



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

INFORME ESCRITO

Presentado por

Karina Cruz Pacheco
M. en. C. en Bioprocesos

como parte del examen predoctoral dentro del programa de

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Tesis en desarrollo:

**Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp.
bulgaricus bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.**

Dirigida por:

Dr. Enrique Durán Páramo.

México, D..F. 3 de febrero de 2009.

**VIABILIDAD DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* LIBRE E INMOVILIZADO BAJO CONDICIONES
GASTROINTESTINALES SIMULADAS *IN VITRO*.**

Karina Cruz Pacheco, Angélica Gabriela Mendoza Madrigal, Gustavo Valencia del Toro y Enrique Durán Páramo*.

Departamento de Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Ave. Acueducto s/n, La Laguna Ticomán, México, 07340, Distrito Federal.

eduran@ipn.mx

RESUMEN

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* es una bacteria láctica probiótica ampliamente utilizada en la elaboración de alimentos lácteos fermentados como el yogur. Se sabe que *Lactobacillus delbrueckii* ejerce cierto efecto probiótico principalmente en el colon humano. Sin embargo, el tracto gastrointestinal humano presenta ciertas barreras fisicoquímicas como son el medio ácido en estómago y la bilis hepática en duodeno, mismas que pueden afectar la viabilidad de este tipo de bacterias teniendo como consecuencia que no realicen su efecto probiótico. Así, en el presente estudio se evaluó la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inmovilizado por atrapamiento en alginato de sodio, tratado en medio ácido y presencia de bilis hepática simulando condiciones de estómago y duodeno humano *in vitro*. Además, se determinó el efecto de inulina al 2% (p/v) asociado al soporte de inmovilización, sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizado. Por último, se evaluó la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en un sistema *in vitro* más complejo, en el cual se adicionaron las enzimas pepsina, mucina y pancreatina. La viabilidad de células

inmovilizadas tratadas en medio ácido se mantuvo hasta 5 veces mayor respecto a la viabilidad de las células libres. *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizado en alginato mantuvo hasta 92 veces mayor viabilidad con respecto a las células en forma libre. Con la adición de inulina al 2% en la matriz de inmovilización fue posible mantener viables hasta un 80% de las células de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas bajo condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*. Por último, las células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas y tratadas bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* y en presencia de mucina, pepsina y pancreatina, mantuvieron casi 20 veces mayor viabilidad en comparación con las células en forma libre; bajo las mismas condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro* y en presencia de una muestra de comida tipo conservaron el 73% de las células libres de *Lactobacillus delbrueckii* conservaron su viabilidad.

Palabras clave: *Lactobacillus delbrueckii*, inmovilización celular, simulación *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Desde hace 20 años el interés por conocer el papel que juegan las bacterias lácticas probióticas en la salud humana ha ido en incremento (Chandramouli, *et al.*, 2004). Actualmente, la industria de lácteos incorpora a las bacterias lácticas no solo como parte fundamental en el proceso de elaboración de alimentos lácteos fermentados, sino como principio activo de lo que se conoce como “alimentos lácteos funcionales”, los cuales principalmente son destinados para ayudar a resolver problemas gastrointestinales como intolerancia a la lactosa y estreñimiento (Sanders y Klaenhammer, 2001; Jiang, *et al.*, 1996; Walker y Duffy, 1998). En años recientes se ha logrado evidenciar que los probióticos brindan cierta protección contra microorganismos patógenos (Casas y Dobrogosz, 2000), estimulan el sistema inmune (Aattouri, *et al.*, 2002) e incluso se les atribuye cierta contribución en la disminución de cáncer en colon. Las bacterias lácticas probióticas pertenecen principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, ejercen su efecto benéfico en el intestino grueso humano principalmente; para llevar a cabo dicho efecto deben llegar viables a este sitio y en número elevado.

Autores como Ouwehand y Salminen (1998), señalan que en los productos lácteos fermentados las bacterias lácticas deben estar activas y en una concentración no menor de 10^7 unidades formadoras de colonia (UFC) por gr de producto. Sin embargo, existen diversos estudios que muestran que las bacterias lácticas contenidas en los productos lácteos pueden perder su viabilidad durante la etapa de

almacenamiento en refrigeración y durante su paso por el tracto gastrointestinal del consumidor (Dave y Shah, 1996; Kailasapathy y Rybka, 1997; Hamilton-Miller, *et al.*, 1999). Los principales factores que pueden afectar la viabilidad bacteriana, antes de que las bacterias lleguen al colon humano, son el ambiente ácido en el estómago y la presencia de bilis en el duodeno.

En este sentido, se han desarrollado diversos sistemas para tratar de simular las condiciones fisicoquímicas presentes en el tracto gastrointestinal humano y estudiar la viabilidad de bacterias lácticas cuando se encuentran en bajo dichas condiciones. Los sistemas de simulación van desde los más sencillos en donde se adicionan las bacterias lácticas libres o inmovilizadas a soluciones de medio ácido y soluciones de bilis hepática y posteriormente se incuban (Chen, *et al.*, 2005, Huang y Adams, 2004; Fravaro-Trindade y Fragoso, 2002; Sultana, *et al.*, 2000, Sun y Griffiths, 2000), hasta sistemas más complejos en donde se diseñan simuladores del sistema gastrointestinal humano para estudiar interacciones de bacterias probióticas con el ambiente microbiano intestinal o el efecto de bacterias probióticas y productos simbióticos en la microbiota intestinal humana (Mainville, *et al.*, 2005; De Boever *et al.*, 2000; Molly *et al.*, 1993, Molly *et al.*, 1996; Nollet *et al.*, 1997, Kontula *et al.*, 1998; Alander *et al.*, 1999; Gmeiner *et al.*, 2000). Minekus *et al.*, (1995) propusieron un modelo del tracto gastrointestinal humano que contenía cuatro cámaras para simular el estómago, duodeno, yeyuno e íleo. Otros estudios de viabilidad de bacterias lácticas se han realizado *in vivo* en intestino de cerdo (Iyer, *et al.*, 2005).

Otros autores han empleado la técnica de inmovilización celular por encapsulamiento con la finalidad de minimizar la pérdida de viabilidad bacteriana bajo condiciones similares a las gastrointestinales humanas, usando diversos soportes de inmovilización (Muthukumarasamy, *et al.*, 2006; Chandramouli, *et al.*, 2004; Lee and Heo, 2000; Lian *et al.*, 2003; Adhikari, *et al.*, 2000; Klinkenberg, *et al.*, 2000; Nighswonger, *et al.*, 1996 Shah and Ravula, 2000; Sheu and Marshall, 1993).

En el presente trabajo se estudió la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado por atrapamiento en alginato de sodio, primero en presencia de medio ácido y en bilis hepática simulando condiciones de estómago y duodeno. Posteriormente, se estudió el efecto de la presencia de inulina, asociada al soporte de inmovilización, sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizado. Por último, el modelo de simulación fue complementado con la presencia de pepsina, mucina y pancreatina y se evaluó la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* NRRL-734 fue obtenido del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica, el cual fue conservado en placas de Petri que contenían medio MRS sólido (Man y Rogosa, 1960).

Inmovilización por Atrapamiento Celular.

Lactobacillus delbrueckii fue cultivado en 100mL de medio MRS durante 12 horas a 37°C; al final del cultivo se recuperó la biomasa por centrifugación (5000 rpm, 4°C, 5 min). La

biomasa recuperada se disolvió en una solución de alginato de sodio al 2% (p/v). La suspensión bacteriana fue pasada, con ayuda de una bomba peristáltica, a través de una manguera de silicón la cual contenía una aguja en su extremo final. La suspensión bacteriana fue goteada sobre una solución de cloruro de calcio 0.3 M. Las gotas de la suspensión bacteriana (alginato de sodio y biomasa) al entrar en contacto con la solución de cloruro de calcio, forman alginato de calcio y solidifican de manera instantánea dejando atrapadas a las bacterias y formando partículas esféricas de aproximadamente 2 mm de diámetro. Las partículas conteniendo a las bacterias inmovilizadas se dejaron reposar durante 30 min en la solución de cloruro de calcio (Durán-Páramo, 1997; Cruz, 2003).

Diseño de un sistema simulador de las condiciones gastrointestinales humanas.

El sistema de simulación gastrointestinal *in vitro* diseñado fue instalado en una campana de flujo laminar. El sistema estuvo compuesto por 2 biorreactores de vidrio con capacidad de 500 mL enchaquetados, con tapa de vidrio desmontable. Las tapas de los biorreactores tenían 5 entradas para el suministro de las soluciones de HCl y NaOH, la toma de muestra y la instalación del electrodo de pH y el termómetro.

Los biorreactores estaban conectados en serie a un baño de temperatura controlada, el cual los mantuvo a 37°C, temperatura fisiológica del organismo humano; así mismo, los biorreactores estaban colocados sobre parrillas de agitación para mantenerlos en agitación constante a 50 rpm. En el primer biorreactor se llevó a cabo la simulación *in vitro* del estómago del ser humano. En el segundo biorreactor se simuló *in vitro* el

intestino delgado del ser humano; para ello, se le adaptó una manguera de silicón de 1 cm de diámetro interno para simular la peristalsis intestinal por medio de una bomba peristáltica que funcionaba a 50 rpm.

Determinación de la viabilidad celular.

Para determinar la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre, se tomó 1 mL de caldo de cultivo y se diluyó con 9 mL de solución salina estéril al 0.9% (p/v). A partir de esta solución se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} con solución salina estéril al 0.9% (p/v) y se sembró 0.1 mL por extensión en placa de Petri con medio MRS sólido (con agar al 2% p/v). Las placas se incubaron a 38 °C durante 48 h; al término de la incubación se contaron las colonias de microorganismos que crecieron sobre la superficie del medio de cultivo y los resultados se reportaron como porcentaje (%) de viabilidad bacteriana (Cruz, 2003).

Para determinar la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizado, se tomaron 92 partículas esféricas que contenían células inmovilizadas, las cuales representaban una muestra de 1 mL de la suspensión bacteriana utilizada durante el proceso de inmovilización (gel y biomasa). De tal forma que las unidades formadoras de colonia (UFC) puedan ser reportadas por mL de gel para las células inmovilizadas.

La muestra de células inmovilizadas (92 partículas equivalentes a 1 mL de gel) se adicionó a un tubo con 9 mL de solución de citrato de sodio 0.1 M a 40°C y con agitación continua por medio de un vortex, para disolver el soporte de inmovilización y liberar del soporte a las células inmovilizadas y poder cuantificarlas (Durán-Páramo, 1997; Cruz, 2003). Posteriormente, una

vez disueltas todas las partículas de gel, se tomó 1 mL de dicha solución y se trataron de la misma forma que para la determinación de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre.

Diseño de un alimento tipo, de un alimento testigo, de una comida tipo y una bebida de café para la realización de las cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la mezcla de otro tipo de alimentos con los alimentos lácteos funcionales que contienen bacterias lácticas probióticas y simular los hábitos de alimentación de las personas que consumen alimentos lácteos funcionales, se diseñaron un alimento tipo, un alimento testigo, una comida tipo y una bebida de café, en donde las células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* fueran mezcladas, para posteriormente ser sujetas a las condiciones simuladas que se presentan en el sistema gastrointestinal humano. El alimento tipo consistió en una solución estéril de 250 mL de leche de vaca con 50 grs de mango y 50 grs de papaya. El alimento testigo se diseñó para contar con un alimento similar, en consistencia, al yogurt que pudiera ser esterilizado sin que se presentara la precipitación de las proteínas de la leche. Por ello, el alimento testigo consistió de una solución estéril de almidón al 8% (p/v) en donde se suspendió *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado.

Por último, se simuló una comida tipo de la dieta de los mexicanos. Para ello se consideró una comida compuesta por chilaquiles, cuya composición fue la siguiente: 75 grs de tortilla, 20 grs de pollo y 5 grs de chile serrano. Por último, se diseñó una solución de café soluble al 1%.

Todos los alimentos diseñados servirán para evaluar el efecto de la presencia de éstos sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado sometido a condiciones simuladas *in vitro* del sistema gastrointestinal humano.

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en medio ácido.

Para evaluar el efecto de la acidez que presenta el estómago del ser humano, sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* y considerando un tiempo de vaciado del estómago humano de 30 min, se realizaron cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* en medio ácido a pH 2.4, ajustado con solución de ácido clorhídrico 150 mM, para simular las condiciones que se presentan en el estómago humano. Las cinéticas se realizaron en presencia y en ausencia de desayuno tipo, manteniendo constantes la temperatura y agitación orbital a 37°C y 50 rpm respectivamente, durante 60 min. Se tomaron cada 15 min muestras de células libres (equivalentes a 1 mL de solución) e inmovilizadas (equivalentes a 1 mL de gel), para determinar la viabilidad bacteriana, por cuenta en placa en medio MRS sólido (Cruz, 2003). Los resultados de viabilidad obtenidos en UFC/mL fueron reportados como porcentajes, considerando que el 100% de viabilidad representó la concentración inicial de células viables de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas ó células viables libres presentes al inicio de cada cinética. También se determinó la velocidad de pérdida de viabilidad de células durante las cinéticas, graficando los porcentajes de viabilidad contra el tiempo en minutos; de la gráfica resultante, se calcularon las pendientes y se

reportaron en % de pérdida de viabilidad por minuto.

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en presencia de bilis hepática.

Para evaluar el efecto el efecto de la bilis hepática sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii*, se realizaron cinéticas de pérdida de viabilidad en presencia de bilis hepática al 0.3% (p/v), en presencia y ausencia de desayuno tipo y peristalsis. El movimiento peristáltico del intestino humano se simuló con una bomba peristáltica que recirculaba la suspensión bacteriana a 50 rpm; el intestino humano fue simulado por medio de una manguera de silicón de 1 cm de diámetro interno por donde recirculó la suspensión bacteriana. Al igual que en el caso anterior, se tomó cada 15 minutos una muestra de células libres e inmovilizadas, para determinar la viabilidad bacteriana y se estimaron las velocidades de pérdida de viabilidad bacteriana, como se mencionó en el punto anterior.

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizado con adición de inulina en el soporte de inmovilización y en presencia de bilis hepática y medio ácido.

Se realizaron cinéticas para simular *in vitro* la estancia de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en el tracto gastrointestinal del ser humano (estómago y duodeno). Las cinéticas tuvieron una duración de 90 min; en los primeros 30 min las células fueron tratadas bajo condiciones gástricas (muestra de desayuno tipo estéril en medio ácido a pH 2.4, 37°C, 50 rpm) simuladas en el estómago *in vitro*.

Posteriormente, las muestras fueron sometidas durante 60 min a condiciones que simulaban, *in vitro*, las existentes en el duodeno del ser humano (alimento muestra con bilis hepática 0.3% y peristalsis). Para inmovilizar las células de *Lactobacillus delbrueckii* se utilizó alginato de sodio al 2% y se adicionó inulina al 2.5% (como prebiótico), con la finalidad de evaluar el efecto de la inulina asociada al soporte de inmovilización sobre la viabilidad bacteriana, bajo dichas condiciones. Se tomaron muestras de células libres e inmovilizadas cada 15 min para determinar la pérdida de viabilidad, por cuenta viable en placa, y se estimaron las velocidades de pérdida de viabilidad bacteriana.

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro* y en presencia de alimento testigo.

Se realizaron cinéticas de pérdida de viabilidad con células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii*; durante 90 minutos las células fueron sometidas a condiciones gástricas simuladas *in vitro* (pepsina 3%, mucina 4%, NaCl 0.5% ajustando el pH a 2.0 con HCl 5M) y en presencia de 100 mL de alimento testigo (solución estéril de almidón al 8%, p/v), manteniéndose constantes la temperatura a 37°C y la agitación a 50 rpm. Posteriormente, las células fueron tratadas durante 150 min en condiciones intestinales *in vitro* (pancreatina 1%, mucina 4%, bilis hepática 0.3%, NaCl 0.5%, ajustando el pH a 6.8 con NaOH 1.5M) manteniéndose constantes la temperatura a 37°C y la agitación a 50 rpm. En esta etapa se simuló el movimiento peristáltico en el intestino del ser humano con una bomba

peristáltica que funcionó a 50 rpm, la temperatura y agitación se mantuvieron constantes. Durante la cinética se tomó una muestra de 1 mL cada 30 minutos para determinar la viabilidad bacteriana por cuenta en placa, al igual que las pruebas anteriores se expresaron los resultados en porcentaje de viabilidad y se calcularon las velocidades de pérdida de viabilidad bacteriana. Así mismo, también se evaluó el efecto de una solución de café y de una comida tipo (chilaquiles) sobre la viabilidad bacteriana de células libres de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas bajo las mismas condiciones gastrointestinales *in vitro*.

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS versión 12. Se aplicó un ANOVA de una vía para determinar la presencia de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y la prueba de rango múltiple de Duncan para identificar entre qué tratamientos se presentaron las diferencias. Los datos fueron analizados con un 5% de nivel de significancia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en medio ácido.

El Cuadro 1 y la Figura 1 presentan los resultados de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres e inmovilizadas en alginato de calcio, en medio ácido a pH 2.4 y en ausencia del alimento tipo. Al inicio de las cinéticas, la concentración de las células libres fue de 2.43×10^8 UFC/mL; sin embargo, al término de las

cinéticas de pérdida de viabilidad, únicamente el 14% de las células libres se mantuvieron viables (3.47×10^7 UFC/mL). Con respecto a las células inmovilizadas, al inicio de la cinética la concentración fue de 7.30×10^8 UFC/mL; después de 60 minutos de exposición al medio ácido el 70% de las células inmovilizadas mantuvieron su viabilidad (5.10×10^8 UFC/mL); lo que representó una concentración celular casi 5 veces mayor a aquella obtenida cuando se utilizaron las células libres.

Los valores estimados de las velocidades de pérdida de viabilidad para las células de *Lactobacillus delbrueckii* libres fueron 4 veces mayor con respecto a las células inmovilizadas (cuadro 2); los resultados indican que las células libres de *Lactobacillus delbrueckii* pierden 4 veces más rápidamente su viabilidad con respecto a las células inmovilizadas, cuando son expuestas a un medio ácido durante 60 min.

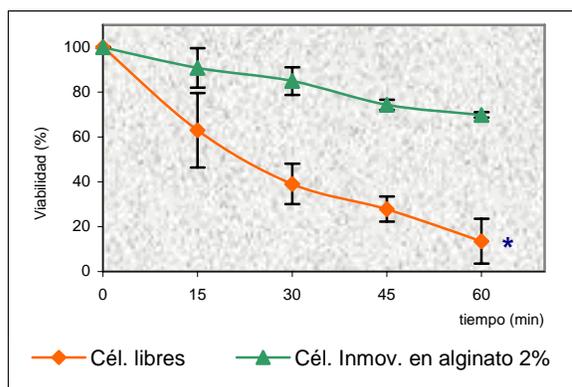


Figura 1. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii*, libres e inmovilizadas en medio ácido y en ausencia de alimento tipo. Nota: n=3, (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas, Duncan ($p < 0.05$).

Cuadro 1. Viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* en medio ácido y en ausencia de alimento tipo.

Tiempo (min)	Células libres (%)	Células Inmovilizadas (%)
0	100 ± 00.0	100 ± 0.0
15	63 ± 16.6	91 ± 8.8
30	39 ± 09.0	85 ± 6.2
45	28 ± 05.6	74 ± 2.3
60	14 ± 10.0	70 ± 1.2

Nota: los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

Cuadro 2. Velocidades de pérdida de viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* en medio ácido y en ausencia de alimento tipo.

Muestra	Velocidad de pérdida de viabilidad bacteriana (% de pérdida de viabilidad/min)	Tiempo (min)
Células libres.	2.03 ± 0.30	30
Células Inmovilizadas.	0.50 ± 0.21	30

La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que existieron diferencias estadísticas significativas entre los 2 tratamientos que se dieron a las células (libres e inmovilizadas) ($F_{2,6} = 67.882$, $p = 0.0001$). Utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan, se observaron diferencias significativas entre la viabilidad de células libres y células inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* ($p < 0.05$). La viabilidad bacteriana resultó significativamente mayor cuando las bacterias lácticas fueron previamente inmovilizadas.

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en medio ácido y en presencia del alimento tipo.

El Cuadro 3 y la Figura 2 presentan los resultados de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado, sometido a medio ácido a pH 2.4 y en presencia del alimento tipo. Al inicio de las cinéticas, la concentración de las células libres e

inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* fue de 3.27×10^8 UFC/mL y 9.80×10^8 UFC/mL, respectivamente. Al término de las cinéticas de pérdida de viabilidad únicamente el 16% de las células libres mantuvieron su viabilidad (4.67×10^7 UFC/mL), mientras que las células inmovilizadas mantuvieron el 78% de viabilidad (7.80×10^8 UFC/mL). Las células inmovilizadas soportaron 5 veces más el tratamiento en medio ácido en presencia de alimento tipo con respecto a las células libres tratadas bajo las mismas condiciones. Así mismo, la presencia de alimento tipo permitió mantener mayores niveles de viabilidad tanto para las células libres como para las células inmovilizadas.

La velocidad de pérdida de viabilidad fue 2 a 7 veces mayor para las células de *Lactobacillus delbrueckii* libres con respecto a las velocidades estimadas para las células previamente inmovilizadas (cuadro 4).

Cuadro 3. Viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* en medio ácido y en presencia de alimento tipo.

Tiempo (min)	Células libres (%)	Células Inmovilizadas (%)
0	100 ± 0.00	100 ± 00.0
15	76 ± 7.05	90 ± 07.0
30	70 ± 5.76	86 ± 09.0
45	40 ± 4.13	81 ± 13.0
60	16 ± 9.76	78 ± 14.0

Nota: los resultados presentados son el promedio de tres repeticiones ± D. E.

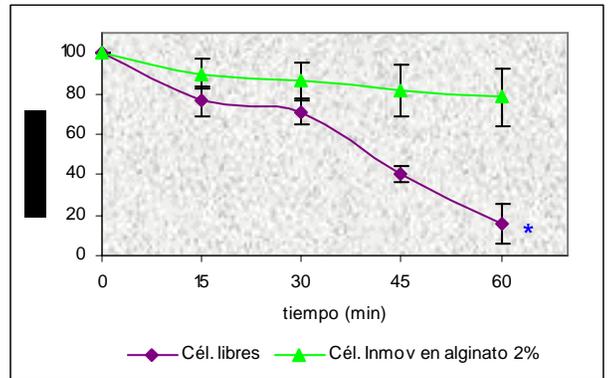


Figura 2. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres e inmovilizadas en medio ácido y en presencia de alimento tipo.

Nota: n=3, (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas, Duncan (p<0.05).

Cuadro 4. Velocidades de pérdida de viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* en medio ácido y en presencia de alimento tipo.

Muestra	Velocidad de pérdida de viabilidad bacteriana (% de pérdida de viabilidad/min)	Tiempo (min)
Células libres.	1.00 ± 0.19	0 - 30
	1.82 ± 0.30	30 - 60
Células Inmovilizadas.	0.46 ± 0.30	0 - 30
	0.26 ± 0.16	30 - 60

Nota: los resultados presentados son el promedio de tres repeticiones ± D. E.

La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* ($F_{2,6} = 11.836$, $p \leq 0.008$). Utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan, se observaron diferencias significativas entre la viabilidad de células libres de *Lactobacillus delbrueckii* y la viabilidad de células inmovilizadas ($p < 0.05$), resultando significativamente mayor la viabilidad cuando las bacterias lácticas se encontraron inmovilizadas.

Con los resultados obtenidos, se demostró que la técnica de inmovilización celular por atrapamiento

en alginato contribuyó favorablemente en el mantenimiento de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii*. También fue posible reducir la velocidad de pérdida de viabilidad bajo las condiciones gástricas simuladas *in vitro* y en ausencia del alimento tipo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas relacionadas con el efecto de la adición del alimento tipo sobre la viabilidad de las células de *Lactobacillus delbrueckii* libres o inmovilizadas, aunque la viabilidad de células libres tratadas en presencia de alimento tipo y medio ácido fue ligeramente mayor al término de la cinética en comparación con la viabilidad de células libres tratadas en medio ácido y en ausencia de alimento tipo.

Chen *et al.*, (1995), obtuvieron resultados de viabilidad del 80% para *Lactobacillus plantarum* encapsulado en alginato-poliilisina a los 5 minutos de tratamiento en medio ácido a pH de 2; de 2.6% en el minuto 30 y del 0.2% en el minuto 60 de evaluación. Por otra parte, Sun and Griffiths, (2000), reportaron que encontraron diferencias significativas para *Bifidobacterium infantis* ATCC-15697 encapsulado en goma xantana al 1% y gelana al 0.75%, tratadas con jugo gástrico simulado a pH 2.5, 2.0 y 1.5.

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en presencia de bilis hepática.

El Cuadro 5 y la Figura 3 presentan los resultados de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres e inmovilizadas tratadas en presencia de bilis hepática. Las cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* iniciaron con una concentración de 1.99×10^6 UFC/mL de células libres viables y de 1.25×10^9

UFC/mL de células viables inmovilizadas. Al término de las cinéticas de pérdida de viabilidad, se observó que únicamente el 0.6% de las células libres mantuvieron su viabilidad (6.67×10^3 UFC/mL), mientras que las células inmovilizadas se mantuvieron viables en un 55% (6.87×10^8 UFC/mL). Las células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizado soportaron el tratamiento 92 veces más con respecto a las células libres expuestas a las mismas condiciones.

La velocidad de pérdida de viabilidad para las células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas fue 8 veces menor comparada con la de las células libres (Cuadro 6).

Cuadro 5. Viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* en presencia de bilis hepática.

Tiempo (min)	Células libres (%)	Células Inmovilizadas (%)
0	100 ± 0.00	100 ± 0.00
15	7.6 ± 5.37	89 ± 6.95
30	4.4 ± 4.92	79 ± 4.71
45	1.5 ± 1.85	70 ± 5.60
60	0.6 ± 1.05	55 ± 8.81

Nota: los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D.E.

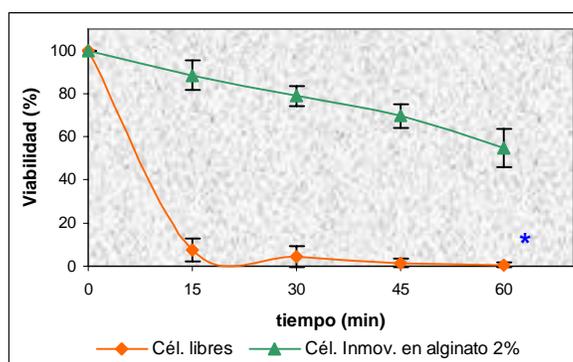


Figura 3. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres e inmovilizadas con bilis hepática.

Nota: n = 3, (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas, Duncan (p<0.05).

La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que existieron diferencias estadísticas significativas entre las células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas con bilis hepática ($F_{2,6} = 337.712$, $p = 0.0001$).

Cuadro 6. Pérdida de viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* con bilis hepática.

Muestra	Velocidad de pérdida de viabilidad bacteriana (% de pérdida de viabilidad/min)	Tiempo (min)
Células libres.	6.16 ± 0.36	0 - 15
Células inmovilizadas.	0.76 ± 0.46 0.63 ± 0.70	0 - 15 15 - 30

Nota: los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones \pm D. E.

Utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan, se observaron diferencias estadísticas entre la viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas y la viabilidad de las células libres ($p \leq 0.05$).

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en presencia de bilis hepática y en presencia de alimento tipo.

Los resultados de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres e inmovilizadas tratadas con bilis hepática y en presencia de alimento tipo, se presentan en el cuadro 7 y la figura 4.

Al inicio de las cinéticas, la concentración de las células viables de *Lactobacillus delbrueckii* en forma libre fue de 9.73×10^8 UFC/mL y de 6.57×10^8 UFC/mL para las células inmovilizadas. Al término de las cinéticas de pérdida de viabilidad sólo el 34% de las células libres se mantuvieron

viables (3.91×10^8 UFC/mL), mientras que hasta el 84% de las células inmovilizadas mantuvieron su viabilidad (5.53×10^8 UFC/mL). Los resultados indicaron que las células inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* soportaron 2.5 veces más el tratamiento con bilis hepática en presencia del alimento tipo, con respecto a las células libres sometidas al mismo tratamiento (Cuadro 7).

Los valores de velocidad estimados indicaron que la velocidad de pérdida de viabilidad de las células inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* fueron de 2.5 a 5 veces menores, comparados con la velocidad de pérdida de viabilidad de células libres (Cuadro 8).

Cuadro 7. Resultados de viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* con bilis hepática y en presencia de alimento tipo.

Tiempo (min)	Células libres (%)	Células inmovilizadas (%)
0	100 ± 0.00	100 ± 0.00
15	80 ± 14.8	96 ± 0.63
30	65 ± 20.8	93 ± 2.03
45	48 ± 17.5	90 ± 2.20
60	34 ± 20.8	84 ± 1.04

Nota: los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones \pm D. E.

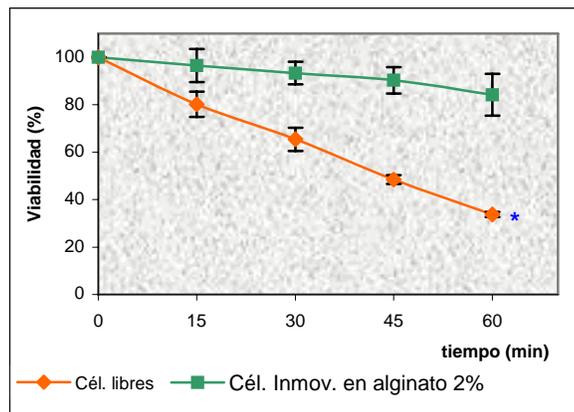


Figura 4. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres e inmovilizadas con bilis hepática y en presencia de alimento tipo. Nota: $n = 3$, (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas, Duncan ($p < 0.05$).

Cuadro 8. Pérdida de viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* con bilis hepática y en presencia de alimento tipo.

Muestra	Velocidad de pérdida de viabilidad bacteriana (% de pérdida de viabilidad/min)	Tiempo (min)
Células libres.	1.13 ± 0.39	0 - 45
	0.98 ± 0.51	45 - 60
Células Inmovilizadas.	0.22 ± 0.56	0 - 45
	0.40 ± 0.08	45 - 60

La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que existieron diferencias estadísticas significativas entre las células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas con bilis hepática y en presencia de alimento tipo ($F_{2,6} = 357.044$, $p \leq 0.014$). Utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan, se observaron también diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$).

En esta prueba se demostró que la inmovilización celular permitió mantener elevados niveles de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* cuando son tratadas con bilis hepática que representa un factor muy agresivo para la viabilidad de las bacterias lácticas. Este efecto puede ser debido a que la matriz de inmovilización representó una cierta protección para las bacterias lácticas y minimizó el efecto dañino de la bilis hepática sobre la viabilidad celular. Además, fue posible reducir la velocidad de pérdida de viabilidad bacteriana bajo las condiciones simuladas *in vitro* evaluadas.

Los resultados de viabilidad obtenidos en presencia de bilis hepática, confirman lo reportado por Fávaro-Trindade y Grosso (2002), quienes obtuvieron porcentajes de viabilidad del 80% para *Bifidobacterium lactis* encapsulado en celulosa en condiciones similares a las aquí utilizadas.

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizado con inulina en presencia de bilis hepática, medio ácido y alimento tipo.

En el Cuadro 9 y la Figura 5 se presentan los resultados de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado con adición de inulina en el soporte de inmovilización, tratadas en condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro* y en presencia del alimento tipo.

Cuadro 9. Viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* bajo condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro* (medio ácido y bilis hepática) con peristalsis y en presencia de alimento tipo.

Tiempo (min)	Células libres (%)	Células inmovilizadas (%)	Células inmovilizadas con adición de inulina (%)
0	100 ± 00.00	100 ± 00.00	100 ± 00.00
15	79 ± 04.00	91 ± 04.04	99 ± 01.00
30	72 ± 02.64	87 ± 07.81	97 ± 02.51
45	60 ± 04.93	82 ± 06.42	94 ± 03.21
60	52 ± 10.26	76 ± 07.63	89 ± 01.00
75	39 ± 11.06	66 ± 10.40	83 ± 01.52
90	24 ± 04.50	59 ± 10.78	80 ± 04.35

Nota: los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

Las cinéticas de pérdida de viabilidad iniciaron con una concentración de células libres viables de 1.35×10^8 UFC/mL. La concentración celular disminuyó a 72% después de haber sido expuesta, durante 30 min (9.70×10^7 UFC/mL); lo que representó una concentración celular 1.2 veces menor a la obtenida para las células inmovilizadas expuestas bajo las mismas condiciones (1.05×10^9 UFC/mL). Sin embargo, las células inmovilizadas conteniendo inulina en el soporte de inmovilización mantuvieron el 97% de viabilidad (2.56×10^9 UFC/mL), lo que representó una

concentración celular 1.3 mayor con respecto a la obtenida con las células libres.

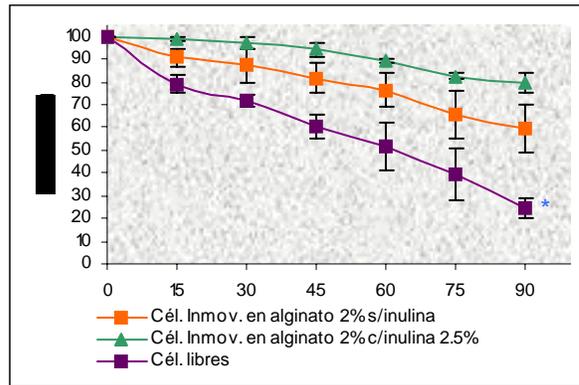


Figura 5. Cinética de pérdida de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres e inmovilizadas bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* (medio ácido y bilis hepática) con peristalsis y en presencia de alimento tipo.

Nota: n = 3, (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas, Duncan (p<0.05).

Cuadro 10. Pérdida de viabilidad de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* bajo condiciones gastrointestinales simuladas *in Vitro* (medio ácido y bilis hepática) con peristalsis y en presencia de alimento tipo.

Muestra	Velocidad de pérdida de viabilidad bacteriana (% de pérdida de viabilidad/min)	Tiempo (min)
Células libres.	0.94	0 - 30
	0.78	30 - 90
Células Inmovilizadas.	0.43	0 - 30
	0.48	30 - 90
Células Inmovilizadas con adición de inulina.	0.10	0 - 30
	0.30	30 - 90

Al finalizar el tratamiento con bilis hepática y movimiento peristáltico (al minuto 90 de la cinética), el 24% de las células libres de *Lactobacillus delbrueckii* conservaron su viabilidad (3.27×10^7 UFC/mL); mientras que el 59% de las células inmovilizadas se mantuvieron viables (7.20×10^8 UFC/mL), siendo 2.5 veces mayor a lo obtenido con las células libres. En el caso de las células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas con adición de inulina, la viabilidad

fue del 80% (2.11×10^9 UFC/mL), es decir, 3 veces mayor que la obtenida con las células en forma libre tratadas bajo las mismas condiciones simuladas *in vitro*.

La velocidad de pérdida de viabilidad estimada para las células inmovilizadas fue 2 veces menor con respecto a la velocidad de células libres durante la etapa de simulación gástrica *in vitro* y de 1.6 veces menor que la presentada por las células libres de *Lactobacillus delbrueckii* en la etapa de tratamiento bajo condiciones intestinales simuladas *in vitro* (Cuadro 10). Sin embargo, durante el tratamiento bajo condiciones gástricas simuladas *in vitro*, las células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas con adición de inulina presentaron velocidades de pérdida de viabilidad 9 veces menor con respecto a la observada para las células libres y 3 veces menor con respecto a la velocidad de pérdida de células libres durante la etapa de tratamiento en condiciones intestinales *in vitro* (Cuadro 10).

La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres, células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas sin adición de inulina y células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas con adición de inulina, todas las muestras tratadas en medio ácido y en presencia de alimento tipo ($F_{4,10} = 10.137$, $p \leq 0.002$), así mismo existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres, células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas sin adición de inulina y células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas con adición de inulina, tratadas en presencia de bilis hepática y de alimento tipo ($F_{4,10} = 14.80$, $p = 0.0001$). Utilizando la prueba de

rango múltiple de Duncan, se observaron diferencias estadísticas entre la viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas con adición de inulina y las células inmovilizadas sin adición de inulina con respecto a la viabilidad de células libres (Duncan, $p \leq 0.05$).

Mainville *et al.*, (2005), reportaron que células libres de *Lactobacillus rhamnosus* tratado en medio ácido perdió su viabilidad y *Lactobacillus johnsonii* tratado en medio ácido durante 90 minutos conservó el 6% de su viabilidad. Así mismo, reportaron un 1% de viabilidad para células libres de *Bifidobacterium infantis* tratadas en presencia de bilis Oxgall al 0.3% durante 90 minutos, mientras que las células de *Bifidobacterium infantis* perdieron totalmente su viabilidad cuando fueron tratadas en medio ácido durante 30 minutos.

Chandramoulli *et al.*, (2004), reportaron porcentajes de viabilidad de alrededor 80% para *Lactobacillus acidophilus* encapsulado en alginato de sodio. Por su parte, los trabajos de Gibson (1999, 1995 y 1994) solo han relacionado la presencia de inulina para células libres con el objetivo de estimular el crecimiento de bacterias lácticas prebióticas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inulina al 2.5% asociada a la matriz de inmovilización (alginato de calcio). Los resultados del efecto de la presencia de la inulina asociada al soporte de inmovilización sobre la viabilidad bacteriana estuvieron relacionados con el mantenimiento de la viabilidad en 97% y 80% al término de los tratamientos bajo condiciones gástricas (min 30 de la cinética) e intestinales (min 90 de la cinética) simuladas *in vitro*, respectivamente. Dicho resultados pueden deberse a que el prebiótico inulina, cuya función principal

representa la estimulación del crecimiento de las bacterias lácticas probióticas, estabilizó a las células de *Lactobacillus delbrueckii* contenidas en la matriz de inmovilización y potenció el efecto de protección de la matriz, resultando tasas elevadas de viabilidad celular comparadas con las obtenidas para las células en forma libre sometidas a las mismas condiciones.

El efecto de la inulina sobre la viabilidad de bacterias lácticas probióticas ha sido principalmente estudiado con Bifidobacterias (Roberfroid *et al.*, 1998).

Cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro* en presencia de alimento testigo.

En el Cuadro 11 y la Figura 6 se presentan los resultados de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado en presencia de condiciones gástricas *in vitro* (solución de NaCl 0.5%, pepsina 3% y mucina 4%, ajustada a pH 2.0) y condiciones intestinales *in vitro* (solución de NaCl 0.5%, pancreatina 1%, bilis 0.3% y mucina 4%, ajustada a pH 6.8); ambos tratamientos en presencia de alimento testigo.

Las cinéticas de pérdida de viabilidad iniciaron con un 100% de células libres viables (1.27×10^9 UFC/mL) de *Lactobacillus delbrueckii*, al término de la evaluación en condiciones gástricas *in vitro* (minuto 90), el 40% (5.08×10^8 UFC/mL) de las células libres mantuvieron su viabilidad, esto es 1.3 veces menor viabilidad que las células inmovilizadas 52% (7.4×10^8 UFC/mL). Al finalizar el tratamiento en condiciones intestinales *in vitro* el 1.6% (2×10^7 UFC/mL) de las células libres mantuvieron su viabilidad, mientras que el 39%

(5.5×10^8 UFC/mL) de las células inmovilizadas en alginato de sodio al 2% se mantuvieron viables, esto representa 24 veces mayor viabilidad respecto a las células en forma libre tratadas en las mismas condiciones *in vitro*.

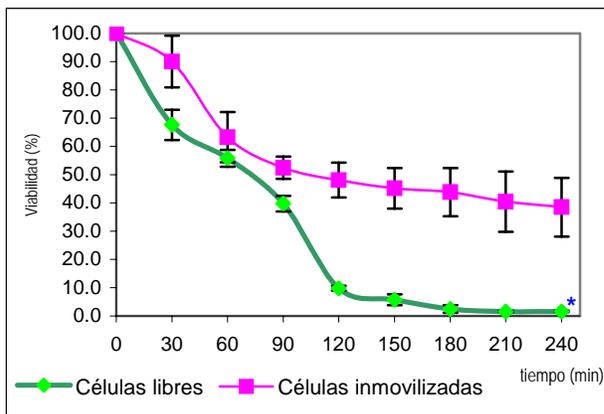


Figura 6. Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro* y en presencia de alimento testigo. Nota: n = 3, (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas, Duncan ($p < 0.05$).

Cuadro 11. Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre e inmovilizado tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro* y en presencia de alimento testigo.

Tiempo (h)	Células Libres (%)	Células Inmovilizadas (%)
0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
30	68 ± 5.4	90 ± 9.1
60	56 ± 3.0	63 ± 8.9
90	40 ± 2.7	52 ± 3.9
120	9.8 ± 0.9	48 ± 6.2
150	5.7 ± 1.9	45 ± 7.2
180	2.4 ± 1.3	44 ± 8.5
210	1.6 ± 0.3	40 ± 10.7
240	1.6 ± 0.3	39 ± 10.4

Nota: los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

Cuadro 12. Velocidad de pérdida de células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* bajo condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro* y en presencia de alimento testigo.

Tiempo (min)	Células libres (%/min)	Células inmovilizadas (%/min)
0-30	1.0797	0.3326
30-60	0.3934	0.8914
60-90	0.5357	0.3611
90-120	0.9968	0.1463
120-180	0.1228	0.0704
180-210	0.0283	0.1119

Los valores de velocidad estimados indicaron que las velocidades de pérdida de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas fueron de 3 a 1.5 veces menores, comparados con los obtenidos para las células libres durante la etapa de simulación *in vitro* de las condiciones gástricas humanas. Al inicio de la etapa de simulación en condiciones intestinales *in vitro*, las velocidades de pérdida de viabilidad de las células inmovilizadas fue 7 veces menor respecto a las de células libres.

Utilizando la prueba de Duncan, se observaron diferencias estadísticas significativas entre la viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* libres e inmovilizadas tratadas bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* y en presencia de alimento testigo (Duncan, $p \leq 0.05$).

En el Cuadro 13 y la Figura 7 se presentan los resultados de las cinéticas de pérdida de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre, tratado bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*, en presencia de una comida tipo (chilaquiles), de una solución de café negro al 1% y del alimento testigo (solución de almidón al 8% p/v), analizando cada efecto de manera independiente.

Las cinéticas de pérdida de viabilidad iniciaron con una concentración de células libres de *Lactobacillus delbrueckii* de 1.27×10^9 UFC/mL correspondiente al tratamiento en presencia de alimento testigo; para el tratamiento en presencia de solución de café la concentración inicial de células libres de *Lactobacillus delbrueckii* fue de 1.25×10^9 UFC/mL y la concentración de células libres de *Lactobacillus delbrueckii* para el tratamiento en presencia de comida tipo (chilaquiles) fue de 1.91×10^9 UFC/mL. Al término de la etapa en condiciones gástricas (solución salina al 0.5% con mucina 4% y pepsina 3%, ajustada a pH 2.0), el 40% de las células libres tratadas en presencia de alimento testigo conservó su viabilidad (5×10^8 UFC/mL), mientras que el 67% (8.45×10^8 UFC/mL) y el 80% (1.5×10^9 UFC/ml) de las células en presencia de café negro y chilaquiles, respectivamente, se conservaron viables. Al finalizar el tratamiento en condiciones intestinales *in vitro* (solución de NaCl 0.5% con pancreatina 1%, bilis 0.3% y mucina 4%, ajustando el pH a 6.8), las células libres tratadas en presencia de café negro mantuvieron su viabilidad 3.5 veces mayor respecto a la viabilidad obtenida en presencia del alimento testigo. Al término de la cinética, la viabilidad de las células libres de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas en presencia de la comida tipo fue 36.5 veces mayor que la viabilidad celular obtenida en presencia del alimento testigo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que cuando se adicionó en el medio una muestra de comida tipo, la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre fue significativamente elevada comparada con la obtenida en presencia del alimento testigo y con la obtenida en presencia de café negro al 1%.

Michida, *et al.*, 2006 y Patel, *et al.*, 2002, evidenciaron que cereales como malta, cebada y trigo brindaron cierto efecto protector a bacterias lácticas como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus acidophilus* cuando fueron tratadas en condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*. Sostienen que el efecto protector se debe a que los cereales tienen un alto contenido de vitaminas, minerales y fibra que actúa como prebiótico y estabiliza a estas bacterias minimizando la pérdida de viabilidad bacteriana en las condiciones tratadas. De acuerdo con los resultados de viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* obtenidos en el tratamiento en presencia de comida tipo (chilaquiles), podría atribuirse al maíz contenido en la tortilla cierto efecto prebiótico, sin embargo es necesario realizar un estudio más específico para determinar el efecto del maíz en el mantenimiento de la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* tratado bajo condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*.

La prueba de ANOVA de medidas repetidas indicó que existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de células libres de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* y en presencia de alimento testigo, comida tipo y solución de café negro ($F_{2,6} = 78.787$, $p \leq 0.000$). Así mismo, utilizando la prueba de Duncan, se observaron diferencias estadísticas entre la viabilidad de células libres de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* y en presencia de alimento testigo, comida tipo y solución de café (Duncan, $p \leq 0.05$).

Cuadro 13. Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre tratado en condiciones gastrointestinales humanas *in vitro*.

Tiempo (h)	Testigo (%)	Café negro (%)	Chilaquiles (%)
0	100 ± 0.0	100 ± 00.0	100 ± 0.0
30	68 ± 5.0	86 ± 18.0	91 ± 6.0
60	56 ± 3.0	72 ± 16.0	85 ± 7.0
90	40 ± 3.0	67 ± 17.0	80 ± 11.0
120	10 ± 1.0	39 ± 11.0	76 ± 9.0
150	6 ± 2.0	11 ± 07.0	76 ± 9.0
180	2 ± 1.0	9 ± 07.0	75 ± 9.0
210	2 ± 0.0	7 ± 04.0	75 ± 9.0
240	2 ± 0.0	7 ± 03.0	73 ± 11.0

Nota: los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones ± D. E.

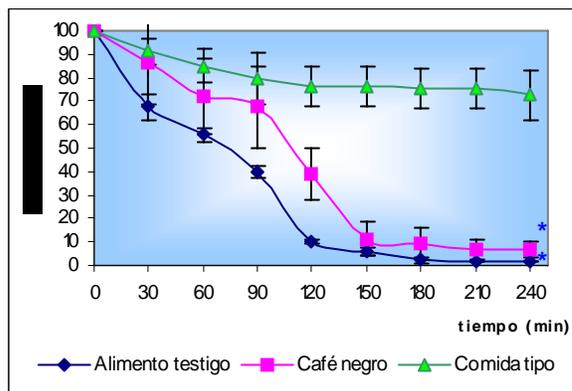


Figura 7. Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* libre tratado en condiciones gastrointestinales humanas *in vitro* en presencia de diferentes muestras de alimento. Nota: n=3, (*) indica que existen diferencias estadísticas significativas, Duncan (p<0.05).

CONCLUSIONES.

Los resultados de viabilidad bacteriana obtenidos durante los tratamientos *in vitro* en presencia de medio ácido y bilis hepática mostraron que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NRRL-734 inmovilizado en una matriz de alginato de calcio mantuvo mayores niveles de viabilidad con respecto a las células en forma libre tratadas bajo las mismas condiciones fisicoquímicas.

Así mismo, las velocidades de pérdida de viabilidad de células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas fueron inferiores comparadas con la velocidad de pérdida de viabilidad de las células libres, en los diferentes tratamientos.

Cuando *Lactobacillus delbrueckii* fue tratado en presencia de una muestra de alimento tipo y bilis hepática, se disminuyó significativamente la pérdida de viabilidad de las células libres, así como la velocidad de pérdida de viabilidad durante las cinéticas realizadas en estas condiciones. Con base en los resultados obtenidos de las simulaciones *in vitro* en presencia de medio ácido y bilis, se puede concluir que resulta preferible consumir las células de *Lactobacillus delbrueckii* acompañadas de algún alimento tipo, como el que se utilizó en el presente estudio, con la finalidad de contar con mayores posibilidades para que dichas células en

forma libre sobrevivan frente a las condiciones gastrointestinales del ser humano.

Las células de *Lactobacillus delbrueckii* inmovilizadas en alginato de sodio 2% sin inulina en el soporte y con inulina asociada al soporte de inmovilización permitió obtener mayores niveles de viabilidad celular con respecto a la viabilidad obtenida en el caso de las células libres de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas en medio ácido y en presencia de bilis hepática. Con base en las simulaciones efectuadas, se puede concluir que la presencia de inulina en el soporte de inmovilización permitiría mantener viables a las células de *Lactobacillus delbrueckii* de tal forma que pudieran transitar a través del sistema gastrointestinal del ser humano y llegar al colon en concentraciones suficientes para poder fijarse y llevar a cabo su acción probiótica.

Por otra parte, la adición de una muestra de alimento tipo que consistió de leche de vaca y frutas como papaya y mango, tuvo un efecto positivo en los diferentes tratamientos (medio ácido y presencia de bilis hepática), sin embargo es necesario destacar que dicho efecto fue más notorio cuando las células libres de *Lactobacillus delbrueckii* fueron tratadas en presencia de bilis hepática, esto es de gran importancia ya que la bilis es un factor muy agresivo para las bacterias

lácticas. Con las cinéticas de pérdida de viabilidad se trató de simular el paso de las células libres e inmovilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* a través del duodeno *in vitro*, con los resultados de viabilidad obtenidos se confirmó que éstas células son muy sensibles al efecto agresivo de la bilis hepática que se concentra en este sitio, por lo que la muestra de alimento que se adiciona juega un importante papel, ya que dependiendo de su naturaleza podrá ejercer cierto efecto protector de las células de *Lactobacillus delbrueckii*.

Cuando se trataron las células de *Lactobacillus delbrueckii* libres en presencia de alimento testigo, comida tipo y solución de café en un sistema de simulación gastrointestinal *in vitro* más completo (en presencia de pepsina, pancreatina, mucina, bilis hepática), se presentó un efecto protector mayor con la presencia de la comida tipo (mezcla de tortilla, pollo y chile) respecto al alimento testigo y a la muestra de solución de café. De esto, se concluye que la presencia de comida tipo ejerce un efecto protector significativo en las células de *Lactobacillus delbrueckii* en forma libre tratadas bajo condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*. Tal efecto puede ser atribuible a diferentes razones entre las que están la composición química de los

diferentes componentes que integran la muestra de comida tipo (vitaminas, proteínas, fibra, etc.), además, de ciertas características físicas de la muestra como lo es la viscosidad. En este sentido podrían realizarse determinaciones de viabilidad específicos para ciertas sustancias presentes en alimentos o bebidas, por ejemplo la cafeína, con la finalidad de determinar su factor de impacto sobre la viabilidad de bacterias lácticas. En este trabajo es importante puntualizar, que el haber seleccionado una muestra de comida tipo, típica de los mexicanos denominada “chilaquiles”, fue debido al interés por conocer de manera real el efecto que tienen la combinación de tortilla, pollo y chile sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii*. En este contexto, investigaciones relacionadas es esta misma línea, pueden tener un fuerte impacto social, debido a con la existencia de información de este tipo, es posible llevar a cabo ciertas recomendaciones que ayuden a mejorar los hábitos alimenticios de la población y así poder obtener mejores resultados en el consumo de alimentos probióticos, mismas que no están implícitas en la etiqueta de los diversos productos existentes en el mercado.

Es posible concluir que la técnica de inmovilización celular por atrapamiento en alginato de sodio, puede ser aplicada como

vector probiótico, debido a su efecto protector de las células de *Lactobacillus delbrueckii* tratadas en condiciones gastrointestinales *in vitro* similares a las que se encuentran en el estómago e intestino delgado del ser humano.

Por último, la técnica de inmovilización celular por atrapamiento podría ser aplicada en la elaboración de alimentos funcionales destinados a remediar problemas de intolerancia a la lactosa y a la regeneración de la flora intestinal humana.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo del programa PIFI y por el apoyo financiero para el desarrollo de los proyectos 20082706, 20070160 y 20060651. Así mismo, los autores agradecen al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica por la donación de la cepa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, K., A. Mustapha, I.U. Grün, and L. Fernando. 2000. Viability of microencapsulated *Bifidobacteria* in set yogurt during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.* 83:1946-1951.
- Aattouri, N., M. Bouras, D. Tome, A. Marcos, and D. Lemonnier. 2002. Oral ingestion of lactic acid bacteria by rats increases lymphocytic proliferation and interferon and production. *Br. J. Nutr.* 87:367-373.
- Alander, M., De Smet, I., Nollet, L., Verstraete, W., von Wright, A., Mattila Sandholm, T. 1999. The effect of probiotic strains on the microbiota of

- the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). *International Journal of Food Microbiology*. 46:71-79.
- Casas, I. A., and W. J. Dobrogosz. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals". *Microbial. Ecol. Health Dis.* 12:247-285.
- Cruz, P. K. 2003. Aplicación de la inmovilización celular en la preservación de bacterias lácticas del género *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Tesis de Licenciatura. UPIBI-IPN. México.
- Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris, and M. Jones. 2003. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp., in simulated gastric conditions". *J. of Microbiol. Methods*. 56:27-35.
- Chen, K. N., M. J. Chen, J. R. Liu, C. W. Lin and H. Y. Chiu, 2005. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating materials for probiotic microencapsulation. *J. of Food Science*. 70: M260-M266.
- De Boever, P., Deplancke, B. and Verstraete W. 2000. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is Improved by supplementing a soygerm powder. *American Society for Nutritional Science*.
- Dave, R. I., and N. P. Shah. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci*. 81:2804-2816.
- Durán-Páramo. E. 1997. Étude du comportement physiologique de *Bacillus subtilis* ATCC-21556 confiné et en suspension: suivi des métabolites et d'activités enzymatiques endo et exocellulaires. Tesis de Doctorado. Université de Technologie de Compiègne, Francia.
- Fávaro-Trindade C. S., and Grosso C. R. F. 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of stomach and in bile. *J. of Microencapsulation*. 19:485-494.
- Ganong, F. W. (2002). *Fisiología Médica*. Ed. Manual Moderno. México. 928 p.
- Gibson, G. R., and Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol*. 77:412- 420.
- Gibson, G. R. 1999. Dietary modulation of the human microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr*. 129:1438S-1441S.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang X., and Cummings, J. H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 108:975-982.
- Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Wouters, R., De Boever, P., Nollet, L., Verstraete, W. 2000. Influence of a symbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:219-223.
- Hamilton-Miller, J. M. T., Shah, S., Winkler, J. T., 1999. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public. Health Nutr*. 2, 223-229.
- Huang, Y., and Adams, M. 2004. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 91:253-260.

- Iyer, C., Phillips, M., and Kailasapathy K. 2005. Release studies of *Lactobacillus casei* strain Shirota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in ex vivo porcine gastrointestinal contents. *Lett. Appl. Microbiol.* 41(6):493-497.
- Jiang, T., A. Mustapha, and D.A. Savaiano. 1996. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy. Sci.* 79:750-757.
- Kailasapathy, K., and Rybka, S. 1997. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*: their therapeutic potential and survival in yogurth. *Aust. J. Dairy Technol.* 52:28-35.
- Kailasapathy, K., and J. Chin. 2000. Survival and potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Inmunol. Cell. Biol.* 78:80-88.
- Klinkenberg, G., K.Q. Lystad, D.W. Levine, and N. Dyrset. 2000. Cell release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in chitosan and alginate Coated Beads". *J.Dairy Sci.* 84:1118-1127.
- Lee, K. H. and T. R. Heo. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salts solution. *Appl. Environ Microbiol.* 66:869-873.
- Lian, W. C., Hsiao, H. C., and Chou, C. C. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *Int. J. Food Microbiol.* 86(3):293-301.
- Mainville, I., Arcand, Y., and Farnworth, E. R. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Inter. J. of Food Microbiol.* 99:287-296.
- Man, J. C., and M. E Rogosa. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 23(1), 130 – 135.
- Marteau, P. 1997. Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and effects of Bile. *J.Dairy Sci.* 80:1031-1037.
- Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S., Webb, C., Fukuda, H., and Kondo, A. 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal.* 28:73-78.
- Minekus, M., Marteau, P., Havennar, R., Huis in 't Veld. J. H. J., 1995. A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and the small intestine. *Alternatives to Laboratory Animals.* 23:197-209.
- Molly, K., Vande Woestyne, M., Verstraete, W. 1993. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 39:254-258.
- Molly, K., De Smet, I., Nollet, L., Vande Woestyne, M., Verstraete, W. 1996. Effect of Lactobacilli on the ecology of the gastrointestinal microbiota cultured in the SHIME reactor. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 9:79-89.
- Muthukumarasamy, P., P. Allan-Wojtas, and R. Holley. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *J. of Food Science.* 71:M20-M24.
- Nighswonger, B. D., M. M. Brashears, and S. E. Gilliland 1996. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.* 79:212-219.

- Nollet, L., Vande Velde, I., Versatraete, W. 1997. Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC35244 on the gastrointestinal microbiota and its activity, as simulated in an in vitro simulator of the human gastrointestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48:99-104.
- Ouwehand, A. C. and Salminen, S. J. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 749-758.
- Patel, H., Pandiella, S., Wang, R., and Webb, C. 2004. Influence of malt, wheat and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of lactobacilli. *Food Microbiology*. 21:83-89.
- Prevost, H., and Divies, C. 1992. Cream fermentation by a mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. *Biotechnol. Lett.* 14:583-588.
- Roberfroid, B. M., Van Loo Jan, A. E., and Gibson, R. G. 1998. The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and its Hydrolysis Products. *J. Nutr.* 128:11-19.
- Sanders, M. E., and T. R. Klaenhammer. 2001. Invited Review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.* 84:319-331.
- Shah, N. P., and R. R. Ravula, 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Aust. J. Dairy Technol.* 55:139-44.
- Sheu, T. Y., and R. T. Marshall, 1993. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *J. Food Sci.* 54:557-61.
- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, and K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 47-55.
- Sun, W., and M. W. Griffiths. 2000. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *Int. J. Food Microbiol.* 61(1):17-25.
- Walker, A. W., and L. C. Duffy. 1998. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics: Review. *J. Nutr. Biochem.* 9:668-675.
- Wang, X., and Gibson, G. R. 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 75:373-3809