el almacenamiento no se ve sustancialmente afectada por el contenido de grasa, pero el pH y oxígeno tienen efectos significativos en la sobrevivencia de las bacterias. Hay evidencia que el beneficio de la microencapsulación en la estabilidad se debe más a la protección contra el oxígeno, que del ácido en el ambiente.

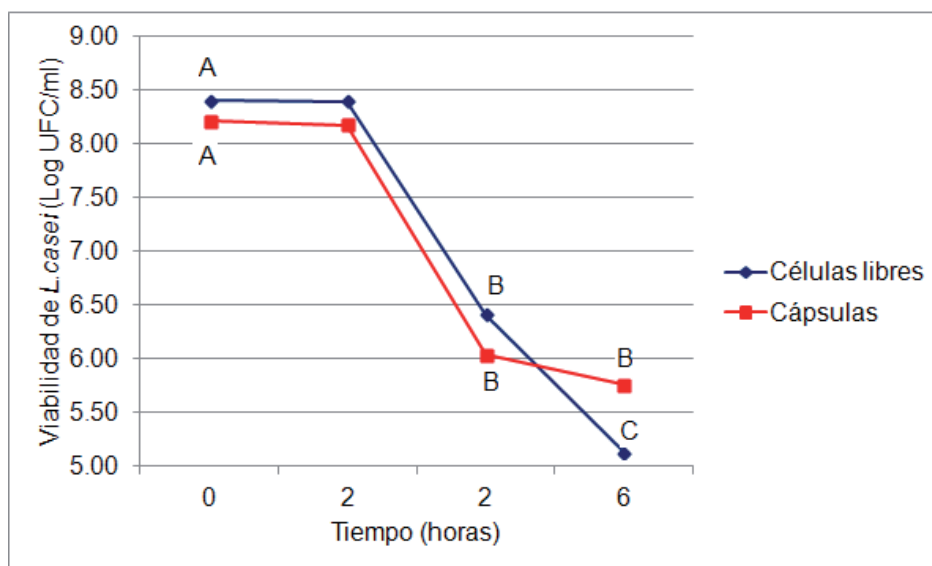
Debido al fenómeno de sobre-acidificación que puede presentarse debido a la adición de *L. casei* ATCC334, para la formulación de un producto como la crema ácida deberá tomarse en cuenta la disminución del pH debido al metabolismo del probiótico, reduciendo las cantidades de ácidos orgánicos adicionados para obtener un producto de buena calidad sensorial.

Evaluación de la tasa de sobrevivencia del probiótico, después del tiempo de almacenamiento, durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

El uso de mezclas de CPS con otros materiales como agentes encapsulantes de probióticos está

reportado por Huq y col. (2013). El uso de almidón fosfatado representa una opción de material encapsulante que resulta en un menor costo y provee de una matriz insoluble en agua. En estudios anteriores del grupo de investigación se evaluaron diferentes proporciones de ambos materiales para efectos de microencapsulación en los que se concluyó que con pequeñas cantidades de CPS se pueden obtener resultados cercanos a los obtenidos con matrices de CPS.

Al exponer las muestras de crema ácida reducida en grasa almacenadas por 39 días, con *L. casei* encapsulado en 80AAM20CPS y en su forma libre a condiciones simuladas gástricas (pH 2) no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de las bacterias encapsuladas o libres después de 2 horas de exposición (Gráfica 3). Inicialmente se consideró llevar a cabo el ensayo de TGI a las dos semanas de almacenamiento en función de que la crema es un producto fresco. Se hicieron los ensayos con un control de células encapsuladas en CPS, células libres y células encapsuladas con 80AAM20CPS. Debido a que el último tratamiento mencionado fue más sensible a las condiciones intestinales, las diluciones utilizadas para el conteo celular no permitieron validar el ensayo para esta muestra (objeto de este estudio), por lo que éste se repitió al final del período de almacenamiento.



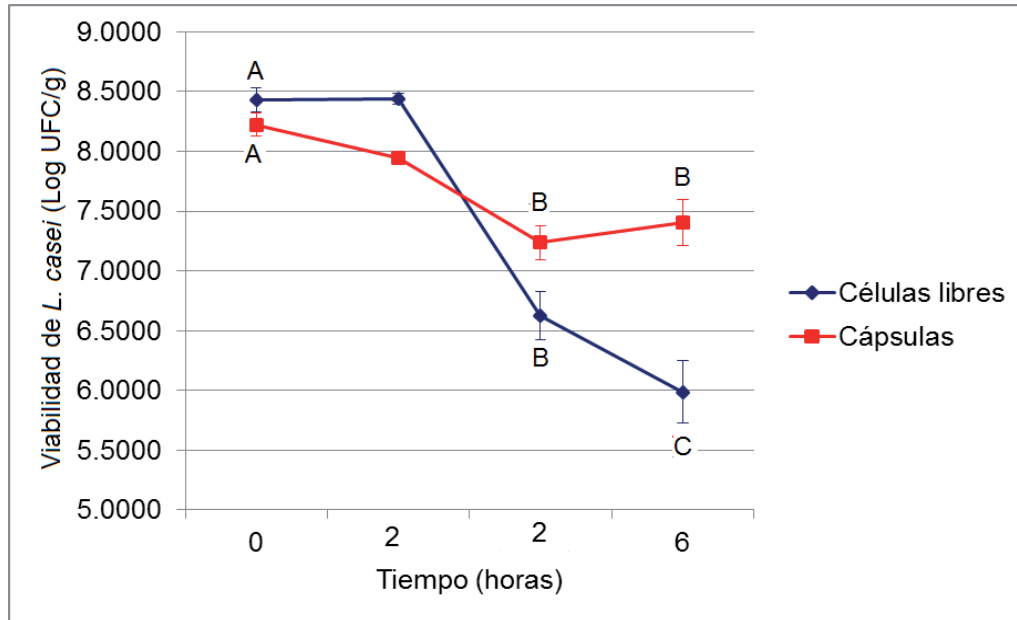
Gráfica 3. Viabilidad de *L. casei* encapsulado en 80AAM20CPS y sin encapsular, adicionado a una crema ácida reducida en grasa (39 días de almacenamiento a 4°C) durante su exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas. A las dos horas se llevó a cabo el cambio de jugo gástrico a jugo intestinal

Kim y col. (2008) evaluaron la sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* cuando este probiótico microencapsulado con alginato de sodio mediante el método de goteo fue expuesto a condiciones gástricas simuladas y reportaron que la población de células libres fue destruida después de 3 horas de exposición (pH 1.2 y 1.5), mientras que las células encapsuladas mostraron una pérdida de viabilidad de 3 ciclos logarítmicos manteniendo una viabilidad de 4 ciclos logarítmicos.

En este estudio, se observó que *L. casei* fue tolerante a las condiciones ácidas del ensayo gástrico (pH 2), aunque como resultado del cambio de pH del ensayo intestinal (pH 8), para ambos tratamientos, se observó una disminución drástica de la población de *L. casei* de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos. Una vez registrada esta pérdida inicial de viabilidad durante el ensayo intestinal, las células microencapsuladas no mostraron una variación significativa en la población durante el tiempo restante del ensayo (4 horas de permanencia en jugo intestinal), en contraposición con las células libres, las cuales mostraron

una tendencia marcada de disminución de la población hasta el final del ensayo intestinal. Los conteos obtenidos en este estudio para *L. casei* encapsulado en 80AAM20CPS y en su forma libre durante el ensayo completo de exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal mostraron una pérdida en la viabilidad de 2.4 y 3.2 ciclos logarítmicos respectivamente.

La sobrevivencia de las células de *L. casei* microencapsuladas en CPS fue mayor que la registrada con 80AAM20CPS, aunque cabe resaltar que el ensayo con las cápsulas con CPS se realizó a los 17 días de almacenamiento, por lo que el efecto protector durante el ensayo de condiciones simuladas del tracto gastrointestinal observado de ambos materiales pudo estar influenciado o afectado por el tiempo de almacenamiento y a condiciones fisiológicas diferentes de las células. Los conteos de células microencapsuladas con CPS mostraron una pérdida de la viabilidad de 0.83 ciclos logarítmicos, mientras que las células libres registraron una disminución de 2.5 ciclos logarítmicos (Gráfica 4).



Gráfica 4. Viabilidad de *L. casei* encapsulado en CPS y sin encapsular (17 días de almacenamiento a 4°C), adicionado a una crema ácida reducida en grasa durante su exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas. A las dos horas se llevó a cabo el cambio de jugo gástrico a jugo intestinal.

Se observaron diferencias estadísticas significativas entre las células encapsuladas con ambos materiales, CPS y la mezcla de CPS con almidón fosfatado con respecto a las células libres durante el período de ensayo intestinal indicadas con diferentes letras en los puntos de las gráficas (2 y 3) de 2 a 6 horas. El efecto adverso del cambio de pH gástrico a intestinal fue menos pronunciado en las células microencapsuladas con CPS. Si bien el CPS confirió mayor protección a las células, debe considerarse llevar a cabo el ensayo de condiciones simuladas del tracto gastrointestinal con muestras de crema con células encapsuladas con ambos materiales con el mismo tiempo de almacenamiento. En las condiciones analizadas en este estudio ambos materiales confirieron un efecto protector del probiótico asegurando un

número suficiente de células para considerar al vehículo alimentario como un alimento probiótico.

La pérdida de viabilidad de probióticos debida a cambios de pH del ambiente gástrico al intestinal ha sido reportado por varios autores. Sultana y col. (2000) reportaron una pérdida en la viabilidad de *L. casei* durante su exposición a sales biliares (1-2%, pH 4.5) después de 2 horas, de 2 ciclos logarítmicos. Blazenka y col. (2000) reportaron una pérdida de viabilidad de células de *L. acidophilus* de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos registradas durante la exposición de las células de jugo gástrico a intestinal (permanencia en jugo gástrico a intestinal simulado de 4 horas).

Es posible utilizar sistemas múltiples de encapsulación con el uso de otros materiales encapsulantes que permitan mantener una mayor viabilidad de las células durante los cambios de pH gástrico e intestinal. Ivanoska y col. (2012) reportaron el uso de alginato para la microencapsulación de *L. casei* por secado por aspersión, en combinación con quitosano que fue utilizado como un agente de recubrimiento, el cual formó un complejo polielectrolítico con cloruro de calcio, ofreciendo mayor protección a las células viables probióticas contra la alta acidez y efectos antimicrobianos de las sales biliares.

De acuerdo a Champagne y col. (2005), también la matriz del alimento vehículo tiene influencia en la sobrevivencia de los probióticos, por ejemplo, los quesos parecen permitir una mayor eficiencia en la entrega de bacterias viables en el intestino que un yogurt, pero una mayonesa puede disminuir la viabilidad celular por la actividad bactericida del ácido acético que contiene (Fahimdanesh y col., 2012). La crema posee una consistencia densa que puede conferir una mayor protección que el yogurt, pero no de la magnitud como la de un queso. Kailasapathy y Masandole (2005:252) reportaron que una matriz densa puede no permitir el libre intercambio de nutrientes y metabolitos dentro y fuera de las cápsulas. La matriz densa de crema reducida en grasa utilizada como vehículo del probiótico *L. casei* permitió el crecimiento del microorganismo libre durante el tiempo de almacenamiento, mientras que las células microencapsuladas pudieron verse más limitadas en el intercambio de nutrientes no aumentando en número durante el período de almacenamiento, pero al final de éste ambos tratamientos no mostraron diferencia significativa en el número de células.

IV. Conclusiones

El proceso de secado por aspersión resultó ser un buen método de microencapsulación del probiótico *L. casei* ATCC 334. El microorganismo

mostró buena tolerancia a las condiciones de secado registrando una alta tasa de sobrevivencia. La crema ácida reducida en grasa formulada fue un buen vehículo para la incorporación de *L. casei* encapsulado y en su forma libre. El probiótico no se vió afectado durante el tiempo de almacenamiento por 28 días a 4°C en el alimento y etapa del ensayo gástrico simulado. El cambio de pH entre jugo gástrico e intestinal afectó mayormente a la cepa exhibiendo una reducción en la viabilidad similar tanto en su forma libre como encapsulada, pero al final de 4 horas de ensayo intestinal, se registró una diferencia estadística significativa entre los dos tratamientos, siendo mayor la sobrevivencia de las células encapsuladas. El material encapsulante probado en este estudio (80AAM20CPS) confirió protección a las células durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después del almacenamiento de la crema durante 39 días a temperaturas de refrigeración. El probiótico *L. casei* microencapsulado con CPS mostró una mayor tasa de sobrevivencia en estas condiciones después de 17 días de almacenamiento. Ambos tratamientos microencapsulados mostraron diferencia significativa con respecto a las células libres.

Resúmenes curriculares:

Dra. Beneranda Murúa Pagola. Doctora en Ciencias, Especialidad en Materiales, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Querétaro, Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química, UAQ. Ing. Bioquímico Administrador en Procesado de Alimentos, ITESM Campus Querétaro. Docente de Facultad de Química, UAQ.

IQAL. Rocio Sanchez Alaníz. Ingeniera Química en Alimentos, Universidad Autónoma (2012), En el año 2014 ingresó a trabajar a Nestlé Gerber actualmente se desempeña como Especialista en Innovación Tecnológica en el negocio de Nestlé

Confectionery, donde lleva a cabo el desarrollo de fórmula y embalaje de nuevos productos para marcas como Crunch® y Carlos V®.

Dr. Eduardo Castaño Tostado. Doctor en Estadística, Universidad de Okayama, Japón, Maestría en Estadística, UNAM, I.I.M.A.S., Licenciatura en Actuaría, UNAM. MIEMBRO SNI, NIVEL 2.

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano. Doctora en Ciencias, Especialidad en Materiales por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Querétaro, Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos por el posgrado de Alimentos de la Facultad de Química de la UAQ, Química en Alimentos por la Facultad de Química de la UAQ. 22 años de experiencia en docencia, miembro SNI nivel 1, 18 artículos indizados, 6 capítulos de libro, 12 proyectos financiados como responsable técnico.

Referencias bibliográficas:

- Ananta, E., Volker, M., y Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15, 399-409.
- AOAC (2000). Official methods of analysis. 14th edition. EUA: Association of Official Analytical Chemistry.
- Blasenka, K., Jagoda, S., Jadranka, G., y Sreko, M. (2000). Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Food Technology Biotechnology*, 38 (2), 121-127.
- Behboudi-Jebbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L. y Fisk, I. (2013). Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*, 31, 1274-1283.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J., y Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1), 61-84.
- Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L. y Collins, J. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 759-768.
- El-Salam, M.H.A. y El-Shibiny, S. (2015). Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. *Dairy Science and Technology*, 95, 393-414.
- Fahimdanesh, M., Mohammadi, N., Ahari, H., Zanjani, M.A.K., Hargalani, F.Z. y Behrouznasab, K. (2012). Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in mayonnaise sauce. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (40), 6853-6858.
- Ivanovska, T.P., Petrussevska-Tozi, L., Kostaska, M. D., Geskovski, N., Grozdanov, A., Stain, C., Stafilov, T., Mladenovska, K. (2012). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in chitosan-Ca-alginate microparticles using spray-drying method. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 31(1), 115-123.
- Goderska K, Zybals M and Czarnecki Z. (2003). Characterization of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* LR7 strain. *Pol J Food Nutr Science*, 12, 21-24.
- Huq, T., Khan, A., Khan, R., Riedl, B. y Lacroix, M. (2013). Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critical Review Food Science Nutrition*. 53, 909-916.
- Mortazavian, A., R.S. Hadi, M.R. Ehsani y S. Sohrabvandi. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran J Biotechnol*, 5 (1): 1-18.
- Kailasapathy, K. and Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biology*, 78, 80-88.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria. *Curr Issues Intest Microbiology*, 3, 39-48.

- Kim, S.J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.J., Shin, S., Cha, D.S. y Park, H.J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lb. acidophilus* ATCC 43121. *LWT*, 41, 493-500.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt: a review. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.
- Kailasapathy, K., y Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *B. lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60 (3), 252-258.
- Lim, S. y Seib, P. (1993). Preparation and Pasting Properties of Wheat and Corn Starch Phosphates. *Cereal Chem.* 70 (2), 137-144.
- Picot, A., y C. Lacroix (2003b). Production of Multiphase Water-Insoluble Microcapsules for Cell Microencapsulation Using an Emulsification/Spray-drying Technology. *J Food Science*, 68(9), 2693-2700.
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., y Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1410-1417.
- Serna-Cock, L. y Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 4743-4753.
- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907.
- Shah, N.P. y Lankaputhra, W.E.V. (1997). Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. in yogurt. *International Dairy Journal*, 7, 349-359.
- Sultana, K., Godward, K., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, R. y Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47-55.
- Tripathy, MK y Giri, SK. (2014). Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.
- Vergara-Sobarzo, A.O. (2007). Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei* en Jugo de Pera. Tesis. Universidad Austral de Chile.