



# Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
RESIDENCIA PROFESIONAL PERIODO: ENERO-JUNIO 2014

**Viabilidad de microorganismos autóctonos encapsulados a diferentes  
condiciones de almacenamiento.**

PRESENTA:

**Alejandro Argüello Esponda**

ASESOR:

**Dr. Miguel Abud Archila**

**Tuxtla Gutiérrez, Chiapas**

**Junio 2014**

## CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	4
2	FUNDAMENTO TEÓRICO.....	6
2.1	MÉTODOS DE ENCAPSULAMIENTO.....	7
2.1.1	Metodología de emulsión.....	7
2.1.2	Metodología de extrusión o goteo.....	8
2.1.3	Liofilización.....	9
2.1.4	Pulverización.....	10
2.1.5	Atomización o secado por aspersión.....	10
2.2	SELECCIÓN DEL MATERIAL ENCAPSULANTE.....	10
2.3	MECANISMOS DE LIBERACIÓN DEL MATERIAL ACTIVO.....	12
2.4	IMPORTANCIA DE LA APLICACIÓN DE LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS.....	14
3	JUSTIFICACION	16
4	OBJETIVO GENERAL	17
4.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
5	PROBLEMAS A RESOLVER	17
6	PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	18
6.1	MICROORGANISMO.....	18
6.2	ENCAPSULAMIENTO.....	18
6.3	PREPARACION DEL PELLET.....	18
6.4	SECADO POR ASPERSIÓN.....	19
6.5	VIABILIDAD CELULAR.....	19
6.6	MONITOREO INICIAL.....	19
6.7	MONITOREO MENSUAL.....	19
7	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	20
7.1	Viabilidad Celular a los 30 días de almacenamiento a 4° C y -18° C..	20
7.2	Viabilidad Celular a los 60 días de almacenamiento a 4° C y -18° C..	24
8	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	28

9	COMPETENCIAS DESARROLLADAS O APLICADAS	28
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

## 1. INTRODUCCIÓN

Recientemente, en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez se han desarrollado diversas investigaciones acerca de una bebida fermentada tradicional del estado de Chiapas llamada “taberna”. Alcántara *et al.* (2010) en estudios *in vitro* reportaron que durante las primeras etapas de la fermentación de la taberna, el consorcio microbiano estaba formado principalmente por *Zymomonas mobilis*, *Fructobacillus spp.*, *Pantoea agglomeran* y *Gammaproteobacteria*. Posteriormente, a las 60 h de fermentación, las bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus nagelii*, *L. sucicola* y *L. spp.* se encontraron en una proporción del 30%. Y finalmente después de 108 h de fermentación la comunidad bacteriológica incluía *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus nagelii* y *Acetobacter pasteurianus*. Esta investigación sugiere que *Zymomonas mobilis* representa una proporción muy importante en el consorcio microbiano de la taberna (60-80%) durante toda la fermentación.

Alegría (2011) evaluó la dinámica poblacional de las levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) que participan en el proceso fermentativo de la taberna producida por la fermentación natural de la savia de la palma de coyol mediante análisis molecular. Con esta investigación se lograron aislar 64 cepas de levaduras, 35 cepas de BAA y 30 cepas de BAL en los primeros 5 días de fermentación, de acuerdo a la morfología macroscópica y microscópica. Los análisis por PCR-DGGE de la taberna, confirman la diversidad microbiana durante el proceso fermentativo de la taberna. En el DGGE-Levaduras se apreciaron 6 diferentes bandas a partir del día 2 al 14 de fermentación, asumiendo 6 levaduras diferentes o diferentes polimorfismos de las mismas, estos resultados concuerdan con las diferentes morfologías observadas de las cepas aisladas. Para el DGGE-BAL y DGGE-BAA se observaron 10 y 9 diferentes bandas respectivamente, mismas que podrían corresponder a diferentes bacterias o polimorfismos diferentes a partir del día 2 de fermentación. Los resultados de la morfología colonial tanto para BAL (6 morfologías) como para BAA (5 morfologías) concuerdan con los análisis de DGGE, haciendo evidente la diversidad bacteriana

y permaneciendo un grupo importante de bacterias lácticas y acéticas durante todo el proceso fermentativo.

Rustrian (2011) reportó el efecto de los materiales encapsulantes y las variables del proceso de secado por aspersión sobre la viabilidad del consorcio microbiano de la taberna microencapsulada. En el proceso de optimización reporta el empleo de la mezcla de Maltodextrina-Alginado de sodio a una concentración del 30 y 3% respectivamente, una temperatura de 97° C con un flujo de alimentación de 3mL/min para maximizar la supervivencia de los microorganismos presentes en la “taberna”.

El secado por aspersión, como método de encapsulación, consiste en atomizar en aire caliente una suspensión o emulsión previamente homogeneizada de microorganismos en la matriz del material elegido para encapsular, consiguiendo con ello una rápida evaporación del solvente (agua) para obtener finalmente en forma de partículas de polvo. El proceso de secado por aspersión es controlado mediante la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura.

En este trabajo se evaluará el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad celular de los microorganismos aislados de la taberna y encapsulados mediante secado por aspersión.

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Se define como encapsulación a “la tecnología empleada para el embalaje/envoltura de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas capsulas que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo determinadas condiciones”. La encapsulación se inició en 1930, el método más antiguo empleado en microorganismos es el secado por aspersion (Perez, 2013).

Una capsula está constituida por una membrana fuerte, delgada, esférica y semipermeable que envuelve a un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que puede variar desde unas pocas micras o varios milímetros. El tamaño y la forma de estas capsulas, dependen de los materiales y métodos usados para prepararlas. Ellas son producidas también en forma de gel suave (capsulas de gel) o en gorma de polvo seco. La morfología de la superficie de las capsulas pueden ser lisa (regular y esférica) o irregular (desigual) con o sin presencia de poros, los cuales son los responsables de reducir la eficiencia de encapsulación. La encapsulación, por lo tanto, ayuda a separar el núcleo central, en nuestro caso los microorganismos, de su entorno hasta su liberación, protegiéndolo de diversos factores adversos como acidez, concentración de oxígeno y temperaturas, mejorando con ello su estabilidad y vida media y proporcionando una liberación controlada dependiendo del material empleado como matriz. Esta liberación se puede producir mediante diversos mecanismos, como ruptura mecánica de la pared de la capsula, disolución de la misma, fusión de la pared o difusión del contenido a través de la pared (Iyer, 2005). Finalmente debe destacarse que, al tratarse de las capsulas de una membrana semipermeable, permite el intercambio de nutrientes y metabolitos con el exterior, hecho importante para el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos.

Los probióticos son “microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del huésped” (FAO/WHO, 2002). Sus efectos beneficiosos sobre la salud humana han sido ampliamente reconocidos y demostrados mediante números estudios y en la mayoría de los casos estos efectos son dependientes de la viabilidad del

microorganismo en el lugar de acción. No siempre esto se consigue, ya que el microorganismo ha de soportar condiciones desfavorables tanto en el vehículo en que es administrado, relacionadas con las características del producto alimentario (acidez del producto, interacción con otros microorganismos, oxigenación, temperatura de almacenamiento, entre otros), como en el tracto gastrointestinal (acidez en el estómago, sales biliares, enzimas digestivas) cuando son administradas por vía oral.

Para intentar mejorar la viabilidad de los microorganismos a diferentes procesos tecnológicos o bien a las condiciones de los tractos en que se administran, se han estudiado diferentes métodos, que incluyen incrementar la resistencia de cepas probióticas a pH ácido y sales biliares incrementar la exposición progresiva a concentraciones crecientes de los mismos.

En la actualidad, está cobrando importancia la protección física de estos microorganismos mediante técnicas de encapsulación, las cuales han venido demostrando su eficacia en los últimos años. Sin embargo, las técnicas de encapsulación y los materiales de encapsulación empleados pueden variar dependiendo del estudio, así como también existe una carencia de estudios in vivo para corroborar los resultados obtenidos a nivel de laboratorio.

Existen una gran variedad de métodos de encapsulación de microorganismos. Se debe señalar que como paso previo en todas las técnicas que se describen, se obtiene un cultivo de microorganismo crecidos en condiciones óptimas, los cuales son luego centrifugados y empleados en forma de suspensión para su posterior encapsulación.

## **2.1 METODOS DE ENCAPSULAMIENTO**

### **2.1.1 Metodología de emulsión.**

La emulsificación se define como un proceso de dispersión de un líquido en un segundo líquido inmiscible. Si se incluye el material a encapsular en el primer líquido, este se puede encapsular aplicando esta metodología (de Vos, 2010).

Como en la mayoría de los casos se emplean diversos polímeros como material de encapsulación, esta metodología aplicada a los microorganismos se desarrolla de la siguiente manera: un pequeño volumen de una solución polimérica con células microbianas en suspensión (fase discontinua) es añadido a un volumen mayor de aceite vegetal (fase continua), como aceite de soja, girasol o maíz y la mezcla es homogeneizada hasta formar una emulsión de agua aceite. Una vez que la emulsión se ha formado, el polímero hidrosoluble ha de ser insolubilizado mediante un entrecruzamiento para formar las capsulas dentro de la fase oleosa (Krasaekoopt, 2003). El método de insolubilización va a depender del tipo de polímero que se use, por ejemplo, si se emplea alginato se insolubilizara con una solución de cloruro cálcico (Shue, 1993). El tamaño de las capsulas resultantes puede variar de 20  $\mu\text{m}$  a 2 mm y su tamaño final puede resultar reducido mediante el empleo de surfactantes y reduciendo el tamaño de la fase interna o discontinua.

Aunque dicha técnica se ha empleado con éxito para la encapsulación de microorganismos (Adhikari, 2003) presenta algunos inconvenientes a la hora de aplicarla en industria alimentaria: por un lado el aceite residual en las capsulas perjudica la textura y características organolépticas del alimento y, por otro, el aceite residual, los emulsificantes y surfactantes, pueden ser tóxicos para determinadas células (Krasaekoopt, 2003). Además, la necesidad de añadir un paso más al proceso para eliminar estos residuos, junto con el empleo de aceites vegetales, encarecen este método de encapsulación.

### **2.1.2 Metodología de extrusión o goteo**

La extrusión consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado forzando el paso de una solución a través de una aguja de jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo (de Vos, 2010). Para ello, los microorganismos son adicionados a una solución hidrocoloide y esta suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual, como en el método de emulsión, va a variar dependiendo del material empleado. El tamaño de las capsulas obtenidas suele rondar los 2-4 mm, y este va a depender del diámetro de salida de la solución, ya que cuanto menor sea el diámetro de la abertura



correspondiente (aguja/boquilla), menor será el tamaño de las capsulas. Se trata de una técnica apropiada para la encapsulación ya que es poca agresiva, no emplea disolventes perjudiciales para los microorganismos y además, empleando los dispositivos adecuados se puede producir a gran escala.

La atomización, como método de encapsulación, consiste en atomizar en aire caliente una suspensión o emulsión previamente homogenizada de microorganismos en la matriz del material elegido para encapsular, consiguiendo de ello una rápida evaporación del solvente (agua) para obtener finalmente los microorganismos inmovilizados en forma de partículas de polvo (Rokka, 2010). El proceso de atomización es controlado mediante la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura. En cuanto a los materiales empleados para la encapsulación, normalmente se emplean polisacáridos, aunque también es posible emplear proteínas de la leche.

Este proceso presenta una serie de ventajas, como son la posibilidad de establecer esta tecnología como un proceso continuo, su facilidad de manejo y su bajo costo, características que hacen de esta una técnica idónea para sus aplicaciones en procesos industriales. Por otro lado, existen también desventajas asociadas a esta técnica: se trata de una técnica de inmovilización, más que de encapsulación, de manera que algunas bacterias pueden pasar al producto cuando la hidratación tiene lugar y pueden alterar las propiedades del mismo (de Vos, 2010) otro importante inconveniente son las altas temperaturas empleadas en el proceso para la evaporación del solvente, las cuales pueden afectar a la supervivencia de determinadas cepas (Chavarri, 2010).

### **2.1.3 Liofilización**

La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y una vez congelado se introduce en una cámara de vacío para que se separe el agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido, obteniendo un producto seco. Sin

embargo, el secado, en general no se considera una metodología realmente eficaz para la conservación de la actividad biológica de microorganismos (de Vos, 2010).

#### **2.1.4 Pulverización**

En esta técnica, el material a encapsular es suspendido en aire y la matriz es pulverizada sobre el mismo, formando las capsulas. El material de recubrimiento puede ser inyectado desde diversos ángulos, lo que influye en las propiedades del recubrimiento (Champagne, 2007).

Para su aplicación en probióticos, los microorganismos han de ser liofilizados como paso previo al recubrimiento, el cual se puede realizar con proteínas, carbohidratos, pero principalmente con materiales de base lipídica en industria alimentaria, lo que conlleva algunas limitaciones a la hora del recuento microbiano.

#### **2.1.5 Atomización o secado por aspersión**

La atomización, como método de encapsulación, consiste en atomizar en aire caliente una suspensión o emulsión previamente homogeneizada de probióticos en la matriz del material elegido para encapsular, consiguiendo con ello una rápida evaporación del solvente (agua) para obtener finalmente los probióticos inmovilizados en forma de partículas de polvo (Kailasapathy, 2002). El proceso de atomización es controlado mediante la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura. En cuanto a los materiales empleados para la encapsulación, normalmente se emplean polisacáridos, aunque también es posible emplear proteínas como matriz (Gill, 2001).

### **2.2 SELECCIÓN DEL MATERIAL ENCAPSULANTE**

La selección del material de recubrimiento es el paso más importante para obtener un producto encapsulado porque, dependiendo de sus propiedades, se pueden cumplir los requerimientos de protección. El material protector debe reunir ciertas propiedades que dependen de las características químicas del material encapsulado, la aplicación, las condiciones de almacenamiento y del proceso al cual será expuesto. Las características de un recubrimiento ideal para encapsular

son: baja viscosidad a altas concentraciones, baja higroscopicidad para facilitar su manipulación y evitar aglomeración, capacidad de emulsificar y estabilizar el material central, el recubrimiento es soluble en los solventes alimenticios comunes o en el producto alimenticio final, máxima protección al material central contra condiciones adversas (luz, pH, oxígeno, humedad y otros ingredientes reactivos); liberación completa de solventes y otros materiales usados durante el proceso de encapsulación, sabor insípido y bajo costo.

En el caso de los microorganismos, normalmente se emplean como material de encapsulación polisacáridos de diferentes orígenes.

Cuadro. 1 Orígenes de los polímeros más utilizados para encapsulamiento de microorganismos

<b>Orígen</b>	<b>Polisacáridos</b>
Algas marinas	k-carragenano, alginato
Plantas	Almidón y sus derivados, gomas
Bacterias	Gelano, xantato
Animales	Quitosano
Proteínas animales	Leche, gelatina

El alginato es un polisacárido anionico, formado por residuos de los ácidos  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico. En la encapsulación de microorganismos se unas en concentraciones en el rango de 0.5-4 %. Las capsulas de alginato tienen la ventaja de formar fácilmente matrices de gel alrededor de las células del microorganismo, son seguras y biocompatibles con él, baratas y las condiciones del proceso son simples y de fácil manejo.

Para ser más eficiente el encapsulado es mezclar al alginato con otros compuestos poliméricos (almidón), al cubrir las capsulas con otros componentes (quitosano) y al modificar su estructura utilizando varios aditivos (glicerol).

El carragenano se obtiene de algunas algas rojas. La gelificación es dependiente de la temperatura pero para la formación de las cápsulas necesita de KCl, bien

como solución de endurecimiento o para insolubilizar el polímero, dependiendo de la técnica empleada.

El quitosano es una molécula policatiónica obtenida mediante desacetilación alcalina de la quitina presente en el exoesqueleto de los crustáceos. Se disuelve fácilmente a pH ácido por lo que con frecuencia se emplea en combinación con otro polímero (frecuentemente alginato) que soporte el pH ácido.

La amilosa es el constituyente lineal del almidón, amilosa forma una cubierta que es resistente a los ácidos gástricos y a las enzimas pancreáticas. Este se puede hacer más resistente modificándolo mediante eterificación, esterificación o acidificación (de Vos, 2010). Los almidones con alto contenido de amilosa forman películas fuertes, resistentes y más flexibles, pero es difícil de dispersar en agua y puede gelificar muy rápidamente (Kailasapathy, 2002). Estos almidones tienen la ventaja de ser seguros, no tóxicos y de fácil disponibilidad.

### **2.3 MECANISMOS DE LIBERACIÓN DEL MATERIAL ACTIVO**

En el caso de los microorganismos, el material activo consiste en células viables de los microorganismos a encapsular con el material de recubrimiento, el cual debe ofrecer algún mecanismo de liberación del material activo a un tiempo determinado.

Los principales mecanismos de liberación que se aplican en el sector de alimentos son los siguientes:

- **Disolución o fusión:** La integridad de la cápsula se destruye por disolución en un solvente apropiado o por acción del calor. Los recubrimientos hidrosolubles se disuelven fácilmente con el incremento de la humedad, la adición de agentes químicos o con el ajuste a diferentes niveles de sales (Sandoval, 2004). La liberación térmica se utiliza en cápsulas con material protector de base grasa, el cual funde y libera el centro activo (Shue, 1993).
- **Liberación física:** El material protector se fractura por fuerzas externas como presión o fricción. La masticación es el principal mecanismo de liberación;

igualmente, durante la mezcla de las materias primas se presenta la liberación por fricción (Shue, 1993).

- Difusión: Este proceso de liberación es guiado por el gradiente de concentración y las fuerzas atractivas entre cadenas, como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, grado de entrecruzamiento y cristalinidad (Sandoval, 2004). Además, está controlado por la solubilidad y la permeabilidad del material activo en el material protector (Adhikari, 2003).

La liberación del contenido de las cápsulas se puede llevar a cabo por disolución en agua, esfuerzos de cizalla, temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. No obstante, esta liberación puede controlarse por difusión a través de la pared de la cápsula o bien por medio de una membrana que recubra la pared (Martín, 2009).

En los métodos físicos de encapsulación se busca la formación de una estructura amorfa metaestable, de baja permeabilidad al compuesto encapsulado, al oxígeno y otros compuestos y con alta temperatura de transición vítrea (Truelstrup, 2002). La permeabilidad del material protector cambia al someterse a condiciones específicas de temperatura y humedad. Los principios físico-químicos de la transición vítrea de estos materiales han demostrado que la liberación del centro activo se presenta en la transición del estado vítreo a estado gomoso, por calentamiento de la matriz. El material central se libera por difusión a una velocidad que aumenta con el incremento de la temperatura. La estabilidad de la cápsula depende de que su temperatura de transición sea superior a la temperatura de almacenamiento (Nag, 2011).

Según Lozano (Kailasapathy, 2002), el estudio de liberación in vitro del material activo a partir de las cápsulas es muy importante, cuya liberación está gobernada por factores dependientes del polímero (insoluble, solubilidad pH dependiente, peso molecular, estado cristalino), del material activo (solubilidad y peso molecular) y de la propia cápsula (estructura interna reservorio o matricial y el contenido teórico del material activo con respecto al polímero). Para el estudio de

liberación se puede utilizar los métodos de flujo, agitación de viales, membranas de diálisis, entre otros. Las cápsulas son incubadas en el medio y se determina su liberación con el tiempo. La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad de los componentes de la pared de la cápsula influyen en la velocidad de difusión. También es importante la naturaleza química, morfológica, la temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento de los componentes de la cubierta, ya que pueden disminuir la velocidad de liberación (Dewettinck, 1999).

## **2.4 IMPORTANCIA DE LA APLICACIÓN DE LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS**

Dentro de los aditivos encapsulados en la industria de alimentos se enumeran a los microorganismos (Favaro, 2002). Las aplicaciones y ventajas de los microorganismos encapsulados han sido enfocadas en diferentes líneas de investigación: producción de cultivos iniciadores, producción de productos alimenticios, viabilidad de las células probióticas en el tracto gastrointestinal, aplicación en fermentadores, aplicación de nuevos métodos en la elaboración de alimentos y mejoramiento de las propiedades sensoriales de productos probióticos (Mortazavian, 2007).

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, se ha observado que la encapsulación puede ser usada eficientemente para la preparación de cultivos iniciadores de bacterias con más alta viabilidad y que la vida de anaquel de las células encapsuladas se incrementa y pueden ser directamente ingeridas en los productos y consumidas (Kailasapathy, 2002). Varias investigaciones confirman que la encapsulación incrementa eficientemente la viabilidad de los probióticos durante el paso por el tracto gastrointestinal en presencia de condiciones enzimáticas, sales biliares y acidez (Mortazavian, 2007) y (Chandramouli, 2004).

Su aplicación en fermentadores ha reportado ventajas durante la producción de biomasa que incrementa la tolerancia de microorganismos contra la infección de bacteriófago (Picot, 2002), toxicidad de agentes químicos, protege las células de

los microorganismos contra cambios no deseados como mutaciones genéticas, se alcanza buena productividad en la producción de metabolitos especialmente a altas velocidades de agitación (Lee, 2000) y se produce más densidad de biomasa (Steenson, 1987). En productos alimenticios, la encapsulación puede marcadamente mejorar la viabilidad de los probióticos y la vida de anaquel, debido a su efecto protector contra factores medioambientales (elevada acidez, bajo pH, presencia de oxígeno, agentes tóxicos generados durante el proceso, principalmente tratamiento con calor, enzimas digestivas, bacteriófagos y procesos de secado (Arnauld, 1992).

Las nuevas formas alcanzadas para la elaboración de alimentos probióticos lácteos, mediante la aplicación de la encapsulación de microorganismos, permiten que estas puedan tener velocidades deseables de actividad metabólica celular. De hecho, se han comparado los métodos de encapsulación con los tradicionales para la producción de yogurt, lo cual ha favorecido sus propiedades sensoriales, muy altas viabilidades de las bacterias del yogur y control de los sabores del producto con menos acidez, debido a una baja producción de ácido láctico (Krasaekoopt, 2003) (Mortazavian, 2007).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los microorganismos presentes en la “taberna” pueden conservarse de forma individual dentro de una matriz encapsulante, que permita además de mantener su viabilidad, un fácil manejo para obtener el consorcio inoculante para la estandarización de la elaboración de la taberna. Además, su encapsulamiento permite mejorar su resistencia a las condiciones adversas a las que son sometidas durante su paso a través del tracto gastrointestinal y su posible empleo para la elaboración de otro tipo de productos funcionales.

La supervivencia de los microorganismos en los productos alimenticios y en el tracto gastrointestinal es afectada por un grupo muy diversos de factores, entre ellos las condiciones ambientales, tecnológicas y gastrointestinales a los cuales son sometidos. Es en la estabilidad de estos microorganismos donde juegan un papel importante técnicas como la microencapsulación, que ofrecen una protección física a las bacterias frente a condiciones desfavorables a las que se pueden enfrentar durante los procesos de producción, almacenamiento y durante su paso a través del tracto gastrointestinal al administrarse por vía oral.

Es necesario evaluar la sobrevivencia celular de los microorganismos encapsulados durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración y de congelamiento para obtener tecnologías más eficientes que incrementen la vida de anaquel, estabilidad y funcionalidad de los microorganismos de interés.



## **4. OBJETIVOS**

Objetivo general

Evaluar la supervivencia de microorganismos de interés almacenados a temperatura de refrigeración y congelación.

### **4.1 Objetivos específicos**

- Encapsular los microorganismos de interés en una matriz de maltodextrina-alginato de sodio mediante secado por aspersión.
- Evaluar la viabilidad celular de los microorganismos encapsulados durante su almacenamiento a 4° C.
- Evaluar la viabilidad celular de los microorganismos encapsulados durante su almacenamiento a -18° C.

## **5. PROBLEMAS A RESOLVER**

Es necesario desarrollar técnicas eficaces para conservar microorganismos de interés en matrices sólidas que permitan mantener las características genotípicas y fenotípicas estables durante el mayor tiempo posible. Además de facilitar su reactivación y su incorporación a los diferentes sistemas alimenticios.

## **6. DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

### **6.1 Microorganismos**

Se emplearon 2 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL 03 y BAL 10), 2 cepas de bacterias ácido acéticas (BAA 23-04 y BAA 24-05) y 2 cepas de levaduras (LEV 51 y LEV 64) seleccionadas de una colección inicial de cultivos del Laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, aisladas de una muestra de taberna colectada en la Colonia Benito Juárez del municipio de Villaflores, Chiapas, México. Los cultivos frescos utilizados se obtuvieron por reactivación en caldo MRS para las bacterias ácido lácticas (BAL), para las bacterias ácido acéticas (BAA) en caldo enriquecido y para las levaduras en caldo YM.

### **6.2 Encapsulamiento**

Como agente encapsulante se empleó una mezcla de maltodextrina 10DE (MD) y alginato de sodio (AG). La concentración de maltodextrina fue al 30% (p/v) y la de alginato de sodio al 3% (p/v). Los agentes encapsulantes fueron hidratados con agua destilada a 40 °C durante 24 horas. Posteriormente, se mezclaron en una relación de 60-40% MD-AG y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### **6.3 Preparación del Pellet**

Para cada experimento se prepararon 200 mL del caldo correspondiente para cada microorganismo y se inocularon al 2%. Se incubaron a una temperatura de 35 °C durante 24 horas en el caso de las bacterias ácido lácticas y levaduras, y en el caso de las bacterias ácido acéticas durante 72 horas. Posteriormente, los medios fueron centrifugados a una velocidad de 4,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C para obtener el Pellet. El Pellet fue resuspendido en la solución del agente encapsulante estéril y homogenizado en un homogenizador ultra Turrax 25 Basic durante 5 minutos a una velocidad de 5,000 rpm. Después fue alimentado directamente al secador por aspersion.

#### **6.4 Secado por aspersión**

Las emulsiones fueron deshidratadas en un secador por aspersión tipo laboratorio marca Buchi empleando una temperatura del aire de entrada a 120 °C y el flujo de alimentación al secador fue de 3 mL/min. Posteriormente, el polvo fue almacenado bajo condiciones de vacío en bolsas de plásticos y se almacenaron a 4° C y a -18° C.

#### **6.5 Viabilidad celular**

La viabilidad celular de los microorganismos se determinó mediante recuento en placa con agar MRS (BAL), agar GYC (BAA) y agar YM (LEV). Las cajas fueron incubadas durante 48 horas a 30° C.

#### **6.6 Monitoreo inicial**

Se rehidrataron 0.5 g de polvo obtenido después del encapsulamiento en 5 mL de agua esterilizada. Las muestras fueron agitadas en un vortex durante 10 minutos o hasta tener una suspensión homogénea, se realizaron diluciones seriadas según fue requerido y se inocularon 100 µL en los correspondientes agares para cada tipo de microorganismo. Las cajas se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 48 horas.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Viabilidad celular a los 30 días de almacenamiento a 4° C y -18° C

La viabilidad celular de los microorganismos encapsulados evaluados durante el almacenamiento a 4° y -18° C se muestra en los cuadros 2 y 3 se observa que los microorganismos más resistentes fueron las bacterias ácido lácticas, seguidas por las bacterias ácido acéticas y finalmente por las levaduras.

**Cuadro 2. Viabilidad celular durante el almacenamiento a 4° C**

MICROORGANISMO	Tiempo cero			T1 (30 días)		
	UFC/mL	Log 10	Viabilidad (%)	UFC/mL	Log 10	Viabilidad (%)
LEV 51	1.19E+08	8.08	100.00	9.67E+02	2.99	36.97
LEV 64	1.05E+08	8.02	100.00	5.33E+02	2.73	33.99
BAL 03	6.32E+07	7.80	100.00	3.33E+06	6.52	83.62
BAL 10	4.32E+09	9.64	100.00	2.99E+08	8.48	87.96
BAA 2304	4.40E+06	6.64	100.00	1.57E+05	5.19	78.20
BAA 2405	9.20E+06	6.96	100.00	2.13E+03	3.33	47.81

**Cuadro 3. Viabilidad celular durante el almacenamiento a -18° C**

MICROORGANISMO	Tiempo cero			T1		
	UFC/mL	Log 10	Viabilidad (%)	UFC/mL	Log 10	Viabilidad (%)
LEV 51	1.19E+08	8.08	100.00	1.70E+03	3.23	40.00
LEV 64	1.05E+08	8.02	100.00	1.27E+03	3.10	38.68
BAL 03	6.32E+07	7.80	100.00	3.50E+06	6.54	83.89
BAL 10	4.32E+09	9.64	100.00	3.27E+08	8.51	88.37
BAA 2304	4.40E+06	6.64	100.00	1.93E+05	5.29	79.57
BAA 2405	9.20E+06	6.96	100.00	2.23E+03	3.35	48.09

Resultados similares fueron reportados por Wang *et al.* (2004) quienes obtuvieron alrededor del 40% de viabilidad celular a las 4 semanas de almacenamiento a 25° C en cepas prebióticas encapsuladas con leche de soya mediante secado por aspersión. Fahimdanesh *et al.* (2012), evaluaron la sobrevivencia de cepas probióticas de *L. casei* y *B. bifidum* encapsuladas con Alginato de Calcio y almidón, quienes después de 4 semanas de almacenamiento a 4° C reportaron 70% de supervivencia de *L. casei* y 60% para *B. bifidum*.

Realizando un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) con un nivel de significancia del 95% se observa que la temperatura de almacenamiento no tuvo efecto estadístico significativo sobre la viabilidad celular de los microorganismos evaluados. Sin embargo, si se encontró efecto estadístico significativo en el tipo de microorganismo encapsulado (Cuadro 4). Es decir, cada microorganismo dependiendo de su genotipo presenta diferente tipo de resistencia a las condiciones de estrés generadas durante el encapsulamiento.

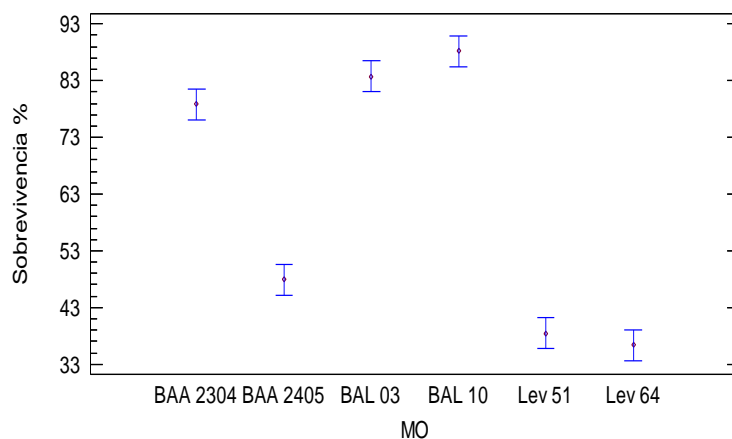
**Cuadro 4. Análisis de Varianza de la viabilidad celular durante 30 días en almacenamiento.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Almacenamiento	8.41687	1	8.41687	5.09	0.0737
B: Microorganismo	5703.25	5	1140.65	689.65	<b>0.0000</b>
RESIDUOS	8.26977	5	1.65395		
TOTAL (CORREGIDO)	5719.94	11			

Empleando una prueba de Tuckey con un nivel de confianza del 95% se muestra la diferencia estadística significativa entre los microorganismos evaluados (Figura 1). Se observa que las Bacterias ácido lácticas fueron las más resistentes de todos los microorganismos sin presentar diferencia estadística entre ellas en la viabilidad celular durante el almacenamiento. Estas bacterias fueron identificadas molecularmente como *Lactobacillus pentosus* (BAL 03) y como *Lactobacillus*

*succicola* (Bal 10). Según González, (2013) dichas bacterias presentan potencial probiótico demostrando que son capaces de sobrevivir en condiciones severas de pH, temperatura, etc. En cuanto a las levaduras evaluadas ambas se identificaron como *Saccharomyces cerevisiae* y no presentan diferencia estadística significativa entre la sobrevivencia que tuvieron en almacenamiento. Estas levaduras fueron las que presentaron más muerte celular durante la evaluación disminuyendo hasta 5 ciclos logarítmicos en los primeros 30 días.

Las cepas de las bacterias ácido acéticas evaluadas aún no han sido caracterizadas molecularmente, sin embargo es evidente que presentan un metabolismo celular diferente ya que la BAA-2304 alcanzó una sobrevivencia celular hasta del 79% mientras que la BAA 2405 únicamente sobrevivió en un 48% después de 30 días de almacenamiento.



**Figura 1. Efecto del tipo de microorganismo en la viabilidad celular durante 30 días de almacenamiento.**

La actividad bioquímica de las bacterias se ve afectada por el estrés, pero es un estado transitorio. Cuando el microorganismo se estabiliza y se elimina la causa de estrés, los procesos moleculares son recuperados en su totalidad. Sin embargo, el estrés producido por el procedimiento de congelación debe ser mitigado en el momento del procedimiento de descongelación para que facilite el intercambio molecular iónico y se restituya la actividad bioquímica de la membrana rápidamente (Sánchez, 2005).

Así mismo, se ha planteado como las bacterias están capacitadas con una maquinaria biomolecular que incluye proteínas anticongelantes (Acker, 2003) y se ha establecido que los microorganismos en congelación conservan una alta actividad metabólica para soportar cambios metabólicos y activar mecanismos de reparación, relacionados con el mantenimiento de la integridad celular y de esta forma con la capacidad de ser cultivable (Mukamolova, 2003).

En las bacterias ácido lácticas (BAL) el daño por frío no está muy definido, pero se sabe que afecta la estructura celular y las reacciones enzimáticas. Al inicio del enfriamiento se inducen las síntesis de enzimas específicas que detienen el crecimiento celular, y una vez que se adapta a la célula al nuevo entorno; se detiene la síntesis de esas proteínas y comienza un crecimiento lento (Sandoval, 2004).

La exposición al frío provoca los siguientes efectos en las bacterias BAL:

- Disminución de la fluidez de membrana.
- Estabilización de estructuras secundarias de ADN y ARN.
- Plegamiento lento o reducido de proteínas.
- Adaptación de los ribosomas a trabajar a baja temperatura.
- Alteración del metabolismo.

En el caso de la congelación la respuesta celular es más pasiva, y la actividad metabólica prácticamente se detiene. Estos cambios, que en organismos muy desarrollados puede significar un daño irreparable para su supervivencia, constituye para los microorganismos bacterianos un reto y muchos de ellos logran una adaptación que se traduce en fabricación de enzimas resistentes al frío, sistemas de transporte adaptados a bajas temperaturas e incluso una transformación en la membrana aumentando la proporción de fosfolípidos de membrana, específicamente en la cantidad de ácidos grasos insaturados o poliinsaturados lo que le permite mantener el estado semifluido de la membrana y evitar la congelación (Bouachanh, 2004).

## 7.2 Viabilidad Celular a los 60 días de almacenamiento a 4° C y -18° C

La viabilidad celular de los microorganismos encapsulados y almacenados tanto a temperatura de refrigeración como de congelamiento continuo disminuyendo respecto al tiempo de almacenamiento. En el cuadro 5 se observa que las bacterias ácido lácticas siguen presentando la resistencia celular más alta durante el almacenamiento, manteniendo hasta un 50% de su viabilidad celular. Las levaduras y las bacterias ácido acéticas disminuyeron su concentración celular hasta 2 ciclos log.

**Cuadro 5. Viabilidad celular durante 60 días en almacenamiento a 4° C y -18° C**

MICROORGANISMO	T2 (60 días)					
	REFRIGERACIÓN (4° C)			CONGELAMIENTO (-18° C)		
	UFC/mL	Log 10	Viabilidad (%)	UFC/mL	Log 10	Viabilidad (%)
LEV 51	1.67E+02	2.22	27.51	9.67E+02	2.99	36.97
LEV 64	1.67E+02	2.22	27.70	3.67E+02	2.56	31.96
BAL 03	9.50E+03	3.98	50.99	1.83E+04	4.26	54.63
BAL 10	6.00E+03	3.78	39.21	1.13E+04	4.05	42.06
BAA 2304	2.67E+02	2.43	36.52	4.33E+02	2.64	39.69
BAA 2405	3.67E+02	2.56	36.82	8.00E+02	2.90	41.69

Mansouripouret *et al.* (2013) mencionan que la viabilidad celular de probióticos durante la exposición a tratamientos térmicos depende de cada cepa, debido a que existen especies que son mucho más resistentes a ese tipo de estrés. Además, el empleo de alginato de sodio al 4% como agente encapsulante contribuye al mejoramiento de la viabilidad celular durante el almacenamiento.

El contenido de humedad, la actividad de agua y la temperatura de transición vítrea influyen directamente en la estabilidad celular durante el almacenamiento. Los dos primeros son consecuencia directa de la eficiencia del proceso de secado y de la calidad del empaque.



Teixeira (1995) reportó que el polvo obtenida durante el secado por aspersión con valores de actividad de agua entre 0.11 y 0.23 previene la muerte celular durante el almacenamiento de *L. delbruekki*.

De acuerdo a un ANOVA multifactorial con un nivel de significancia del 95% de la supervivencia celular a los 60 días de almacenamiento se obtuvo que tanto la temperatura de almacenamiento como el tipo de microorganismo encapsulado tuvieron efecto estadístico significativo (Cuadro 6).

**Cuadro 6. ANOVA multifactorial de la viabilidad celular a los 60 días en almacenamiento.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Microorganismo	647.662	5	129.532	43.52	0.0004
B:Almacenamiento	66.5052	1	66.5052	22.34	0.0052
RESIDUOS	14.8833	5	2.97667		
TOTAL (CORREGIDO)	729.05	11			

Realizando una prueba de Tuckey con un nivel de confianza del 95% se encontró que los microorganismos encapsulados sobreviven más tiempo en condiciones de congelamiento (-18° C) que a temperaturas de refrigeración.

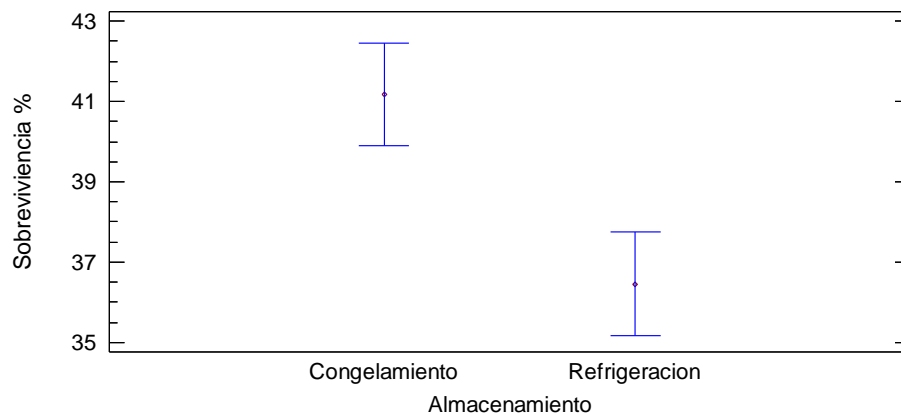
El efecto de las temperaturas bajas consiste en el retardo de las reacciones químicas, que inhiben el crecimiento de los microorganismos o las enzimas presentes en los alimentos. Existe proporcionalidad entre la disminución de temperatura, la disminución de los microorganismos y su multiplicación.

La refrigeración y la congelación se sirven del descenso de la temperatura para prolongar el periodo de conservación de microorganismos. La diferencia esencial entre ambos métodos de conservación, dejando a un lado las distintas temperaturas, radica en la formación de cristales de hielo en el medio donde se encuentran inmersos los microorganismos y en el interior del mismo. Por tanto, este método asocia dos variables importantes: la disminución de la temperatura, que conlleva un impedimento de la actividad microbiana, una paralización de las reacciones celulares y una drástica disminución de la velocidad de las reacciones

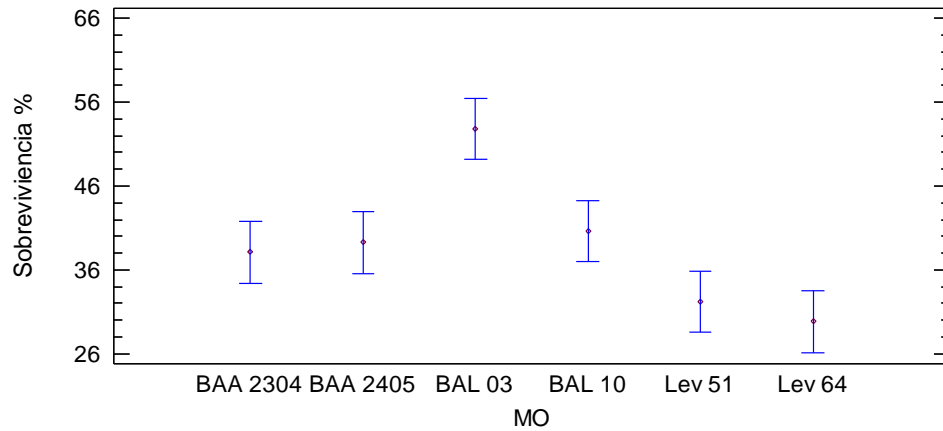
químicas; y el cambio de agua a hielo, que hace fijar la estructura del tejido y aislar el uso del agua, al encontrarse esta en forma de hielo (Sánchez, 2005).

Durante la refrigeración, los microorganismos tienen un metabolismo lento; por el contrario, en la congelación, se paraliza toda actividad metabólica. La mayor tasa de destrucción bacteriana se observa inmediatamente tras la congelación, después se reduce notablemente y llega a estabilizarse durante largos periodos de tiempo. Por eso, aunque el número de sobrevivientes disminuya, la congelación es un método efectivo para mantener la viabilidad de las bacterias.

Cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de las bacterias. Para conseguir una mínima destrucción de las bacterias se deshidraten parcialmente impidiéndose la nucleación intracelular, pero no lo suficiente como para que se reduzca su viabilidad (Ordoñez *et al.*, 1998).



**Figura 2. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad celular después de 60 días en almacenamiento.**



**Figura 3. Efecto del tipo de microorganismo en la viabilidad celular durante el almacenamiento.**

En cuanto al efecto de los microorganismos evaluado con la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ ) se observó que si hay diferencia estadística significativa entre ellos. La BAL 03 fue el microorganismo que mantuvo la viabilidad más alta en almacenamiento, tanto en congelación como en refrigeración. Entre los demás microorganismos no se observó diferencia estadística significativa, manteniendo una viabilidad celular en un rango entre 30 y 40%.

## **8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Cada microorganismo dependiendo de su genotipo desarrolla diferentes tipos de resistencia a las condiciones de estrés generadas durante el encapsulamiento y su almacenamiento.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) fueron las que tuvieron el porcentaje más alto de supervivencia durante el almacenamiento conservando hasta un 54% de viabilidad después de 8 semanas de almacenamiento a temperatura de congelación.

Es necesario evaluar el empleo de otro tipo de agentes encapsulantes que permitan prolongar la viabilidad de los microorganismos en almacenamiento.

## **9. COMPETENCIAS DESARROLLADAS O APLICADAS.**

Utiliza los conceptos de almacenamiento en refrigeración y congelación y comprende cómo afectan a la viabilidad microbiana.

Trabajo en equipo.

Comprende la utilización de software Statgraphics para el análisis de resultados.

Interpreta los resultados del análisis estadístico.

Compara y discute los resultados de forma adecuada.

Redacta de forma clara los resultados.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Acker, J. (2003). Protective effect of intracellular ice during freezing. *Criobiology*, 197-202.

Adhikari, K. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science.*, 68(1), 275-280.

Arnauld, J. (1992). Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continues fermentation with entrapped growing *Lactobacillus casei*. *J Food Sci.*, 419-427.

Bouachanh, T. (2004). Resin straw as an alternative system to securely store frozen microorganisms. *Journal of Microbiological Methods.*, 181-186.

Champagne, C. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology.*, 18(2), 184-190.

Chandramouli, V. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J Microbiol Methods*, 56(1), 27-35.

Chavarri, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology.*, 142(1-2), 185-189.

de Vos, P. (2010). encapsulation for preservation of fuctionality and targeted delivery of bioictive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.

Dewettinck, K. (1999). Agglomeration tendency during top-spray fluidized bed coating with galatin and starch hydrolysate. *Food Sci Technol.*, 32(2), 102-106.

FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.* Canada.

Favaro, C. (2002). Microencapsulation of *L.acidophilus* (Lac-05) and *B. lactis* (Bd-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J Microencapsulation.*, 19(4), 485-494.

Gill, H. (2001). Enhancenment of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactus* HN109. *American Journal of clinical Nutrition*, 74(6), 833-839.

- Gonzalez, E. (2013). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de una bebida fermentada autóctona de Chiapas. INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ, 36-58.
- Iyer, C. (2005). Realase studies of *Lactobacillus casei* strain Shirota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in ex vivo porcine gastrointestinal contents. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), 493-497.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of bacteria: technology and potential. *Current Issues Intestinal Microbiol.*, 3(2), 39-48.
- Krasaekoopt, W. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.
- Lee, K. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl Environm*, 66(2), 869-873.
- Martín, J. (2009). Técnicas de microencapsulación para probióticos. *Ars Pharm*, 50(1), 43-50.
- Mortazavian, A. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian J Biotechnol.*, 5(1), 1-18.
- Mukamolova, G. (2003). Adoption of the transiently non-culturable state a bacterial survival strategy. *Advances in applied Microbiology*, 65-109.
- Nag, A. (2011). Development of microencapsulation technique for probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 431 using a proteinpolysaccharide complex. *Thesis for the grade of Masters in Food Technology.*, 10-25.
- Pedroza, R. (2002). Alimentos microencapsulas: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para las larvas de especies acuícolas. *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición acuícola.*, 1-20.
- Perez, L. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. 47(1), 14-25.
- Picot, A. (2002). Effect of dynamic loop mixer operating conditions on O/W emulsion used for cell encapsulation. *Le Lait.*, 173-182.
- Rokka, S. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology.*, 321(1), 1-12.

Sánchez, L. (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *NOVA Publicaciones Científicas*, 3(4), 28.

Sandoval, A. (2004). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *Ingeniería y Competitividad.*, 5(2), 73-83.

Sheu, t. (1993). Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *J Food Sci.*, 58(3), 557-561.

Steenson, L. (1987). Calcium alginate immobilized cultures of lactic Streptococci are protected from attack by lytic bacteriophage. *J Dairy Sci.*, 1121-1127.

Teixeira, P. (1995). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray drying. *Journal of Dairy Science*, 1025-1031.

Truelstrup, L. (2002). Survival of free and calcium-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in simulated gastro-intestinal conditions. *Food Microbiol*, 35-45.

Wang, Y.C.; Yu, R.C.; Chou, C.C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydratation and storage. *International Journal of Food Microbiology*. 93, 209-217.