



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Presentada por

David Ernesto Simental Valle

Inmovilización de *Lactobacillus acidophilus* en mezclas de alginato,
gelana y mucílago de nopal

Dirigida por

Dr. Jorge Yáñez Fernández

México, D. F. mayo de 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 12 del mes de marzo del 15 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:
Inmovilización de *Lactobacillus acidophilus* en mezclas de alginato, gelana y mucílago de nopal

Presentada por el alumno:

Simental Valle David Ernesto
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)
Con registro:

A	1	3	0	0	9	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Jorge Yañez Fernández

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Dr. Ramón Villanueva Arce

Dra. Ana Bélem Peña Guzmán

Dra. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

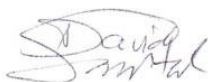
Dr. Ramón Villanueva Arce




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita



**David Ernesto Simental
Valle**



**Vo. Bo. Del director de tesis
Dr. Jorge Yáñez Fernández**

El trabajo experimental de la Tesis de Maestría en Ciencias “Inmovilización de *Lactobacillus acidophilus* en mezclas de alginato, gelana y mucílago de nopal” de David Ernesto Simental Valle, se realizó bajo la dirección del Dr. Jorge Yáñez Fernández, en el Laboratorio de Biotecnología Alimentaria Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI-IPN), del Instituto Politécnico Nacional.

La investigación fue financiada por los proyectos: Procesos de bioseparación para la obtención de enzimas y subproductos y por el Proyecto: SIP-IPN 2013-1801: .

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional

Presente

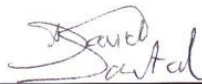
Bajo protesta de decir verdad el que suscribe David Ernesto Simental Valle, alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A130097, manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "Inmovilización de *Lactobacillus acidophilus* en mezclas de alginato, gelana y mucílago de nopal", en adelante "La Tesis" y de cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante "El IPN", autorización para publicar en línea en el repositorio institucional "La Tesis" por un período de **3 años** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovara automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México D.F., 13 de marzo de 2015

Atentamente



David Ernesto Simental Valle

Agradecimientos.

Nadie alcanza el éxito sin ayuda de los demás. El sabio y el seguro de sí mismo reconocen esta ayuda con gratitud”.

Alfred North Whitehead.

A mi director de tesis, Dr. Jorge Yáñez Fernández. Gracias por su apoyo y por su interés en mi crecimiento profesional.

A la comisión revisora: Dr. Gustavo Valencia del Toro, Dr. Ramón Villanueva Arce, Dra. Yolanda de las Mercedes Gómez y Gómez, Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo y Dra. Ana Belem Piña Guzmán.

Gracias a todos por el apoyo. Agradezco las contribuciones que hicieron a mi trabajo y las consideraciones que tuvieron hacia mí.

A la Dra. María del Carmen Núñez Santiago, por su apoyo en la concepción de algunos experimentos, por sus contribuciones en mi trabajo y por permitirme trabajar en CEPROBI-IPN.

Al Dr. Hugo Martínez Gutiérrez y al Dr. Juan Vicente Méndez Méndez, por permitirme aprender técnicas de microscopía.

A mi amiga Diana Catalina Castro Rodríguez, por sus valiosos consejos.

A mi amiga Mónica Paola Lozada Cruz y a mi amigo Gerardo Guerrero Muñoz, por su apoyo en la realización de algunos experimentos.

A mi tío Agustín Valle Peza, por ayudarme a establecerme en la ciudad.

A mi tía Lourdes Rodríguez Valle, por el valioso apoyo cuando me encontraba trabajando en CEPROBI-IPN.

A mis amigos y compañeros de posgrado, gracias por todos los momentos.

Agradezco a mis padres: Enrique David Simental Rodríguez y María Evilacia Valle Peza por el apoyo incondicional que me dan. Y a mis hermanos: Evy María y Enrique Daniel, por los consejos que me dan.

Contenido

CONTENIDO DE FIGURAS	IX
CONTENIDO DE TABLAS.....	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Inmovilización.	5
2.2. Métodos de inmovilización.	5
2.2.1 Adsorción en soportes con superficies sólidas.	5
2.2.2 Atrapamiento en una matriz porosa.....	6
2.2.3 Agregación.....	6
2.2.4 Confinamiento mecánico dentro de una barrera.	7
2.3. Técnicas de inmovilización.....	8
2.3.1 Extrusión:	8
2.3.2 Emulsificación:	8
2.3.3 Secado por Aspersión:	8
2.4. Materiales utilizados como soporte de inmovilización.....	10
2.4.1 Alginato.....	13
2.4.2 Mucílago de nopal.....	14
2.4.3 Goma gelana.....	15
2.5. Inmovilización para la protección de cepas probióticas en condiciones gástricas.....	16
2.6. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.2. Objetivos específicos.....	20

V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1.	Estrategia experimental.....	21
5.2.	Materiales.....	22
5.2.1	Materiales utilizados en el soporte de inmovilización.....	22
5.2.2	Cepa probiótica.....	22
5.2.3	Medios de cultivo.....	22
5.3.	Extracción y secado de mucílago de nopal.....	23
5.4.	Caracterización químico proximal del mucílago.....	24
5.5	Preparación de las dispersiones utilizadas como soporte de inmovilización. 24	
5.6	Determinación del pH de las dispersiones.....	25
5.7	Propiedades reológicas del soporte de inmovilización.....	25
5.8	Método de inmovilización.....	26
5.9	Análisis de imágenes.....	26
5.10	Análisis del perfil de textura.....	27
5.11	Calorimetría diferencial de barrido.....	28
5.12	Determinación de rugosidad por Microscopía de fuerza atómica.....	28
5.13	Microscopía electrónica de barrido.....	28
5.14	Absorción de agua de los soportes liofilizados.....	28
5.15	Acondicionamiento del medio de cultivo previo a la inmovilización.....	29
5.16	Formación de soportes y adición de bacterias ácido lácticas.....	29
5.17	Rendimiento del atrapamiento.....	30
5.18	Viabilidad de <i>L. acidophilus</i> en condiciones gástricas simuladas.....	30
5.19	Análisis estadístico.....	30
VI.	Resultados y discusión.....	31
6.1.	Análisis químico proximal del mucílago de nopal.....	31
6.2.	pH de las dispersiones.....	32
6.3.	Propiedades reológicas de las dispersiones.....	33
6.4.	Análisis de los perfiles texturales de los geles.....	40
6.5.	Calorimetría diferencial de barrido.....	42
6.6.	Parámetros morfológicos de los soportes antes y después de liofilizar.....	45

6.7.	Capacidad de hinchamiento de los soportes liofilizados.....	47
6.8.	Microscopía de fuerza atómica.	49
6.9.	Microscopía electrónica de barrido.	52
6.10.	Porcentaje de atrapamiento.	55
6.11.	Viabilidad de <i>Lactobacillus acidophilus</i> inmovilizado en condiciones gástricas simuladas.	56
VII.	Conclusiones.....	58
VIII.	Referencias bibliográficas.....	59

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Métodos básicos de inmovilización celular.....	7
2	Estructura de los bloques de alginato.....	13
3	Identificación tentativa de las unidades repetidas del mucílago de nopal.....	15
4	Estructura de la goma gelana.....	16
5	Características biosintéticas, genómicas y probióticas de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	18
6	Organigrama de la estrategia experimental del proyecto.....	21
7	Extracción del mucílago de nopal.....	23
8	Curva típica de un análisis de textura utilizando una doble compresión.....	27
9	Comportamiento viscoso de las mezclas de alginato, gelana y mucílago.....	33
10	Módulo de almacenamiento de dispersiones de alginato, gelana y/o mucílago.....	37
11	Módulo de pérdida de dispersiones de alginato, gelana y/o mucílago.....	37
12	Módulo de pérdida y almacenamiento de las mezclas cuando se someten a un baño de CaCl ₂	39
13	Termograma de geles de alginato, gelana y mucílago.....	43
14	Capacidad de hinchamiento de los geles liofilizados.....	48
15	Microscopía de fuerza atómica de la superficie de un soporte liofilizado.....	50
16	Microscopía electrónica de barrido a magnificaciones de 35x y 1,500x de soportes de inmovilización.....	53-54
17	Porcentaje de atrapamiento de las diferentes mezclas.....	55

CONTENIDO DE TABLAS.

Tabla		página
1	Materiales utilizados como soportes de inmovilización.....	10
2	Efecto de mezclas de mucílagos de distintas fuentes con polímeros gelificantes.....	12
3	Mezclas empleadas como soportes de inmovilización.....	25
4	Análisis proximal del mucílago de nopal.....	31
5	pH de las distintas mezclas de alginato, gelana o mucílago....	32
6	Parámetros del modelo de Cross de las dispersiones de alginato, gelana o mucílago.....	35
7	Pendiente de G' y G'' de las dispersiones de alginato, gelana y/o mucílago.....	38
8	Parámetros de textura de geles de alginato, gelana y/o mucílago.....	41
9	Pico endotérmico de los termogramas de las diferentes mezclas.....	44
10	Parámetros morfológicos de las esferas antes de liofilizar.....	45
11	Parámetros morfológicos de las esferas después de liofilizar..	46
12	Parámetros de rugosidad de los geles de alginato, gelana y/o mucílago.....	51
13	Porcentaje de viabilidad a las pruebas gástricas in-vitro.....	56

RESUMEN.

El alginato ha sido un material de soporte muy utilizado para la protección de bacterias ácido lácticas; sin embargo, se le considera un material débil en las condiciones ácidas que presenta el estómago. El estómago es la parte del tracto gastrointestinal donde más se compromete la viabilidad de las cepas probióticas, por lo que mejorar los soportes de inmovilización sigue siendo un reto tecnológico.

La mezcla de polímeros se ha perfilado como una alternativa fácil para modificar los soportes de inmovilización. Permitiendo crear sistemas con características novedosas que no serían posibles al usar sólo uno de los polímeros.

En el presente trabajo, se obtuvieron soportes de inmovilización para *Lactobacillus acidophilus* a partir de mezclas de biopolímeros (alginato, gelana y mucílago). Los biopolímeros fueron mezclados utilizando una base de alginato 2% m/m y combinaciones de gelana y mucílago de nopal (*Opuntia ficus*) hasta concentraciones de 1% m/m. Para el proceso de inmovilización se utilizó la técnica de extrusión empleando una solución endurecedora de CaCl_2 (0.2M).

La caracterización reológica de las dispersiones empleadas para la producción de soportes de inmovilización muestra que existe un incremento en la viscosidad al adicionar gelana a las mezclas de biopolímeros. Por el contrario al incorporar una mayor concentración de mucílago, se presenta un efecto de dilución con respecto a la viscosidad.

Respecto a los parámetros texturales se observó que la adición de 1% gelana aumenta la resiliencia de los soportes, y al adicionar 1% de mucílago aumenta la cohesividad de los soportes. Por el contrario al incorporar gelana y mucílago en cualquier combinación, la dureza de los soportes disminuye. Los soportes liofilizados mostró que una concentración de gelana al 1% presentó mayor rugosidad ($R_a=87.58$), la adición de 1% de mucílago mostró una menor rugosidad (10.97). La combinación de los 3 biopolímeros no afectó significativamente los parámetros de rugosidad ($p<0.05$). Los soportes con 1% y 0.75% de gelana se ven menos afectadas por el proceso de liofilización.

El análisis de calorimetría diferencial de barrido mostró el mismo pico endotérmico (212-213 °C) para las mezclas de alginato que incluyeron gelana al 1%, 0.75% y 0.25%.

La adición de 1% o 0.75% de gelana al alginato mejoró la protección que ofrece el soporte de inmovilización si se compara con el control de alginato. Por lo que la mezcla alginato/gelana puede convertirse en una alternativa si se busca mejorar la protección de un soporte en condiciones gástricas.

ABSTRACT.

Alginate has been a highly used support material for Lactic acid bacteria protection, however it is considered as a weak material under acid stomach conditions. Stomach is the gastrointestinal section where the majority of probiotic strain viability is compromised; therefore the improvement of immobilization supports is a technological challenge.

Polymer blends have been shaped as an easy way to modify immobilization supports, leading the creation of systems with novel properties that wouldn't be possible if using a single polymer.

In this study we obtained immobilization supports for *Lactobacillus acidophilus* using polymer blends (alginate, gellan and mucilage). Polymers were mixed using an alginate base 2% w/w and gellan with cactus mucilage ratios up to 1% w/w concentrations. Extrusion technique, using a CaCl₂ hardening solution (0.2M), was employed as the immobilization process.

The rheological characterization of the dispersions used for immobilization support production showed the presence of incrementing viscosity values when gellan gum was added to the polymer blend. Quite the opposite, when mucilage concentration increased there was a dilution effect within the viscosity.

Regarding the textural parameters, it was observed that 1% gellan addition increased the beads resilience, and adding 1% mucilage increased the beads cohesiveness. On the other hand by incorporating gellan and mucilage at any rate the beads hardness decreased. The lyophilized beads showed that a 1% gellan concentration presented a greater rugosity (Ra=87.58) and adding 1% mucilage presented the lowest rugosity (10.97). The blend of the three polymers had no effect on rugosity values as the difference was not statistically significant ($p < 0.05$). 1% and 0.75% gellan beads were least affected by lyophilization process.

Differential scanning calorimetric analysis showed the same endothermic peak (212-213 °C) for alginate blends containing gellan at 1%, 0.75% and 0.25%.

1% or 0.75% gellan addition in alginate improved the protection granted by the immobilization support if it is compared to the alginate control. Therefore alginate gellan blends could turn in to an alternative if the bead required improving the protection in gastric conditions.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas han tenido un papel importante a lo largo de la historia del ser humano, tanto por su aplicación segura en la fabricación de productos lácteos como por sus propiedades benéficas a la salud (Del Piano, *et. al.*, 2006).

Estas bacterias benéficas han sido denominadas como probióticos, los cuales pueden ser mono-cultivos o cultivos mixtos, que al ser suministrados en un número adecuado, confieren beneficios a la salud del su hospedero. Algunas de las especies ampliamente usadas como probióticos son: *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Algunos otros géneros incluidos como probióticos son *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Ozyurt y Ötles, 2014).

La ingesta de microorganismos probióticos reduce o elimina dolores, así como irritación en el colon, constipación o diarrea. Algunos otros beneficios incluyen: la inhibición de bacterias patógenas, bajos niveles de amonio en la sangre, la absorción de colesterol y la inhibición de la formación de tumores (Rehaiem, *et. al.*, 2014). Sin embargo, mantener la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos probióticos, hasta que lleguen a su destino en el intestino humano, es uno de los requisitos clave para la fabricación de alimentos funcionales (Ross, *et. al.*, 2005).

En los últimos años, la investigación se ha centrado en la microencapsulación para la mejora de la supervivencia del probiótico, ya que es un proceso tecnológico que tiene como objetivo proteger a las bacterias probióticas y ofrece un gran potencial como sistema de entrega de células viables. Una amplia gama de materiales de encapsulación se han empleado para éstos fines, entre los que destacan los polisacáridos para formar una matriz que puede ser degradada por microorganismos de la microbiota intestinal y, así, permitir una administración dirigida de los probióticos en el intestino humano. Aunque varios polisacáridos se han descrito para la encapsulación de bacterias ácido lácticas, el polisacárido más comúnmente utilizado es alginato; sin embargo, los geles obtenidos son susceptibles a la desintegración en presencia de exceso de agentes quelantes, de iones Ca^{2+} y de ambientes químicos agresivos, además, el alginato ha mostrado no ser eficiente para proteger a los probióticos en ambientes muy ácidos (Jiménez-Pranteda, *et. al.*, 2012).

Con la finalidad de contrarrestar las deficiencias que presenta el alginato, algunos trabajos de microencapsulación han empleado mezclas de polisacáridos para incrementar la estabilidad de los sistemas de inmovilización y la viabilidad de los microorganismos (Sandoval-Castilla, *et. al.*, 2010, Totosaus, *et. al.*, 2013). En

donde se ha observado que ocurren interacciones típicas entre polisacáridos cargados positiva y negativamente por atracciones electrostáticas, las cuales pueden dar como resultado incompatibilidad entre estos; también las diferencias entre algunas de sus propiedades como son forma, tamaño o carga podrían causar la separación de las fases (de Jong, *et. al.*, 2009). En aquellos sistema en los que particularmente se lleva a cabo un proceso de gelificación, el balance entre la separación de fases y los procesos de gelación determinan sus propiedades mecánicas y de estructura, siendo la concentración de la mezcla de biopolímeros crucial para el proceso de gelificación (Picone y da Cunha, 2010).

Se han realizado pocos estudios, hasta la fecha, explorando diversos materiales de encapsulación; Por lo tanto, existe un campo abierto de investigación en esta área (Heidebach, *et. al.*, 2009).

II. ANTECEDENTES

2.1. Inmovilización.

La inmovilización, es un proceso fisicoquímico o mecánico para atrapar un material activo en un espacio definido por un material de soporte que envuelve o recubre. Los materiales activos pueden ser líquidos o sólidos y poseen compuestos que actúan como estabilizadores, diluyentes o catalizadores (Bansode, *et. al.*, 2010) La inmovilización tiene el propósito de producir partículas con un tamaño y estructura determinados permitiendo crear sistemas funcionales y novedosos (Burgain, *et. al.*, 2011).

La inmovilización contribuye a mejorar el almacenamiento y la preservación de ingredientes para la industria alimentaria. En el caso de los probióticos inmovilizados, el soporte actúa creando una barrera protectora alrededor de los microorganismos, asegurando una viabilidad prolongada. Además, se ha reportado que las cepas inmovilizadas aumentan su viabilidad cuando son expuestas al calentamiento (Lemay, *et. al.*, 2002) y son menos sensibles a factores biológicos que podrían comprometer su viabilidad, tales como bacteriófagos (Champagne, *et. al.*, 1992) o agentes antimicrobianos (Champagne, *et. al.*, 1989).

2.2. Métodos de inmovilización.

Existen diversos métodos para inmovilizar, éstos se pueden dividir en cuatro categorías basadas en el mecanismo físico empleado para inmovilizar: (A) adsorción en soportes con superficies sólidas, (B) atrapamiento en una matriz porosa, (C) conglomerado y (D) confinamiento detrás de barreras (Kourkoutas, *et. al.*, 2004). La clasificación de los métodos de inmovilización se puede apreciar en la figura 1.

2.2.1 Adsorción en soportes con superficies sólidas.

La adsorción en soportes con superficies sólidas consiste en una interacción directa entre el soporte y el material activo. Una superficie sólida que posea una geometría atractiva con una amplia área superficial se utiliza como mecanismo físico para inmovilizar el material activo (Buitelaar, *et. al.*, 1996).

El procedimiento de inmovilización por adsorción consiste en mezclar el componente biológico y un soporte con propiedades adsorbentes, bajo condiciones de pH y fuerza iónica, seguido de una recolección del material inmovilizado y un lavado extenso para remover los componentes no ligados.

Habitualmente la interacción entre el soporte y el material activo se basa en fuerzas débiles: formación de fuerzas Van der Waals, fuerzas iónicas o puentes de hidrógeno. Aunque el método de adsorción por fuerzas débiles es fácil de preparar, presenta una gran desventaja, debido a las interacciones débiles entre el soporte y el biocatalizador, existe una amplia pérdida en la adsorción, convirtiendo el método en inestable y obteniendo diferentes cargas celulares entre un lote de soportes y otro (Kosseva, 2011).

Aunque es común encontrar fuerzas débiles que propician la adsorción, enlaces fuertes pueden formarse por la interacción de grupos funcionales. La adsorción por enlaces covalentes de un material activo con un soporte ocurre utilizando el grado de reactividad de diferentes grupos funcionales del soporte con un aminoácido como la arginina, el ácido aspártico o la histidina (Kourkoutas, *et. al.*, 2004).

2.2.2 Atrapamiento en una matriz porosa.

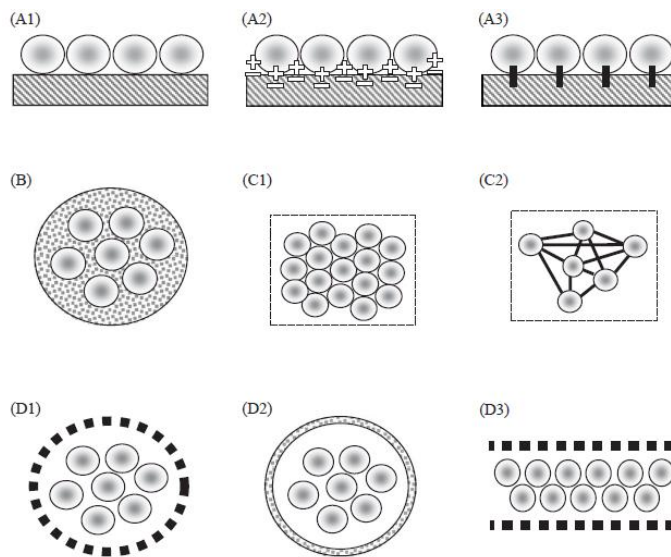
El atrapamiento consiste en inmovilizar las células en una matriz o dentro de fibras, generalmente el soporte de inmovilización se describe como un gel. (Morris, *et. al.*, 2012). El atrapamiento se realiza de tal forma que se permite inmovilizar el biocatalizador permitiendo la entrada de sustrato, para esto se utilizan polímeros con propiedades gelificantes. Al inducir la gelación, el material de interés queda atrapado entre las redes poliméricas.

2.2.3 Agregación.

La agregación es un tipo de inmovilización donde no es necesario el uso de un soporte de inmovilización; se logra mediante la capacidad intrínseca de algunos organismos para formar agregados o flocular. Este método puede incitarse al utilizar reactivos que fomenten la formación de conglomerados como los polielectrolitos, en un proceso denominado como reticulado o floculación artificial (Kourkoutas, *et. al.*, 2004).

2.2.4 Confinamiento mecánico dentro de una barrera.

El confinamiento detrás de una barrera se puede llevar a cabo al usar filtros de membrana microporosos, inmovilizando en una interacción superficial de dos líquidos inmiscibles o atrapando el material de interés en una cápsula formada por redes poliméricas (Gorecka y Jastrzebska, 2011). Esta última es similar al atrapamiento en una matriz polimérica; Sin embargo la encapsulación es un proceso donde se forma un revestimiento continuo alrededor de una matriz interna que está totalmente contenida dentro de la pared de la cápsula (Gbassi y Vandamme, 2012).



Métodos de inmovilización

- | | |
|--|---|
| <p>A. Inmovilización sobre la superficie de un soporte sólido.</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Adsorción sobre una superficie. 2. Enlaces electrostáticos sobre una superficie. 3. Enlaces covalentes sobre una superficie. |
| <p>B. Atrapamiento en una matriz polimérica.</p> | |
| <p>C. Agregación.</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Floculación natural. 2. Floculación artificial (reticulado). |
| <p>D. Confinamiento mecánico detrás de una barrera.</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Microencapsulación. 2. Microencapsulación interfacial. 3. Confinamiento entre membranas microporosas. |

Figura 1. Métodos básicos de inmovilización celular (tomado de (Kourkoutas, *et. al.*, 2004)).

2.3. Técnicas de inmovilización.

En la inmovilización de bacterias es conveniente utilizar una técnica que en combinación con los materiales resulte lo menos agresiva posible (Laurenti y Garcia, 2013). El criterio impuesto para la inmovilización de probióticos se basa en la mejora de la viabilidad, por lo que la técnica y los materiales empleados no deben comprometerla. El soporte de inmovilización generalmente se fabrica utilizando polímeros biocompatibles y disolventes que no resulten tóxicos para las células. Los polímeros utilizados como material de soporte poseen estructuras y propiedades mecánicas únicas, por lo que elegir una técnica de inmovilización adecuada permite manipular el polímero y convertirlo en una forma útil.

Para la inmovilización de probióticos, la forma más común de manipular dispersiones poliméricas y convertirlas en soportes de inmovilización es la formación de gotas de dispersión que se someten a una transformación química o física; basándose en la formación de gotas las técnicas más comunes son: extrusión, emulsión y secado por aspersion.

2.3.1 Extrusión: La técnica de extrusión consiste en la preparación de una solución hidrocoloide, añadiendo microorganismos a ésta y extruyendo la suspensión celular a través de una aguja en forma de gotas para que caigan en una solución endurecedora. La forma y el tamaño de la esfera dependen del diámetro de la aguja, de la distancia de la caída y de las propiedades de la dispersión. El método de extrusión es simple, barato y permite retenciones celulares altas debido a que las condiciones usadas en la preparación de las mezclas son suaves (Krasaekoopt, *et. al.*, 2003).

2.3.2 Emulsificación: La técnica de emulsificación involucra a una fase dispersa compuesta por la mezcla de células y una solución polimérica dentro de una fase continua compuesta de un aceite. La mezcla se homogeniza para formar una emulsión agua en aceite con la ayuda de un surfactante y agitación. La fase dispersa gelifica adicionando un agente coacervante a la emulsión (Song, *et. al.*, 2013).

2.3.3 Secado por Aspersion: En la técnica de aspersion una solución o emulsión se somete a aspersion por un atomizador, se utilizan temperaturas elevadas que evaporen el solvente. Las propiedades del soporte dependen de la naturaleza de la alimentación y de los parámetros como la temperatura de entrada (Estevinho, *et. al.*, 2014).

El secado por aspersion compromete la viabilidad y funcionalidad de los probióticos, la exposición de los probióticos a las temperaturas que utiliza el

secador pueden ser dañinas para las cepas; afectando la pared celular, el ADN y el ARN, resultando en pérdida o reducción de la actividad metabólica de la cepa (Tripathi y Giri, 2014).

Las técnicas anteriores se basan en una matriz líquida (por ejemplo: solución, emulsión o dispersión) que se transforma en partículas sólidas o semisólidas. La transformación generalmente se lleva a cabo por procesos como: evaporación, gelación, polimerización, coacervación y formación de liposomas.

Evaporación: El soporte se forma por un disolvente volátil y un polímero, la evaporación del disolvente convierte al polímero en un soporte que inmoviliza al ingrediente activo. En la preparación de soportes de inmovilización por evaporación, la capacidad de la fase continua es insuficiente para disolver el volumen entero de la fase dispersa. Por lo tanto, el solvente debe evaporarse de la superficie de la dispersión para formar soportes lo suficientemente sólidos (Freitas, *et. al.*, 2005).

Gelación: La dispersión polimérica se somete a un proceso de gelificación que puede suceder de diversas maneras, ya que existen polímeros que reaccionan a distintas condiciones: alginato en presencia de iones divalentes (Voo, *et. al.*, 2011) o gelatina o agarosa en un gelación térmica (Laurenti y Garcia, 2013).

Polimerización interfacial: Consiste en la reacción de un monómero disuelto con un segundo monómero, los cuales son disueltos respectivamente en dos fases inmiscibles, la reacción toma lugar en la interfase de los dos líquidos para formar una membrana en la interfase (Gao, *et. al.*, 2004).

Coacervación: El proceso de coacervación consiste principalmente en tres pasos básicos: emulsificación, coacervación y formación de soportes. La fuerza impulsora son atracciones electrostáticas entre moléculas con cargas opuestas. Esta fuerza puede ser inducida entre un compuesto bioactivo cargado y un carbohidrato con carga opuesta (Coacervación simple) o un compuesto bioactivo puede ser atrapado dentro de una partícula que forme complejos electrostáticos de carga positiva (quitosa) y biopolímeros con carga negativa (alginato) (Fathi, *et. al.*, 2014).

Formación de liposomas: Se trata de la formación de una vesícula al dispersar un surfactante con un polímero. El soporte se forma espontáneamente cuando los fosfolípidos son dispersos en un medio acuoso, la interacción de los grupos hidrofílicos con agua resulta en la formación de vesículas (Vemuri y Rhodes, 1995).

2.4. Materiales utilizados como soporte de inmovilización.

Existen diferentes tipos de materiales utilizados como soportes de inmovilización: gomas (arábica, alginato); carbohidratos (almidón, dextrano); lípidos (cera de abeja) o proteínas (gelatina).

El deseo de catalogar al soporte como un agente “libre de riesgo” o producir un compuesto que se etiquete como “ingrediente natural” influye en que se opte por recurrir a un soporte fabricado por materiales naturales, como los biopolímeros, incluso si su desempeño es más bajo. Al elegir biopolímeros como materiales de soporte, la inmovilización destinada a procesos alimentarios puede mostrarse conforme a los requerimientos de seguridad que dictan agencias gubernamentales como la FDA en Estados Unidos y EFSA en Europa (Kosseva, 2011).

La tabla 1. Presenta ejemplos de materiales utilizados para formar soportes de inmovilización.

Tabla 1. Materiales utilizados como soportes de inmovilización (Datta, *et. al.*, 2013).

Tipo de material	Ejemplos del material en específico.
Polímeros naturales	Alginato, Colágeno, Carragenina y almidón
Polímeros sintéticos	Amberlita y DEAE Celulosa
Materiales inorgánicos	Cerámica, zeolita, vidrio y sílice.

Algunos polímeros como: alginato, κ -carragenina, goma arábica, goma gelana, goma de algarrobo, pectina y gelatina poseen propiedades gelificantes y han sido utilizadas de forma exitosa en la inmovilización de las cepas probióticas (Champagne, *et. al.*, 2010). Además, estos polímeros pueden ser mezclados entre sí para formar nuevos soportes de inmovilización.

El uso de combinaciones de polímeros causa características interesantes en distintas propiedades del gel: Aumento o decremento de la viscosidad, la mejora en la textura o un incremento en la estabilidad durante el almacenamiento. Por lo que la adición de más de un polímero al soporte, puede ser indispensable para obtener un producto con características personalizadas (Datta, *et. al.*, 2013) de

una manera más fácil, versátil y barata de lo que sería sintetizar un material completamente nuevo.

En general las ventajas de mezclar polímeros pueden resumirse en:

- Desarrollo de nuevas propiedades o mejorar las propiedades existentes.
- Reducción de los costos del material con una pequeña o nula pérdida de las propiedades del polímero.
- Mejoramiento en el procesamiento del material.
- Satisfacer las necesidades de industrias emergentes al superar el paso de polimerización.

(Sarath, *et. al.*, 2014).

Existen algunos casos exitosos de mezclas de polímeros, donde las propiedades de la mezcla son superiores o son cualitativamente diferentes a las propiedades que presenta el polímero individual. Por ejemplo: al mezclar κ -Carragenina con goma garrofín los dos polímeros interactúan, formando un gel con mayor dureza (Chen, *et. al.*, 2001), la mezcla de Goma garrofín con goma xantana, forma de un gel elástico termorreversible (Liu, *et. al.*, 1998).

A pesar de los estudios de varias mezclas, es difícil predecir el comportamiento de los polímeros, cuando los polímeros se mezclan pueden ocurrir tres comportamientos: (A) Los polímeros son miscibles, (B) los polímeros son compatibles y (C) los polímeros son inmiscibles. Cuando los polímeros son miscibles, éstos coexisten en una sola fase y la mezcla es termodinámicamente estable. Sin embargo, en la mayoría de los casos mezclar dos o más biopolímeros resulta en una separación de fases, que puede ser una (A) separación asociativa (la primera fase siendo enriquecida en ambos polímeros, la segunda en un solvente) o una (B) separación segregativa (cada fase siendo enriquecida con uno de los dos biopolímeros). La separación de fase segregativa, también llamada incompatibilidad termodinámica, es la más frecuente y es principalmente debido a efectos de volumen excluidos y repulsión entre los dos biopolímeros (Panouillé y Larreta-Garde, 2009).

La situación es más compleja si uno o dos polímeros experimentan una transición sol-gel (solución-gel). En ese caso, una competición entre la gelación y separación de fases aparece y la cinética de cada fenómeno determina el estado final de la mezcla (Panouillé y Larreta-Garde, 2009). Por ejemplo, la agarosa forma un gel mediante dos mecanismos, primero se forma una hélice inicial y después se agregan las hélices. La adición de goma xantana o de alginato a la agarosa modifica su mecanismo de gelificación: la goma xantana reduce la movilidad y difusión de las cadenas de agarosa distribuidas homogéneamente. En cambio,

cuando la agarosa se mezcla con alginato; ocurre un comportamiento diferente, ya que el alginato consiste en bucles flexibles y enredados que difícilmente impiden la difusión de las cadenas de agarosa y la formación del gel (Russ, *et. al.*, 2014).

La mezcla de polímeros resulta especialmente útil en aquellos polímeros que gelifican iónicamente con la adición de cationes divalentes como el Ca^{2+} . Como la gelación ionotrópica es demasiado rápida la habilidad de controlar y modificar la estructura del gel es limitada. En este sentido, la modificación química de un polímero o la mezcla de un polímero con otros materiales brinda la posibilidad de modificar la estructura del gel (Florián-Algarín y Acevedo, 2010).

Recientemente, los mucílagos derivados de plantas o semillas han sido utilizados para modificar las propiedades mecánicas de un gel (Medina-Torres, *et. al.*, 2003) o para desarrollar soportes destinados como sistemas de liberación. Muchos de estos soportes fueron preparados mediante gelación iótopica, donde los mucílagos se mezclaban principalmente con polímeros iónicos (Nayak y Pal, 2014).

Tabla 2. Efecto de mezclas de mucílagos de distintas fuentes con polímeros gelificantes.

Mezcla	Efecto	Referencia
Mucílago de semilla de Psyllium / gelana	El soporte presenta una buena mucoadhesividad con la mucosa intestinal de cabras.	(Nayak y Pal, 2014)
κ - carragenina / mucílago de nopal	Mayor rigidez del gel en una combinación de 80 κ - carragenina / 20 mucílago de nopal.	(Medina-Torres, <i>et. al.</i> , 2003)
Agar / mucílago de quimbombó	Mejora en la retención celular de una cepa probiótica al compararla con polímeros comerciales como el alginato.	(Laurenti y Garcia, 2013)
Mucílago de semilla de alholva/ alginato	Se descubrió un potencial uso del mucílago de semilla de alholva como un excipiente mucoadhesivo que podría ser usado en soportes de liberación prolongada.	(Nayak, <i>et. al.</i> , 2013)
Mucílago de mostaza amarilla / goma garrofín	Habilidad del mucílago de formar un gel fuerte en presencia de goma de garrofín (relación 9 partes de mucílago y 1 parte de goma garrofín)	(Cui, <i>et. al.</i> , 2006)

2.4.1 Alginato.

El alginato es un polisacárido lineal no ramificado, compuesto de una proporción variable de 1,4 β -D-ácido manurónico y α -L-ácido gulurónico, el cual tiene la habilidad de formar un gel cuando se encuentra con cationes divalentes como el Ca^{2+} (Song, *et. al.*, 2013). Se encuentra en la pared celular y los espacios intercelulares de algas marrones en forma de algina, proveyendo flexibilidad y fuerza a las plantas. El ácido algínico, la forma ácida del alginato, es un producto intermedio en la manufactura comercial de alginatos y tiene poca estabilidad. Para brindar un producto soluble en agua con más estabilidad, el ácido algínico se transforma en una variedad de alginatos comerciales al incorporar distintas sales (Homayouni, *et. al.*, 2007).

La gelificación del alginato está relacionada a interacciones específicas y fuertes entre largos tramos de unidades de ácido gulurónico (G) e iones divalentes. La importancia de las unidades G en este proceso se remarca por el hecho de que la fuerza del gel es directamente relacionada al contenido total de unidades G y el promedio de longitud del bloque G en el polímero (Pawar y Edgar, 2012) (figura 2).

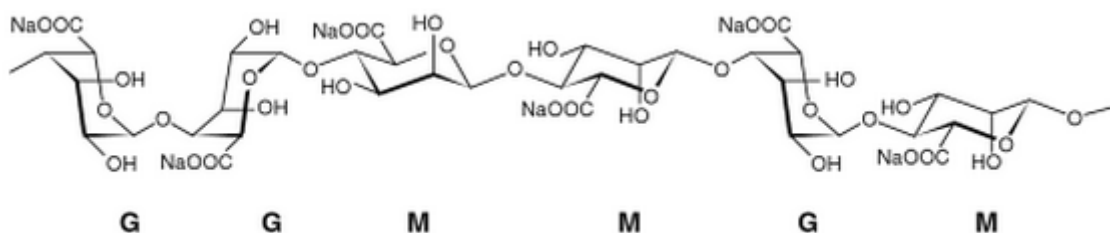


Figura 2. Estructura de los bloques de alginato. Ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M). tomado de (Rehm, 2009).

Dentro de las ventajas de usar alginato se incluye: su facilidad de manipulación, su naturaleza no toxica, su bajo costo (Sultana, *et. al.*, 2000) y generalmente, es menormente afectado por ataques microbianos si se compara con otros carbohidratos (Inal y Yiğitoğlu, 2011).

El alginato como soporte de inmovilización tiene la desventaja de ser inestable en presencia de queladores de calcio como el fosfato, lactato o citrato y a iones de sodio y magnesio que desplazan al calcio. Además los soportes son susceptibles a ambientes ácidos y presentan una gran difusión de humedad y otros fluidos. Esto provoca que se reduzca el efecto de barrera que ofrezca el soporte contra factores ambientales desfavorables (Martín, *et. al.*, 2015).

El alginato de sodio ha sido usado ampliamente como polisacárido y como soporte en la inmovilización celular utilizando la técnica de extrusión o emulsión. La

inmovilización celular con alginato ha sido utilizada para distintos procesos: como fermentación de productos (Herrero, *et. al.*, 2001), Producción de Biomasa (Yoo, *et. al.*, 1996) y producción de ácido láctico (Rao, *et. al.*, 2008) (Yen y Lee, 2010).

Algunas combinaciones de alginato con otros polímeros también han resultado exitosas como soportes de protección. La mezcla de alginato y pectina provee una mejor protección a la cepa *Lactobacillus casei* bajo condiciones gástricas simuladas (Sandoval-Castilla, *et. al.*, 2010).

En ocasiones se ha intentado cambiar el agente gelificante por otro ion divalente, utilizando bario como agente gelificante; Sin embargo, utilizar bario puede inducir efectos negativos en las células debido a su toxicidad (Yoo, *et. al.*, 1996). Para evitar la toxicidad se utiliza generalmente calcio como agente gelificante.

2.4.2 Mucílago de nopal.

El nopal es un cultivo de cactus domesticado que ha cobrado importancia en la agricultura de regiones áridas y semiáridas, principalmente se destina al cultivo de su fruta, aunque también se cosechan los cladodios (pencas de nopal) como cultivo vegetal. Los cladodios del nopal realizan la fotosíntesis, reemplazando a las hojas en esta función. Además, El mucílago presente en el cladodio puede almacenar grandes cantidades de agua que le permite a la planta soportar la sequía (Griffith, 2004).

El mucílago de nopal es un carbohidrato complejo y sus propiedades pueden variar dependiendo de la aclimatación que sufre la planta. Por ejemplo, la viscosidad del mucílago varía de acuerdo a la cantidad de agua que la planta recibe, la tierra extremadamente seca produce un mucílago más viscoso que el de una tierra semi árida. (Sáenz, *et. al.*, 2004).

El mucílago del nopal (*Opuntia ficus*) es un polisacárido con un peso molecular en el orden de 2.3×10^4 (Medina-Torres, *et. al.*, 2003), posee una estructura extremadamente ramificada; conteniendo proporciones de L-arabinosa, Piranosa y formas de furanosa. Las mayores unidades de azúcares neutras son: D- galactosa, L-ramnosa y oxano-2,3,4,5-tetrol D-xylosa, así como ácido galacturónico en proporciones distintas (Guevara-Arauz, *et. al.*, 2012) (figura 3).

El ácido galacturónico presente en la estructura del mucílago le brinda una carga negativa, ya que los iones hidrógenos tienden a disociarse de la parte carboxílica (-COOH). Esta negatividad resulta en una unión de iones calcio (Ca^{2+}) a muchos lugares en la molécula de mucílago (Gibson y Nobel, 1990).

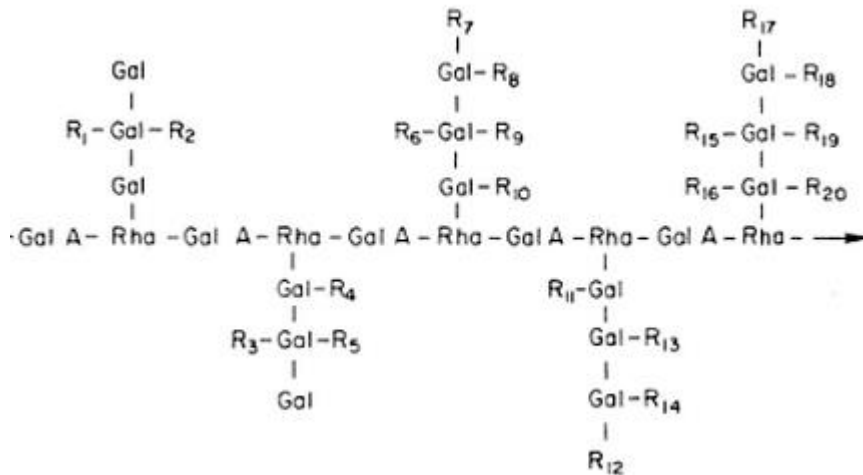


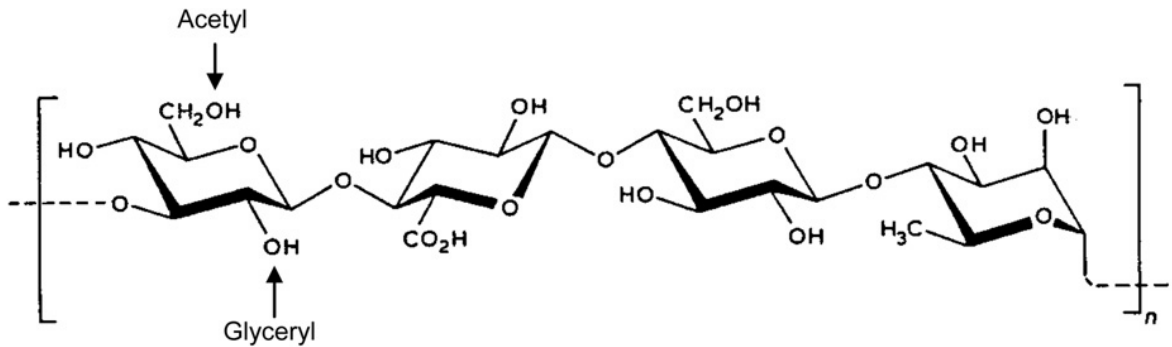
Figura 3. Identificación tentativa de las unidades repetidas del mucílago de nopal. Los 20 residuos (R_1 a R_{20}) contienen xilosa o arabinosa. “Gal A” se refiere a ácido galacturónico, “Rha” se refiere a ramnosa y “Gal” se refiere a galactosa. Tomado de (Gibson y Nobel, 1990).

El mucílago de nopal se considera un polisacárido de potencial industrial, muestra altas propiedades elásticas similares a la del poliisobutileno (Medina-Torres, *et. al.*, 2003); es soluble en agua, produciendo soluciones coloides y modificando la viscosidad de sistemas acuosos (Medina-Torres, *et. al.*, 2000) (Gibson y Nobel, 1990) y retiene grandes cantidades de agua (Hernandez, 2009).

El mucílago como material de soporte de inmovilización ha sido estudiado por Medina y colaboradores en el 2013 para inmovilizar ácido gálico, utilizando la técnica de secado por aspersion y produciendo microcápsulas de mucílago de nopal en forma de un polvo estable (Medina-Torres, *et. al.*, 2013).

2.4.3 Goma gelana.

La gelana es un polisacárido extracelular aniónico producido por *Sphingomonas elodea*. Los grupos acilo presentes en el polímero nativo son removidos por hidrólisis alcalina en la producción normal comercial, dando como resultado una secuencia tetracíclica repetida de glucosa, ramnosa y ácido glucurónico en relación molar de 2:1:1 que se unen para formar una estructura lineal: de glucosa (Glc ρ), ácido glucurónico (Glc ρ A) y ramnosa (Rhap) en forma: $\rightarrow 3)-\beta$ -d-Glc ρ -(1 \rightarrow 4)- β -d-Glc ρ A-(1 \rightarrow 4)- β -d-Glc ρ -(1 \rightarrow 4)- α -l-Rhap-(1 \rightarrow . (Danalache, *et. al.*, 2015) (Figura 4).



→ 3)-β-D-Glcp-(1 → 4)-β-D-GlcpA-(1 → 4)-β-D-Glcp-(1 → 4)-α-L-Rhap-(1 →
Figura 4. Estructura de la goma gelana. Tomada de: (Morris, *et. al.*, 2012).

En la industria alimentaria la gelana se ha utilizado como estabilizante, gelificante, formador de películas y agente encapsulante. Estas propiedades múltiples se deben a su reactividad a cationes y su habilidad para formar geles a concentraciones más bajas que otros hidrocoloides (Morris, *et. al.*, 2012).

La formación del gel se concibe con la formación de espirales aleatorias para después someterse a una transición de doble hélice, se pueden formar geles más fuertes si existen cationes, particularmente cationes divalentes que contribuyen a formar geles fuertes mediante la agregación de hélices (Kirchmayer, *et. al.*, 2014).

2.5. Inmovilización para la protección de cepas probióticas en condiciones gástricas.

El sistema gastrointestinal constituye un ecosistema que involucra muchas funciones. Incluyendo actividades metabólicas, efectos tróficos sobre el epitelio intestinal e interacciones con el sistema inmune del huésped. La microflora residente también actúa como barrera para prevenir la colonización de microorganismos patógenos y oportunistas.

El consumo de probióticos ayuda a crear la microflora protectora y previene enfermedades relacionadas con síntomas gastrointestinales, sin embargo es crucial protegerlos para que lleguen viables al colon. La naturaleza ácida del jugo gástrico impide el paso de los probióticos al tracto intestinal. En consecuencia, cualquier probiótico que sobreviva al tránsito gastrointestinal debe tener una alta tolerancia a la acidez. En un ensayo típico de tolerancia a acidez, la viabilidad de los organismos probióticos se determina al exponerlos a bajos pH en una solución buffer o medio durante un periodo de tiempo (Morris, *et. al.*, 2012).

El diseño de soportes de inmovilización como sistemas de entrega de probióticos debe de tomar en cuenta la naturaleza del soporte ya que la viabilidad de las células inmovilizadas puede ser afectada por propiedades fisicoquímicas del soporte de inmovilización como: el tipo y concentración de los materiales, el tamaño de partícula y el número inicial de células. El uso de distintos hidrocoloides puede afectar la viabilidad celular y por consiguiente las propiedades benéficas de los microorganismos (Totosaus, *et. al.*, 2013).

Si el soporte es utilizado como medio de liberación controlada de las cepas en diferentes etapas del sistema gastrointestinal se debe de considerar que el soporte debe de comportarse de manera diferente cuando se encuentra en el estómago y cuando se encuentra en el intestino: Durante el paso por el estómago se debe lograr una mejora en la viabilidad y la retención de bacterias, durante el paso por el intestino, el soporte debe degradarse para dar paso a liberación de las bacterias (Cook, *et. al.*, 2012).

2.6. *Lactobacillus acidophilus*.

Muchas cepas del género *Lactobacillus*, como *Lactobacillus acidophilus* han demostrado producir beneficios profilácticos y terapéuticos en humanos. Algunos beneficios asociados a la cepa son: reducción de los síntomas gastrointestinales relacionados con la intolerancia a la lactosa, alivio de los síntomas de constipación, tratamiento de la diarrea infantil y actividad contra *Helicobacter pylori* (Gopal, 2011).

Lactobacillus acidophilus es una bacteria ácido láctica Gram positiva, de origen humano, con una morfología tipo cocos o bacilos y un tamaño de 2-10 μm ; es una bacteria facultativa, aunque también se considera microaerófila. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 37 - 45 °C. El grupo de *L. acidophilus* requiere nutrientes específicos y sólo se adaptada a crecer en sustratos orgánicos complejos. Su capacidad de fermentación produce ácido láctico, además de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) que incluyen a la lactocina B, Lactacina F, acidocina A y acidocina B. (Gopal, 2011).

A diferencia de otras cepas con propiedades probióticas como *Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* presenta una gran tolerancia a las sales biliares pudiendo sobrevivir y crecer en el tracto intestinal. Además tiene propiedades de adhesión a superficies mucosas, así como a fibras dietéticas como arroz, papa, zanahoria y manzana. (García-Cruz, *et. al.*, 2013) que le confieren una ventaja competitiva de importancia para el mantenimiento dentro del

tracto gastrointestinal y permite interacciones con los enterocitos (Bernet, *et. al.*, 1994).

El trabajo genómico de *Lactobacillus acidophilus* ha identificado regiones importantes en la funcionalidad probiótica, las características probióticas de esta cepa incluyen la producción de bacteriocinas, metabolismo de azúcares y prebióticos, adherencia a células humanas, metabolismo de la lactosa y tolerancia a stress fisiológicos relevantes que incluyen ácidos y sales biliares (Lee y Salminen, 2009).

En general, las características probióticas de *Lactobacillus acidophilus* pueden dividirse en dos categorías: la primera es su fisiología probiótica, relacionada a su tolerancia a pH ácidos, su estabilidad en productos, producción de sustancias antimicrobianas y actividad de lactasa. La segunda categoría abarca los efectos observables en el contexto de estudios de alimentación, como los relacionados a la regulación de respuestas inmunes, reducción en el colesterol del huésped, mejora en el metabolismo de la lactosa y prevención de infecciones (öhman, *et. al.*, 2009). La figura 5 muestra las propiedades genómicas biosintéticas y los efectos probióticos que se han encontrado en *Lactobacillus acidophilus*.

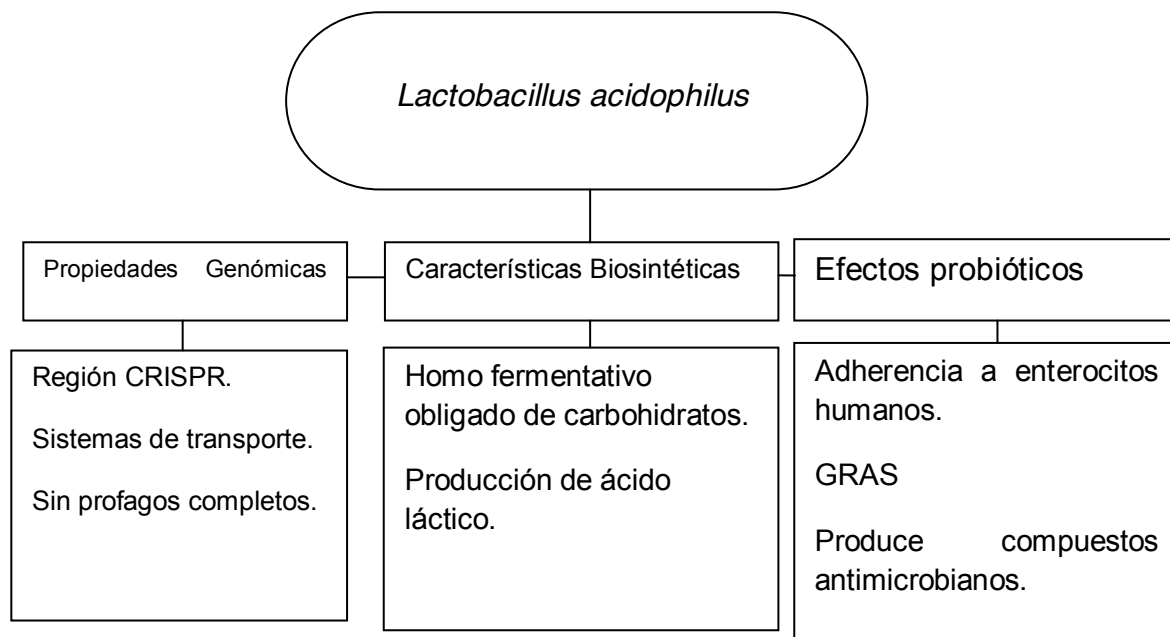


Figura 5. Características biosintéticas, genómicas y probióticas de *Lactobacillus acidophilus*. Modificado de: (öhman, *et. al.*, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN.

Los procesos de encapsulación e inmovilización proporcionan una barrera física que ofrece una mejor protección a los microorganismos probióticos, siendo uno de los principales objetivos de este proceso el mantener la sobrevivencia y la viabilidad de los microorganismos atrapados.

En este sentido, de todos los materiales, el alginato es uno ampliamente investigado y empleado en la inmovilización y encapsulación de células y microorganismos, esto debido principalmente a la facilidad con la que se forman matrices encapsulantes con cloruro de calcio, en un ambiente muy suave y compatible con los microorganismos. Por otro lado el bajo costo y el ser incluido en la categoría de seguro para su uso en alimentos le brindan una ventaja sobre otros materiales de inmovilización. No obstante, se ha reportado que *Lactobacillus* inmovilizados en matrices de alginato no son muy eficientes en ambientes muy ácidos.

Es importante señalar que existen estudios con otros polisacáridos, que han sido empleados como soporte de atrapamiento, los cuales de forma individual no poseen propiedades funcionales importantes que permitan un eficiente inmovilización de microorganismos; sin embargo, también existen otros estudios que proponen el uso de estos materiales de forma compuesta y que proporcionan un efecto sinérgico respecto a la funcionalidad como soportes de individuales de inmovilización.

De esta manera es posible que en un proceso tradicional de inmovilización donde se emplea alginato como soporte principal y se incorporen biopolímeros como gelana y mucílago de nopal, las interacciones de estos biopolímeros tengan un efecto crucial durante el proceso de gelificación, modificando las propiedades mecánicas y de estructura de una matriz de atrapamiento.

Así la incorporación de mezclas de biopolímeros cargados positiva y negativamente con alginato podrían coadyuvar a generar interacciones que den como resultado una mejoría en la estabilidad del alginato y una mayor biocompatibilidad.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto que ofrece un soporte de inmovilización formulado con alginato y combinaciones de goma gelana y mucílago de nopal en la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* inmovilizado.

4.2. Objetivos específicos.

Formular dispersiones de alginato con combinaciones de goma gelana y mucílago de nopal para ser utilizadas como un soporte de inmovilización.

Evaluar las propiedades reológicas de una mezcla de alginato al 2% y comparar los cambios en los perfiles reológicos de sus combinaciones con gelana y mucílago.

Evaluar las propiedades texturales, superficiales y morfológicas de los geles de alginato y sus combinaciones con gelana y mucílago.

Evaluar el rendimiento por atrapamiento que posee *Lactobacillus acidophilus* en las distintas mezclas de alginato, gelana y mucílago destinadas como soportes de inmovilización.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Estrategia experimental.

Para el desarrollo experimental del proyecto se establecieron 2 etapas, la primera consistió en caracterizar las propiedades reológicas, estructurales y morfológicas de los soportes de inmovilización. En la segunda etapa se evaluó el porcentaje de atrapamiento y la viabilidad de *L. acidophilus* en condiciones de pH 2. Las etapas del proyecto se esquematizan en la figura 6.

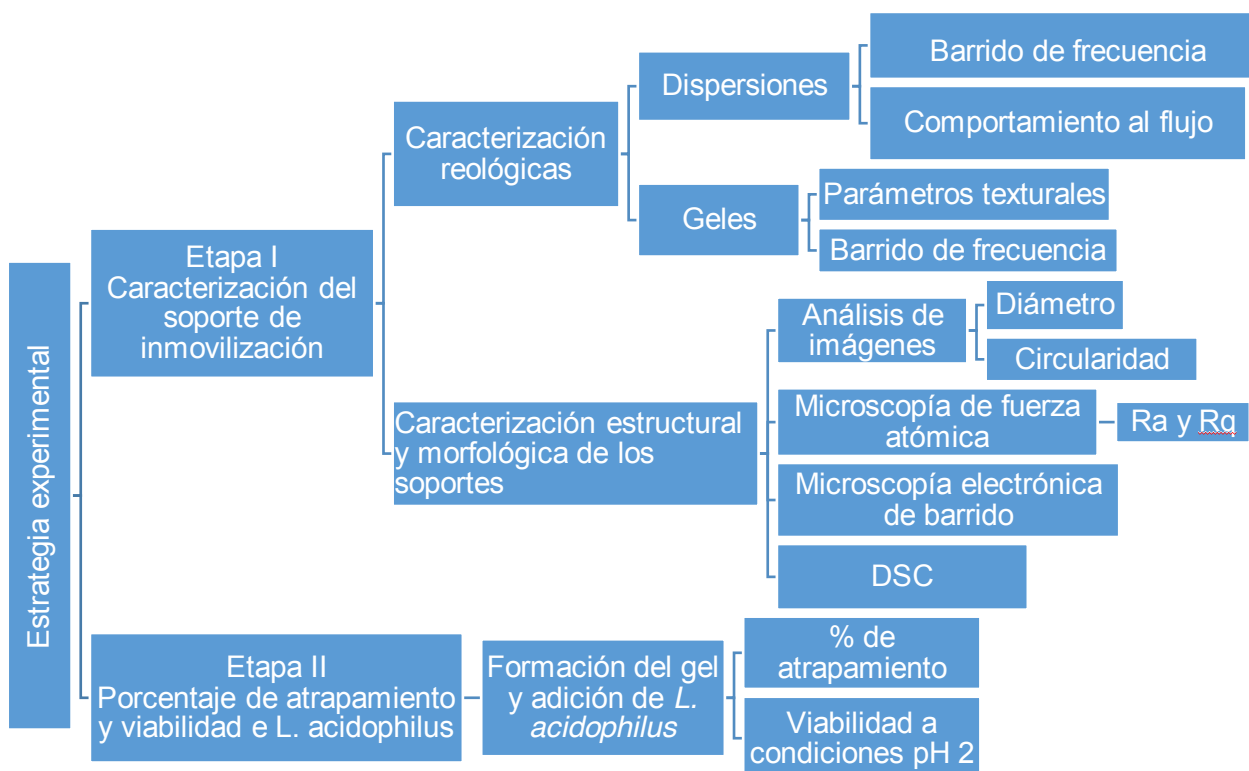


Figura 6. Organigrama de la estrategia experimental del proyecto.

5.2. Materiales.

5.2.1 Materiales utilizados en el soporte de inmovilización.

Los biopolímeros utilizados fueron Alginato de sodio (Reactivos química Meyer, México, con clave de lote: TM1208713), goma gelana de bajo acilo (Kelcogel F, Ingredion, EUA) y Mucílago de nopal (se trabajó con un extracto de mucílago extraído a nivel laboratorio [laboratorio de bioingeniería, UPIBI]. La materia prima fueron pencas de nopal provenientes de un mercado de la Ciudad de México).

5.2.2 Cepa probiótica.

La cepa empleada fue *Lactobacillus acidophilus* aislado de un producto comercial (Kurago Biotek, Ventro). Para aislar la cepa se adiciono un gramo de gel del producto en un matraz con 100 ml de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) el matraz fue incubado durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución salina (0.85%) y se sembraron las tres últimas diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} en medio Agar MRS a razón de 0.1 mL por caja Petri, las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se seleccionó una colonia de cada caja y se sembró cada colonia en una caja Petri formando cuatro estrías para posteriormente ser inoculadas a 37°C durante 24 horas. Se realizó una tinción de Gram de las colonias, las cuales resultaron ser bacilos Gram positivos.

5.2.3 Medios de cultivo.

Se utilizó medio MRS en forma de agar y caldo. Se utilizó la siguiente mezcla para el caldo: Peptona de caseína (10 g/L), Extracto de carne (5 g/L), Extracto de levadura (5 g/L), Glucosa (20 g/L), Fosfato dipotásico (2 g/L), Acetato de sodio (5 g/L), Citrato de amonio (2 g/L), Sulfato de magnesio (0.1 g/L) y Sulfato de manganeso (0.05 g/L). Para preparar Agar MRS se adiciono 13 gramos de Agar-Agar por cada litro de la mezcla anterior.

5.3. Extracción y secado de mucílago de nopal.

Los cladodios de nopal fresco (*Opuntia ficus*) adquiridos en un mercado local de la Ciudad de México fueron limpiados manualmente, lavados y posteriormente sometidos a un proceso de cocción durante aproximadamente diez minutos. El cladodio cocido y entero fue licuado en una licuadora (Osterizer modelo 4108) y posteriormente centrifugado a 8880 rpm por 16 minutos a 24°C en una centrífuga (Beckman Coulter J2-MC). El *pellet* obtenido se descartó y el sobrenadante obtenido se filtró empleando una tela (manto de cielo) previo a verterlo en recipientes de vidrio estéril para su posterior almacenamiento a 4°C (Figura 7).

El mucílago extraído fue secado por aspersión, empleando un secador por aspersión (Buchi Mini Spray Dryer B-290. Suiza), usando las condiciones propuestas por Orozco y colaboradores en el 2006. La temperatura del aire de secado fue de 130°C, la temperatura de salida de 70°C de temperatura de salida y la velocidad de alimentación de 3 mL/min. El polvo obtenido se guardó en un recipiente de vidrio y se almaceno en un desecador hasta su uso.

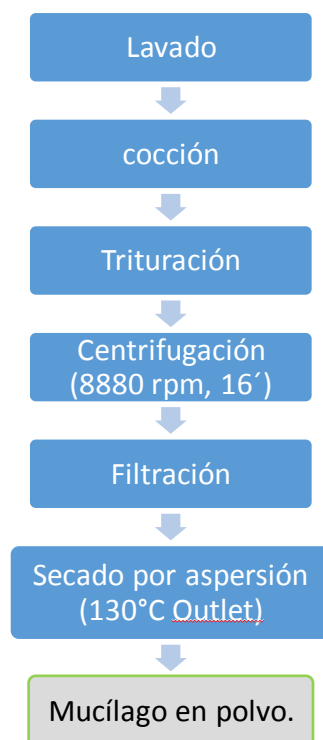


Figura 7. Extracción del mucílago de nopal.

5.4. Caracterización químico proximal del mucílago.

Se caracterizaron los siguientes macrocomponentes del mucílago de acuerdo a la metodología de la norma oficial AOAC (Horwitz y Chemists, 2000).

- 5.4.1 Determinación de la humedad (925.30). Se calculó como la pérdida de peso después de un secado a 65°C hasta peso constante.
- 5.4.2 Determinación de las cenizas totales (923.03). Se calculó como el peso remanente después de calcinar la muestra en mufla a 550°C.
- 5.4.3 Determinación de Lípidos totales (920.39). Se determinó el extracto etéreo por el método de Soxhlet (3 horas de extracción con éter de petróleo) a la muestra desecada.
- 5.4.4 Determinación de proteína (955.04) Se empleó el método micro-Kjendhal, obteniendo el contenido de proteína multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor de correlación que le corresponda.
- 5.4.5 Determinación de carbohidratos por diferencia (925.09), después de determinar humedad, cenizas, lípidos y proteínas.

5.5 Preparación de las dispersiones utilizadas como soporte de inmovilización.

Las dispersiones que se emplearon como soporte de inmovilización consistieron en combinaciones de alginato de sodio, goma gelana y/o mucílago de nopal (tabla 3). Se emplearon cinco mezclas. Para preparar las dispersiones, la concentración de alginato, gelana y mucílago requeridos para cada mezcla se disolvieron en agua destilada a 80°C con una agitación magnética de 400 rpm por aproximadamente 2 horas.

Tabla 3. Mezclas empleadas como soportes de inmovilización.

Mezcla	Alginato de sodio (% m/m)	Gelana (% m/m)	Mucílago de nopal (% m/m)
1	2	1	0
2	2	0.75	0.25
3	2	0.5	0.5
4	2	0.25	0.75
5	2	0	1

5.6 Determinación del pH de las dispersiones.

El pH de cada una de las dispersiones se determinó a 25 °C con un potenciómetro (OAKTON 510).

5.7 Propiedades reológicas del soporte de inmovilización.

Las propiedades reológicas de las mezclas se determinaron utilizando un reómetro de esfuerzo controlado (AR-1000-N TA instruments, EUA.) empleando una geometría de cono y placa (diámetro de 60mm, ángulo de 4°, GAP de 110 μ m) para las dispersiones y una geometría de placas paralelas (diámetro de 40mm y *Gap* de 2mm) *Cross-Hatched* para los geles. Se obtuvieron barridos de frecuencia de 0.2 a 100 rad/s a 25°C dentro de la zona viscoelástica lineal, previa determinación de la misma.

Se graficaron los logaritmos de G' y G'' contra el logaritmo de la velocidad angular, se sometieron a una regresión lineal y las pendientes fueron calculadas siguiendo las siguientes relaciones:

$$G' \text{ o } G'' = A\omega^n \quad (1)$$

$$\text{Log } G' = n \log \omega + \log A \quad (2)$$

$$\text{Log } G'' = n \log \omega + \log A \quad (3)$$

Donde:

G': módulo de almacenamiento (Pa).

G'': módulo de pérdida (Pa).

ω : velocidad angular (rad/s).

n: pendiente (adimensional).

A: intercepción (Pa sⁿ). (Ahmed, *et. al.*, 2008).

5.8 Método de inmovilización.

La técnica utilizada para formar el sistema de inmovilización fue la de extrusión. Una dispersión se gotea en una solución endurecedora de cloruro de calcio (0.2 M) con una agitación de 350 rpm, para la extrusión se utiliza una bomba peristáltica (Cole Palmer Masterflex. EUA). Las esferas se dejan en la solución de cloruro de calcio por 30 minutos a una agitación de 350 rpm. Posteriormente se lavan los geles con agua estéril para remover el exceso de calcio, los geles se almacenan en refrigeración a 4°C.

5.9 Análisis de imágenes.

El estudio de los parámetros morfológicos de las esferas se realizó mediante el análisis digital de imágenes en los soportes antes y después de liofilizar. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital (Olympus SP-320. Japón) acoplada a un microscopio óptico de luz transmitida (Olympus CX31. Japón) utilizando un objetivo 4x. Las imágenes fueron procesadas mediante el software ImageJ v. 1.48 (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland. EUA.), el cual consistió su adaptación de 24 bits a imágenes con tonos de gris de 8 bits. Posteriormente se determinaron los siguientes parámetros: perímetro, área, diámetro de Feret y circularidad (Chandramouli, *et. al.*, 2004) .

5.10 Análisis del perfil de textura.

Para determinar la dureza, cohesividad y resiliencia de los geles se realizaron pruebas de compresión utilizando un texturometro TA-XT2i (Texture Technologies, EUA). Los geles de las diferentes dispersiones se moldearon en cilindros de 10mm de diámetro, adicionando CaCl_2 0.2 M, los geles fueron cortados, obteniendo geles de 10 mm de espesor y se sometieron a una compresión del 50% de su altura (5 mm) en un ciclo de doble compresión (Chandramouli, *et. al.*, 2004)

Los parámetros de textura fueron definidos de la siguiente forma: La Dureza se determinó como la fuerza máxima alcanzada durante la primera compresión, la cohesividad se definió como la relación entre el área positiva de la segunda compresión entre el área de la primera compresión y la resiliencia se determinó como el área positiva y el área negativa de la primera compresión (Figura 8).

$$\text{Cohesividad} = \frac{\text{Área 3}}{\text{Área 1} + \text{Área 2}} \quad (4)$$

$$\text{Resiliencia} = \frac{\text{Área 2}}{\text{Área 1}} \quad (5)$$

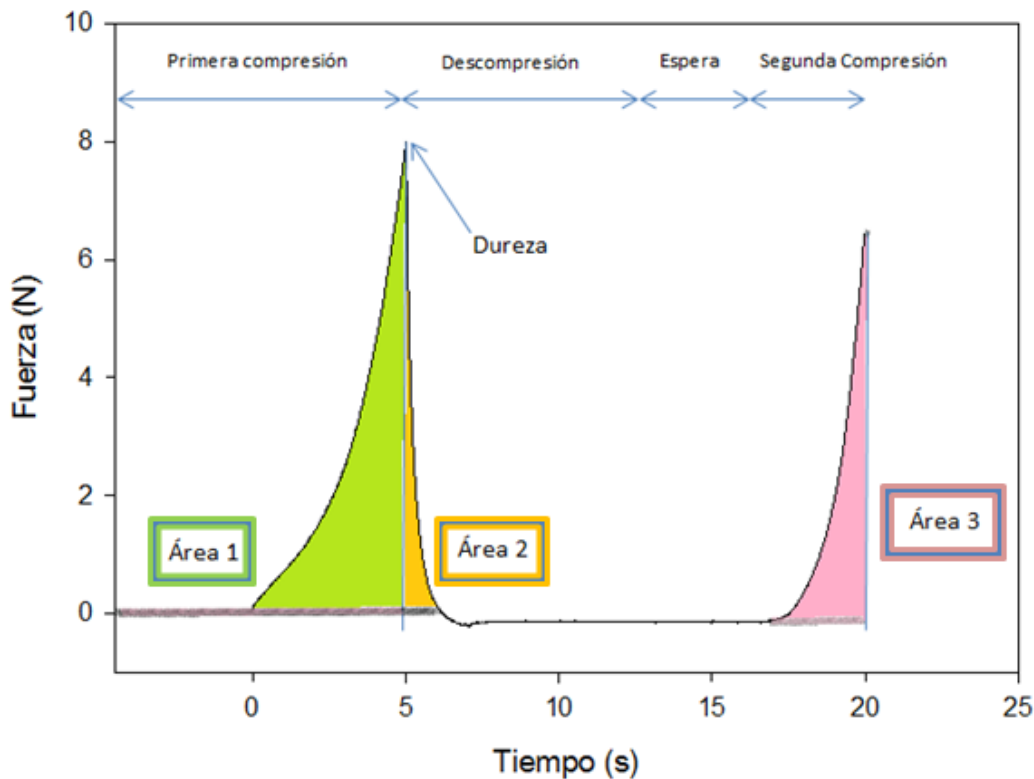


Figura 8. Curva típica de un análisis de textura utilizando una doble compresión. Modificada de: (Chandramouli, *et. al.*, 2004).

Para determinar las áreas bajo las curvas del análisis de textura se empleó la herramienta macros del software Sigma plot v. 10.0 (Systat Software Inc., San Jose, California. EUA).

5.11 Calorimetría diferencial de barrido.

Se obtuvieron termogramas de los geles liofilizados empleando un calorímetro DSC 20130 (TA Instruments, EUA). Utilizando un calentamiento de 15 a 500 °C a una tasa de 10 °C/min. Se utilizó una charola vacía como referencia. Las lecturas fueron calibradas utilizando indio (99.9% pureza).

5.12 Determinación de rugosidad por Microscopía de fuerza atómica.

La rugosidad de los soportes de inmovilización de cada mezcla fue examinada utilizando un microscopio de fuerza atómica (Veeco di multimode V, EUA) en modo *tapping* y un controlador *di nanoscope V* a una frecuencia de escaneo de 1 Hz.

Se utilizó el software *nanoscope analysis* v. 1.40 (Bruker Corp., Camarillo, California. EUA) Para analizar la rugosidad de los soportes determinando los parámetros Ra y Rq.

5.13 Microscopía electrónica de barrido.

La estructura de los soportes liofilizados fue examinada utilizando un microscopio electrónico de barrido (Quanta 3D FEG, FEI, EUA). Se utilizó cinta de doble cara para pegar una muestra de las diferentes mezclas en una celda de acero inoxidable. El voltaje utilizado en el análisis fue de 1KV.

5.14 Absorción de agua de los soportes liofilizados.

La absorción de agua se determinó con base en la cantidad de agua absorbida por los geles liofilizados introducidos en 100 ml de solución salina (0.5% m/v). Los geles hidratados se retiraron de la solución y se secaron con toallas de papel para remover el agua de la superficie. El cambio de peso fue monitoreado a intervalos

de una hora hasta que las mezclas mostraron un peso constante. El cambio de peso a intervalos de una hora se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ Cambio de peso} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{Peso inicial}} * 100 \quad (6)$$

(Fang, *et. al.*, 2011)

5.15 Acondicionamiento del medio de cultivo previo a la inmovilización.

El cultivo se realizó de la siguiente manera: Dos colonias de *Lactobacillus acidophilus* fueron cultivadas por 24 horas a 37 °C en medio MRS (50 ml). La biomasa del fermento fue recolectada por centrifugación a 4,000 g por 10 minutos (Centrifuga Hermle Z306), el pellet se lavó por triplicado con solución salina, posteriormente se adicionó 1 mL de solución salina al pellet para formar un concentrado de biomasa.

5.16 Formación de soportes y adición de bacterias ácido lácticas.

El concentrado de biomasa se incorporó en las dispersiones. Un mililitro del concentrado de biomasa se adicionó a 30 ml de dispersión, agitando magnéticamente a 350 rpm hasta que la dispersión tomó un color uniforme (blanco lechoso). Se continuó con la agitación magnética de la dispersión a 350rpm durante todo el proceso de extrusión con la bomba peristáltica, una vez obtenida la consistencia deseada en la dispersión, ésta se adiciona en forma de gotas en una solución endurecedora de CaCl₂ (0.2M), los geles obtenidos se mantuvieron en agitación a 350 rpm durante 30 minutos. Finalmente, los geles formados se lavaron con agua estéril para remover el exceso de calcio y se almacenan a 4 °C.

Para analizar la rugosidad, el cambio de tamaño por absorción de agua y la estructura por microscopía electrónica de barrido se liofilizaron los soportes en una liofilizadora Labconco freezone 6 plus a -80mbar por 48 horas.

5.17 Rendimiento del atrapamiento.

El rendimiento de atrapamiento de cada gel obtenido en las diferentes mezclas se calculó mediante la relación:

$$EY = \left(\frac{N}{N0} \right) * 100 \quad (7)$$

Dónde:

EY: Rendimiento por atrapamiento (%).

N: Número de células liberadas de las macropartículas (log 10 CFU/g).

N0: Número de células libres (log 10 CFU/g) añadidas a la dispersión durante el proceso de micro encapsulación (Corbo, *et. al.*, 2011).

La liberación de las células se realizó utilizando citrato de sodio 0.1 M. Se disolvió un gramo de gel de cada mezcla en 9 ml de citrato de sodio (0.1M) y se agitó hasta que los geles se disolvieron por completo. De la solución de citrato con soporte disuelto, se tomaron 100 µl y se diluyeron 7 veces en 900 µl de solución salina (0.85%) posteriormente se realizó siembra en placa de las últimas tres diluciones.

5.18 Viabilidad de *L. acidophilus* en condiciones gástricas simuladas.

Para evaluar *in-vitro* el efecto de las condiciones gástricas humanas sobre la viabilidad de *L. acidophilus* libre e inmovilizado en las diferentes mezclas; se evaluó el efecto de jugo gástrico simulado, tomando una muestra de un mililitro de células libres o un gramo inmovilizado. Se adicionaron las células libres o las células inmovilizadas en 50 mL de caldo MRS ajustado a pH 2 con HCl (6 N) (simulando el jugo gástrico) a 37 °C y se revisó la viabilidad después de 60 minutos.

5.19 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS v. 22 (IBM Corp. (Armonk, Nueva York, EUA.), mediante un análisis de varianza, y una prueba de Duncan para determinar la diferencia entre grupos.

VI. Resultados y discusión.

6.1. Análisis químico proximal del mucílago de nopal.

Se realizó una caracterización de los macrocomponentes del extracto de mucílago que se obtuvo del secado por aspersión y se compararon con los obtenidos por Rivera y colaboradores en el 2014 (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis proximal del mucílago de nopal.

Componente	Análisis proximales (g/100 g)	Análisis proximales* (g/100 g)
Carbohidratos	68.36±0.2	66.65±0.61
Grasa	1.18±0.07	0.59±0.00
Proteína	8.52±0.66	6.34±0.14
Cenizas	20.21±0.00	23.19±0.69
Humedad	1.73±0.04	3.23%±0.39

* Valores obtenidos por Rivera y colaboradores (Rivera-Corona, *et. al.*, 2014).

En general el contenido de Cenizas, proteínas y carbohidratos es similar al reportado por Rivera y colaboradores en el 2014, con una gran porción de azúcares, proteínas y cenizas. Parte de la cantidad de cenizas pueden deberse al proceso al que se sometieron los cladodios, (cocción por 10 minutos en agua y un posterior secado por aspersión) Torres y colaboradores reportan un incremento en la cantidad de metales cuando se somete el cladodio a una cocción seguido por un secado por aspersión, probablemente por la cantidad de sales que proporciona el agua (Torres-Bustillos, *et. al.*, 2013). El contenido de humedad puede ser diferente debido a que se trató de un proceso distinto de secado, además el mucílago en polvo se almacenó en un desecador, reduciendo la humedad del ambiente que el mucílago pudiera adquirir durante el almacenamiento.

6.2. pH de las dispersiones.

Las dispersiones no sufrieron ajuste de pH, por lo que la adición de uno u otro polímero provoca un efecto en este parámetro. La adición de mucílago en todas las mezclas disminuye el pH, el mucílago tiene un carácter ácido proporcionado por un grupo carbonilo, este grupo cede H^+ cuando se encuentra en solución.

Tabla 5. pH de las distintas mezclas de alginato, gelana o mucílago.

Mezcla	pH
2% Alginato, 1% Gelana. (Mezcla 1)	6.32
2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago. (Mezcla 2)	5.20
2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago. (Mezcla 3)	4.86
2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago. (Mezcla 4)	4.50
2% Alginato, 1% Mucílago. (Mezcla 5)	4.55
2% Alginato (Control)	5.50

El efecto de las mezclas en el pH se debe a las cargas que se presenta en la dispersión, cuando los polisacáridos aniónicos se encuentran disueltos en agua, los únicos cationes presentes en la solución son aquellos presentes como contraiones a los grupos cargados de las cadenas del polímero. La actividad de estos iones positivos en la totalidad de la solución es reducida por la atracción electrostática de las cadenas de polímeros cargadas negativamente (Morris, *et. al.*, 2012), una mayor atracción por parte de la gelana y el alginato produce menos cationes H^+ libres en la dispersión, en contraparte el mucílago y el alginato, al no presentar una atracción, no logran reducir los protones H^+ que presenta la dispersión, presentándose un pH más ácido.

6.3. Propiedades reológicas de las dispersiones.

El conocimiento sobre la modificación de las propiedades reológicas producidas por utilizar mezclas de polímeros es importante ya que puede influenciar los costos de operación de diferentes etapas en un proceso industrial (Gómez-Díaz y Navaza, 2004). Además la respuesta de un material puede estar condicionada por su estructura molecular, por lo que es un buen método de caracterización.

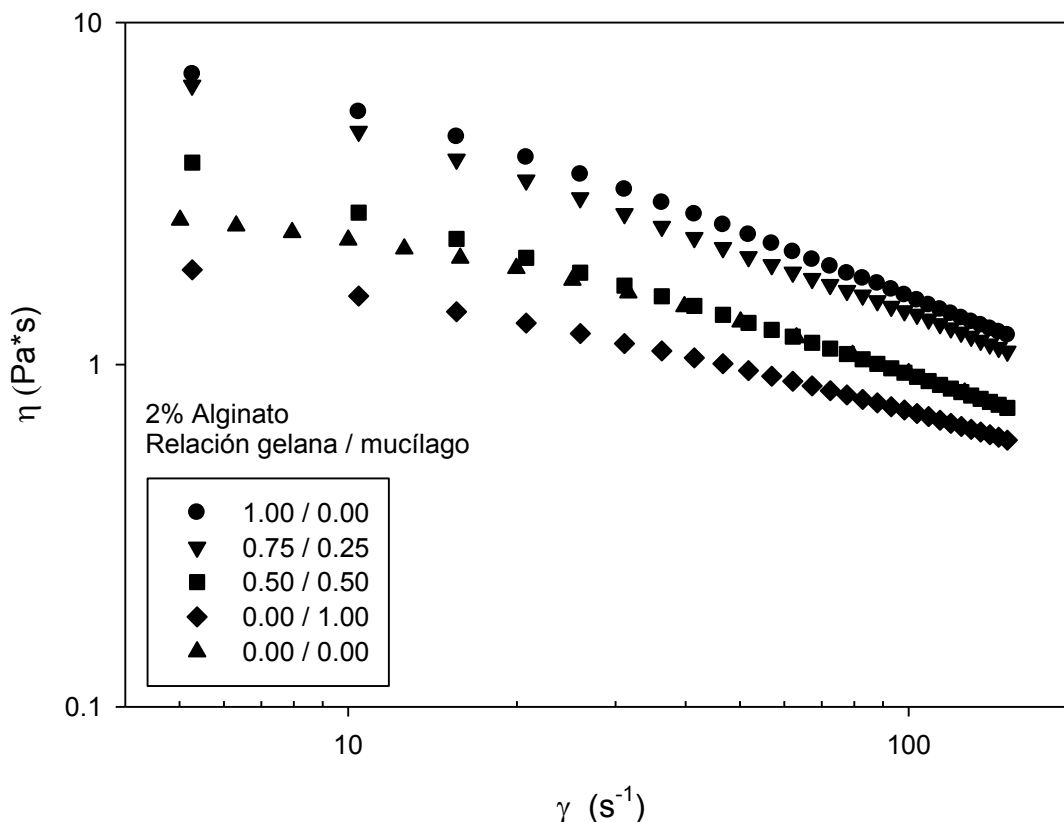


Figura 9. Comportamiento viscoso de las mezclas de alginato, gelana y mucílago. (Mezcla 1 (●), mezcla 2 (▼), mezcla 3 (■), mezcla 5 (◆), control (▲)).

El comportamiento viscoso de las dispersiones de combinaciones de alginato, gelana y/o mucílago (figura 9), muestran la influencia de la velocidad de deformación en la viscosidad de las dispersiones. En general todas las mezclas presentaron un comportamiento reofluidizado por cizalla, la mayor viscosidad se obtuvo en la mezcla al 2% de alginato y 1% de gelana, presentando un efecto sinérgico entre los dos polímeros con respecto al alginato solo. Por otro lado, la sustitución de la gelana por el mucílago produjo una disminución en los valores de viscosidad, siendo más evidente dicha disminución cuando se empleó la fórmula 2%

alginato y 1 % mucílago. El incremento de la viscosidad entre el alginato y la gelana plantean una mayor compatibilidad entre dichos polímeros.

La relación de la viscosidad con la compatibilidad de mezclas poliméricas se basa en las interacciones repulsivas de polímeros que causan un encogimiento de las redes de las moléculas poliméricas, resultando en unos valores de viscosidad reducidos. Si existe una interacción atractiva en la mezcla de polímeros, la viscosidad se incrementa y el sistema es compatible (Mathew, *et. al.*, 1998) (Prasad, *et. al.*, 2012). Resultados semejantes han sido reportados por Haque y Sheela en el 2013 donde una combinación de más del 70% de quitosan en una mezcla con Eudragit incrementa la atracción molecular de los polímeros en solución modificando los parámetros hidrodinámicos (Haque y Sheela, 2013), así mismo la mezcla de gelana con gelatina presenta un efecto de dilución que aparece cuando la concentración de gelatina aumenta sugiriendo la inexistencia de interacciones entre los dos polímeros al no modificar los parámetros hidrodinámicos (Lee, *et. al.*, 2003)

La compatibilidad del alginato y la gelana ha sido sugerida por Rosas y colaboradores en el 2013, una combinación de 2% alginato con 0.2% gelana posee un efecto sinérgico en los valores de viscosidad, aumentando los valores al doble si se compara con una dispersión de 2% alginato. Existe poca información sobre las interacciones moleculares que podrían presentarse entre el alginato y la gelana, se cree que el efecto sinérgico ocurre a través de puentes de hidrogeno entre estos dos polímeros dando como resultado un sistema más estructurado que el de sus formas individuales (Rosas-Flores, *et. al.*, 2013).

Para ajustar los datos experimentales de soluciones macromoleculares de polímeros en configuración aleatoria, como es el caso de los galactomananos y en particular el mucílago de nopal, se ha utilizado el modelo de Cross (8) (Medina-Torres et al., 2000).

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\lambda}\right)^m} \quad (8)$$

En el modelo de Cross, η_0 indica valores de viscosidad a bajos esfuerzos de corte, el parámetro λ indica el tiempo característico del material, la magnitud de m está relacionada con el índice de flujo (Medina-Torres, *et. al.*, 2000).

Las soluciones macromoleculares analizadas bajo los valores de regresión del ajuste del modelo de Cross fueron satisfactorias ($R^2=0.99$). Los parámetros del modelo calculado se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros del modelo de Cross de las dispersiones de alginato, gelana o mucílago.

Mezcla	Composición	Parámetros del modelo			
		η_0 (Pa*s)	λ (s)	m	R ²
1	2% Alginato, 1% Gelana.	11.9347	0.1942	0.7638	0.99
2	2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago.	10.781	0.5873	0.6477	0.99
3	2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago.	22.79	2.03	0.529	0.99
4	2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago.	NI	NI	NI	NI
5	2% Alginato, 1% Mucílago.	4.66	0.6477	0.4573	0.99
Control	2% Alginato	3.2896	0.069	0.77	0.99

NI, no identificable.

La mezcla 4 presento la formación de una estructura tipo gel la cual no pudo ser ensayada mediante un análisis de flujo.

Los resultados obtenidos del modelo de Cross muestran que la mezcla 3 presenta los parámetros más altos de η_0 y λ , los valores más altos de η_0 indican una mayor viscosidad a bajos esfuerzos de corte, los valores más altos de λ indican que el cambio de la zona newtoniana a la zona refluidificada por cizalla requiere una mayor cantidad de tiempo, esto se conoce como el tiempo característico del material; es decir el tiempo en el que las cadenas de polímero en la dispersión se alinean, debido al incremento en la tasa de deformación (García-Cruz, *et. al.*, 2013). Lo anterior nos indica que en la mezcla 3 las interacciones de gelana y mucílago presentan un sistema más estructurado que opone una mayor resistencia al movimiento de los polímeros cuando se someten a un esfuerzo. Esto puede estar condicionado por la capacidad de la gelana de formar geles conforme

se reducen valores de pH, promoviendo la formación de redes al reducir las cargas negativas del polímero y reducir las repulsiones electrostáticas entre las hélices (Morris, *et. al.*, 2012).

Durante un barrido de frecuencia, la mezcla de polímeros está sujeta a deformaciones casi infinitesimales, por lo que la respuesta del material está condicionada a su estructura molecular.

Las figuras 10 y 11 muestra cambios en la pendiente de los módulos de almacenamiento y pérdida con respecto a las mezclas, el valor de las pendientes puede apreciarse en la tabla 7.

En los perfiles mecánicos la dispersión compuesta por 1% de mucílago muestra un perfil similar al control por lo que el alginato domina las propiedades mecánicas.

Las dispersiones que poseen gelana muestran una tendencia a disminuir el valor de la pendiente a medida que aumenta la concentración de mucílago. A velocidades angulares altas se muestra el mismo comportamiento para las mezclas 1, 2 y 3 por lo que la interacción alginato y gelana domina el perfil mecánico.

La disminución de la pendiente de G' conforme se agrega mucílago coincide con el efecto visto en los parámetros del modelo de Cross, donde la mezcla 3 presentaba un mayor tiempo característico del material, lo que supone la formación de redes. La disminución en la pendiente de G' que ocurren en las mezclas cuando se agrega mucílago también sugiere que se inicia un proceso de gelificación, un comportamiento típico de un gel lo muestra la mezcla 4.

La mezcla 4 muestra una independencia de los módulos con respecto a la velocidad angular, además muestra un comportamiento con una G' significativamente más grande que su G'' , presenta un pH propicio para que la gelana forme redes. La adición de mucílago reduce el pH de las dispersiones. En la mezcla 4 se presume un dominio de la estructura por parte de la gelana. Cabe destacar que cuando una mezcla de polímeros se somete a un perfil mecánico es el polímero de mayor concentración generalmente domina las propiedades mecánicas. Sin embargo, si un polímero presenta una propiedad gelificante, éste puede dominar las propiedades mecánicas.

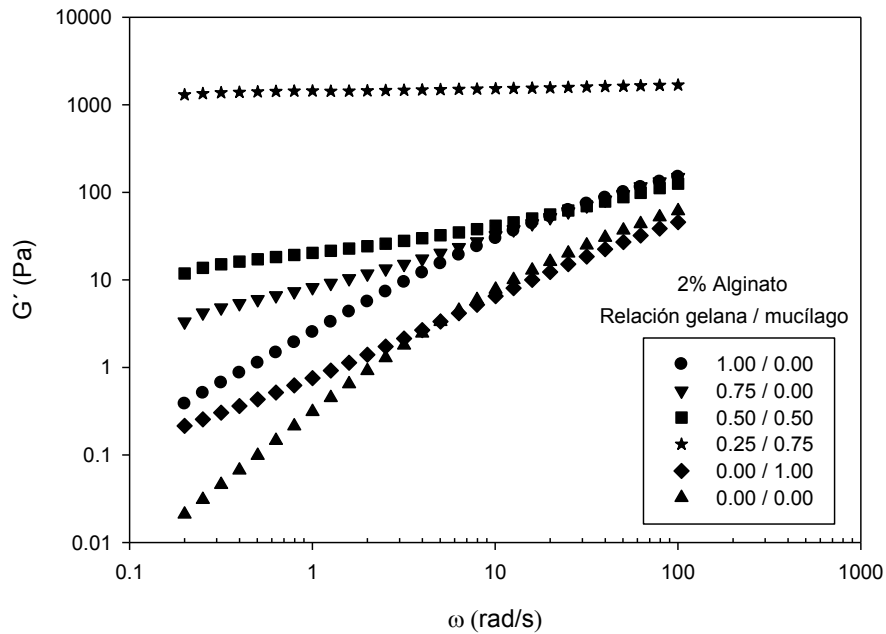


Figura 10. Módulo de almacenamiento de dispersiones de alginato, gelana y/o mucílago. Mezcla 1 (●), mezcla 2 (▼), mezcla 3 (■), mezcla 4 (★), mezcla 5 (◆), control (▲).

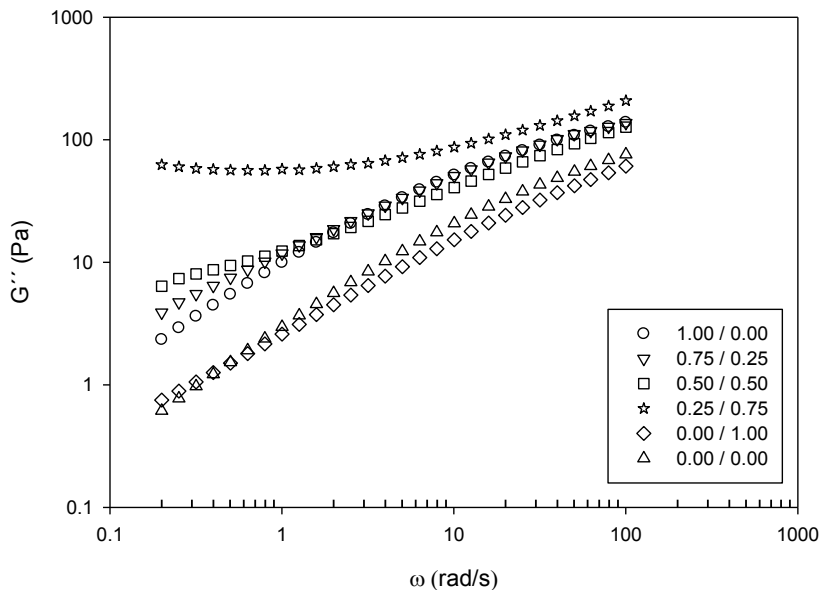


Figura 11. Módulo de pérdida de dispersiones de alginato, gelana y/o mucílago. Mezcla 1 (○), mezcla 2 (▽), mezcla 3 (□), mezcla 4 (☆), mezcla 5 (◇), control (△).

Tabla 7. Pendiente de G' y G'' de las dispersiones de alginato gelana y/o mucílago.

Mezcla	$G' = A\omega^{n'}$		$G'' = A\omega^{n''}$	
	n'	R^2	n''	R^2
2% Alginato, 1% Gelana. (Mezcla 1)	0.98	0.99	0.66	0.98
2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago. (Mezcla 2)	0.60	0.99	0.58	0.99
2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago. (Mezcla 3)	0.36	0.98	0.49	0.99
2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago. (Mezcla 4)	0.03	0.97	0.2	0.85
2% Alginato, 1% Mucílago. (Mezcla 5)	0.89	0.99	0.72	0.99
2% Alginato. (Control)	1.31	0.98	0.78	0.99

Los barridos de frecuencia de las mezclas cuando se someten a gelificación en una solución de $CaCl_2$ muestran un cambio en los módulos de almacenamiento y pérdida. Un gel presenta un comportamiento cercano al “perfectamente elástico” donde se muestra una G' mayor a G'' y una G' independiente de la frecuencia. En los barridos de frecuencia se muestran una mejor estructura del gel conforme existe una mejor independencia de G' y una mejor efectividad del proceso de

formación del gel cuando existe un incremento en la relación G''/G' (Rocheffort, *et al.*, 1986).

La Figura 12 muestra el comportamiento mecánico de los geles formados con la adición de CaCl_2 a las soluciones poliméricas. De acuerdo con la figura, tanto el módulo de almacenamiento como el de pérdida mostraron poca dependencia con la frecuencia. El módulo G' es mayor a G'' este comportamiento es característico de un gel conformado por la presencia de una red tridimensional en el sistema.

La mejor mezcla en cuanto a eficiencia en el proceso de gelificación lo muestra la mezcla 4 al poseer mayor diferencia en la relación G''/G' . La formulación 4 presentó la caracterización de un gel antes de someterse a la solución endurecedora de CaCl_2 y aumenta el valor de G' una vez que se somete a ésta.

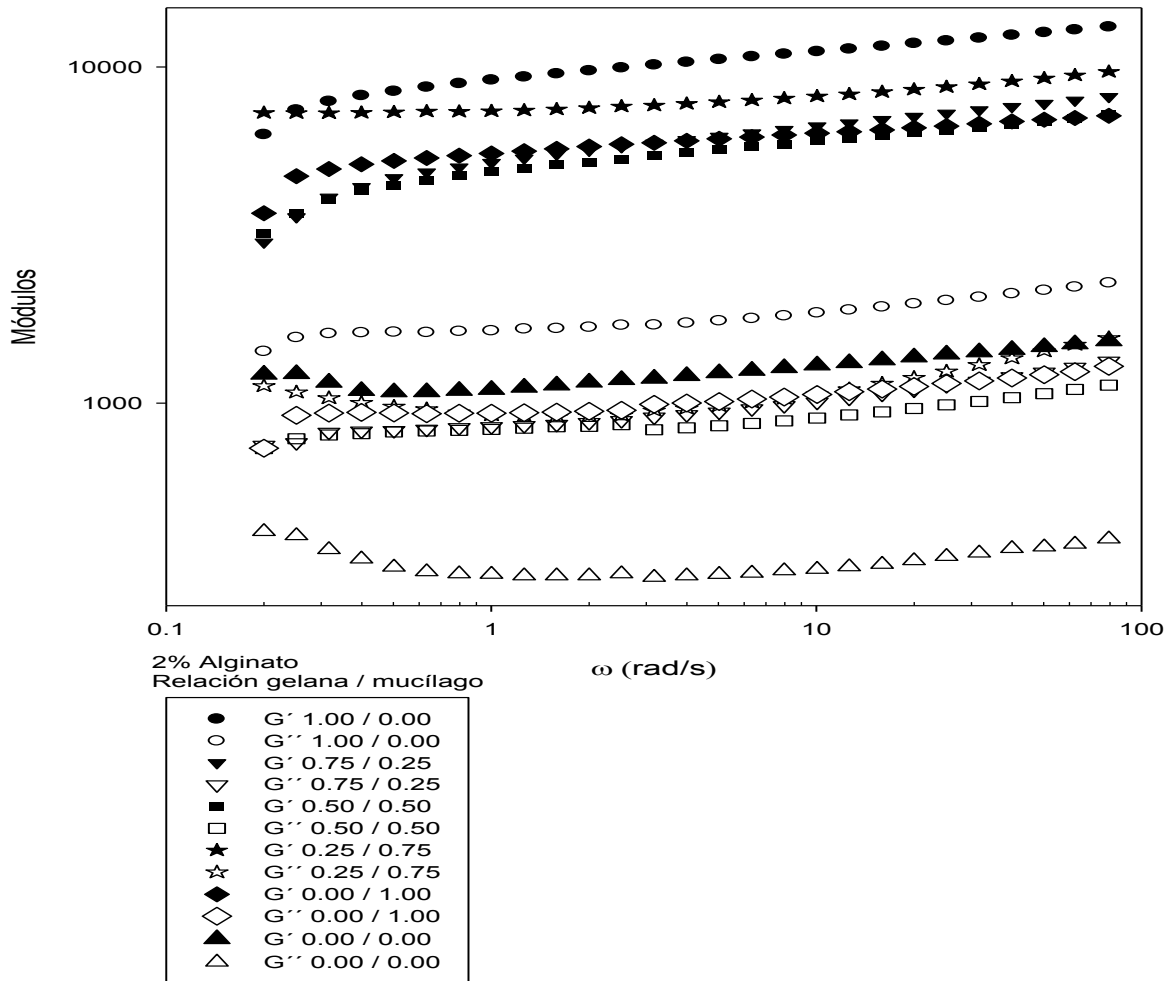


Figura 12. Módulo de pérdida y almacenamiento de las mezclas cuando se someten a un baño de CaCl_2 por 30 minutos.

6.4. Análisis de los perfiles texturales de los geles.

La tabla 8 resume los parámetros obtenidos en las pruebas de textura. De acuerdo con los valores de la tabla existen cambios en la conformación de los geles preparados con cloruro de calcio y las distintas combinaciones presentes en las mezclas, resultando en diferentes propiedades texturales.

La mezcla 1 presentó una resiliencia significativamente mayor y las menores resiliencias se encuentran en las mezclas 2 y 4. Los geles con menor resiliencia presentan una mayor dificultad en regresar a su forma una vez que la fuerza que actúa sobre ellos ha sido eliminada, los geles con una gran cantidad de enlaces internos regresan a su forma original después de una primer compresión.

Los valores de resiliencia menores a 0.2 indican una baja propiedad elástica por parte de los geles. El alginato produce geles de baja y media resiliencia (0.1 – 0.38) que dependen principalmente de la concentración de alginato y la concentración de CaCl_2 (Roopa y Bhattacharya, 2008).

La cohesividad es un indicador de los enlaces internos de una masa semisólida, además indica la cantidad de muestra que se deforma en vez de quebrarse (Tampion y Tampion, 1987) (Rodríguez-Huezo, *et. al.*, 2011). La incorporación de 1% de mucílago a una dispersión de 2% de alginato (Mezcla 5) muestra que la cohesividad es significativamente más grande que los otros tratamientos.

La dureza de los geles mostró diferencias significativas para las Mezclas 3 y 4, incrementando aproximadamente al doble la fuerza necesaria para lograr una deformación en los geles, sin embargo utilizar solamente el alginato mostró la mayor dureza.

Tabla 8. Parámetros de textura de geles de alginato, gelana y/o mucílago.

Mezcla	Resiliencia	Cohesividad	Dureza (N)
2% Alginato, 1% Gelana. (Mezcla 1)	0.1729±0.04 ^b	0.3120±0.09 ^{a,b}	5.4839±1.4 ^a
2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago. (Mezcla 2)	0.1189±0.08 ^a	0.2862±0.16 ^{a,b}	6.6259±1.0 ^a
2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago. (Mezcla 3)	0.1383±0.05 ^{a,b}	0.3399±0.04 ^b	12.3312±1.0 ^b
2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago. (Mezcla 4)	0.1288±0.10 ^a	0.2187±0.09 ^a	13.0766±1.3 ^b
2% Alginato, 1% Mucílago. (Mezcla 5)	0.1490±0.04 ^{a,b}	0.8758±0.03 ^c	6.5590±1.5 ^a
2% (Control)	Alginato 0.135±0.02 ^{a,b}	0.313±0.03 ^b	16.20±0.5 ^c

Valores en la misma columna con la misma letra como superíndice no representan diferencia significativa (Duncan, $p < 0.05$), $n=5$.

La incorporación de otros hidrocoloides como la gelana y el mucílago redujo la dureza de los geles. Estos resultados son similares a los que reporta Totosaus en el 2013, donde la incorporación de goma de algarrobo y carragenina disminuye la dureza de los geles de alginato (Totosaus, *et. al.*, 2013). El mecanismo de gelificación requiere de la formación de una estructura ordenada, la dureza de un gel depende de que se forme una estructura con cadenas rígidas, la incorporación de otro polímero puede interrumpir la conformación regular que tiene un polímero, disminuyendo la rigidez de las cadenas y por lo tanto la dureza. El incremento en la dureza de los geles para las mezclas 3 y 4 puede deberse a que la dureza de los geles de gelana está determinada por el pH (Picone y Cunha, 2011).

6.5. Calorimetría diferencial de barrido.

Los termogramas obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (figura 13) muestran evidencias de formación de gel en todas las mezclas, la existencia de un pico endotérmico cuando se someten a un calentamiento, además no se pudo detectar un pico exotérmico; lo que indica que no existe degradación del polímero debido a reacciones de despolimerización, posiblemente debido a la formación de redes o estructuras como la conformación de “caja de huevo”.

El control de alginato al 2% muestra 2 picos endotérmicos (180 °C y 210°C). Las mezclas 1,2 y 4 muestran amplios picos endotérmicos a una temperatura de 212-213 °C. La mezcla 5 muestra un pico endotérmico en 223. Los picos endotérmicos de las mezclas 1,2 y 4 parecen estar relacionados a la gelana en su composición, ya que la adición de mucílago, aumenta la temperatura de transición como se ve en la mezcla 5.

La mezcla 3 muestra un pico endotérmico a 180°C parecido al que muestra el control de alginato, la similitud en sus perfiles de los termogramas en la mezcla 3 y el control puede deberse a que no domine uno de los tres polímeros de la mezcla.

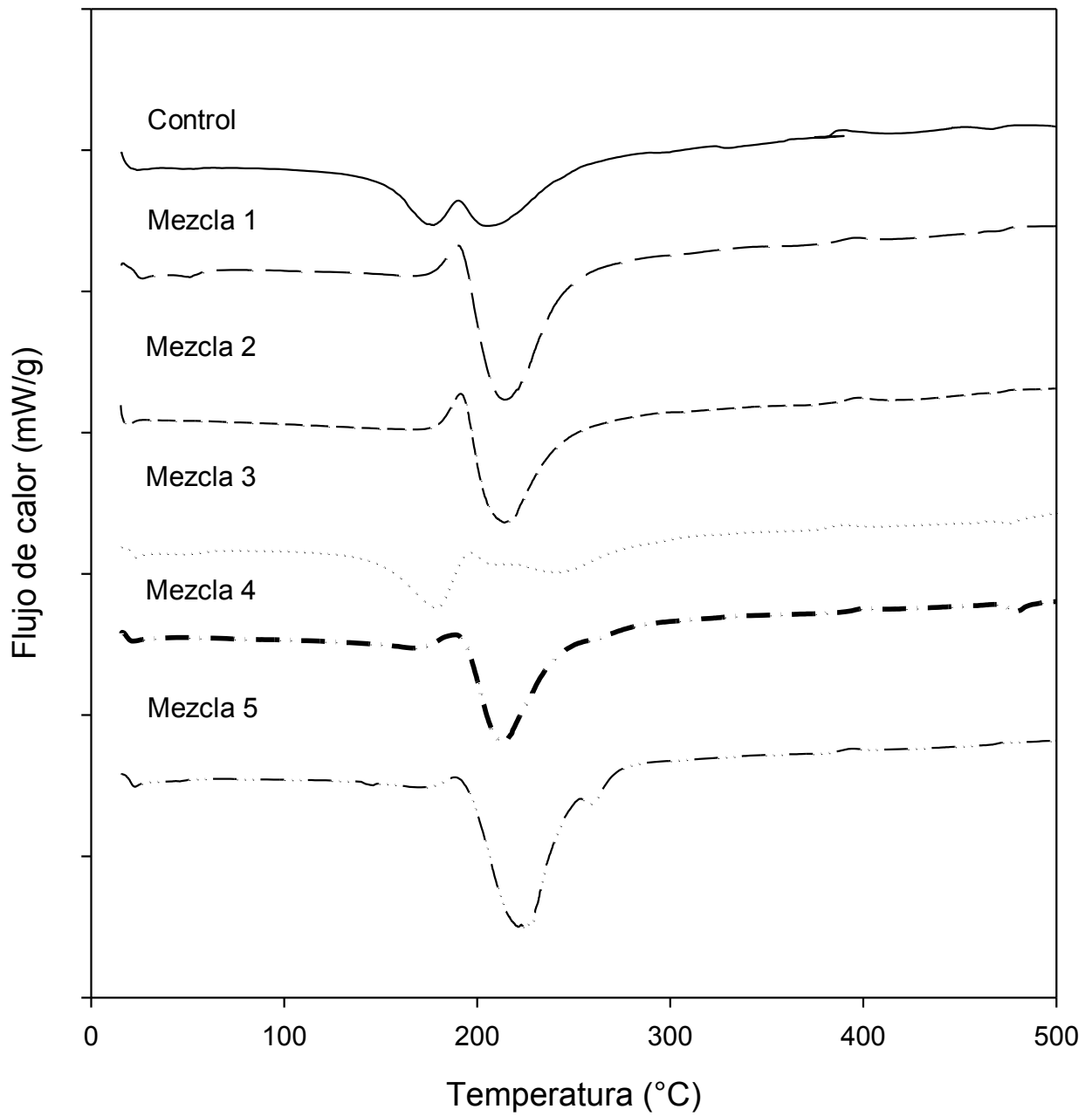


Figura 13. Termograma de geles de alginato, gelana y mucílago.

Tabla 9. Pico endotérmico de los termogramas de las diferentes mezclas.

Mezcla	Pico endotérmico
2% Alginato, 1% Gelana. (Mezcla 1)	212 °C
2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago. (Mezcla 2)	213 °C
2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago. (Mezcla 3)	180 °C
2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago. (Mezcla 4)	213 °C
2% Alginato, 1% Mucílago. (Mezcla 5)	222 °C
2% Alginato. (Control)	180 °C y 210 °C

6.6. Parámetros morfológicos de los soportes antes y después de liofilizar.

Tabla 10. Parámetros morfológicos de los soportes antes de liofilizar.

Mezcla	Área (mm ²)	Perímetro (mm)	Circularidad	Diámetro de Feret (mm)
2% Alginato, 1% Gelana. (Mezcla 1)	8.45±1.11 ^a	10.46±0.64 ^a	0.97±0.03 ^d	3.45±0.18 ^a
2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago. (Mezcla 2)	12.60±2.4 ^c	12.91±1.28 ^c	0.93±0.00 ^c	4.50±0.43 ^c
2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago. (Mezcla 3)	10.73±2.8 ^b	12.01±1.51 ^b	0.92±0.00 ^{b,c}	4.12±0.46 ^b
2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago. (Mezcla 4)	15.13±1.81 ^c	14.56±0.95 ^d	0.89±0.03 ^b	5.01±0.27 ^d
2% Alginato, 1% Mucílago. (Mezcla 5)	11.69±2.45 ^c	14.16±1.55 ^d	0.73±0.07 ^a	4.99±0.59 ^d
2% (Control)	5.91±1.24 ^e	8.7±0.92 ^e	0.97±0.01 ^d	2.97±0.23 ^e

Valores en la misma columna con la misma letra como superíndice no representan diferencia significativa (Duncan, $p < 0.05$), $n=39$.

Los parámetros morfológicos de las mezclas muestran un incremento en los parámetros relacionados con el tamaño de los geles (área, perímetro y diámetro de Feret) cuando se agrega mucílago de nopal, así mismo, existe un decremento en los parámetros de forma (circularidad) a medida que se agrega mucílago.

La viscosidad de la dispersión es un parámetro importante en el tamaño de los soportes, en general el diámetro promedio de los soportes disminuye conforme la viscosidad aumenta. La deformación en la forma puede ocurrir con dispersiones que presenten bajas viscosidades, esta deformación ocurre cuando la dispersión choca con la solución endurecedora. Las dispersiones con bajas viscosidades son incapaces de retener su forma esférica ya que cuando la gota entra en la solución endurecedora, las fuerzas viscosas condicionan la retención de la forma. La colisión y la fricción de la solución pueden deformar la gota dando como resultado geles con formas irregulares (Lee, *et. al.*, 2013).

Tabla 11. Parámetros morfológicos de los soportes después de liofilizar.

Mezcla	Área (mm ²)	Perímetro (mm)	Circularidad	Diámetro de Feret (mm)
2% Alginato, 1% Gelana. (Mezcla 1)	4.03±0.74a	7.60±0.76a	0.87±0.05b	2.68±0.35a
2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago. (Mezcla 2)	4.89±1.26b	8.42±1.11b	0.86±0.00b	2.96±0.41b
2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago. (Mezcla 3)	7.85±1.3c	10.82±0.85d	0.84±0.00b	3.73±0.06c
2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago. (Mezcla 4)	4.57±0.97 ^{a,b}	8.27±1.13b	0.84±0.09b	2.95±0.44b
2% Alginato, 1% Mucílago. (Mezcla 5)	5.13±0.98b	9.42±0.82c	0.72±0.00a	3.36±0.3d
2% Alginato. (Control)	1.63±0.26e	4.98±0.35e	0.82±0.10 e	1.76±0.1e

Valores en la misma columna con la misma letra como superíndice no representan diferencia significativa (Duncan, $p < 0.05$), $n=39$.

Para las esferas liofilizadas también existe un incremento en los parámetros de tamaño cuando se le agrega gelana o mucílago, sin embargo solamente la mezcla 5 muestra una diferencia significativa en el decremento del parámetro de la circularidad (parámetro de forma). La mezcla 5 antes y después de liofilizar sugiere la poca interacción de alginato y gelana ya que no puede mantener su forma esférica cuando se somete a gelación y es la que más se deteriora cuando se somete a un proceso de liofilización.

La mezcla 3 muestra los parámetros de tamaño más grandes, además, es el que menores cambios presenta al comparar los soportes antes y después de liofilizar.

La mayor disminución de tamaño al liofilizar ocurre en la mezcla 4 y en el control de alginato al 2% donde el diámetro se reduce cerca de un 40%.

6.7. Capacidad de hinchamiento de los soportes liofilizados.

La capacidad que tiene las mezclas de hincharse en agua se muestra en la figura 14.

Los parámetros físicos de un soporte condicionan la habilidad de éstos para absorber agua, Draget reportó que la reducción de tamaño de esferas de alginato reducen la capacidad de hinchamiento (Draget, *et. al.*, 1996). Sin embargo, la hinchazón de las mezclas en agua no mostró relación con la reducción de tamaño de las esferas ya que aunque la mezcla que posee los parámetros de menor tamaño (mezcla 1) supera a las mezclas 2,4 y 5 en absorción de agua. No supera la mezcla 3 que es el que posee los mayores parámetros de tamaño.

La porosidad de los soportes tampoco influyó en la capacidad de absorber el agua, en teoría, mayores porosidades absorberían más agua al tener más superficie de contacto (Lee, *et. al.*, 2013); esto se cumple para la mezcla que presento mayores porosidades (mezcla 1 de acuerdo a microscopía de fuerza atómica), pero no para la mezcla 3 que no presenta diferencias significativas con los valores de rugosidad de las mezclas 2 y 4.

Los parámetros físicos de los soportes no condicionan la adsorción de agua de los soportes de alginato, gelana y mucílago, por lo que es posible que se trate de la estructura química la que condicione la absorción. Generalmente el proceso de hinchamiento de los soportes involucra a los grupos hidrofílicos y se divide en dos pasos: (A) Cuando un hidrogel se encuentra en medio acuoso, existe una hidratación de los grupos hidrofílicos y la agrupación del agua con los grupos hidrofílicos hacen que la red se hinche, posteriormente (B) existe una absorción

adicional del agua libre debido a la presión osmótica. La retracción elástica de la red se opone a la absorción adicional que presenta el medio acuoso en estado libre, logrando que la matriz no se desintegre y disuelva (Zimmermann, *et. al.*, 2003).

En general la habilidad de los soportes de inmovilización de absorber agua es menor cuando se agrega mucílago de nopal. El mucílago de nopal no contribuye a absorber agua a pesar del carácter hidrofílico del mucílago, se ha reportado que algunos polielectrolitos impiden el paso de agua, por lo que el mucílago se puede comportar de esta manera (Pasparakis y Bouropoulos, 2006) (Frenzel, *et. al.*, 2011). Existe una mezcla (mezcla 3) que aunque posea mucílago no parece impedir la absorción de agua en los soportes, esta mezcla dio resultados similares al control en la calorimetría diferencial de barrido donde parece que ninguno de los 3 polímeros se juntan para formar una estructura ordenada.

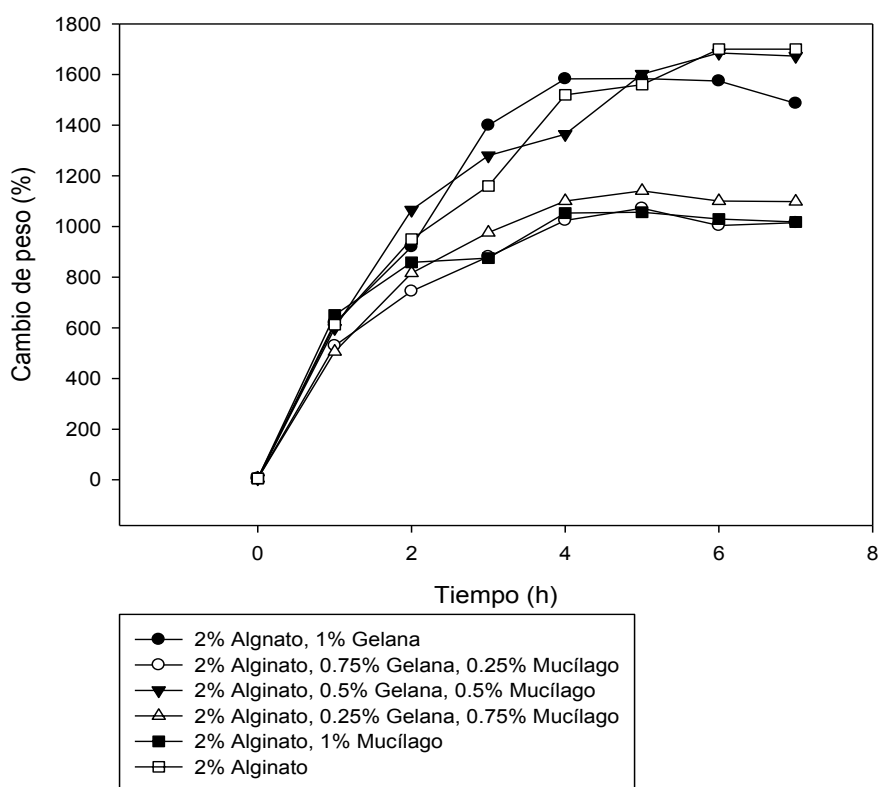


Figura 14. Capacidad de hinchamiento de los geles liofilizados.

6.8. Microscopía de fuerza atómica.

La textura de la superficie de las diferentes mezclas fue determinada usando microscopía de fuerza atómica. Para estimar la rugosidad se determinaron los parámetros estadísticos Ra y Rq.

Ra es el promedio aritmético de los valores absolutos de las desviaciones de la altura de la superficie (Z) (9), mientras que Rq es el promedio de la raíz cuadrada de las desviaciones de la altura tomadas del promedio de los datos de la imagen plana (10) (Antoniou, *et. al.*, 2015). Valores más grandes de estos parámetros indican una estructura más rugosa.

$$Ra = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |Z_j| \quad (9)$$

$$Rq = \sqrt{\frac{\sum Z_i^2}{N}} \quad (10)$$

La figura 15 muestra imágenes obtenidas de la superficie de los soportes liofilizados mediante microscopía de fuerza atómica, éste tipo de imágenes muestra a los puntos brillantes como los puntos altos, mientras que los poros se representan como depresiones oscuras.

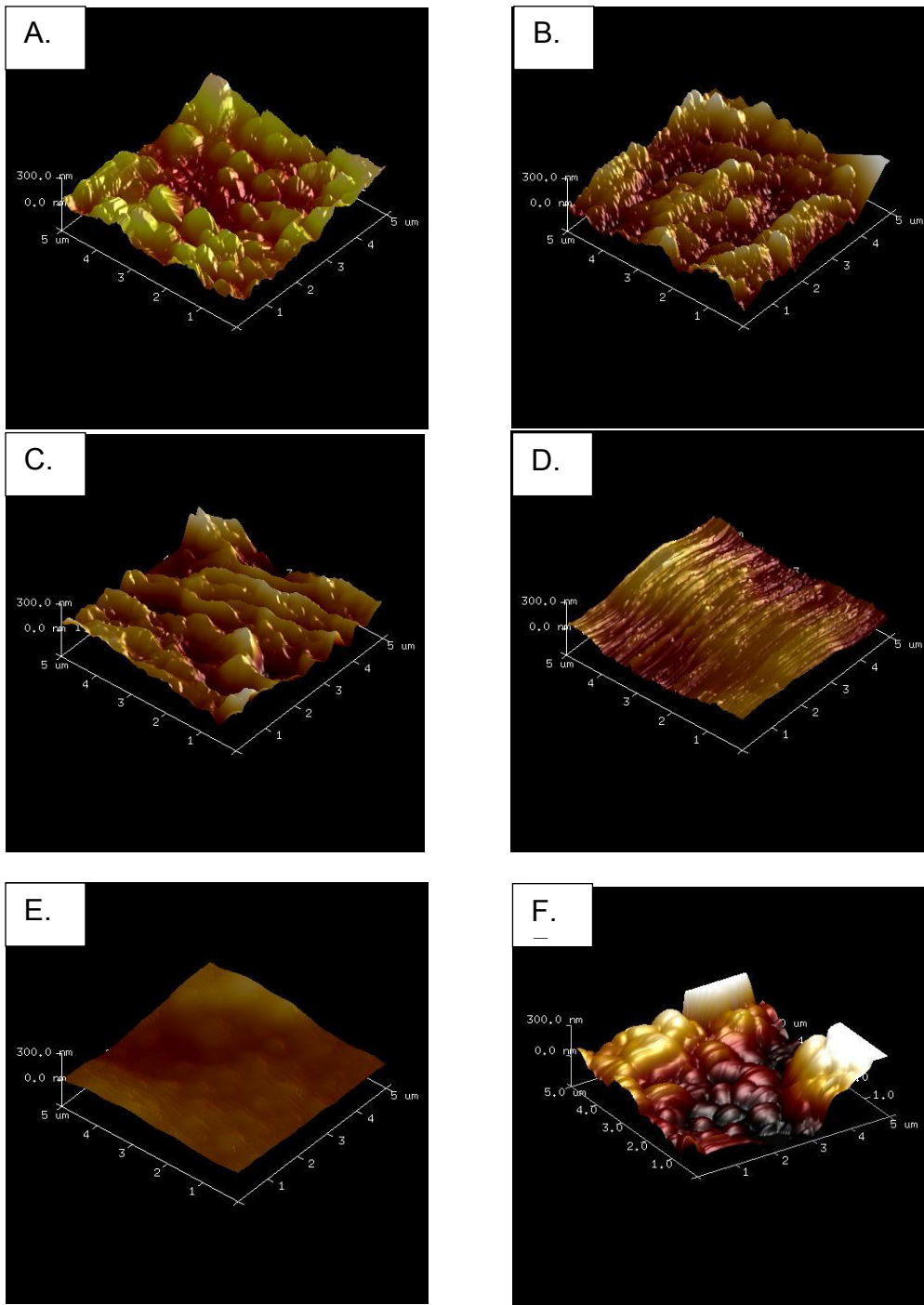


Figura 15. Microscopía de fuerza atómica de la superficie de un soporte liofilizado: A. 2% alginato, 1% gelana; B. 2% alginato, 0.75% gelana y 0.25% mucílago; C. 2% alginato, 0.50% gelana y 0.50% mucílago; D. 2% alginato, 0.25% gelana y 0.75% mucílago; E. 2% alginato, 1% mucílago; F. 2% alginato.

Tabla 12. Parámetros de rugosidad de los geles de alginato, gelana y/o mucílago.

Mezcla				Ra	Rq
2%	Alginato,	1%	Gelana.	87.58±22.2 ^c	108.4±22.51 ^c
(Mezcla 1)					
2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago.				49.34±7.21 ^b	62.1±8.97 ^b
(Mezcla 2)					
2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago.				43.94±8.52 ^b	55.86±10.68 ^b
(Mezcla 3)					
2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago.				41.4b±11.64 ^b	49.94±13.61 ^b
(Mezcla 4)					
2%	Alginato,	1%	Mucílago.	10.97±2.05 ^a	26.29±3.0 ^a
(Mezcla 5)					
2% Alginato. (Control)				48.86±7.5 ^b	60.68±11.06 ^b

Valores en la misma columna con la misma letra como superíndice no representan diferencia significativa (Duncan, $p < 0.05$), $n=5$.

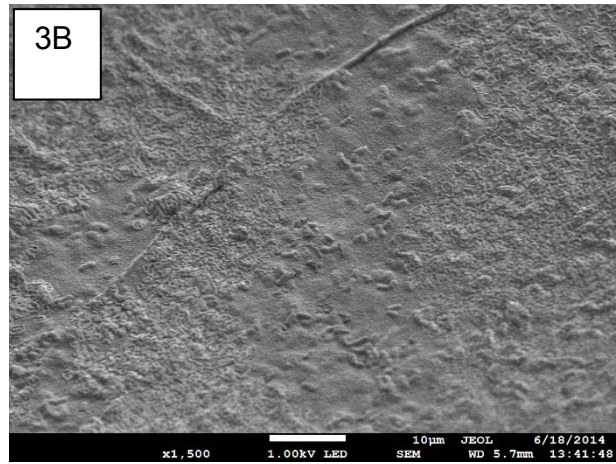
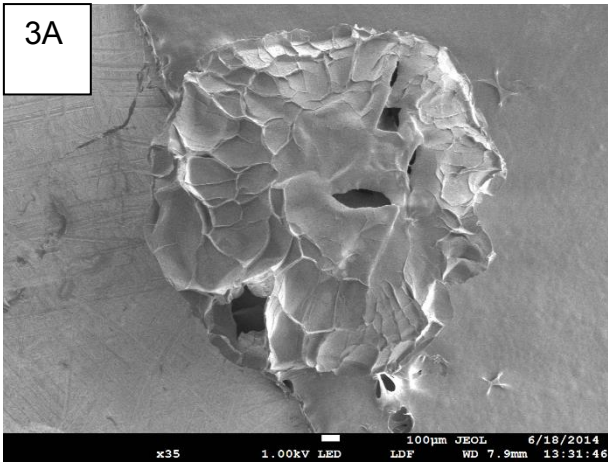
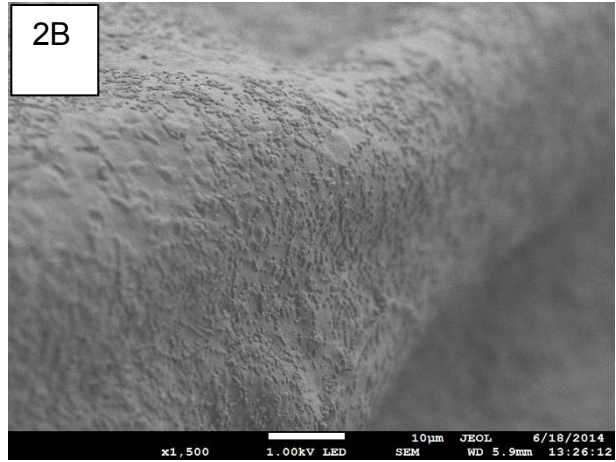
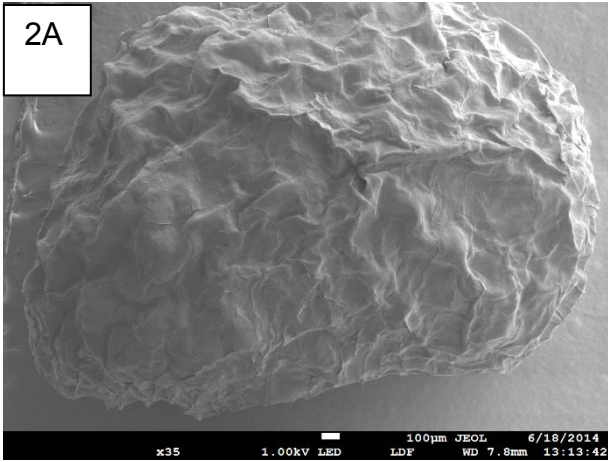
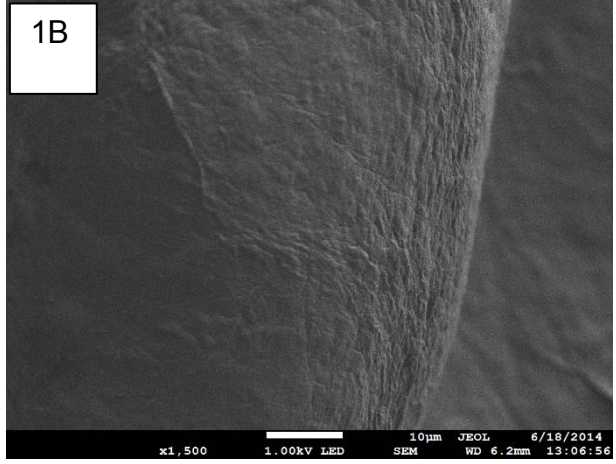
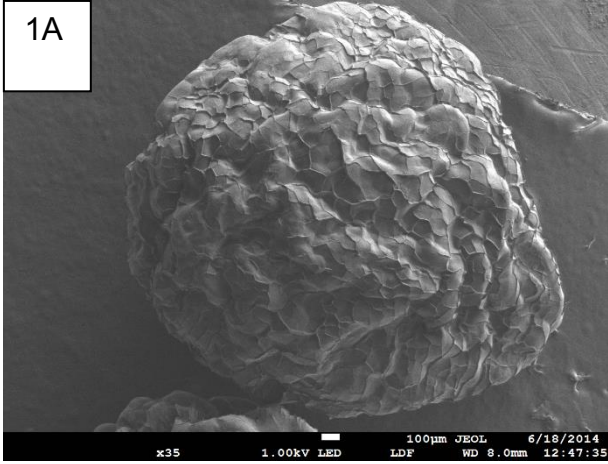
Los parámetros de rugosidad muestran que la adición de 1% de mucílago de nopal o 1% de gelana proporciona diferentes características a la rugosidad del soporte de inmovilización, la gelana aumenta los parámetros de rugosidad mientras que el mucílago los disminuye.

El peso molecular de un polímero es un factor importante que influye en la formación de redes, teniendo un efecto en la superficie del polímero (Sun, *et. al.*, 2013, Zhong, *et. al.*, 2010). El alginato sufre una notable reducción de su peso molecular al reducir el pH a valores menores a 5, induciendo una hidrólisis ácida de los enlaces glicosídicos (Rehm, 2009), la mezcla 5 muestra los valores de pH más bajos, por lo que es posible que sus características en rugosidad sean producto de la reducción del peso molecular del alginato.

6.9. Microscopía electrónica de barrido.

La microscopía electrónica de barrido de los soportes (figura 16) revela una morfología esférica con superficies irregulares para las mezclas 1 y 2. Conforme aumenta la concentración de mucílago a 0.5% (mezcla 3), 0.75% (mezcla 4), y 1% (mezcla 5), la morfología se asemeja a una hojuela. El control de alginato al 2% muestra la morfología de una esfera colapsada. La superficie irregular de todas las mezclas puede ser atribuida a la pérdida de agua durante el proceso de liofilización. Sin embargo, aunque la superficie de todas las mezclas sea irregular la mezcla 1 y 2 poseen mejores cualidades visuales, similares a las que se muestran cuando a los soportes se les agrega una sustancia que actué como relleno (Chan, *et. al.*, 2011).

En algunas mezclas (3 y 5) se encontraron fisuras en la superficie mostrando una estructura dañada. A un aumento de 1500x la superficie de las esferas mostro estructuras continuas con presencia de grumos. La microscopía electrónica de barrido dio a conocer diferentes cualidades morfológicas en las mezclas, sin embargo a magnificaciones de 1,500x no se pudieron observar diferencias en las características de la superficie.



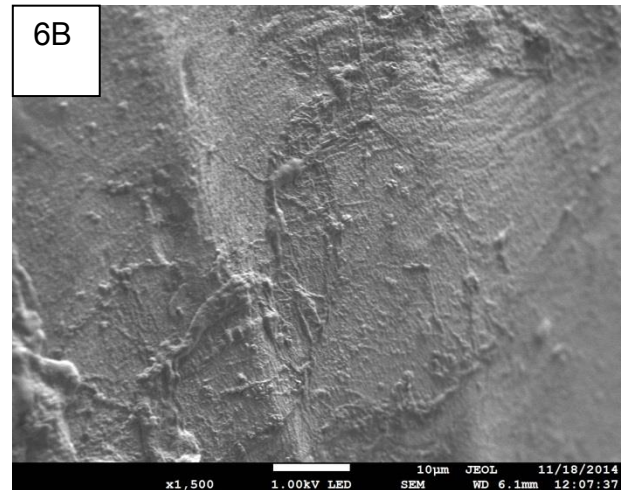
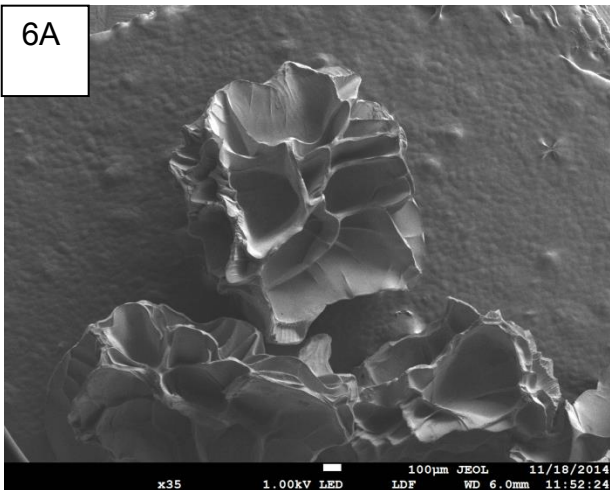
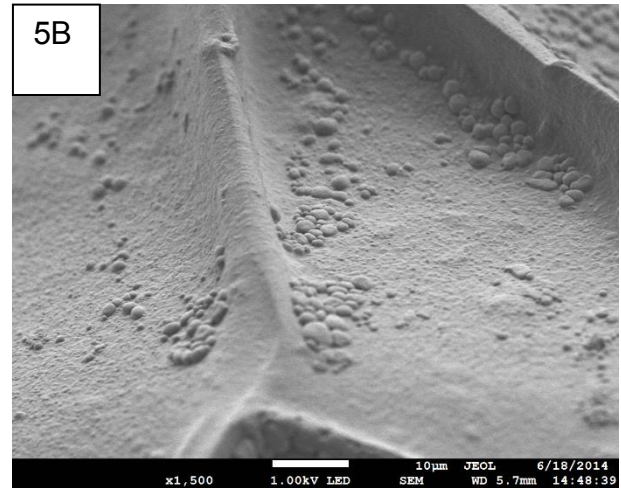
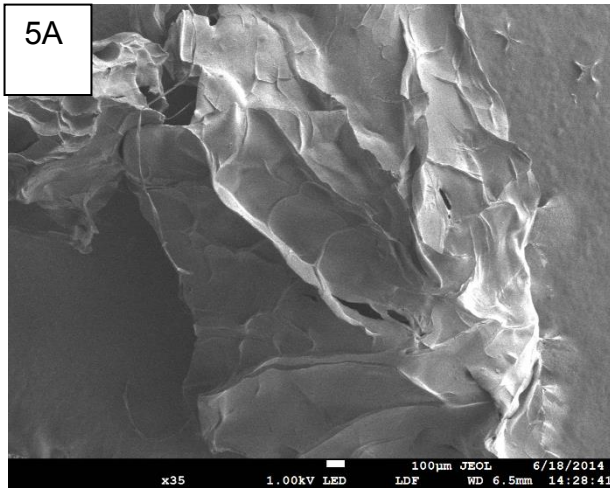
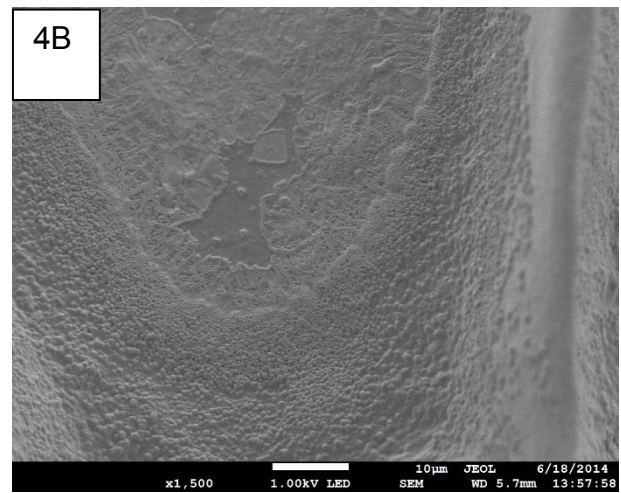
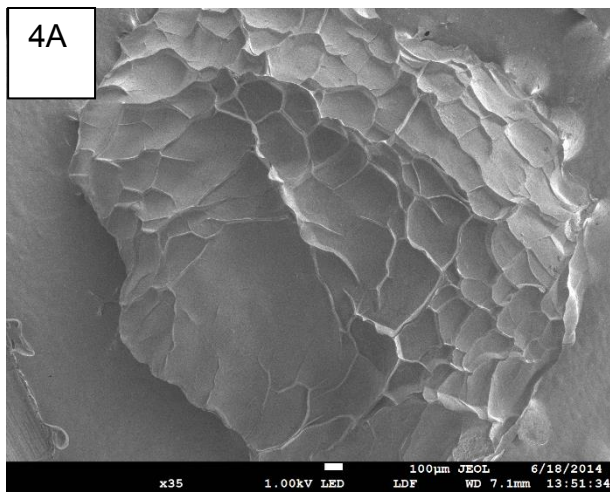


Figura 16. Microscopía electrónica de barrido a magnificaciones de 35x(A) y 1,500x (B) de soportes de inmovilización: 2%Alginato, 1% Gelana (1); 2% Alginato, 0.75% Gelana, Mucílago 0.25% (2); 2% Alginato, 0.50% Gelana, Mucílago 0.50% (3); 2% Alginato, Gelana 0.25%, Mucílago 0.75% (4); 2% Alginato, Mucílago 1%(5) y 2% Alginato (6).

6.10. Porcentaje de atrapamiento.

El porcentaje de atrapamiento de los probióticos utilizando soportes de alginato es muy variable, se ha reportado porcentajes de atrapamiento altos de 93%, a valores de aproximadamente 50% de atrapamiento (Agrawal, 2005).

Los porcentajes de atrapamiento de las mezclas (figura 17) muestran diferencias significativas con respecto a la combinación de gelana/mucílago. En general, la adición de gelana aumenta el porcentaje de atrapamiento. La mezcla 4 (2% alginato, 0.75% de gelana y 0.25% de mucílago de nopal) es la que presenta el mayor porcentaje de atrapamiento, la caracterización reológica de la mezcla 4 resulto en un gel más estructurado y en un mejor proceso de gelificación, lo que explica el aumento en su porcentaje de atrapamiento.

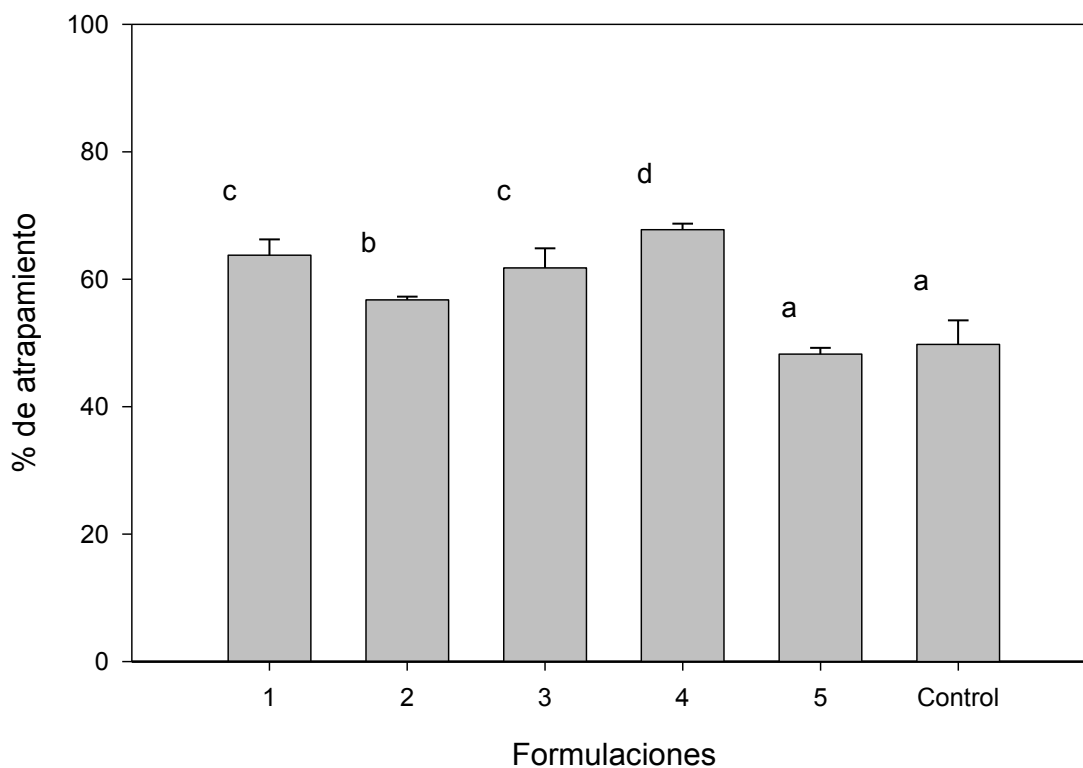


Figura 17. Porcentaje de atrapamiento de las diferentes mezclas. Barras con la misma letra no representan diferencia significativa (Duncan, $p < 0.05$), $n = 4$.

6.11. Viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* inmovilizado en condiciones gástricas simuladas.

La mayor viabilidad la muestran las mezclas 1 y 2 (70.71% y 70.63% respectivamente). La menor viabilidad lo presenta la mezcla 5 (13.97%). Existe una disminución en la viabilidad de *L. acidophilus*, que parece estar relacionada con una adición de mucílago mayor a 0.5% en la mezcla gelana/mucílago. Las mezclas que presentan una concentración de mucílago mayor al 0.5% no presentan una buena capacidad de protección cuando se someten a condiciones de pH 2 si se comparan con un control de alginato o con las células libres (tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de viabilidad a las pruebas gástricas in-vitro.

Mezcla	% de viabilidad después de 60 minutos.
2% Alginato, 1% Gelana. (Mezcla 1)	70.71±6.82 ^a
2% Alginato, 0.75% Gelana, 0.25% Mucílago. (Mezcla 2)	70.63±5.51 ^a
2% Alginato, 0.5% Gelana, 0.5% Mucílago. (Mezcla 3)	35.05±6.63 ^d
2% Alginato, 0.25% Gelana, 0.75% Mucílago. (Mezcla 4)	35.73±4.86 ^d
2% Alginato, 1% Mucílago. (Mezcla 5)	13.97±4.16 ^e
2% Alginato. (Control)	57.20±3.82 ^b
Células libres	48±4.24 ^c

Valores en la misma columna con la misma letra como superíndice no representan diferencia significativa (Duncan, $p < 0.05$), $n=3$.

La mejora en la viabilidad de *L. acidophilus* en condiciones gástricas parece estar relacionada con la compatibilidad que puede presentar la mezcla de gelana/mucílago con el alginato, esta compatibilidad se puede ver en el aumento de la viscosidad cuando se agrega gelana al 1% y 0.75%, además los soportes elaborados con las mezclas 1 y 2, presentan una menor deformación en su estructura cuando se someten a un proceso de liofilización.

Las características físicas que obtiene el soporte al mezclar gelana y mucílago con alginato, no parecen correlacionarse con la mejora en la viabilidad, Totosaus y col., (2013) realizaron una correlación de los parámetros texturales de los soportes de inmovilización con la viabilidad de una cepa probiótica, encontrando que a mayor resiliencia de los soportes mejora la viabilidad de las cepas ácido lácticas (Totosaus, *et. al.*, 2013). Los ensayos realizados en TPA muestran que la mezcla 1 posee una resiliencia significativamente mayor a la de las demás mezclas; sin embargo, no existe diferencia significativa en la viabilidad de la cepa cuando se le somete a condiciones de pH 2 de la mezcla 1 con la mezcla 2, por lo que la mejora en la viabilidad puede no deberse a un parámetro textural por parte de los soportes.

Los parámetros morfológicos tampoco parecen mostrar una relación con la mejora en la viabilidad de *L. acidophilus*, se ha reportado que un mayor tamaño en el soporte de inmovilización mejora la viabilidad en condiciones gástricas (Chandramouli, *et. al.*, 2004); sin embargo, el control de alginato al 2%, la mezcla con menor tamaño, presenta una mejor viabilidad que las mezclas 4 y 5 que presentan el mayor tamaño.

VII. Conclusiones.

El presente estudio sugiere que una mejora en la viabilidad de *L. acidophilus* cuando se somete a condiciones gástricas *in-vitro* se relaciona con una adición de la concentración de gelana en 1% o 0.75%. La adición de gelana a la dispersión de alginato provocó un efecto sinérgico en la viscosidad de las dispersiones ensayadas en este trabajo, al adicionar gelana en concentraciones de 1% y 0.75%, los soportes de inmovilización presentan mejores parámetros de circularidad, menores tamaños de soporte y una estructura más estable si se comparan con las otras mezclas.

Las propiedades reológicas de las mezclas muestran un comportamiento reofluidificado por cizalla, los cuales se correlacionan con el modelo de Cross.

En el análisis de textura se encontró que la adición de otro hidrocoloide (gelana o mucílago) al alginato hace que el soporte reduzca su dureza. Sin embargo la incorporación de estos hace que aumente otras propiedades texturales, en el caso de gelana, la adición de 1% aumenta la resiliencia del soporte y la adición de 1% de mucílago incrementa la cohesividad.

El análisis térmico de los soportes liofilizados muestra que no hay cambio en la temperatura de cristalización para las mezclas 1,2 y 4.

La adición de 1% de gelana aumenta la rugosidad de las soportes y la adición de 1% de mucílago disminuye la rugosidad. Los sistemas de tres polímeros no afectan los parámetros de rugosidad alginato al 2%.

La adición de gelana en los diferentes soportes de inmovilización mejora el atrapamiento de *Lactobacillus acidophilus* comparándolo con un soporte de alginato al 2%.

La adición de 1% y 0.75% de gelana a los soportes con alginato brindaron una mayor viabilidad en *Lactobacillus acidophilus* (70%) bajo condiciones de gástricas *in-vitro*.

VIII. Referencias bibliográficas.

- Agrawal, Renu. "Probiotics: An Emerging Food Supplement with Health Benefits." *Food Biotechnology* 19, no. 3 (2005): 227-46.
- Ahmed, Jasim, Hosahalli S. Ramaswamy, and Vijaya G. S. Raghavan. "Dynamic Viscoelastic, Calorimetric and Dielectric Characteristics of Wheat Protein Isolates." *Journal of Cereal Science* 47, no. 3 (2008): 417-28.
- Antoniou, John, Fei Liu, Hamid Majeed, and Fang Zhong. "Characterization of Tara Gum Edible Films Incorporated with Bulk Chitosan and Chitosan Nanoparticles: A Comparative Study." *Food Hydrocolloids* 44, no. 0 (2015): 309-19.
- Bansode, S.S., S.K. Banarjee, D.D. Gaikwad, S.L. Jadhav, and R.M. Thorat. "Microencapsulation: A Review ". *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 1, no. 2 (2010).
- Bernet, M F, D Brassart, J R Neeser, and A L Servin. "*Lactobacillus acidophilus* La 1 Binds to Cultured Human Intestinal Cell Lines and Inhibits Cell Attachment and Cell Invasion by *Enterovirulent bacteria*." *Gut* 35, no. 4 (1994): 483-89.
- Buitelaar, R.M., C. Bucke, J. Tramper, and R.H. Wijffels. *Immobilized Cells: Basics and Applications: Basics and Applications*. Elsevier Science, (1996).
- Burgain, J., C. Gaiani, M. Linder, and J. Scher. "Encapsulation of Probiotic Living Cells: From Laboratory Scale to Industrial Applications." *Journal of Food Engineering* 104, no. 4 (2011): 467-83.
- Cook, Michael T., George Tzortzis, Dimitris Charalampopoulos, and Vitaliy V. Khutoryanskiy. "Microencapsulation of Probiotics for Gastrointestinal Delivery." *Journal of Controlled Release* 162, no. 1 (2012): 56-67.
- Corbo, Maria Rosaria, Antonio Bevilacqua, and Milena Sinigaglia. "Shelf Life of Alginate Beads Containing *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*: Characterisation of Microspheres Containing *Lactobacillus delbrueckii Subsp. Bulgaricus*." *International Journal of Food Science & Technology* 46, no. 10 (2011): 2212-17.
- Cui, Steve W., Michael A. N. Eskin, Ying Wu, and Shaodong Ding. "Synergisms between Yellow Mustard Mucilage and Galactomannans and Applications in Food Products — a Mini Review." *Advances in Colloid and Interface Science* 128–130, no. 0 (2006): 249-56.
- Champagne, C. P., F. Girard, and N. Gardner. "Growth of Yeast Contaminants in an Immobilized Lactic Acid Bacteria System." *Letters in Applied Microbiology* 8, no. 6 (1989): 207-10.
- Champagne, C. P., N. Morin, R. Couture, C. Gagnon, P. Jelen, and C. Lacroix. "The Potential of Immobilized Cell Technology to Produce Freeze-Dried, Phage-Protected Cultures of *Lactococcus lactis*." *Food Research International* 25, no. 6 (1992): 419-27.
- Champagne, ClaudeP, ByongH Lee, and Linda Saucier. "Immobilization of Cells and Enzymes for Fermented Dairy or Meat Products." Chap. 13 In *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, edited by N. J. Zuidam and Viktor Nedovic, 345-65: Springer New York, (2010).

- Chan, Eng-Seng, Sze-Ling Wong, Peh-Phong Lee, Jau-Shya Lee, Tey Beng Ti, Zhibing Zhang, Denis Poncelet, *et al.* "Effects of Starch Filler on the Physical Properties of Lyophilized Calcium–Alginate Beads and the Viability of Encapsulated Cells." *Carbohydrate Polymers* 83, no. 1 (2011): 225-32.
- Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris, and M. Jones. "An Improved Method of Microencapsulation and Its Evaluation to Protect *Lactobacillus Spp.* In Simulated Gastric Conditions." *Journal of Microbiological Methods* 56, no. 1 (2004): 27-35.
- Chen, Y., M. L. Liao, D. V. Boger, and D. E. Dunstan. "Rheological Characterisation of K-Carrageenan/Locust Bean Gum Mixtures." *Carbohydrate Polymers* 46, no. 2 (2001): 117-24.
- Danalache, Florina, Sara Beirão-da-Costa, Paulina Mata, Vítor D. Alves, and Margarida Moldão-Martins. "Texture, Microstructure and Consumer Preference of Mango Bars Jellified with Gellan Gum." *LWT - Food Science and Technology* 62, no. 1, Part 2 (2015): 584-91.
- Datta, Sumitra, L. Rene Christena, and Yamuna Rani Sriramulu Rajaram. "Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials." *3 Biotech* 3, no. 1 (2013): 1-9.
- de Jong, Saskia, H. Jan Klok, and Fred van de Velde. "The Mechanism Behind Microstructure Formation in Mixed Whey Protein–Polysaccharide Cold-Set Gels." *Food Hydrocolloids* 23, no. 3 (2009): 755-64.
- Del Piano, M., L. Morelli, G. P. Strozzi, S. Allesina, M. Barba, F. Deidda, P. Lorenzini, *et al.* "Probiotics: From Research to Consumer." *Digestive and Liver Disease* 38 (2006): 248-55.
- Draget, K. I., G. Skjåk-Bræk, B. E. Christensen, O. Gåserød, and O. Smidsrød. "Swelling and Partial Solubilization of Alginate Acid Gel Beads in Acidic Buffer." *Carbohydrate Polymers* 29, no. 3 (1996): 209-15.
- Estevinho, Berta N., Ana M. Damas, Pedro Martins, and Fernando Rocha. "Microencapsulation of B-Galactosidase with Different Biopolymers by a Spray-Drying Process." *Food Research International* 64, no. 0 (2014): 134-40.
- Fathi, Milad, Ángel Martín, and David Julian McClements. "Nanoencapsulation of Food Ingredients Using Carbohydrate Based Delivery Systems." *Trends in Food Science & Technology* 39, no. 1 (2014): 18-39.
- Florián-Algarín, Vivian, and Aldo Acevedo. "Rheology and Thermotropic Gelation of Aqueous Sodium Alginate Solutions." *Journal of Pharmaceutical Innovation* 5, no. 1-2 (2010): 37-44.
- Freitas, Sergio, Hans P. Merkle, and Bruno Gander. "Microencapsulation by Solvent Extraction/Evaporation: Reviewing the State of the Art of Microsphere Preparation Process Technology." *Journal of Controlled Release* 102, no. 2 (2005): 313-32.
- Frenzel, Ralf, Christiane Swaboda, Gudrun Petzold, Rico Emmler, and Frank Simon. "Controlling the Water Uptake of Wood by Polyelectrolyte Adsorption." *Progress in Organic Coatings* 72, no. 1–2 (2011): 88-95.

- Gao, Haixiang, Tao Jiang, Buxing Han, Yong Wang, Jimin Du, Zhimin Liu, and Jianling Zhang. "Aqueous/Ionic Liquid Interfacial Polymerization for Preparing Polyaniline Nanoparticles." *Polymer* 45, no. 9 (2004): 3017-19.
- García-Cruz, E. E., J. Rodríguez-Ramírez, L. L. Méndez Lagunas, and L. Medina-Torres. "Rheological and Physical Properties of Spray-Dried Mucilage Obtained from *Hylocereus Undatus* Cladodes." *Carbohydrate Polymers* 91, no. 1 (2013): 394-402.
- Gbassi, Gildas K., and Thierry Vandamme. "Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut." *Pharmaceutics* 4, no. 1 (2012): 149-63.
- Gibson, A.C., and P.S. Nobel. *The Cactus Primer*. Harvard University Press, (1990).
- Gómez-Díaz, Diego, and José M. Navaza. "Rheology of Food Stabilizers Blends." *Journal of Food Engineering* 64, no. 2 (2004): 143-49.
- Gopal, P. K. "Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus Spp.*: *Lactobacillus acidophilus*." In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, edited by John W. Fuquay, 91-95. San Diego: Academic Press, (2011).
- Gorecka, Elzbieta, and Magdalena Jastrzebska. "Immobilization Techniques and Biopolymer Carriers". *Biotechnology food science* 75, no. 1 (2011): 65-86.
- Griffith, M. Patrick. "The Origins of an Important Cactus Crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): New Molecular Evidence." *American Journal of Botany* 91, no. 11 (2004): 1915-21.
- Guevara-Arauz, JuanCarlos, Jos Jesús Ornelas-Paz, DianaJaqueline Pimentel-González, Sergio Rosales Mendoza, RuthElena Soria Guerra, and LuzMaríaTeresita Paz Maldonado. "Prebiotic Effect of Mucilage and Pectic-Derived Oligosaccharides from Nopal (*Opuntia ficus-Indica*)." *Food Science and Biotechnology* 21, no. 4 (2012): 997-1003.
- Haque, Sk Ershadul, and A. Sheela. "Miscibility of Eudragit/Chitosan Polymer Blend in Water Determined by Physical Property Measurements." *International Journal of Pharmaceutics* 441, no. 1-2 (2013): 648-53.
- Heidebach, Thomas, Petra Forst, and Ulric Kulozik. "Microencapsulation of Probiotic Cells by Means of Rennet-Gelation of Milk Proteins." *Food Hydrocolloids* 23 (2009): 1670-77.
- Hernandez, Fabiola Ruiz. "Aplicación De Películas Comestibles a Base De Quitosano Y Mucilago De Nopal En Fresa (*Fragaria ananassa*) Almacenada En Refrigeración." Universidad de las Americas Puebla, (2009).
- Herrero, Mónica, Adriana Laca, Luis A. García, and Mario Díaz. "Controlled Malolactic Fermentation in Cider Using *Oenococcus Oeni* Immobilized in Alginate Beads and Comparison with Free Cell Fermentation." *Enzyme and Microbial Technology* 28, no. 1 (2001): 35-41.
- Homayouni, Aziz, Mohammad Reza Ehsani, Aslan Azizi, Mohammad Saeid Yarmand, and S. Hadi Razavi. "Effect of Lecithin and Calcium Chloride Solution on the Microencapsulation Process Yield of Calcium Alginate Beads." *Iranian Polymer Journal* 16, no. 9 (2007): 597-606.
- Horwitz, W., and Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the Aoac*. Association of Official Analytical Chemists, (2000).

- Inal, Murat, and Mustafa Yiğitoğlu. "Production of Bioethanol by Immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* onto Modified Sodium Alginate Gel." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86, no. 12 (2011): 1548-54.
- Jiménez-Pranteda, María Luján, Denis Poncelet, María Elena Náder-Macías, Antonio Arcos, Margarita Aguilera, Mercedes Monteoliva-Sánchez, and Alberto Ramos-Cormenzana. "Stability of *Lactobacilli* Encapsulated in Various Microbial Polymers." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113, no. 2 (2012): 179-84.
- Kirchmajer, Damian Martin, Benedikt Steinhoff, Holly Warren, Ross Clark, and Marc in het Panhuis. "Enhanced Gelation Properties of Purified Gellan Gum." *Carbohydrate Research* 388, no. 0 (2014): 125-29.
- Kosseva, MariaRaytchinova. "Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes." *Food and Bioprocess Technology* 4, no. 6 (2011): 1089-118.
- Kourkoutas, Y., A. Bekatorou, I. M. Banat, R. Marchant, and A. A. Koutinas. "Immobilization Technologies and Support Materials Suitable in Alcohol Beverages Production: A Review." *Food Microbiology* 21, no. 4 (2004): 377-97.
- Krasaekoopt, Wunwisa, Bhesb Bhandari, and Hilton Deeth. "Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yogurt." *International dairy journal* 13 (2003): 3 - 13.
- Laurenti, Elisa, and Sandra Garcia. "Eficiencia De Materiais Encapsulantes Naturais E Comerciais Na Liberacao Controlada De Probiotico Encapsulado." *Campinas* 16, no. 2 (2013): 107-15.
- Lee, B. B., P. Ravindra, and E. S. Chan. "Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping." *Chemical Engineering & Technology* 36, no. 10 (2013): 1627-42.
- Lee, Kwang Yeon, Jaeyong Shim, In Young Bae, Jaeho Cha, Cheon Seok Park, and Hyeon Gyu Lee. "Characterization of Gellan/Gelatin Mixed Solutions and Gels." *LWT - Food Science and Technology* 36, no. 8 (2003): 795-802.
- Lee, Y.K., and S. Salminen. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. Wiley, (2009).
- Lemay, M. J., C. P. Champagne, C. Gariépy, and L. Saucier. "A Comparison of the Effect of Meat Formulation on the Heat Resistance of Free or Encapsulated Cultures of *Lactobacillus sakei*." *Journal of Food Science* 67, no. 9 (2002): 3428-34.
- Liu, C. A., D. Q. M. Craig, F. C. Hampson, and P. W. Dettmar. "An Investigation into the Rheological Synergy between Xanthan Gum-Locust Bean Gum Mixtures." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50, no. S9 (1998): 149-49.
- Martín, María José, Federico Lara-Villoslada, María Adolfinia Ruiz, and María Encarnación Morales. "Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 27, no. 0 (2015): 15-25.
- Mathew, M., K. N. Ninan, and S. Thomas. "Compatibility Studies of Polymer-Polymer Systems by Viscometric Techniques: Nitrile-Rubber-Based Polymer Blends." *Polymer* 39, no. 25 (1998): 6235-41.

- Medina-Torres, L., E. Brito-De La Fuente, B. Torrestiana-Sanchez, and S. Alonso. "Mechanical Properties of Gels Formed by Mixtures of Mucilage Gum (*Opuntia ficus indica*) and Carrageenans." *Carbohydrate Polymers* 52, no. 2 (2003): 143-50.
- Medina-Torres, L., E. Brito-De La Fuente, B. Torrestiana-Sanchez, and R. Katthain. "Rheological Properties of the Mucilage Gum (*Opuntia ficus indica*)." *Food Hydrocolloids* 14, no. 5 (2000): 417-24.
- Medina-Torres, L., E. E. García-Cruz, F. Calderas, R. F. González Laredo, G. Sánchez-Olivares, J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, and J. Rodríguez-Ramírez. "Microencapsulation by Spray Drying of Gallic Acid with Nopal Mucilage (*Opuntia ficus indica*)." *LWT - Food Science and Technology* 50, no. 2 (2013): 642-50.
- Morris, Edwin R., Katsuyoshi Nishinari, and Marguerite Rinaudo. "Gelation of Gellan – a Review." *Food Hydrocolloids* 28, no. 2 (2012): 373-411.
- Nayak, Amit Kumar, and Dilipkumar Pal. "*Trigonella foenum-graecum* L. Seed Mucilage-Gellan Mucoadhesive Beads for Controlled Release of Metformin Hcl." *Carbohydrate Polymers* 107, no. 0 (2014): 31-40.
- Nayak, Amit Kumar, Dilipkumar Pal, Jyotiprakash Pradhan, and M. Saquib Hasnain. "Fenugreek Seed Mucilage-Alginate Mucoadhesive Beads of Metformin HCl: Design, Optimization and Evaluation." *International Journal of Biological Macromolecules* 54, no. 0 (2013): 144-54.
- öhman, L., A. c Lindmark, S. Isaksson, I. Posserud, H. Strid, H. Sjövall, and M. Simrén. "B-Cell Activation in Patients with Irritable Bowel Syndrome (Ibs)." *Neurogastroenterology & Motility* 21, no. 6 (2009): 644-e27.
- Orozco Carlos, Diaz Sanchez Cristina, Ramirez Dennisse, Yáñez Fernández Jorge. "Secado por aspersion de mucilago de nopal". IX congreso de ciencia de los alimentos, Universidad de Guanajuato, (2006).
- Ozyurt, V. Hazal, and Semih Ötles. "Properties of Probiotics and Encapsulated Probiotics in Food." *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment* 13, no. 4 (2014): 413-24.
- Panouillé, Maud, and Véronique Larreta-Garde. "Gelation Behaviour of Gelatin and Alginate Mixtures." *Food Hydrocolloids* 23, no. 4 (2009): 1074-80.
- Pasparakis, George, and Nikolaos Bouropoulos. "Swelling Studies and in Vitro Release of Verapamil from Calcium Alginate and Calcium Alginate–Chitosan Beads." *International Journal of Pharmaceutics* 323, no. 1–2 (2006): 34-42.
- Pawar, Siddhesh N., and Kevin J. Edgar. "Alginate Derivatization: A Review of Chemistry, Properties and Applications." *Biomaterials* 33, no. 11 (2012): 3279-305.
- Picone, Carolina Siqueira Franco, and Rosiane Lopes Cunha. "Influence of pH on Formation and Properties of Gellan Gels." *Carbohydrate Polymers* 84, no. 1 (2011): 662-68.
- Picone, Carolina Siqueira Franco, and Rosiane Lopes da Cunha. "Interactions between Milk Proteins and Gellan Gum in Acidified Gels." *Food Hydrocolloids* 24, no. 5 (2010): 502-11.

- Prasad, P., G. S. Guru, H. R. Shivakumar, and K. Sheshappa Rai. "Investigation on Miscibility of Sodium Alginate/Pullulan Blends." *Journal of Polymers and the Environment* 20, no. 3 (2012): 887-93.
- Rao, ChSubba, R. S. Prakasham, A. Bhaskar Rao, and J. S. Yadav. "Functionalized Alginate as Immobilization Matrix in Enantioselective L (+) Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 149, no. 3 (2008/06/01 2008): 219-28.
- Rehaim, Amel, Zouhaier Ben Belgacem, Mohammad Reza Edalatian, Beatriz Martínez, Ana Rodríguez, Mohamed Manai, and Nelson Pérez Guerra. "Assessment of Potential Probiotic Properties and Multiple Bacteriocin Encoding-Genes of the Technological Performing Strain *Enterococcus faecium* Mmra." *Food Control* 37, no. 0 (2014): 343-50.
- Rehm, B.H.A. *Alginates: Biology and Applications: Biology and Applications*. Springer, (2009).
- Rivera-Corona, Jose Luis, Francisco Rodríguez-González, Rodolfo Rendón-Villalobos, Edgar García-Hernández, and Javier Solorza-Feria. "Thermal, Structural and Rheological Properties of Sorghum Starch with Cactus Mucilage Addition." *LWT - Food Science and Technology* 59, no. 2, Part 1 (2014): 806-12.
- Rochefort, WillieE, Tim Rehg, and PaoC Chau. "Trivalent Cation Stabilization of Alginate Gel for Cell Immobilization." *Biotechnology Letters* 8, no. 2 (1986): 115-20.
- Rodríguez-Huezo, M.E., C. Lobato-Calleros, J.G. Reyes-Ocampo, O. Sandoval-Castilla, C. Perez-Alonso, and D.J. Pimentel-Gonzalez. "Survivability of Entrapped *Lactobacillus rhamnosus* in Liquid- and Gel-Core Alginate Beads During Storage and Simulated Gastrointestinal Conditions." *Revista mexicana de ingeniería química* 10 (2011): 353-61.
- Roopa, B. S., and Suwendu Bhattacharya. "Alginate Gels: I. Characterization of Textural Attributes." *Journal of Food Engineering* 85, no. 1 (2008): 123-31.
- Rosas-Flores, Walfred, Emma Gloria Ramos-Ramírez, and Juan Alfredo Salazar-Montoya. "Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* Using Alginate and Gellan Gum." *Carbohydrate Polymers* 98, no. 1 (2013): 1011-17.
- Ross, R. P., C. Desmond, G. F. Fitzgerald, and C. Stanton. "Overcoming the Technological Hurdles in the Development of Probiotic Foods." *Journal of Applied Microbiology* 98, no. 6 (2005): 1410-17.
- Russ, Natalie, Birgitta I. Zielbauer, and Thomas A. Vilgis. "Impact of Sucrose and Trehalose on Different Agarose-Hydrocolloid Systems." *Food Hydrocolloids* 41, no. 0 (2014): 44-52.
- Sáenz, Carmen, Elena Sepúlveda, and Betty Matsuhira. "*Opuntia Spp* Mucilage's: A Functional Component with Industrial Perspectives." *Journal of Arid Environments* 57, no. 3 (2004): 275-90.
- Sandoval-Castilla, O., C. Lobato-Calleros, H. S. García-Galindo, J. Alvarez-Ramírez, and E. J. Vernon-Carter. "Textural Properties of Alginate-Pectin Beads and Survivability of Entrapped *Lb. casei* in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt." *Food Research International* 43, no. 1 (2010): 111-17.

- Sarath, Chandran C., Robert A. Shanks, and S. Thomas. "Chapter 1 - Polymer Blends." In *Nanostructured Polymer Blends*, edited by Sabu Thomas, Robert Shanks and Sarathchandran Chandrasekharakurup, 1-14. Oxford: William Andrew Publishing, (2014).
- Song, Huiyi, Weiting Yu, Meng Gao, Xiudong Liu, and Xiaojun Ma. "Microencapsulated Probiotics Using Emulsification Technique Coupled with Internal or External Gelation Process." *Carbohydrate polymers* 96 (2013): 181-89.
- Sultana, Khalida, Georgia Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, and Kaila Kailasapathy. "Encapsulation of Probiotic Bacteria with Alginate-Starch and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yogurt." *International Journal of Food Microbiology* 62 (2000): 47--55.
- Sun, Yang, Yongda Yan, Yingchun Liang, Zhenjiang Hu, Xuesen Zhao, Tao Sun, and Shen Dong. "Effect of the Molecular Weight on Deformation States of the Polystyrene Film by Afm Single Scanning." *Scanning* 35, no. 5 (2013): 308-15.
- Tampion, J., and D. Tampion. *Immobilized Cells: Principles and Applications*. Cambridge University Press, (1987).
- Torres-Bustillos, Luis G., Sandra Carpinteyro Urban, and Carlos Orozco. "Production and Characterization of *Opuntia ficus indica* Mucilage and Its Use as Coagulant-Floculant Aid for Industrial Waste Waters." *International Journal of Biotechnology Research* 1, no. 3 (2013): 38-45.
- Totosaus, Alfonso, Teresita de Jesus Ariza-Ortega, and Maria de Lourdes Pérez-Chabela. "Lactic Acid Bacteria Microencapsulation in Sodium Alginate and Other Gelling Hydrocolloids Mixtures." *Journal of Food and Nutrition Research* 52, no. 2 (2013): 107-20.
- Tripathi, M. K., and S. K. Giri. "Probiotic Functional Foods: Survival of Probiotics During Processing and Storage." *Journal of Functional Foods* 9, no. 0 (2014): 225-41.
- Vemuri, Sriram, and C. T. Rhodes. "Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: A Review." *Pharmaceutica Acta Helveticae* 70, no. 2 (1995): 95-111.
- Voo, Wan-Ping, Pogaku Ravindra, Beng-Ti Tey, and Eng-Seng Chan. "Comparison of Alginate and Pectin Based Beads for Production of Poultry Probiotic Cells." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111, no. 3 (2011): 294-99.
- Yen, Hong-Wei, and Yi-Chih Lee. "Production of Lactic Acid from Raw Sweet Potato Powders by *Rhizopus oryzae* Immobilized in Sodium Alginate Capsules." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, no. 2 (2010): 607-15.
- Yoo, Ik-Keun, Gi Hun Seong, Ho Nam Chang, and Joong Kon Park. "Encapsulation of *Lactobacillus casei* Cells in Liquid-Core Alginate Capsules for Lactic Acid Production." *Enzyme and Microbial Technology* 19, no. 6 (1996): 428-33.
- Zhong, Dan, Xin Huang, Hu Yang, and Rongshi Cheng. "New Insights into Viscosity Abnormality of Sodium Alginate Aqueous Solution." *Carbohydrate Polymers* 81, no. 4 (2010): 948-52.

Zimmermann, H., M. Hillgärtner, B. Manz, P. Feilen, F. Brunnenmeier, U. Leinfelder, M. Weber, *et al.* "Fabrication of Homogeneously Cross-Linked, Functional Alginate Microcapsules Validated by Nmr-, Clsm- and Afm-Imaging." *Biomaterials* 24, no. 12 (2003): 2083-96.