

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus reuteri* CO-ENCAPSULADO

Krysthel Rodríguez Pérez

Tecnológico Nacional de México/ I. T.
Superior de Juan Rodríguez Clara, Mpio.
Juan Rodríguez Clara
<https://orcid.org/0000-0001-7043-7468>

Ernestina Paz Gamboa

Tecnológico Nacional de México/ I. T.
Tuxtepe
Tuxtepec, Oax
<https://orcid.org/0000-0002-8225-6020>

Dalis Sofia Sosa Gutierrez

<https://orcid.org/0000-0002-9185-1745>

Edgar Sánchez Ortega

<https://orcid.org/0000-0001-6932-2364>

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



Resumen: Los probióticos aportan beneficios a la salud en un nivel de viabilidad no menor a 10^6 - 10^7 UFC mL⁻¹, siendo importante su incorporación a nuevos productos alimenticios; sin embargo, existe pérdida de viabilidad en condiciones de procesado y almacenamiento. Actualmente la encapsulación múltiple (utilización de biopolímeros e ingredientes funcionales) es la tendencia para mejorar la viabilidad de dichas bacterias. El objetivo de este trabajo fue evaluar la termoresistencia de *Lactobacillus reuteri* co-encapsulado. La concentración inicial de *L. reuteri* fue de 10 Log UFC/mL. A partir del concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola (CFDBC) se obtuvo el extracto (ECFDBC) mediante filtración. Los encapsulados se obtuvieron mediante extrusión manual (aguja 21Gx32mm), las formulaciones consistieron en 2% de alginato de sodio (AlgNa), 0.015% goma xantana (GX), 2% del ECFDBC y dos tipos de quitosano: bajo y medio peso molecular (QBPM y QMPM) a 0.2 y 0.4% y un control. Se determinó la tolerancia a la temperatura (70,80 y 90 °C), caracterizando el peso unitario, tamaño y resistencia a la compresión (Texturómetro TA XT2) de las cápsulas y a un control. Los resultados se analizaron mediante comparación de medias agrupadas mediante ANDEVA, utilizando MINITAB® Versión 17 y tratados por un modelo matemático empleando un diseño factorial 2^k, utilizando MATLAB. Los resultados para la prueba de tolerancia a la temperatura mostraron que la formulación de AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4 % fue la más adecuada para la encapsulación de *L. reuteri*. Asimismo, presentó una mejor estabilidad en peso, tamaño y fuerza de compresión por efecto de las condiciones de temperatura. En conclusión, la utilización de un multi-compuesto biopolimérico con ECFDBC y QBPM mostró ser más estable y eficaz en la protección del *L. reuteri* a altas temperatura.

Palabras clave: Probiótico, Fibra dietaria, polímeros orgánicos.

INTRODUCCIÓN

El mercado de los alimentos funcionales se está expandiendo y evolucionando como una estrategia potencial en la prevención de enfermedades crónicas, ya que se supone que tiene efectos beneficiosos fisiológicos al poseer bioactivos específicos agregados por sus beneficios para la salud, conteniendo una cantidad mayor de nutrientes promocionando comodidad a los consumidores (Fuentes-Berrio et al., 2015). La sensibilidad de las bacterias a temperaturas drásticas, el cambio durante el almacenamiento y el procesamiento son algunos factores que limitan la multi-aplicación de probióticos en la industria alimentaria y farmacéutica. Como tal, un mínimo consumo probiótico de 6-7 Log UFC por gramo de un producto manufacturado es requerido para que ejerza beneficios funcionales. La incorporación de estos probióticos en cápsulas de componentes poliméricos es un método emergente para reducir la muerte celular durante el procesamiento y almacenamiento, así como una oportunidad para controlar la liberación de estas células a través del tracto intestinal. Esta técnica consiste en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto bioactivo mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica. La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del costo (Montes-Ramírez, 2013). La técnica de extrusión es un proceso físico que consiste en hacer pasar la solución con los microorganismos vivos por un inyector a

presiones altas y bajo condiciones controladas, proceso denominado “prilling” (Burgain et al., 2011), por lo que, se considera el proceso más simple de encapsulación, y de mejores resultados, pues genera partículas esféricas y muy estables. Entre todos los materiales de encapsulación, el más ampliamente utilizado es el alginato, que es un heteropolisacárido lineal de ácidos D-manurónico y L-gulurónico, y se extrae de varias especies de algas. Las propiedades funcionales del alginato como material de apoyo son fuertemente asociadas con la composición y la secuencia de sus monómeros. Sin embargo, el gel es susceptible a la desintegración en presencia de un exceso de iones monovalentes, Ca^{2+} , agentes quelatizantes y fuertes ambientes químicos. Algunas tecnologías de encapsulación han considerado el uso de diversos agentes de preservación que adicionados a la mezcla del material pared, tienen efectos de protección frente a los agentes activos encapsulados, durante la aplicación de la tecnología, el almacenamiento y algunos de ellos tras el consumo. El uso de goma xantana provoca una excelente protección de los probióticos contra ambientes ácidos y temperaturas altas, además, de que estudios han demostrado la interacción molecular que tiene con el alginato, que conduce a la formación de un complejo-matriz-estructura (Fareez et al., 2015). De igual forma, el recubrimiento de cápsulas de alginato con poli-cationes puede mejorar la estabilidad química y mecánica de perlas de alginato, en consecuencia, mejorar la eficacia de encapsulación y para esto se han obtenido muy buenos resultados utilizando como revestimiento otro polímero como el quitosano ya que, no se disuelve en presencia de quelantes de Ca^{2+} o agentes antigelificantes y, por lo tanto, mejora la estabilidad del gel. Algunas tecnologías de encapsulación han considerado el uso de diversos agentes de preservación que adicionados a la mezcla del

material pared, tienen efectos de protección frente a los agentes activos encapsulados, durante la aplicación de la tecnología, el almacenamiento y algunos de ellos tras el consumo. Los prebióticos considerados como un ingrediente alimentario no digerible, son fundamentalmente de naturaleza polimérica y oligosacáridos que, al no ser digeridos por las enzimas humanas, benefician de manera selectiva el crecimiento y actividad de los microorganismos benéficos del intestino. Su adición puede favorecer la viabilidad y acción de estos microorganismos benéficos en el tracto gastrointestinal. Debido al efecto que causa una mezcla de polímeros como un buen potencial protector como materiales de encapsulación, pueden proporcionar una mejor protección de los probióticos en los alimentos y, finalmente, en el tracto intestinal.

METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizó como cepa *Lactobacillus reuteri* NRRL 14171(10 Log UFC/mL), la cual fue proporcionada por la UNIDA (Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos) del Instituto Tecnológico de Veracruz. El **alginato de sodio**, **goma xantana** y **quitosano** fueron adquiridos de Sigma Aldrich para la elaboración de los encapsulados, así como, fosfato de sodio mono y dibásico de J.T. Baker para la preparación del buffer utilizado para la liberación del microorganismo del encapsulado. El **concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola** se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Pantaleón-Velazco et al., (2014), y de este se obtuvo subsecuentemente mediante la técnica de Amorós-López, (2013) modificada, un extracto el cual fue utilizado en la formulación del encapsulado, que para fines de este trabajo se expresa como ECFDBC. Los encapsulados se obtuvieron mediante extrusión manual por método de

gelificación iónica, utilizando como matriz polimérica alginato de sodio, goma xantana y como recubrimiento quitosano (Sigma Aldrich®) de bajo y medio peso molecular (0.2 y 0.4% de concentración) y un control. Para la liberación del microorganismo, se tomaron 1 g de cápsulas y se adicionaron en 99 mL de solución buffer de fosfato de sodio a 0.1 M con un pH de 7. La suspensión se homogenizó 10 min en un homogenizador a 420 rpm seguido de 30 minutos de reposo. Se inocularon en agar MRS por la técnica de vertido en placa. Las muestras fueron incubadas por 48 horas a 37 °C. La termorresistencia se determinó utilizando la metodología de Victoria-León, 2006. Se colocaron 1 mL de la cepa libre y 1 g de cápsulas en tubos con tapa verticalmente posicionados en baños de agua a diferentes temperaturas (70, 80 y 90°C), y se mantuvieron para cada temperatura durante 10 y 15 min, respectivamente. Después del tratamiento térmico, las cápsulas fueron liberadas y 1 mL de caldo de cada tubo calentado a las diferentes temperaturas y tiempos fue sembrado en cajas Petri con agar con medio MRS e incubado mediante anaerobiosis a 37°C durante 48 horas. Se reporta el número de colonias sobrevivientes. En la caracterización de los encapsulados se les determinó el tamaño utilizando un Vernier (General UltraTECH) No. 147 con una precisión de ±0.02mm. Para el peso unitario, se formaron grupos diferentes de 50 cápsulas en una balanza analítica, el valor resultante de cada grupo se dividió por 50 para obtener el peso promedio de cada cápsula, y posteriormente se tomaron los pesos y se promedió finalmente. En un analizador de textura modelo TA-XTplus (Texture Technologies Corporation Stable Microsystems) se midió la resistencia del gel de las cápsulas. En una sonda cilíndrica de aluminio 35 mm de diámetro, a una velocidad de 1 mms⁻¹ en un modo de compresión, utilizando una distancia de ruptura de 1,0

mm, diez cápsulas fueron probadas para cada tratamiento. La fuerza pico se midió en gramos (Krasakoopt y Watcharapoka, 2014). Se hicieron tres repeticiones para cada análisis. Se realizó una comparación de medias agrupadas mediante ANDEVA, utilizando MINITAB® Versión 17 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA, 2015) y tratados por un modelo matemático empleando un diseño factorial 2^k, utilizando MATLAB 7.8.0 2009, expresado: $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + Y_1 Z_1 + Y_2 Z_2$, donde \hat{y} = **variable de respuesta**; X1= variable cuantitativa para la concentración de quitosano; X2= variable cuantitativa para el tiempo de almacenamiento; Z1= variable cualitativa para el ECFDBC; Z2= variable cualitativa para el tipo de quitosano.

RESULTADOS

Existió diferencias significativas (P<0.05) entre las formulaciones, sólo la formulación AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4% presentó mejor estabilidad a 80 °C (**Tabla 2**) durante 15 días de almacenamiento (7.79 Log UFC/mL), con reducción de un ciclo logarítmico a los 30 días (6.45 log UFC/mL), asimismo, presentó 7.4 Log UFC/mL a 90 °C hasta los 30 días (**Tabla 3**), encontrándose en el rango para ser considerado como probiótico. El resto de las formulaciones presentaron una cuenta viable probiótica durante 15 días de almacenamiento a 70 °C por 10 y 15 min de exposición (**Tabla 1**). Cabe mencionar que *L. reuteri* sin encapsular no presentó resistencia al tratamiento térmico, viéndose favorecida la viabilidad al ser encapsulado. Los resultados mostrados podrían ser atribuidos al posible efecto protector generado por la mezcla de AlgNa-GX ya que, estudios anteriores han demostrado que puede ser una excelente protección contra ambientes ácidos y temperaturas altas (Fareez et al., (2015) que, sumado al uso del quitosano como

Cápsulas	70 °C por 10 min (Log UFC/mL)			70 °C por 15 min (Log UFC/mL)		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	7.59±0.07 ^a	7.50±0.14 ^c	7.53±0.15 ^{bc}	7.96±0.03 ^{ab}	7.12±0.25 ^c	0.00±0.00 ^c
AlgNa -GX-QMPM 0.2	7.81±0.03 ^a	7.72±0.12 ^b	7.78±0.81 ^{ab}	7.92±0.03 ^b	7.23±0.28 ^{bc}	0.00±0.00 ^c
AlgNa -GX-QBPM 0.4	7.86±0.04 ^a	7.50±0.19 ^c	6.86±0.45 ^{cd}	8.01±0.01 ^a	7.33±0.57 ^{bc}	6.55±0.82 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	7.86±0.04 ^a	7.44±0.16 ^c	6.45±0.33 ^d	7.99±0.01 ^a	7.38±0.19 ^{bc}	0.00±0.00 ^c
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	7.58±0.05 ^b	7.71±0.04 ^b	7.65±0.25 ^{ab}	8.00±0.01 ^a	7.85±0.15 ^a	6.94±0.07 ^{ab}
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	7.53±0.07 ^b	8.26±0.16 ^a	7.88±0.73 ^{ab}	7.97±0.02 ^{ab}	7.44±0.13 ^{bc}	0.00±0.00 ^c
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	7.57±0.11^b	8.29±0.03^a	8.30±0.48^a	7.99±0.06^a	7.93±0.03^a	7.21±0.28^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	7.81±0.04 ^a	8.11±0.05 ^a	7.98±0.64 ^{ab}	7.80±0.06 ^c	7.57±0.14 ^{ab}	6.80±0.57 ^{ab}
<i>L. reuteri</i>	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 1. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 70 °C por 10 y 15 min.

Cápsulas	80 °C por 10 min (Log UFC/mL)			80 °C por 15 min (Log UFC/mL)		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	7.69±0.00 ^b	7.25±0.07 ^b	6.98±0.65 ^a	0.00±0.00 ^d	7.38±0.20 ^{bc}	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.2	7.68±0.06 ^b	6.75±0.50 ^c	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM 0.4	7.43±0.06 ^d	7.16±0.53 ^{bc}	0.00±0.00 ^b	7.75±0.06 ^a	7.37±0.28 ^{bc}	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	7.57±0.07 ^c	7.49±0.12 ^b	0.00±0.00 ^b	7.62±0.16 ^b	7.06±0.19 ^c	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	0.00±0.00 ^e	7.47±0.06 ^b	7.76±1.01 ^a	7.61±0.06 ^b	7.67±0.31 ^{ab}	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	7.41±0.08 ^d	7.34±0.22 ^b	7.66±1.09 ^a	0.00±0.00 ^d	7.27±0.54 ^c	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	7.83±0.06^a	7.99±0.19^a	7.61±0.71^a	7.53±0.07^{bc}	7.79±0.11^a	6.45±0.52^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	7.46±0.05 ^d	7.37±0.11 ^b	0.00±0.00 ^b	7.49±0.03 ^c	7.41±0.16 ^{abc}	0.00±0.00 ^b
<i>L. reuteri</i>	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 2. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 80 °C por 10 y 15 min.

Cápsulas	90 °C por 10 min (Log UFC/mL)			90 °C por 15 min (Log UFC/mL)		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	7.21±0.10 ^{bc}	6.46±0.18 ^c	0.00±0.00 ^b	7.47±0.00 ^a	6.38±0.08 ^d	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.2	7.63±0.26 ^a	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	7.28±0.18 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM 0.4	7.50±0.04 ^{ab}	7.60±0.22 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	7.56±0.10 ^{ab}	6.71±0.08 ^c	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	7.80±0.06 ^a	7.66±0.28 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	7.60±0.06 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	7.09±0.43 ^c	7.65±0.16 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	7.52±0.06 ^{ab}	7.36±0.09 ^a	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	7.76±0.03 ^a	7.48±0.14 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	6.95±0.20 ^b	0.00±0.00 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	7.13±0.27^c	7.75±0.07^a	7.20±0.87^a	7.34±0.08^a	7.40±0.15^a	7.42±1.03^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	7.74±0.06 ^a	7.43±0.08 ^b	0.00±0.00 ^b	7.55±0.06 ^a	7.30±0.09 ^a	0.00±0.00 ^b
<i>L. reuteri</i>	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^b

*AlgNa: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola.

Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Letras diferentes comparadas por columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 3. Evaluación de la viabilidad de los encapsulados por efecto del tratamiento térmico a 90 °C por 10 y 15 min.

recubrimiento, mejora la estabilidad química y mecánica de las cápsulas (Krasaekoopt et al., 2004). Posiblemente lo que ocurre, es que, al someter a temperaturas altas, la bacteria puede tener una adaptabilidad a estas temperaturas sin ser su óptima para crecer, ya que, las bacterias pueden desarrollar mecanismos de adaptación para enfrentar un entorno desfavorable y sobrevivir bajo estas condiciones conocidas como factores de estrés. Esta respuesta se ha estudiado

intensamente y se ha reportado que durante el estrés se producen y liberan metabolitos al medio circundante capaces de brindar protección contra condiciones letales.

Los resultados de la caracterización física indicaron que independientemente del tipo y concentración de quitosano, así como de la adición del ECFDBC, no existe un efecto significativo en peso unitario (Tabla 4) y tamaño (Tabla 5) de las cápsulas en función del tiempo de almacenamiento. Se encontraron

Cápsulas	Peso unitario (g)		
	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	0.251±0.01 ^a	0.284±0.01 ^b	0.253±0.01 ^a
AlgNa -GX-QMPM 0.2	0.222±0.01 ^a	0.235±0.01 ^a	0.231±0.00 ^a
AlgNa -GX-QBPM 0.4	0.267±0.09 ^a	0.232±0.02 ^a	0.238±0.00 ^a
AlgNa -GX-QMPM 0.4	0.278±0.02 ^a	0.264±0.00 ^a	0.265±0.00 ^a
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	0.255±0.04 ^a	0.249±0.01 ^a	0.247±0.01 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	0.273±0.00 ^a	0.289±0.04 ^a	0.261±0.00 ^a
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	0.230±0.01 ^a	0.248±0.04 ^a	0.245±0.00 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	0.258±0.01 ^a	0.299±0.04 ^a	0.265±0.01 ^a

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa p<0.05

Tabla 4. Determinación del Peso unitario de encapsulados de *L. reuteri* durante los días de almacenamiento a 4 °C.

Cápsulas	Tamaño (mm)		
	0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-QBPM 0.2	1.56±0.05 ^a	1.54± 0.05 ^a	1.52± 0.05 ^a
AlgNa -GX-QMPM 0.2	1.56±0.05 ^a	1.53± 0.00 ^a	1.53± 0.11 ^a
AlgNa -GX-QBPM 0.4	1.57±0.01 ^a	1.54± 0.01 ^b	1.54± 0.01 ^b
AlgNa -GX-QMPM 0.4	1.61±0.06 ^a	1.53± 0.04 ^{ab}	1.50± 0.03 ^b
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.2	1.51±0.04 ^a	1.51± 0.04 ^a	1.51± 0.04 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.2	1.65±0.04 ^a	1.53± 0.10 ^a	1.53± 0.08 ^a
AlgNa -GX-QBPM-ECFDBC 0.4	1.55±0.04 ^a	1.55± 0.10 ^a	1.55± 0.10 ^a
AlgNa -GX-QMPM-ECFDBC 0.4	1.58±0.06 ^a	1.58±0.03 ^a	1.58± 0.03 ^a

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa p<0.05.

Tabla 5. Determinación del Tamaño de encapsulados de *L. reuteri* durante los días de almacenamiento a 4 °C.

valores en peso que oscilan en 0.22-0.26 g para el control, y 0.24-0.27 g con ECFDBC, y para el tamaño en un intervalo de 1.54-1.55 mm para el control, y 1.55 a 1.58 mm para cápsulas con ECFDBC. Esta estabilidad en peso pudiera atribuirse al entrecruzamiento entre el uso del alginato en combinación con la goma xantana y quitosano, ya que aumenta considerablemente, y se producen cápsulas más densas, lo que favorece en una menor velocidad de liberación de la bacteria (Expósito-Harris, 2010). Además, el tener partículas de tamaño controlado compuestas de un multi-compuesto biopolimérico, otorga protección a *L. reuteri* encapsulado, aumentando su biodisponibilidad y facilitando su incorporación, lo cual se puede visualizar al mejorar la eficiencia de encapsulación, pues proporciona una liberación sostenida y controlada a lo largo del tiempo (Neira-Carrillo et al., 2013). Muthukumarasamy et al., (2006), encontraron que cápsulas de alginato con un diámetro entre 2 a 4 mm hechas por la técnica de extrusión son capaces de proteger mejor a *L. reuteri* que cápsulas más pequeñas elaboradas por el método de emulsión. Asimismo, Lee & Heo, (2000), encontraron que *Bifidobacterium logum* después de ser sometido a condiciones gastrointestinales simuladas tiene una viabilidad directamente proporcional al tamaño de la cápsula en intervalos de diámetro entre 1 a 2.6 mm; Reyes-Ocampo, (2010), obtuvo cápsulas en un diámetro de 1.37 mm, mencionando que cápsulas pequeñas limitan a tener baja viabilidad, y cuando se producen cápsulas grandes, las propiedades texturales sensoriales de productos alimenticios a los que son añadidos pudiera afectar negativamente. Cabe mencionar que en este estudio el tamaño obtenido podría representar una ventaja para la protección de la bacteria probiótica a las condiciones de pH y temperatura.

La fuerza de compresión de las cápsulas es una propiedad física importante pues esta puede influir en la estabilidad de las cápsulas por un periodo corto o largo de almacenamiento (Nualkaekul et al., 2014). De acuerdo con el modelo matemático de las variables cualitativas, Z_1 que representa el ECFDBC, X_1 la concentración de quitosano y X_2 el tiempo de almacenamiento, resultaron ser significativos respecto a la fuerza de compresión. A continuación, se muestra la ecuación de regresión obtenida:

$$\hat{y} = 81.24 - 20.09z_1 - 1.58z_2 - 6.88x_1 - 10.18z_1x_1 - 1.42z_2x_1 + 4.82x_2 - 0.85z_1x_2 + 0.40z_2x_2 + 0.36x_1x_2 - 1.36z_1x_1x_2 + 0.98z_2x_1x_2 - 4.59x_2^2 + 0.79z_1x_2^2 + 3.55z_2x_2^2$$

Lo anterior representa que, la adición del ECFDBC y el aumento de la concentración de quitosano tienen un efecto en la fuerza de compresión, pues de acuerdo con el modelo, tienden a disminuir la respuesta. Asimismo, la fuerza de compresión se ve afectada por el tiempo de almacenamiento pues al aumentar este, la resistencia a la compresión tiende a aumentar.

De acuerdo con Barco-Hernández et al., (2011), concentraciones altas de quitosano dan lugar a matrices más densas, por lo que, se esperarían valores de compresión mayores, sin embargo, en este estudio se encontró que la fuerza de compresión tiende a disminuir a una concentración de 0.4%. Esto podría atribuirse a efecto del entrecruzamiento por parte de los biopolímeros, ya que es sabido que el alginato de sodio por naturaleza es un polímero de una fuerte dureza, la cual disminuye con la adición de otros hidrocoloides (Zamora-Vega, 2011), que, aunado al aumento en la concentración de quitosano, favorece a un mayor entrecruzamiento de la matriz polimérica (Expósito-Harris, 2010). La

disminución por parte del ECFDBC pudiera afectar las fuerzas de cohesión que mantiene el entrecruzamiento, provocando un ablandamiento de la cápsula, disminuyendo su resistencia, además, que por el contenido de fibra dietaria soluble, se esperaría un contenido considerable de gomas y mucílagos que propiamente podrían conferirle un ablandamiento a las cápsulas. Este comportamiento puede ser visualizado en gráficas de contorno (Figura 1). En el inciso a) se observa el comportamiento en la fuerza de compresión para encapsulados sin ECFDBC y QBPM 0.2 y 0.4% evaluado a los 0, 15 y 30 días de almacenamiento. Para el inciso b) se aprecian los valores dados por encapsulados con ECFDBC y QBPM en sus dos concentraciones, en los incisos c) y d) se representan los encapsulados sin y con ECFDBC utilizando QMPM a 0.2 y 0.4%. Se observa de acuerdo con la región experimental, que para las formulaciones sin ECFDBC con una concentración de 0.4%, la fuerza de compresión disminuye, viéndose todavía más reducida entre un 52.4 y 58.6% al interactuar con el ECFDBC. Mientras que por periodo de almacenamiento la fuerza de compresión tiende a aumentar.

Por otra parte, de la caracterización, se determinó el peso unitario, tamaño y fuerza de compresión en relación con la formulación de encapsulados que obtuvo los mejores resultados con base al análisis de viabilidad bajo diferentes condiciones de temperatura, por lo que, la formulación con AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4 fue la seleccionada para su caracterización. De acuerdo con el peso (Tabla 6) y tamaño (Tabla 7) de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas, no se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo de almacenamiento, existiendo un aumento proporcional en peso y tamaño en relación con la temperatura de 90 °C por 15 min. Asimismo, se observa que

la fuerza de compresión (Tabla 8) disminuye en función del tiempo de almacenamiento, encontrando valores menores para una temperatura de 90 °C por 15 min, en comparación con el resto de los valores obtenidos para las demás temperaturas (70 y 80 °C). Aunque no existen reportes del comportamiento en las características de encapsulados sometidos a tratamiento térmico, esto se pudiera atribuir a un posible hinchamiento de los encapsulados por efecto de la temperatura, indicando que a mayor temperatura hay una más rápida degradación del entrecruzamiento, por la solubilidad del quitosano, desestabilizando el encapsulado, aunado a una liberación más progresiva de la bacteria, lo que concuerda con la cuenta viable observada en el análisis de viabilidad a esta temperatura. Asimismo, es sabido que con el aumento de la temperatura decrece la viscosidad (Espinoza-Espíritu, 2007), lo que disminuiría la fuerza de compresión por efecto de la reducción del entrecruzamiento.

CONCLUSIONES

La utilización del multi-compuesto biopolimérico formulado con ECFDBC permitió la termorresistencia de *L. reuteri*, logrando mantener la viabilidad en valores de 7 log UFC/mL bajo condiciones de temperatura de 90 °C/15 min durante 15 días de almacenamiento. Asimismo, el peso y tamaño de los encapsulados no tuvieron efecto significativo respecto a los días de almacenamiento, mientras que los resultados de la fuerza de compresión indicaron que a mayor tiempo de almacenamiento mayor es la fuerza ejercida, y que, con mayor concentración de quitosano, junto con la adición del extracto existe una disminución de esta. A efecto de la temperatura existe un posible hinchamiento de los encapsulados, indicando que a mayor temperatura hay una más rápida degradación del entrecruzamiento, por la solubilidad del

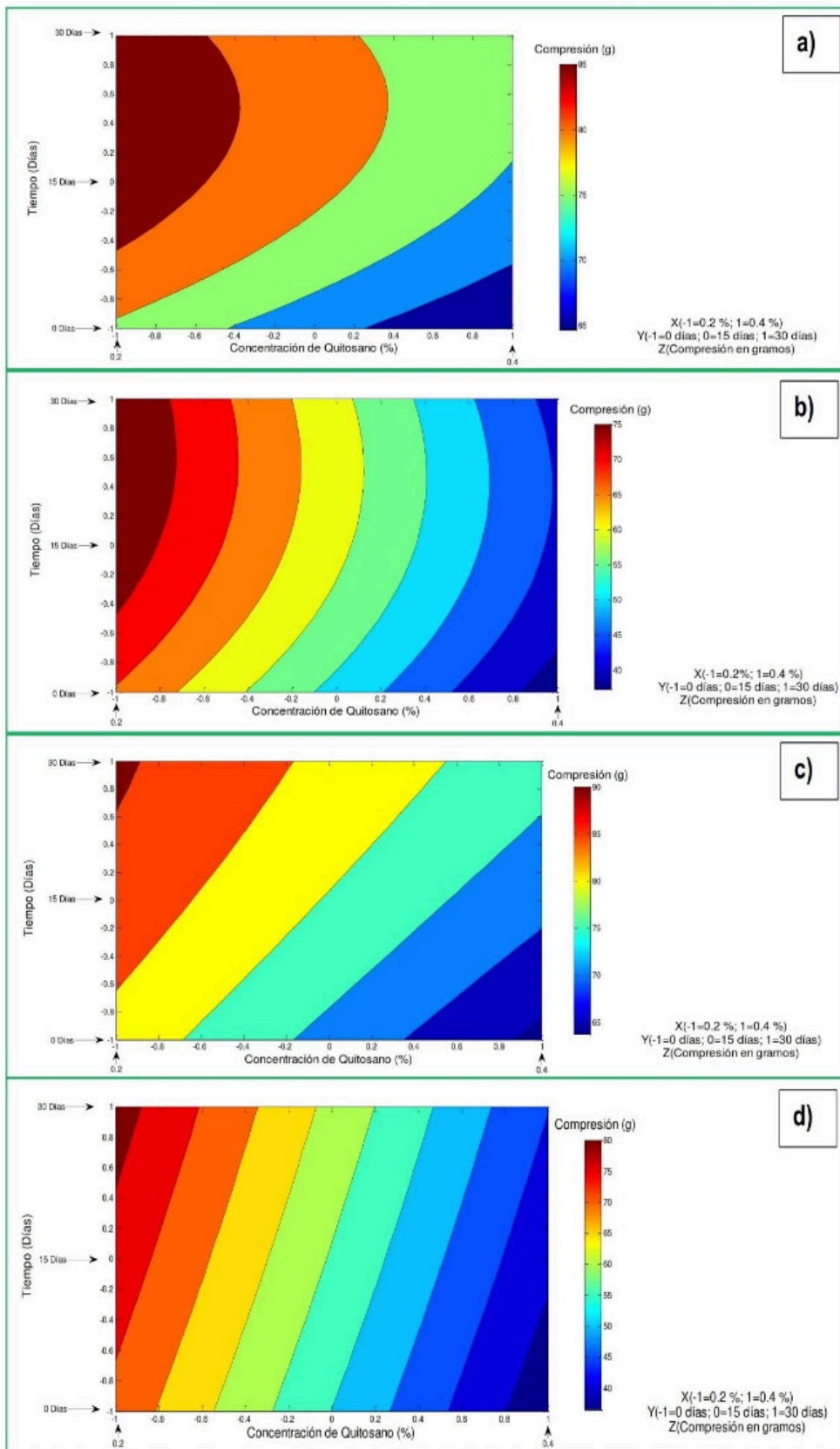


Figura 1. Gráficas de contorno de la fuerza de compresión de encapsulados de *L. reuteri* durante el almacenamiento a 4°C.

Cápsula	T°	Peso (g)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	70/10	0.64±0.01 ^a	0.64±0.00 ^a	0.63±0.01 ^a
	70/15	0.59±0.02 ^a	0.58±0.02 ^a	0.59±0.02 ^a
	80/10	0.69±0.00 ^a	0.69±0.01 ^a	0.69±0.01 ^a
	80/15	0.72±0.00 ^a	0.74±0.02 ^a	0.72±0.00 ^a
	90/10	0.72±0.01 ^a	0.72±0.02 ^a	0.73±0.00 ^a
	90/15	0.79±0.02 ^a	0.81±0.03 ^a	0.80±0.02 ^a

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 6. Peso de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas.

Cápsula	T°	Tamaño (mm)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	70/10	1.84±0.01 ^a	1.83±0.01 ^a	1.84±0.01 ^a
	70/15	1.57±0.04 ^a	1.66±0.05 ^a	1.57±0.01 ^a
	80/10	1.86±0.03 ^a	1.86±0.04 ^a	1.81±0.05 ^a
	80/15	1.63±0.05 ^a	1.63±0.04 ^a	1.65±0.03 ^a
	90/10	1.71±0.07 ^a	1.71±0.03 ^a	1.69±0.08 ^a
	90/15	2.00±0.01 ^b	2.04±0.01 ^{ab}	2.07±0.04 ^a

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 7. Tamaño de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas.

Cápsula	T°	Fuerza de Compresión (g)		
		0 días	15 días	30 días
AlgNa-GX-ECFDBC-QBPM 0.4	70/10	137.95±8.72 ^a	99.05±7.45 ^b	95.83±0.92 ^b
	70/15	142.67±10.51 ^a	132.61±8.33 ^{ab}	120.35±3.58 ^b
	80/10	122.99±12.65 ^a	99.65±1.44 ^b	94.40±3.36 ^b
	80/15	133.38±7.11 ^a	118.79±5.56 ^b	106.48±1.88 ^c
	90/10	107.65±4.36 ^a	91.89±5.64 ^b	88.03±1.47 ^b
	90/15	85.93±8.41 ^a	69.34±10.67 ^b	53.26±1.22 ^c

*Alg: alginato de sodio; GX: goma xantana; QBPM: quitosano de bajo peso molecular; QMPM: quitosano de medio peso molecular; ECFDBC: Extracto de concentrado de fibra dietaria de bagazo de carambola. Los resultados en la tabla son el promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar. Letras diferentes comparadas entre columna tienen diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla 8. Fuerza de compresión de las cápsulas sometidas a diferentes temperaturas.

quitosano, desestabilizando el encapsulado, aunado a una liberación más progresiva de la bacteria, lo que concuerda con la cuenta viable observada en el análisis de viabilidad a esta temperatura de 90°C, y por su parte, con el aumento de la temperatura decrece la viscosidad, disminuyendo la fuerza de compresión por efecto de la reducción del entrecruzamiento. Por lo que, podría ser utilizado para adicionarse en alimentos donde las condiciones de temperatura en el proceso son extremas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo y las facilidades que proporcionaron para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- Amorós-López, D. (2013). Amorós-López, D. (2013). **Efecto del almidón en la viabilidad gastrointestinal de *Lactobacillus acidophilus* en biosoportos de alginato/almidón.** Universidad de Oviedo. Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria.
- Barco- Hernández, P. L., Burbano-Delgado, A. C., Mosquera-Sánchez, S. A., Villada-Castillo, H. S., Navia-Porras, D. P. (2011). **Efecto del recubrimiento a base de almidón de yuca modificado sobre la maduración del tomate.** *Redalyc.Org. Revista Lasallista de Investigación.* 2(8): 96-103.
- Burgain J, Gaiani C., Linder M., Scher J. (2011). **Encapsulation of Probiotic living cells: From laboratory scale to industrial.** Vandoeuvre les Nancy, France: ELSEVIER, *Journal of Food Engineering*, (104). 467- 483 p.
- Espinoza-Espíritu, E.V. (2007). **Propiedades físicas y biológicas de dos tipos de esponjas de quitosano para su aplicación como biomaterial.** Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Expósito-Harris, R. (2010). **Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos.** Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas, Depto. de Bioquímica y Biología Molecular I. ISBN: 978-84-693-5983-9.
- Fareez I.M., Lim S.M., Mishra R. K., Ramasamy K. (2015). **Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12.** *Int. Journal of Biological Macromolecules* 72: 1419-1428.
- Krasaekoopt W. & Watcharapoka S. (2014). **Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt, and fruit juice.** *Food Science and Technology.* 57: 761-766.
- Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. (2004). **The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria.** *International Dairy Journal.* 14: 737-743.
- Lee, K.Y., Heo, T. R. (2000). **Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution.** *Applied environmental Microbiology.* 66:869-873.

Fuentes-Berrio, L., Acevedo-Correa, D., Gelvez- Ordoñez, V.M. (2015). **Functional foods: impact and challenges for development and welfare society Colombian**. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 13 No. 2 (140-149). DOI:10.18684/BSAA.

Montes- Ramírez L.M. (2013). **Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhammosus* ATCC 9469)**. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia. Pp. 1- 106.

Muthukumarasamy P. & Holley A.R. (2006). **Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri***. *International Journal of Food Microbiology*. 111: 164-169.

Neira-Carrillo, A., Yáñez-Muñoz, D., Aguirre-Zazzali, P., Amar-Marini, Y., Vidal-Vilches, S., Egaña-Palma, R. (2013). **Encapsulación de Biomoléculas usando polímeros naturales: “Un nuevo enfoque en la entrega de Fármacos en Medicina”**. *Avances en Ciencias veterinarias*. 2(28): 31-40.

Nuálkaekul, S., Lenton, D., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., Charalampopoulos, D. (2012). **Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice**. *Carbohydrate Polymers*. 90: 1281-1287.

Pantaleón-Velasco M.R., Ruiz-López I.I., Pérez- Silva A., Bravo-Clemente L., Mateos R., Ruiz-Espinosa H., Vivar-Vera M.A. (2014). **Antioxidant and a functional properties of a high dietary fibre powder from carambola (*Averrhoa carambola* L.) pomace**. *International Journal of Food Science & Technology*. Pp. 1-10.

Reyes-Ocampo, J.G. (2010). **Protección de *Lctobacillus rhammosus* en cápsulas de alginato de centro líquido**. *Universidad Autónoma Metropolitana. Maestría en Biotecnología*.

Victoria-León, T., Totosaus, A., Guerrero, I. & Pérez-Chabela, M. L. (2006). **Thermoresistan lactic acid bacteria effect on cooked sausages**. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(2):135-141.

Zamora-Vega, R. (2011). **Elaboración de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e inulina**. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo integral regional. Unidad Michoacán.