

**Microencapsulación de lactobacillus casei con proteínas lácteas geladas enzimáticamente y evaluación de su supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas**

Irene Arenales, Consuelo Lobato, Jaime Vernon y Gabriel Leyva

I. Arenales, C. Lobato, J. Vernon y G. Leyva  
Universidad Tecnológica de Tehuacán. Prolongación de la 1 sur No. 1101, San Pablo Tepetzingo, Tehuacán,  
Puebla. C. P. 75859.  
i\_mar8@hotmail.com

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.) .Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago,  
Guanajuato, 2013.

## Abstract

*Lactobacillus casei* cells were microencapsulated in milk protein matrices without or with chitosan (Q) or sodium alginate (A) coating by means of emulsification, enzymatic gelation, and subsequent dispersion in Q or A solutions (0.1 or 0.5% w/w). The diameter, yield, entrapment efficiency, and microstructure of the microcapsules and the survivability of entrapped *Lactobacillus casei* cells in simulated gastrointestinal conditions (CGIS) were evaluated. Spherical or semispherical microcapsules exhibiting 104.8-142.2  $\mu\text{m}$  in diameter, and 74.8-96.36% of yield were obtained. The inner structure of the microcapsules was like fresh cheese microstructure and their morphology and outer topography was affected by the nature and concentration of the polysaccharides used as coating. In all cases, probiotic cells entrapment efficiency was higher than 95%. The microcapsules coated with 0.5% w/w Q solution provided a significant better protection to *Lactobacillus casei* against CGIS.

## 19 Introducción

La nutrición actual está enfocada a la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles, en las que la dieta y el estilo de vida desempeñan roles etiológicos. El desarrollo y la producción de alimentos funcionales con actividad selectiva relacionada con una o varias funciones del organismo, en particular de aquellos considerados como probióticos, han mostrado incrementos considerables (Heidebach *et al.*, 2009). Los probióticos son considerados como “microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando son administrados en cantidades adecuadas” (Araya *et al.*, 2002). Entre los numerosos beneficios a la salud ejercidos por los probióticos, establecidos científicamente, pueden señalarse la reducción y prevención de diarreas de diferente origen, el mejoramiento del balance microbiano intestinal, el alivio de síntomas de intolerancia a la lactosa, la prevención de alergias alimentarias, el aumento de actividad autoinmune y actividades contra la formación de tumores (McFarland, 2009; Andersson *et al.*, 2000; Salminen *et al.*, 2001). El nivel de consumo de probióticos recomendado es de  $10^8$ - $10^9$  ufc día<sup>-1</sup>, equivalente a 100 g de un producto alimenticio conteniendo  $10^6$ - $10^7$  ufc g<sup>-1</sup> (Kailasapathy y Masondole, 2005). No obstante, los niveles de probióticos detectados en productos lácteos fermentados, se encuentran a menudo muy por debajo de los recomendados, debido a las condiciones adversas generadas durante el almacenamiento de dichos productos (Heidebach *et al.*, 2009; Champagne y Fustier., 2007; Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que el medio altamente ácido del estómago y la acción de las sales biliares en el intestino delgado, pueden reducir considerablemente el número de células viables capaces de alcanzar el intestino (Anal y Singh, 2007; Muthukumarasamy *et al.*, 2006; Krasaekoopt *et al.*, 2003). La técnica de microencapsulación es considerada como una alternativa para aumentar la sobrevivencia de los probióticos durante el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos, y en especial durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal, al proporcionar una barrera física entre estos microorganismos y condiciones externas adversas (Agrawal, 2005; Augustin, 2003; Krasaekoopt *et al.*, 2003).

El entrapamiento de probióticos en matrices formadas por polisacáridos, es un método que prevalece para la producción de microcápsulas insolubles en agua y su aplicación en alimentos (Doleyres y Lacroix, 2005; Krasaekoopt *et al.*, 2003). Los resultados sobre la protección que proporcionan estas matrices de polisacáridos a los probióticos durante el almacenamiento de los productos lácteos y a través de su paso por el tracto gastrointestinal, son inconsistentes (Heidebach *et al.*, 2009). Las dispersiones acuosas de los polisacáridos usados como materiales de pared exhiben altas viscosidades, lo que restringe su uso a concentraciones muy bajas, de alrededor del 2 al 4 %. Lo anterior, resulta tanto en la formación de estructuras de pared de baja densidad, que proporcionan un efecto de barrera limitado (Crittenden *et al.*, 2006), como en la formación de cápsulas relativamente grandes, con diámetros entre 1 y 3 mm, que ocasionan efectos adversos en la calidad sensorial del alimento al que se incorporan (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). En adición, el uso de polisacáridos de origen no lácteo para la encapsulación de probióticos con fines de su incorporación en productos lácteos, no es permitido en algunos países (Champagne *et al.*, 1994; Picot y Lacroix, 2004).

Resulta entonces un reto interesante, el desarrollo de nuevas técnicas para la fabricación de cápsulas pequeñas, insolubles en agua, con propiedades de barrera que garanticen la protección de probióticos durante el procesamiento y el almacenamiento de productos lácteos y a través de su trayecto por el tracto gastrointestinal. Una alternativa para el logro de las características señaladas, la puede constituir el uso de lactoproteínas como materiales de pared, debido a sus propiedades funcionales ampliamente reconocidas en el área de los alimentos. La incorporación de cápsulas elaboradas a partir de lactoproteínas en productos lácteos, puede también contribuir al mejoramiento de las propiedades mecánico-sensoriales de estos productos. Escasas investigaciones se han realizado sobre el uso de lactoproteínas para la preparación de microcápsulas insolubles en agua. La gelificación de las lactoproteínas vía enzimática, constituye una opción para su uso como materiales de pared de microcápsulas conteniendo probióticos. Con base en lo expuesto, el objetivo de este proyecto es en la primera parte proteger *Lactobacillus casei* contra condiciones gastrointestinales simuladas mediante su entrapamiento en microcápsulas de lactoproteínas geladas enzimáticamente, con y sin recubrimiento.

### 19.1 Materiales y Métodos

Cultivo liofilizado de *Lactobacillus casei* LBC81 LYO (Lb, Danisco, Dange Saint Romain, Francia). Caldo y agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) para lactobacilos y peptona de caseína (Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Francia). Leche descremada en polvo (LDP, DIBICO S. A. de C. V., México), cuajo fuerza 1:10 000 (Distribuidora Alcatraz, S. A. de C. V., D.F., México), aceite de canola (AC, Canoil, AGYDSA, México). Cloruro de calcio, ácido ascórbico, cloruro de sodio, ácido clorhídrico y etanol absoluto, todos grado analítico (Química Laitz, S. A. de C. V., México). Alginato de sodio (A, de bajo peso molecular FD-175, 60.5% de ácido gúlcico (CP Kelco, Lille, Skensved, Dinamarca). Glutaraldehído al 2.5 % (v/v) (Electron Microscopy Sciences, Washintgton, EUA.).

Quitosano (Q, de alto peso molecular, > 75 % de desacetilación), bilis de porcino B8631 y TWEEN 60 (peso molecular 1309, ácido palmítico 35-50 %, ácido esteárico 47-55 %, CMC 27 %, HLB 14.9) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA).

### 19.2 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*

La cinética de crecimiento de Lb se realizó usando caldo MRS estéril (121 °C, 15 min) adicionado con ácido ascórbico (0.1 g L<sup>-1</sup>) para promover un ambiente anaerobio (Song *et al.*, 2003) y una temperatura de incubación de 37 °C. Mediciones de absorbancia del medio de cultivo a 540 nm se efectuaron cada 40 min (espectrofotómetro UV, Spectronics Genesys 5 UV/Vis, Spectronic Unicam, Rochester, NY, EUA). A partir de 26 h de incubación las bacterias no mostraron crecimiento adicional, como fue indicado por incrementos poco significativos en los valores de absorbancia. La cinética de crecimiento de Lb se determinó por el método de vaciado en placa usando agar MRS estéril (121 °C, 15 min) adicionado con ácido ascórbico (0.1 g L<sup>-1</sup>), una temperatura de incubación de 37 °C y un periodo de incubación de 26 h. Las unidades formadoras de colonias (ufc) se determinaron en el periodo comprendido de 0 a 26 h, realizando las diluciones decimales necesarias en solución de NaCl estéril (0.9 % p/v). Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 72 h y se determinó el número de ufc mL<sup>-1</sup> (Sheu y Marshall, 1993). La determinación de la cinética de crecimiento de Lb se efectuó por triplicado.

### 19.3 Preparación del concentrado celular de *Lb. casei* a encapsular

Células de *Lb. casei* se cosecharon por centrifugación aplicando 2336.45×g durante 5 min en una centrifuga (Damon/Iec División IEC PR-J, Internacional Equipment Co., Nashville, Tennessee, EUA) a partir de un cultivo en caldo MRS de 19 h de incubación, periodo correspondiente a la fase logarítmica tardía de crecimiento de Lb. El sobrenadante fue decantado y el concentrado celular se lavó dos veces con solución de NaCl (0.9 % p/v) estéril; en ambas ocasiones se centrifugó bajo las condiciones mencionadas y finalmente se resuspendió en agua peptonada estéril (0.1 g 100 mL<sup>-1</sup>), para obtener el concentrado celular a encapsular (CC, 11.56 ± 0.1 log ufc mL<sup>-1</sup>).

### 19.4 Pruebas preliminares para establecer las condiciones de preparación de las microcápsulas

Para establecer las condiciones adecuadas para la preparación de microcápsulas con diámetros en el rango de 100-200 μm, se realizaron pruebas preliminares en las que se tuvieron las siguientes variables de proceso: fracción volumétrica de la emulsión (Φ), velocidad de agitación, tiempo de agitación durante el proceso de emulsión, tiempo de agitación y temperatura durante el proceso de gelación de la caseína. Las variaciones realizadas en el presente experimento fueron fase acuosa (Φ= 0.1, 0.2, 0.3) y velocidad de homogenización (900, 1500, 1680 y 4000 rpm).

### 19.5 Preparación de las microcápsulas

Se preparó una dispersión de LDP (35 g 100 g<sup>-1</sup> p/p) en agua destilada estéril aplicando agitación moderada con un equipo caframo (modelo RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA). Las dispersiones se refrigeraron a 4 °C durante 24 h para completa rehidratación de la LDP. Posteriormente, la dispersión se mezcló con el CC en una relación 9:1 para mantener una carga celular de  $10.56 \pm 0.1$  log ufc ml<sup>-1</sup> y una concentración de proteína de  $10.27 \pm 0.2$  % (DLDL). Se prepararon emulsiones agua-en-aceite (W/O) con una fracción volumétrica ( $\Phi$ ) de 0.3, mediante el procedimiento sugerido por Heidebach *et al.* (2009), con ligeras modificaciones: (a) 60 g de DLDL se adicionaron con 800  $\mu$ l de cuajo (diluido al 25 %, v/v) (DL DLC) e incubó durante 60 min a 5 °C; (b) por separado se pesaron 140 g de AC y se mantuvieron en refrigeración, para que tanto el aceite como la DL DLC se encontraran a la misma temperatura al momento de preparar la emulsión; (c) La DL DLC se incorporó gota a gota al AC mediante el equipo caframo, operado a 1680 rpm y (d) la emulsión W/O formada fue adicionada con 480  $\mu$ L de cloruro de calcio diluido al 10 % p/v y se continuó la agitación durante 10 min. Para prevenir la prematura gelación de las lactoproteínas durante el proceso de emulsificación, la temperatura se mantuvo a  $5 \pm 1$  °C mediante un baño de hielo. Con la finalidad de inducir la gelación de las lactoproteínas y así obtener las microcápsulas de caseína (MC), la emulsión W/O obtenida se sometió a calentamiento ( $40 \pm 1$  °C) durante 5 min, aplicando agitación continua. La mezcla microcápsulas-sobrenadante se dejó reposar 15 min a  $5 \pm 1$  °C, después de lo cual el sobrenadante se removió y las microcápsulas se lavaron dos veces con TWEEN 60 diluido al 1 % p/p, para eliminar el residuo oleoso.

### 19.6 Recubrimiento de microcápsulas

Se prepararon cuatro variaciones de microcápsulas con recubrimiento, con el objeto de brindar mayor protección a los microorganismos atrapados, a partir de las MC usando las siguientes dispersiones: 0.1 % de A (MC<sub>0.1A</sub>), 0.5 % de A (MC<sub>0.5A</sub>), 0.1 % de Q (MC<sub>0.1Q</sub>) y 0.5 % de Q (MC<sub>0.5Q</sub>). Como control se consideraron las MC sin recubrimiento. Algunos estudios reportan las siguientes concentraciones para las dispersiones de recubrimiento: son 0.4 % de quitosano y 0.17 % de alginato para atrapar *Lactobacillus plantarum* (Brinques y Záchia, 2011), 0.4 % de quitosano y 0.2 % de alginato para atrapar *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* (Chavarri *et al.*, 2010), 1 % de quitosano, 1.5 % de alginato y 0.5, 1.0 y 2.0 % de Carboxi-metil-Quitosano (CMCS) para atrapar *Lactobacillus casei* ATCC 393 (Li *et al.*, 2011), teniendo esta información como base y tomando en cuenta que tanto el quitosano como el alginato en disolución tienen una alta viscosidad y que esto podría afectar a las microcápsulas por su tamaño, al encontrarse en una sustancia con alta viscosidad, se definió evaluar las concentraciones de 0.1 y 0.5 % para ambos biopolímeros y las microcápsulas de control fueron sin recubrimiento (CC).

Las dispersiones de A se prepararon hidratando 0.05 g (MC<sub>0.1A</sub>) y 0.25 g (MC<sub>0.5A</sub>) en 49.95 g y 49.75 g de agua estéril, respectivamente, durante 24 h con agitación magnética. Por su parte, las dispersiones de Q se prepararon hidratando 0.05 g (MC<sub>0.1Q</sub>) y 0.25 g (MC<sub>0.5Q</sub>) en 49.95 g y 49.75 g de ácido acético al 3 % p/p, respectivamente, durante 24 h con agitación magnética. Las dispersiones se agregaron, de acuerdo al tratamiento, gota a gota a MC, aplicando agitación magnética durante 15 min, seguido de un reposo de 10 min a 5 °C. Posteriormente las microcápsulas se decantaron y lavaron con agua peptonada (0.1 g 100 mL<sup>-1</sup>). Las microcápsulas obtenidas fueron vaciadas en tubos de plástico estériles de 50 mL y centrifugadas durante 5 min a 1350 rpm, para eliminar el líquido restante; el sobrenadante fue removido y se agregaron 5 mL de agua peptonada (0.1 g 100 mL<sup>-1</sup>) estéril, para evitar la deshidratación. Las microcápsulas se almacenaron a 5°C hasta su caracterización. Todas las microcápsulas se elaboraron por triplicado.

### 19.7 Caracterización de las microcápsulas

**Rendimiento:** Se evaluó el rendimiento de microcápsulas como función de la cantidad de proteína gelificable en la DLDL, utilizando la siguiente ecuación:

Para aplicar la ecuación anterior, se cuantificó la proteína presente en LDL y en las microcápsulas después de 1 d de su elaboración por el método de microkjeldahl (AOAC, 1999). Para el primer caso se consideró que el 80% de la proteína era atribuible a caseínas (Fox *et al.*, 2000); mientras que para la microcápsulas el contenido de proteína determinado se consideró como igual al de caseína.

**Tamaño :** El diámetro mayor medio de veinte microcápsulas se determinó después de 1 d de su elaboración, utilizando el analizador de imágenes Motic Images Advanced 3.2 (Motic Co, Hong Kong, China), a partir de las micrografías obtenidas con una cámara digital Motic 350 (Motic Co, Hong Kong, China) a 40× (Rasband, 2007).

### 19.8 Microestructuras

Las microcápsulas fueron fijadas en una disolución de glutaraldehído al 2 % v/v en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) durante 6 h; posteriormente, se deshidrataron en disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (50, 60, 70, 80, 90 y 100 % v/v), permaneciendo 30 min en cada una. Las microcápsulas fijadas se secaron a punto crítico en un CPA II Technics Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, EUA). Cada microcápsula se fracturó con el objetivo de exponer la estructura interior; luego se montaron en soportes de aluminio y finalmente se cubrieron con una capa fina de oro en un Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). Las microcápsulas fracturadas se observaron en un microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (JEOL Scanning Electron Microscope JMS-035, Jeol Ltd., Akishima, Japón), operado a 20 kV a una magnificación de 150× a 5 000× (Lobato Calleros *et al.*, 2002).

### 19.9 Eficiencia de atrapamiento

Se evaluó la eficiencia de atrapamiento de las células de Lb y se expresó como el porcentaje de células viables atrapadas relativo a la carga inicial presente en la DLDL. Para el recuento de células viables atrapadas, fue necesario destruir mecánicamente las cápsulas y así liberar las células de Lb (Heidebach *et al.*, 2009); se realizaron las diluciones decimales necesarias para hacer la siembra en agar MRS, se incubó a 37°C durante 72 h y se realizó el recuento en placa. La eficiencia de atrapamiento se calculó de acuerdo a lo propuesto por Reid *et al.* (2005).

### 19.10 Supervivencia de *Lb casei* encapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas

Se determinó la supervivencia de Lb en jugo gástrico simulado y sales biliares de manera secuencial, para lo cual se colocó 1 g de microcápsulas preparadas recientemente, por triplicado, en tubos conteniendo 9 mL de solución gástrica simulada estéril (pH 2.0, ácido clorhídrico 0.1 N). Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 3 h en un baño de agua con agitación (Precision 360 Scientific Orbital, West Cortland St., Chicago, IL., EUA) (Hughes y Hoover, 1995) Posteriormente, las microcápsulas se filtraron, enjuagaron con disolución salina y se colocaron en tubos conteniendo 9 mL de extracto de bilis de porcino al 1 % p/v (la concentración máxima de sales biliares en el intestino humano es de 2 %) y pH 6.4. Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h con agitación suave (Carteris *et al.*, 1998; Sun y Griffiths, 2000; Madureira *et al.*, 2005).

Al finalizar el periodo de incubación se determinó la viabilidad de Lb por el procedimiento descrito. Células de Lb sin encapsular en la misma concentración, se sometieron de manera directa a las mismas condiciones gastrointestinales simuladas que las microcápsulas y sirvieron como control (Mosilhey, 2003). La tasa de supervivencia de Lb libres y encapsulados después de ser sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas, se determinó de acuerdo con lo propuesto por Heidebach *et al.* (2009).

### 19.11 Análisis de datos

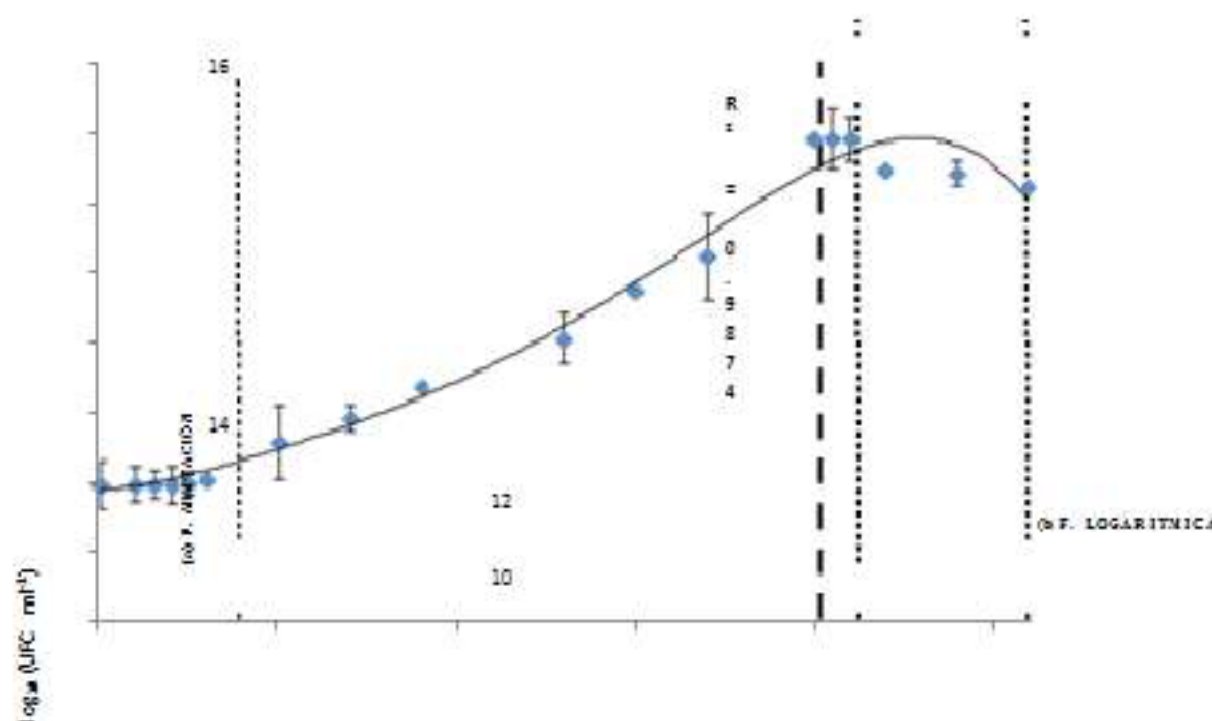
Los experimentos de esta investigación se realizaron por triplicado, usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos correspondientes a las características de las microcápsulas se sometieron a Análisis de Varianza de Clasificación Simple y en los casos pertinentes a pruebas de comparación de medias de Tukey. La significancia se estableció en  $p \leq 0.05$ . Para el análisis de datos se usó el software Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

### 19.12 Resultados y Discusión

Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*: La determinación de la cinética de crecimiento mediante el recuento de ufc de Lb en placa con el tiempo de incubación dio como resultado la gráfica mostrada en la Figura 1, en la cual pueden apreciarse las diferentes fases de crecimiento de Lb relacionadas con el número de ufc mL<sup>-1</sup> presentes.

Las fases del crecimiento microbiano identificadas fueron: (a) fase de adaptación o latencia donde las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento, durante esta fase del ciclo las bacterias sintetizan ARN, enzimas y otras moléculas (Castro *et al.*, 2008), en este caso tuvo una duración de 0-3 h; (b) fase de crecimiento logarítmica o exponencial, es un período caracterizado por la duplicación celular (Castro *et al.*, 2008), en este caso comprendió de 3-20 h; (c) fase estacionaria, en esta la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos (Castro *et al.*, 2008), en este experimento fue muy corta para Lb, con una duración de 1 h (21-22 h) y (d) la fase de muerte, donde las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren (Castro *et al.*, 2008), en este experimento inició después de las 22 h y se documentó hasta las 26 h de cultivo.

**Grafico 19** Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* por la técnica de recuento en placa



Los resultados de esta prueba fueron la base para las siguientes fases de esta investigación, debido a que a partir de estos se definió el periodo de incubación tras el cual se cosechó Lb para ser atrapado en las microcápsulas. La mayor densidad de microorganismos se encontró a las 20 h de cultivo, con  $13.91 \log_{10}$  ufc  $\text{mL}^{-1}$  ( $8.11 \times 10^{13}$  ufc  $\text{mL}^{-1}$ ), por lo cual se determinó la hora de cosecha a las 19 h; tiempo que corresponde a la fase logarítmica tardía. Lo anterior con el fin de evitar la muerte de los microorganismos durante el proceso de microencapsulación (Sheu y Marshall, 1993).

### 19.13 Tamaño de las microcápsulas

Los diámetros de las microcápsulas correspondientes a los distintos tratamientos variaron en el rango de 104.83 a 142.20  $\mu\text{m}$  (tabla 19). Los diámetros de las  $\text{MC}_{0.1A}$  y  $\text{MC}_{0.1Q}$  no difirieron ( $p > 0.05$ ) del valor correspondiente a las MC.

En contraste, el diámetro de las MC<sub>0.5Q</sub> fue menor al de las MC, esto se debe a que el recubrimiento de MC<sub>0.5Q</sub> provocó que las microcápsulas se aglomerasen en menor grado, lo cual se observó tanto en el microscopio al determinar diámetro mayor, como después del lavado de las microcápsulas.

**Tabla 19** Valores medios ( $\pm$  DE) del diámetro de las microcápsulas

Tratamiento	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )
MC	142.20 $\pm$ 35.5 <sup>b</sup>
MC <sub>0.1A</sub>	125.84 $\pm$ 33.8 <sup>ab</sup>
MC <sub>0.1Q</sub>	121.26 $\pm$ 17.5 <sup>ab</sup>
MC <sub>0.5Q</sub>	104.84 $\pm$ 20.7 <sup>a</sup>

MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC<sub>0.1A</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC<sub>0.1Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC<sub>0.5Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano. Diferentes superíndices en una columna indican que las medias son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

El tamaño de las microcápsulas, medido mediante su diámetro, constituye un factor determinante para la selección del tipo de producto alimenticio idóneo al que pueden incorporarse.

Es importante que las microcápsulas presentes en un alimento no demeriten su calidad sensorial. Esto es, es conveniente que microcápsulas con diámetros menores a 100  $\mu\text{m}$  sean incorporadas a alimentos con tamaño de partícula pequeño con la finalidad de que no provoquen sensación de granulosidad (Hansen *et al.*, 2002); mientras que microcápsulas con diámetros superiores a 100  $\mu\text{m}$  pudieran ser adicionados a alimentos como el queso, con tamaño de partícula relativamente grande.

#### 19.14 Rendimiento

El contenido de proteína de la DLDLC fue de 10.28  $\pm$  0.22 %; considerando que el 80 % de las proteínas totales de la leche es caseína y el resto son proteínas del lactosuero (Fox *et al.*, 2000) y que se partió de unidades experimentales de 70 ml de DCL, la cantidad máxima de proteína gelificable es de 5.7568 g.

Por lo cual el rendimiento se calculó tomando como 100 % de proteína gelificable 5.7568 g y se obtuvieron los rendimientos medios mostrados en la tabla 19.1.

**Tabla 19.1** Valores medios ( $\pm$  DE) de rendimiento de las microcápsulas

Tratamiento	% Rendimiento
MC	96.20 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>
MC0.1A	96.36 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
MC0.1Q	74.87 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
MC0.5Q	95.56 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>

MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC0.1A: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC0.1Q: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC0.5Q: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano. Diferentes superíndices en una columna indican que las medias son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

El tratamiento MC<sub>0.1Q</sub> fue el que menor rendimiento mostro y estadísticamente es diferente al resto de los tratamientos, esto se debe a que la disolución de Q al 0.1 % no brindó recubrimiento a la microcápsula, si no que al contrario la daño y la hizo quebradiza, por lo que parte de estas microcápsulas se fracturaron, lo cual se demostró al observar que pequeñas fracciones de microcápsulas MC<sub>0.1Q</sub> se perdieron durante los lavados y esto se reflejo en un menor rendimiento en base a proteína gelificable, esto se atribuye a que se paso de un pH casi neutro de las microcápsulas (pH 6.8) a uno acido (pH 1.3) de la disolución de quitosano, lo que provoco la insolubilización del calcio, la disminución de interacciones y por lo tanto daño la microcápsula.

### 19.15 Microestructuras

Cuando las micelas de caseína son sometidas a la acción de la enzima quimosina, a bajas temperaturas, ocurre la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína, pero no así la floculación de las cadenas de caseína y subsecuente formación de una estructura proteínica de gel. La posterior elevación de la temperatura a valores mayores a 18 °C, induce rápidamente la formación de la estructura de gel de las caseínas (Bansal *et al.*, 2007). Es por ello que una característica semejante en todos los tratamientos fue que las microcápsulas se asemejan a la cuajada de queso fresco.

### 19.16 Microcápsulas de caseína sin recubrimiento (MC)

La microestructura de las microcápsulas del tratamiento MC se puede observar en las figuras 19(19.1) y 19 (19.1). La figura 19(19.1) muestra la micrografía de una MC, pudiendo observarse que exhibió superficie lisa y compacta, distintiva de las microcápsulas constituidas por proteínas (Friberg , 1997). La superficie de la microcápsula está libre de Lb y su apariencia compacta se debe a que el proceso de gelación ocurre del exterior hacia el interior de la microcápsula.

**Figura 19** (19. Micrografía MEB de microcápsula del tratamiento MC, ampliación 1800  $\times$ ; (2) Micrografía MEB de microcápsula del tratamiento MC, (a) capa externa, (b) fracción interna y (c) *Lactobacillus casei* atrapados, ampliación 5000  $\times$ .



Al interior (Fig. 19 (19)), las MC presentaron una estructura relajada y porosa, pudiendo además observarse la presencia de células de Lb, logrando así la protección de estos microorganismos. La estructura interior es muy semejante a la de queso fresco puesto que el principio de elaboración es el mismo, dicha característica se puede comprobar en estudios previos acerca de la microestructura del queso (Lobato-Calleros, *et al.*, 2008).

#### 19.17 Microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato (MC<sub>0.1A</sub>)

Las microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.1A</sub> mostraron una superficie compacta y más lisa que aquella de las MC (Fig. 2(1)), con nula presencia de células de Lb. La fracción interna de las MC<sub>0.1A</sub> fue porosa y relajada al igual que la correspondiente a las MC, pudiendo observarse la presencia de células de Lb. Al igual que en el tratamiento MC la estructura interna es semejante a la de queso fresco.

#### 19.18 Microcápsulas recubiertas con 0.1 % de quitosano (MC<sub>0.1Q</sub>)

Las MC<sub>0.1Q</sub> consistieron de agregados de caseína de distintos tamaños y estructuras amorfas, con superficie en general lisa, pero con algunas fisuras superficiales. Las diferencias apreciadas en la morfología de las MC<sub>0.1Q</sub>, en comparación con la morfología de las MC (Fig. 2(1)) y MC<sub>0.1A</sub>, son congruentes con la suposición de que la elevada acidez de la solución de Q usada para su preparación dañó la estructura de estas microcápsulas, a través de la insolubilización del calcio, la disminución de interacciones caseína-caseína y por tanto, la pérdida de la estructura esférica inicial de las MC. Lo anterior, se reflejó en la disminución del tamaño de las MC<sub>0.1Q</sub> ( $121.26 \pm 17.49 \mu\text{m}$ ). La estructura débil de las MC<sub>0.1Q</sub> se manifestó en dificultad para su manejo por su consistencia quebradiza. La estructura interna de las MC<sub>0.1Q</sub> fue similar a aquella de las MC, puesto que estas últimas fueron usadas para su recubrimiento con Q.

### 19.19 Microcápsulas recubiertas con 0.5 % de quitosano (MC<sub>0.5Q</sub>)

Las MC<sub>0.5Q</sub> (Fig. 19.2(19.1)) presentaron morfología esférica al igual que las MC (Fig. 19(19.1)) y MC<sub>0.5A</sub>, con superficie lisa, compacta y sin presencia externa de Lb. Estos resultados indican que en contraste con el efecto de la solución de Q al 0.1 % sobre la estructura de las MC<sub>0.1Q</sub>, la disolución de Q al 0.5 % sí cumplió la función de recubrimiento. Lo anterior probablemente debido a la mayor viscosidad de la solución de Q al 0.5 % en comparación aquella de la solución de Q al 0.1 % y a su mayor valor de pH (1.7), pudo favorecer la formación del recubrimiento e impedir la migración del ácido al interior de la microcápsula. La fracción interna de las MC<sub>0.5Q</sub> (Fig. 19.2(19.1)) presentó una estructura porosa, relajada, en este tratamiento se observó la mayor cantidad de células de Lb atrapadas.

**Figura 19** Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.5Q</sub>. Ampliación 1800 ×. (2) Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.5Q</sub> (a) fracción interna y (b) *Lactobacillus casei* atrapados. Ampliación 10000 ×



### 19.20 Eficiencia de encapsulamiento

La eficiencia de atrapamiento de las microcápsulas en todos los tratamientos se determinó después de 1 d de su elaboración. Las MC<sub>0.1A</sub> exhibieron la eficiencia de encapsulamiento de Lb m s elevada ( $p \leq 0.05$ ) (104.05%,  $2.82 \times 10^{13}$  ufc mL<sup>-1</sup>) partiendo de una carga celular del CC de  $8.41 \times 10^{12}$  ufc mL<sup>-1</sup> (Cuadro 3). El valor de eficiencia de encapsulamiento mayor al 100 % pudo deberse a dos factores principalmente, siendo el primero el hecho de que las bacterias se cosecharon en fase logarítmica tardía, por lo cual su crecimiento continúa. El segundo factor puede atribuirse al efecto prebiótico reconocido para A. La suma de estos dos factores pudo provocar que la carga celular de las microcápsulas aumentara y por lo tanto el rendimiento fuese mayor al 100%. Resultados similares han sido informados por Heidebach *et al.* (2009) al encapsular *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* F19 y *Bifidobacterium lactis* Bb12, estos autores encontraron eficiencias de encapsulamiento que variaron de 85-125 % y 102-128 % y concluyeron que estos porcentajes no se refieren a pérdida ni ganancia de ufc, sólo son valores estables cercanos al 100%. Las eficiencias de atrapamiento de Lb de las MC<sub>0.1Q</sub> y MC<sub>0.5Q</sub> no fueron diferentes estadísticamente ( $p > 0.05$ ) a aquellas observadas en MC y MC<sub>0.1A</sub> (tabla 19.2).

La menor eficiencia de atrapamiento por MC<sub>0.1Q</sub> y MC<sub>0.5Q</sub> pudo estar relacionada con la acción del ácido acético usado para la disolución del Q, sobre los microorganismos que se encontraban en la periferia de las microcápsulas. Las microcápsulas sin recubrimiento por sí solas tienen un alto grado de atrapamiento de Lb y que efectivamente la menor eficiencia de atrapamiento de las MC recubiertas con Q se debió a la acción dañina por parte del ácido acético usado para la disolución de Q sobre las microcápsulas.

**Tabla 19.2** Valores medios ( $\pm$  DE) de eficiencia de encapsulamiento de *Lactobacillus casei* libre

Código de microcápsula	Eficiencia de Atrapamiento (%)	Carga celular (ufc mL <sup>-1</sup> )
MC	99.03 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	6.31 x 10 <sup>12</sup>
MC <sub>0.1A</sub>	104.05 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	2.82 x 10 <sup>13</sup>
MC <sub>0.1Q</sub>	96.71 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	3.23 x 10 <sup>12</sup>
MC <sub>0.5Q</sub>	96.08 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	2.62 x 10 <sup>12</sup>

MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC<sub>0.1A</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC<sub>0.1Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC<sub>0.5Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano. Diferentes superíndices en una columna indican que las medias son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

### 19.21 Supervivencia de *Lactobacillus casei* encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas

La protección conferida a Lb ante condiciones gastrointestinales simuladas a través de su atrapamiento fue diferente de acuerdo a la naturaleza y a la concentración de los biopolímeros usados como recubrimiento. Los resultados de la supervivencia de Lb al ser sometido a condiciones gástricas simuladas (HCl, pH 2) se muestran en el Cuadro 4, pudiendo observarse que dicha supervivencia varió de 6.50 % (microorganismos libres) a 73.43% (MC<sub>0.5A</sub>).

**Tabla 19.3** Valores medios ( $\pm$  DE) de supervivencia de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado sometido a condiciones gástricas simuladas

Código de microcápsula	Supervivencia <sup>1</sup> (%)	Supervivencia <sup>2</sup> (%)
Lb libres	6.50 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
MC	22.28 $\pm$ 3.1 <sup>bc</sup>	18.03 $\pm$ 2 <sup>c</sup>
MC <sub>0.1A</sub>	31.27 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	19.90 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>
MC <sub>0.1Q</sub>	16.57 $\pm$ 4.9 <sup>bc</sup>	12.33 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
MC <sub>0.5Q</sub>	73.43 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	65.72 $\pm$ 1.8 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>: Supervivencia de *Lactobacillus casei* sometido a condiciones gástricas simuladas (HCl, pH 2); <sup>2</sup>: Supervivencia de *Lactobacillus casei* después de su exposición secuencial a condiciones gastrointestinales simuladas (HCl, pH 2 y 0.1 % p/v de extracto de bilis porcino). MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC<sub>0.1A</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC<sub>0.1Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC<sub>0.5Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano. Diferentes superíndices en una columna indican que las medias son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

La supervivencia de células de Lb libres fue menor significativamente a aquellas de células de Lb atrapadas (Cuadro 4), resultado esperado debido al contacto directo de las células de Lb con el HCl. Así, la mayor supervivencia de Lb bajo condiciones gástricas se presentó cuando sus células fueron atrapadas en MC<sub>0.5Q</sub>, con un valor 73.43 % ( $1.92 \times 10^{12}$  ufc mL<sup>-1</sup>), lo cual significa apenas una disminución de 0.135 log. Este resultado comparado con otros estudios permite concluir que las microcápsulas MC<sub>0.5Q</sub> pueden ser un vehículo de microorganismos probióticos. Los resultados obtenidos muestran que la protección brindada por la matriz de caseína a las células de Lb contra la acción del HCl, fue incrementada sensiblemente mediante el recubrimiento de las MC usando una solución de Q al 0.5 %. Lo anterior, debido probablemente a que el Q es un biopolímero catiónico que contiene numerosos grupos amino en su estructura, los cuales le confieren estabilidad a este biopolímero en medios ácidos y permite que su degradación se desarrolle hasta el colon, por acción de la microflora presente en este sitio (Chavarri *et al.*, 2010).

Como se esperaba, las células libres de Lb fueron las que presentaron el menor porcentaje de supervivencia bajo condiciones gastrointestinales simuladas, presentando un valor de 0.12 % (Cuadro 4). Adicionalmente se observó que células de Lb atrapadas en MC y MC<sub>0.1A</sub> presentaron una supervivencia estadísticamente igual ( $p > 0.05$ ), por lo cual se puede concluir que el recubrimiento con A no confirió mayor protección a Lb ante condiciones gastrointestinales simuladas, en comparación con la proporcionada por MC. Por su parte la protección proporcionada a Lb por parte de las MC<sub>0.1Q</sub> fue menor que aquella brindada por el resto de las microcápsulas, posiblemente debido a las deficiencias en su estructura ya señaladas. En contraste, las MC<sub>0.5Q</sub> confirieron la mayor protección a Lb ante condiciones gastrointestinales simuladas, de manera similar a lo observado bajo condiciones gástricas simuladas, con una supervivencia de 65.72 % ( $1.72 \times 10^{12}$  ufc mL<sup>-1</sup>), lo que equivale a una disminución de apenas 0.18 log. Al comparar estos resultados con lo informado por Heidebach *et al.* (2009) después de ser sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas, puede concluirse que el recubrimiento de las MC usando una solución de Q al 0.5 % mejoró las características de protección de las microcápsulas. Así, la carga celular de Lb en las MC presentó una disminución de 0.75 log, muy semejante a lo reportado por Heidebach *et al.* (2009) para *Lactobacillus paracasei*, mientras que al adicionar el recubrimiento la disminución fue de 0.18 log.

## 19.22 Conclusiones

Se atrapó *Lactobacillus casei* en microcápsulas de caseína gelada enzimáticamente (MC) con y sin recubrimiento a base de quitosano (Q) o alginato de sodio (A), obteniéndose eficiencias de atrapamiento que variaron de 96.08 a 104.05 %.

El diámetro y el porcentaje de rendimiento de las microcápsulas fueron afectados por el tipo y la concentración de biopolímero en la solución usada para su recubrimiento. Así el diámetro varió de 104.8  $\mu\text{m}$  (MC<sub>0.5Q</sub>, recubierta con una solución de Q al 0.5 %) a 142.20  $\mu\text{m}$  (MC, microcápsulas de caseína sin recubrimiento), y el porcentaje de rendimiento estuvo en el rango de 74.8 % (MC<sub>0.1Q</sub>) a 96.36 % (MC<sub>0.1A</sub>). La morfología de las microcápsulas fue esférica con superficie lisa y homogénea, a excepción de las MC<sub>0.1Q</sub>, las cuales presentaron la forma de agregados amorfos de partículas de caseína gelada enzimáticamente, con fisuras en su superficie. La microestructura interna de todas las microcápsulas fue semejante a la de la cuajada de un queso fresco, pudiendo observarse la presencia de células de *Lactobacillus casei*. La protección brindada por las microcápsulas a *Lactobacillus casei* contra condiciones gastrointestinales simuladas varió de acuerdo al tipo y concentración del biopolímero usado para su recubrimiento. Las microcápsulas recubiertas con una solución de Q al 0.5 % (MC<sub>0.5Q</sub>) confirieron la mayor protección, obteniéndose porcentajes de supervivencia de 73.43 % después de su exposición a condiciones gástricas simuladas y de 65.72 % después de su exposición secuencial a condiciones gástricas simuladas y a la acción de sales biliares.

### 19.23 Referencias

- Agrawal, R. (2005). Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*. Volume 19, Issue 3: 227-246.
- Anal, A., Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5): 240-251.
- Anderson DB, McCracken VJ, Aminov RJ, Simpson JM, Mackie RJ, Vestegem MWA, Gaskins HR (2000). Gut microbiology and growth promoting antibiotics in swine. *Pig News and Information*; 20:115N-122N, AOAC International. (1999). Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, USA.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., Ben-Embarek, P. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London (Ontario, Canada) April 30 and May 1. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Consultada 03-05-10.
- Augustin, M. A. (2003). The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58 (2), 156-160.
- Bansal, N.; Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (2007). Aggregation of rennet-altered casein micelles at low temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 8, p. 3120-3126.

- Brinques, G. B. and Záchia A. M. A. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering* 103 (2011) 123–128.
- Carteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotics *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 759–768.
- Castro, G., Valvuená, E., Sánchez, E., Briñez, W., Vera, H. y Leal M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Revista científica*, septiembre-octubre, año/vol. XVII, número 005, Maracaibo, Venezuela, pp. 582-588.
- Champagne, C.P., Lacroix, C., and Sodini-Gallot, I. (1994). Immobilised cell technologies for the dairy industry. *Crit.Rev. Biochem.* 14: 109-134.
- Champagne, C. P. and Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 184-190
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F. and Villarán, M. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology* 142 (2010) 185–189.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. and Augustin, M. (2006). Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Appl Environ Microbiology* 72,2280–2282.
- Doleyres, Y. and Lacroix, C. (2005). Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int Dairy J* 15, 973–988.
- Fox, P. F., T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. H. McSweeney. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Friberg, S.E.(1997). *Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Friberg, S.E y Larsson, K. New York: MarcelDekker, Inc.
- Hansen, L. T., Ian-Wotjas, P. M., Jin, Y. L. and Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. In milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19 (1), 35-45.