



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE *LACTOBACILLUS CASEI* Y *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* ENCAPSULADOS MEDIANTE GELACIÓN IÓNICA EMPLEANDO AGUAMIEL, EN UN SISTEMA GÁSTRICO E INTESTINAL”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIATURA EN INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

VIRGINIA TORRES FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PAOLA HERNÁNDEZ CARRANZA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS ENRIQUE OCHOA VELASCO

Noviembre 2015

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por dejarme vivir esta etapa y todo lo que llevo de mi vida, por darme unos padres, amigos y maestros que han contribuido a ser lo que en este momento soy, por la salud y el trabajo que me ha dado, y por mandarme ángeles cuanto estoy a punto de desfallecer, por toda tu infinita bondad hacia mí.

A MIS PADRES: NERI TORRES Y MA. A. ISABEL FLORES

Quienes me dieron la vida y han cuidado y velado mi camino, los amo.

A mi padre, quien a pesar de ya no estar físicamente conmigo, sé que cuida de mí, al cual le entrego la mejor herencia que pudo haberme dejado (el conocimiento).

A mi madre, por estar siempre cuidándome, por sus consejos, sus apapachos y por todo su apoyo y confianza.

A MI HERMANA CLARA CUETLACH FLORES

Gracias hermanita por ser parte de mi soporte, por estar pendiente de mí y brindarme siempre tu confianza, no defraudare lo que has puesto en mí, te amo.

A MI CUÑADO Y SOBRINOS

Ignacio Fuentes, Miguel Ángel, Gabriel Yahir y Rafael, por su inmenso apoyo en todo momento y cunado lo necesito, así como su cariño, los quiero mucho.

A MI TÍA IRENE Y A MI ABUELITA PETRA

Por brindarnos un techo, alimento, cariño, apoyo y por ser parte de esta esta etapa, las quiero.

A MI FAMILIA

A tíos (as), primos (as) y sobrinos (as), por su cariño y porras para poder culminar esta etapa.

A MIS AMIGOS

Especialmente a Daniel, Oscar, Eli Marco, Lorena y Antonio, por su valiosa amistad, confianza, por las experiencias vividas, los consejos y sobre todo por su invaluable colaboración para que pudiera realizar y terminar esta etapa, los quiero. Así mismo a los amigos y compañeros de la facultad, por su apoyo y ayuda dentro y fuera de las aulas de clases, los quiero y estimo mucho.

A LA EMPRESA GAS UNO DE PUEBLA

Primordialmente al C.P. Gabriel González Bastida, por darme la oportunidad y confianza para colaborar con ellos y apoyarme en todo momento durante el transcurso de mi carrera.

A su vez a la Lic. Isela López, por su apoyo y confianza que me brindo en su momento, a la C.P. Gabriela Muñoz, por la fe y responsabilidad que puso en mí, espero no haberla defraudado.

A mis compañeras y compañeros de trabajo, gracias por compartir sus conocimientos y experiencias, durante los cuatro años que compartí con ustedes, los aprecio mucho y espero que las amistades formadas no desaparezcan aun con la distancia.

En general estoy y estaré siempre agradecida con ustedes por haberme abierto la puerta y apoyar en el momento, en que más necesitaba un trabajo, espero no haber defraudado la confianza que se me dio.

A MI ASESORA DE TESIS DRA. PAOLA HERNÁNDEZ CARRANZA

Por su inmenso apoyo, dedicación, paciencia, comprensión, por los conocimientos transmitidos, por darme la oportunidad de ser parte de sus tesis y sobre todo por seguir

confiando en mí, así como por seguir sujetando mi mano y no soltarme, mil gracias Dra. por todas las experiencias que me ha brindado y por su amistad, la quiero mucho.

A MIS SINODALES

Dra. Edith Jiménez, Mtra. Tania Meza y Dr. Carlos E. Ochoa, por su tiempo y dedicación a la revisión de este trabajo.

A LA FACULTAD Y DIRECCIÓN DE INGENIERÍA QUÍMICA

Por su alojamiento durante este tiempo y por haberme facilitado las aulas, laboratorios y materiales necesarios, para poder concluir esta etapa.

A la dirección, por facilitarme toda la información y documentación necesaria, para el desarrollo de este proyecto, así como para la culminación del mismo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. HIPÓTESIS.....	4
V. OBJETIVOS	5
1.1 OBJETIVO GENERAL	5
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
VI. MARCO TEÓRICO.....	6
Capítulo 1. Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	6
1.1 <i>Generalidades</i>	6
1.2 <i>Características morfológicas de Lactobacillus</i>	6
1.3 <i>Condiciones de crecimiento de Lactobacillus</i>	6
1.4 <i>Clasificación de Lactobacillus</i>	7
1.5 <i>Definición de probiótico</i>	7
1.5.1 <i>Microorganismos identificados como probióticos</i>	8
1.5.2 <i>Beneficios de los probióticos</i>	9
1.5.3 <i>Afectaciones de los probióticos</i>	9
1.6 <i>Lactobacillus casei</i>	10
1.7 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	11

Capítulo 2. Encapsulación	11
2.1 <i>Definición</i>	11
2.2 <i>Aplicación de la encapsulación</i>	12
2.3 <i>Desventajas de la encapsulación</i>	13
2.4 <i>Técnicas de encapsulación</i>	13
2.4.1 <i>Método de gelificación iónica</i>	14
2.5 <i>Materiales de encapsulación y/o de cobertura</i>	15
2.5.1 <i>Características del alginato</i>	16
2.5.1.1 <i>Ventajas y desventajas de la utilización de alginato</i>	16
Capítulo 3. Aguamiel	16
3.1 <i>Generalidades</i>	16
3.2 <i>Características fisicoquímicas del aguamiel</i>	17
3.3 <i>Prebióticos</i>	17
Capítulo 4. Simulación gástrica	18
4.1 <i>Generalidades</i>	18
4.2 <i>Ventajas de su aplicación</i>	18
4.3 <i>Estudios de la simulación gástrica en probióticos</i>	19
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	20
En la Figura 1 se muestra el diagrama general de trabajo	20
7.2 <i>Caracterización composicional de aguamiel</i>	21
7.2.1 <i>Humedad</i>	21
7.2.2 <i>Cenizas</i>	21
7.2.3 <i>Extracto etéreo (grasa)</i>	22
7.2.4 <i>Proteína</i>	23

7.2.4.1 Digestión	23
7.2.4.2 Neutralización	23
7.2.4.3 Destilación	23
7.2.5 Fibra cruda	24
7.2.6 Azúcares reductores totales y directos.....	24
7.3 Compuestos funcionales.....	25
7.3.1 Fructanos en aguamiel.....	25
7.3.1.1 Extracción de fructanos	25
7.3.1.2 Eliminación de sucrosa, almidón y azúcares reductores	25
7.3.1.3 Hidrólisis y medición de fructanos	26
7.3.2 Compuestos fenólicos en aguamiel	27
7.4 Curva de crecimiento para <i>Lactobacillus</i>	27
7.4.1 Preparación del medio de cultivo	27
7.4.2 Obtención de curvas de crecimiento	28
7.5 Formación de cápsulas por gelación iónica.....	29
7.5.1 Formación de cápsulas	29
7.5.2 Encapsulación de microorganismos	29
7.6. Evaluación de la supervivencia de microorganismos en un sistema que simule condiciones gastrointestinales.....	30
7.7 Análisis estadístico.....	31
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
8.1 Análisis químico, composicional y compuestos funcionales de aguamiel.....	32
8.2 Curvas de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en Agar MRS	36
8.3 Evaluación de la supervivencia de <i>Lactobacillus</i> encapsulados y sin encapsular en un sistema que simule condiciones gastrointestinales	38

IX.	CONCLUSIONES	41
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general de trabajo	20
Figura 2. Cápsulas de alginato de sodio con aguamiel, obtenidas mediante gelación iónica	29
Figura 3. Contenido de fructanos de aguamiel de la región de Españita y Nanacamilpa, Tlaxcala	34
Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos (mg AG/100 mL peso fresco) de aguamiel de la región de Españita y Nanacamilpa, Tlaxcala	35
Figura 5. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en agar MRS incubados a 37°C durante 36 h	37
Figura 6. Comportamiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> encapsulado y sin encapsular con aguamiel de la región de Españita y Nanacamilpa, sometido a condiciones de simulación de FGS (2h) y FIS (3h)	38
Figura 7. Comportamiento de <i>Lactobacillus casei</i> encapsulado y sin encapsular con aguamiel de la región de Españita y Nanacamilpa, sometido a condiciones de simulación de FGS (2h) y FIS (3h).	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos probióticos en seres humanos	8
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la aplicación del método de gelación iónica para encapsular probióticos	14
Tabla 3. Materiales para la encapsulación de alimentos	15
Tabla 4. Estudios del efecto de la simulación gástrica en probióticos	19
Tabla 5. Composición del medio MRS	28
Tabla 6. Análisis composicional de aguamiel del estado de Tlaxcala.	32

RESUMEN

Se realizó la simulación gástrica e intestinal de los probióticos (*Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*) encapsulados mediante la técnica de gelación iónica, utilizando como material encapsulante alginato de sodio y aguamiel. El aguamiel fue colectado en los municipios de Españita (ESP) y Nanacamilpa (NAN) del estado de Tlaxcala. Se realizó la caracterización composicional y funcional (contenido de fructanos y compuestos fenólicos) de aguamiel mediante la técnica de la AOAC, la evaluación de la supervivencia de *Lactobacillus* a condiciones simuladas de tipo gástrico e intestinal se realizó con microorganismos encapsulados y sin encapsular (vida libre), incorporando las cápsulas de alginato y aguamiel adicionadas con *L. casei* o *L. rhamnosus* a los fluidos gastrointestinales 2 h en fluido gástrico (FGS) y 3 h en fluido intestinal (FIS), la población microbiana se cuantificó a través del crecimiento en cajas Petri con agar MRS, incubados en condiciones anaerobias a 37 °C por 24 h.

El análisis composicional indicó que el aguamiel de las comunidades de ESP y NAN, posee suficiente cantidad de agua (83 y 81 %) y de carbohidratos (15 y 17 %) respectivamente; ambas bebidas presentaron alrededor del 3 % de fructanos. Sin embargo, se presentó mayor diferencia ($p < 0.05$) respecto a la cantidad de compuestos fenólicos 6.6 mg de ácido gálico/100 g en aguamiel de ESP.

La simulación en FGS de microorganismos encapsulados indicó que la población de *Lactobacillus* se redujo entre 0.5 y 2.5 ciclos logarítmicos (CL) y en FIS se redujo entre 1 y 4 (CL) respecto a los microorganismos en vida libre. Además, se presentó mayor supervivencia de *L. rhamnosus* a condiciones gastrointestinales, lo que sugiere el uso de aguamiel como sustancia prebiótica que promueve la supervivencia de probióticos.

I. INTRODUCCIÓN

Factores como una mala alimentación, falta de ejercicio, y aspectos psicológicos (estrés), entre otros; influyen de manera significativa en el equilibrio de la flora intestinal, que puede jugar un papel importante en el organismo, debido a que provoca enfermedades crónicas degenerativas como lo es el cáncer, obesidad, hipertensión, diabetes, envejecimiento, entre otras enfermedades de tipo gastrointestinal (Torres, 2006; Madigan *et al.*, 2009). Por consiguiente el tracto gastrointestinal (TGI) tiende a sufrir desequilibrios no solo por enfermedades, sino también por la dieta de cada ser humano y la administración de antibióticos, provocando la disminución de la microbiota presente en el TGI. Por ello, una dieta equilibrada genera una flora intestinal benéfica que protege al TGI de la proliferación o infección por bacterias patógenas. Además, se puede lograr que la microbiota recolonice el intestino rápidamente mediante la administración de probióticos (Madigan *et al.*, 2009).

Los probióticos son microorganismos vivos que se administran al hospedador y pueden ejercer un efecto benéfico sobre la salud (Ramos *et al.*, 2012). Estos microorganismos han sido propuestos para establecer y mantener la salud de la microbiota del intestino y prevenir la colonización de bacterias patógenas agotadas por los antibióticos (Calderón *et al.*, 2007). Sin embargo, ciertos estudios indican que los probióticos no siempre llegan vivos al sitio de acción, incluso pueden llegar a perder su funcionalidad por diversos factores que encuentran a su paso en el TGI, los productos que contienen probióticos, tienen como limitantes la presencia de acidez, la concentración de oxígeno, las condiciones gástricas, bilis, etc. (Amin *et al.*, 2013).

La encapsulación es considerada una tecnología de empaquetamiento o recubrimiento, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente y de influencias deletéreas (Lira, 2013); incluso puede ayudar a mantener viables a los probióticos hasta su llegada al punto de acción y permitir su liberación (Lupo *et al.*, 2012).

Actualmente se han realizado estudios de las diversas técnicas y materiales de encapsulación para la protección de probióticos en alimentos (Lira, 2013; Pérez *et al.*, 2013). Sin embargo, no es suficiente solo con aplicar las técnicas de encapsulación para mantener la viabilidad de probióticos, sino que es necesario la presencia de materiales encapsulantes con actividad prebiótica, los cuales ayudan a la supervivencia de los probióticos, incrementan su viabilidad y estimulan el crecimiento de los mismos (Webb, 2006).

Los prebióticos son definidos como “ingredientes alimenticios no digeribles que estimulan de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de un número limitado de bacterias colónicas” (Olagnero *et al.*, 2007), su principal característica es que son moléculas de alto peso molecular, que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas (Ortiz *et al.*, 2008), y son como consecuencia fermentados en el colon, estas sustancias con efecto prebiótico están presentes en leche materna, frutas, vegetales y plantas superiores como el Agave. El aguamiel es un fluido derivado del Agave considerado como prebiótico, debido a la presencia de inulina y fructanos (Lira, 2013), por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar la supervivencia de dos especies de *Lactobacillus*, encapsulados mediante la técnica de gelación iónica utilizando alginato de sodio y aguamiel como materiales de cobertura, y evaluar su viabilidad en un sistema que simule condiciones de fluido gástrico e intestinal.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diversidad de actividades que realizamos y al acelerado ritmo de vida provocan que se tenga una mala alimentación, y de esta forma se adquieran enfermedades de tipo gastrointestinal, esto conlleva a estudiar nuevas tecnologías o métodos que ayuden a la regeneración de la flora nativa y disminuir estos padecimientos.

La administración de bacterias ácido lácticas de manera específica del género *Lactobacillus*, puede ayudar a la regeneración de la flora gastrointestinal, sin embargo, algunas especies son susceptibles a las condiciones gastrointestinales, por esto el uso de técnicas de encapsulación en presencia de sustancias prebióticas podría favorecer la supervivencia de especies de *Lactobacillus*, permitiendo la colonización en el intestino y mejorando los problemas de salud.

El uso de aguamiel como agente prebiótico y material encapsulante permitiría el aprovechamiento de este líquido en el sector alimentario, debido que a partir de la segunda mitad del siglo XX, el maguey empezó a desaparecer, en el 2002 la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), declaró esta planta en peligro de extinción. Hoy en día la producción de aguamiel ha disminuido, su producción se limita a algunos estados del centro y noreste de la República Mexicana, uno de estos es el estado de Tlaxcala, la Fundación produce de Tlaxcala reportó que en 2010 se generó una producción de 10, 6.6 y 4.4 millones de litro de aguamiel en los municipios de Calcuapan, Nanacamilpa y Españita (FPT, 2013), debido a esto se busca la aplicación alimentaria de este producto, permitiendo dar un aprovechamiento sustentable y una aplicación biotecnológica a través de la encapsulación de probióticos.

III. JUSTIFICACIÓN

La aplicación de aguamiel como agente prebiótico y material encapsulante es una alternativa sustentable en el área de alimentos, debido al contenido de carbohidratos y aminoácidos que presenta, los cuales pueden ser aprovechados por microorganismos probióticos, además es un producto económicamente redituable por su fácil obtención.

Por otro lado, la aplicación de técnicas de encapsulación como la gelación iónica, la cual es una técnica económica comparada con otros procesos de encapsulación como lo es la liofilización, secado por atomización, extrusión, entre otros. Estas dos herramientas (sustancia encapsulante y técnica de encapsulación) permiten crear una herramienta en los procesos biotecnológicos de manera sustentable.

Finalmente, es necesario evaluar a través de los procesos de simulación gástrica el efecto prebiótico del aguamiel para poder ser traslapados a matrices alimenticias e incrementar el desarrollo de alimentos funcionales.

IV. HIPÓTESIS

El uso de aguamiel en presencia de alginato de sodio como material encapsulante en el proceso de gelación iónica, permitirá la supervivencia de especies de *Lactobacillus*, cuando se someten a condiciones gástricas e intestinales simuladas.

V. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la supervivencia de dos especies de *Lactobacillus* (*L. casei* y *L. rhamnosus*), mediante la encapsulación por gelación iónica con aguamiel y alginato de sodio a través de un fluido gástrico e intestinal simulado.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el análisis químico, composicional y compuestos funcionales de aguamiel de Nanacamilpa y España de la región de Tlaxcala.
- Elaborar curvas de crecimiento de las especies de *Lactobacillus* (*L. casei* y *L. rhamnosus*), para determinar el tiempo en el que se obtiene una población microbiana alta.
- Elaborar cápsulas por el método de gelación iónica utilizando como material encapsulante aguamiel y alginato de sodio.
- Evaluar la supervivencia de las especies de *Lactobacillus* encapsulados y sin encapsular (vida libre) en un sistema que simule el fluido gástrico e intestinal.

VI. MARCO TEÓRICO

Capítulo 1. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

1.1 Generalidades

En la actualidad las bacterias lácticas han tomado una gran importancia, debido a los beneficios saludables que se les atribuye, pueden utilizarse tanto en la prevención como el control de ciertas enfermedades, son capaces de colonizar de forma natural grandes segmentos del tubo digestivo humano (Madigan *et al.*, 2009). Dentro de las (BAL) hay dos grupos importantes: *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*, este último genero permite la degradación de glucosa a ácido láctico (Ramírez, 2010). Por lo que se emplea en el mejoramiento y conservación de ciertos alimentos (Jiménez, 2009).

1.2 Características morfológicas de *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas, su morfología varía desde bacilos largos y esbeltos a bacilos cortos y curvados o pueden presentarse en forma de cocos comúnmente formando cadenas, son no esporulados, no productores de catalasa, no motiles, pero cuando tienen motilidad es por la presencia de flagelación peritrica. Son anaerobios facultativos y producen ácido láctico como principal producto de fermentación (Olagnero *et al.*, 2007; Lira, 2013).

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. En algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Se desarrollan en medios de cultivo agar-sangre y MRS (Lira, 2013).

1.3 Condiciones de crecimiento de *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* crecen bien en medios ligeramente ácidos, pero cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3.6, aunque están en dependencia de la especie. La mayor

parte de los *Lactobacillus* son mesófilicos (Mossiel *et al.*, 2006). Tienen requerimientos muy complejos para su crecimiento, requieren bajos niveles de oxígeno, carbohidratos fermentables, proteínas, un gran número de vitaminas del complejo B, ácidos grasos insaturados y minerales (Ramírez, 2010).

1.4 Clasificación de Lactobacillus

Los *Lactobacillus* se clasifican en 3 grupos, en base a las vías de fermentación que son:

- a) Homofermentantes obligados: fermentan las hexosas casi completamente hasta producir ácido láctico. No fermentan pentosas o glucanato, utilizan la glucosa por vía fermentativa que da como producto final ácido láctico.
- b) Heterofermentantes facultativos: fermentan las hexosas casi completamente produciendo ácido láctico, acético, fórmico, CO₂ y etanol. Las pentosas son fermentadas hasta ácido láctico y acético estrictos.
- c) Heterofermentantes obligados: fermentan las hexosas hasta ácido láctico, CO₂, ácido acético y etanol (Lira, 2013).

De esta manera las BAL son probablemente los microorganismos probióticos más importantes, asociados con el tracto gastrointestinal humano (Jiménez, 2009).

1.5 Definición de probiótico

Debido a las observaciones de Eli Metshnikoff, surge el término probiótico que deriva del griego y significa “por la vida o a favor de la vida”. Su hipótesis era que el crecimiento de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal desplazaría a otras bacterias putrefactivas (FAO y OMS, 2006).

Existen múltiples definiciones de este término, aunque debe señalarse que la palabra probiótico fue empleada por primera vez por Lilly y Stilwell en 1965. Desde ese momento y a la fecha la definición se ha ido actualizando, hasta nuestros días la más completa es “microorganismos vivos que se administran al hospedador y que ejercen un efecto fisiológico benéfico sobre su salud” (Torres, 2006; Ramos *et al.*, 2012).

Los probióticos han sido propuestos para establecer y mantener la salud de la microbiota del intestino, prevenir la colonización de bacterias patógenas, restablecer la microbiota

benéfica agotada por antibióticos e incrementar la resistencia a infecciones entéricas y gastrointestinales causadas por patógenos (Pérez *et al.*, 2013).

Como consecuencia, para que un microorganismo pueda considerarse como probiótico debe cumplir las siguientes características:

- Ser de origen humano, ya que estas cepas presentan mayor facilidad para colonizar el intestino humano.
- Poseer tolerancia a las condiciones ambientales.
- Ser capaz de adherirse a células epiteliales.
- Adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa.
- No debe ser patógeno ni tóxico (Gutiérrez *et al.*, 2007; Villena *et al.*, 2009)

1.5.1 Microorganismos identificados como probióticos

Algunas especies de microorganismos considerados como probióticos en humanos, se muestran en la Tabla 1.

El consumo de estos microorganismos en diferentes formas y/o presentaciones, genera múltiples beneficios, como los que se mencionan a continuación.

Tabla 1. Microorganismos probióticos en seres humanos.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus y Lactococcus</i>	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Streptococcus salivarius spp. thermophilus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis spp. cremoris</i>	
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>L. lactis spp. lactis</i>	
<i>L. casei spp. rhamosus</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. delbrueckii spp. bulgaricus</i>			
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			

L. johnsonii
L. rhamnosus
L. salivarius
L. fermentum
L. reuteri

Fuente: Torres (2006).

1.5.2 Beneficios de los probióticos

Son múltiples los beneficios que ejercen los probióticos en el ser humano, como la intolerancia a la lactosa, estimulación del sistema inmunológico, resistencia contra patógenos, prevención de diarrea, reducen el riesgo de contraer cáncer de colon, reducen los niveles de colesterol, modifican la flora benéfica fomentando su desarrollo (Ramírez, 2010; Torres, 2006), mejoran la velocidad del tránsito intestinal, ayudan a prevenir úlceras pépticas y el síndrome del intestino irritable, así como previenen infecciones del tracto urogenital y respiratorio, ejerce algunos efectos sobre el estrés crónico y el sistema nervioso en humanos (Ramos *et al.*, 2012). Sin embargo, estos beneficios se ven limitados por diversos factores.

1.5.3 Afectaciones de los probióticos

Se ha reportado que la influencia del estrés, la acidez gástrica, las sales biliares, la sensibilidad a enzimas, los niveles de oxígeno (especialmente para *Bifidobacterias*), el pH, la presencia de inhibidores, la temperatura de almacenamiento, la composición de matrices de alimentos, la composición química del medio, la concentración final de azúcares (aumento de la presión osmótica) e interacción antagónica con otra especie, son algunos factores que influyen directamente en la pérdida de la viabilidad de los microorganismos probióticos (Olagnero *et al.*, 2007; Corona *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2013), debido a estos problemas se buscan alternativas para que los probióticos lleguen vivos a su destino, sin ser alterados bajo estas condiciones, algunas de las estrategias propuestas para incrementar la resistencia de cepas probióticas contra el medio ambiente adverso son: la selección de cepas resistentes a los ácidos y bilis, empaquetamiento de los materiales protegidos de oxígeno, fermentaciones en doble etapa, pre-adaptación a varias condiciones de estrés, adición de micronutrientes en forma de aminoácidos y péptidos, y microencapsulación.

Siendo esta última la más desarrollada, con el objetivo de proporcionar una protección adecuada a las cepas probióticas contra los diversos ambientes (Corona *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2013).

La supervivencia de las bacterias probióticas durante la encapsulación, almacenamiento y en condiciones gástricas es altamente dependiente de la cepa utilizada (Amin *et al.*, 2013), algunos de los microorganismos más estudiados con esta técnica son: *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. gasseri* y *L. reuteri* (Hinestroza y López, 2008).

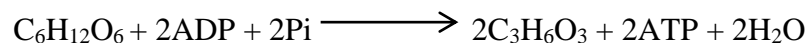
En el presente trabajo nos enfocaremos al estudio de *L. casei* y *L. rhamnosus*.

1.6 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un bacilo microaerófilico, gram positivo, catalasa negativo, fue aislado en el intestino humano, tiene efectos benéficos en el tracto digestivo al inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos intestinales en estudios clínicos realizados en humanos y animales (Gutiérrez *et al.*, 2007).

El metabolismo de *L. casei* es homofermentativo gracias a que posee una enzima llamada fosfoctolasa, que le permite seguir la vía de las pentosas convirtiendo hexosas (principalmente glucosa) en pentosas.

Este microorganismo obtiene su energía a partir de la glucosa basada en la reacción metabólica siguiente:



Debido al pH bajo que presentan el estómago y los jugos biliares del intestino, varias cepas de *Lactobacillus* no son capaces de sobrevivir en su paso. Sin embargo, hay estudios *in vitro* e *in vivo*, acerca de la viabilidad de *L. casei* frente a pH del estómago y han dado resultados favorables a la tolerancia de pH ácidos, por lo tanto se considera que este microorganismo puede sobrevivir en el tracto digestivo e inhibir el crecimiento de bacterias nocivas (Jiménez, 2009). Y como consecuencia, se ha comprobado su inhibición contra *Salmonella*, *Shigella* y *Helicobacter*, reduce la intolerancia a la lactosa y aumenta la respuesta inmunológica (Lozano, 2011).

1.7 Lactobacillus rhamnosus

Es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa, la cual produce ácido láctico y etanol bajo condiciones de anaerobiosis. Fue aislado por primera vez en 1983 en los intestinos de un humano sano por los científicos Barry Goldin y Sherwood Gorbach, cuando fue demostrado tener notable tolerancia a los ácidos agresivos que se encuentran habitualmente en el estómago y el tracto digestivo. El “GG” es el nombre de la cepa *L. rhamnosus GG* esto derivado de los apellidos de los dos científicos que la aislaron.

Puede inhibir el crecimiento de patógenos y presenta capacidad de adherirse a las células intestinales (Rodríguez *et al.*, 2011), al igual que otros probióticos tiene propiedades benéficas en el tracto intestinal (Lira, 2013). No posee actividad antimicrobiana contra otras BAL y posee una buena adhesión a las glicoproteínas del íleon humano y a los productos con fibra dietética, es tolerante al pH bajo y a los fluidos pancreáticos y biliares. Tiene actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Costridium perfringens*, en estudios *in vitro*. Posee excelente viabilidad en yogurt y proporciona buenas propiedades sensoriales (Calderón *et al.*, 2007).

Capítulo 2. Encapsulación

2.1 Definición

La encapsulación es el proceso y/o tecnología en la cual ciertas células vivas, micronutrientes, enzimas y otros componentes sensibles se empacan en una matriz para protegerlos de reacciones con otros compuestos presentes en alimentos o impedir que sufran oxidación debido a la luz o al oxígeno (Hinestroza y López, 2008).

Es considerada también como la tecnología mediante la cual se logra combinar compuestos activos dentro de una matriz polimérica. A los productos resultantes de este proceso se les denomina macropartículas, microcápsulas o microesferas, cuya estructura puede formar un sistema de reservorio y matricial (López, 2012).

La encapsulación es una técnica que crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior, liberando ingredientes alimenticios en determinado tiempo y lugar (López, 2012; Jan y Nedovic, 2010).

En los alimentos las cápsulas permiten enmascarar sabores desagradables, estabilizan ingredientes y/o incrementan la viabilidad de microorganismos (Calero *et al.*, 2008).

La encapsulación se inició en 1930, con la utilización de materiales coloidales para desarrollar las copias sin papel carbón. El método más antiguo empleado en alimentos es el secado por aspersión, el cual comenzó encapsulando sabores en goma arábiga.

La encapsulación se elige de acuerdo con la aplicación requerida, el tamaño de cápsula deseado, el material a encapsular, los costos, el mecanismo de liberación deseado y las propiedades físicas y químicas del recubrimiento (Yáñez *et al.*, 2002), por lo que se pueden obtener diversos tipos de aglomerados o cápsulas dependiendo los ingredientes y el proceso de obtención (López, 2012; Jan y Nedovic, 2010).

Su aplicación es diversa dependiendo el área de aplicación, entre las más sobresalientes se encuentran el área de alimentos, la industria farmacéutica, química, entre otras, de acuerdo a las ventajas que tiene su aplicación.

2.2 Aplicación de la encapsulación

Actualmente la industria que más utiliza esta técnica es la de alimentos, a continuación se mencionan las razones de su aplicación.

- Controlar la liberación del material encapsulado a condiciones predeterminadas, como el cambio de pH, humedad, aplicación de calor o estímulos físicos.
- Reducir la interacción entre el material encapsulado y el ambiente externo (calor, luz, humedad, reactividad, oxidación y volatilización).
- Facilitar la manipulación del material encapsulado: la encapsulación convierte un líquido a estado sólido, además previene la agregación, favorece el proceso de mezclado y asegura que el material encapsulado se encuentre uniforme en la mezcla.

Con respecto al encapsulado de microorganismos, los beneficios de la encapsulación de probióticos está dado por la facilidad de producir cultivos sensibles al oxígeno, mejorar la

supervivencia cuando se exponen a condiciones gástricas, bilis, acidificación, calor, congelación, estabilidad durante el almacenamiento y protección contra contaminantes y bacteriófagos (Pérez *et al.*, 2013).

2.3 Desventajas de la encapsulación

Algunas de las desventajas de la encapsulación, es la morfología de la superficie de las cápsulas que pueden ser lisas (regular y esférica) o irregular (desigual) con o sin presencia de poros, los cuales son los responsables de reducir la eficiencia de este proceso.

En algunas técnicas de encapsulación la utilización de altas temperaturas, puede ser no adecuada para encapsular cultivos probióticos, otra desventaja son los materiales de cobertura y los largos tiempos de gelificación (Lupo *et al.*, 2012; Calero *et al.*, 2002). Otros factores también incluyen el costo de su elaboración y su adaptación a gran escala o a nivel industrial.

2.4 Técnicas de encapsulación

Existen una gran variedad de técnicas de encapsulación, sin embargo, cada técnica tiene sus ventajas, limitaciones y aplicaciones por lo que la elección de alguna de ellas depende de los objetivos que se busquen (Guevara y Jiménez, 2008).

Las técnicas de encapsulación con mayor aplicación en la industria de alimentos se clasifican en dos grupos:

Métodos físicos:

- Secado por aspersión
- Enfriamiento por aspersión
- Liofilización
- Recubrimiento por lecho fluidizado
- Extrusión
- Co-extrusión
- Extrusión fusión
- Cocrystalización

Métodos físico-químicos:

- Liposomas
- Coalescencia
- Gelificación iónica
- Complejos de inclusión

En alimentos una de las técnicas más empleadas es el secado por atomización, sin embargo a nivel laboratorio se utiliza con un gran aprovechamiento la gelificación iónica.

2.4.1 Método de gelificación iónica

El método de gelificación iónica es la formación de hidrogeles, es una técnica de encapsulación muy empleada y continuamente se buscan alternativas que permitan su implementación a escala industrial.

Esta técnica consiste en el goteo de la solución de hidrocoloide a través de un capilar o boquilla, las gotas se reciben en una solución dispersante, en la cual ocurre la acción de gelificación. Se utiliza principalmente alginato de sodio como gelificante y la combinación con iones divalentes de calcio, para inducir la gelificación.

En esta técnica es importante controlar las siguientes condiciones para obtener las características morfológicas y el tamaño de los encapsulados, estos son: densidad, tensión superficial, viscosidad de la solución hidrocoloide, diámetro de la punta de goteo, velocidad de caída, diámetro de la gota, entre otras (López, 2012).

Las ventajas y desventajas de la aplicación del método de gelificación iónica en la encapsulación de microorganismos probióticos se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la aplicación del método de gelificación iónica para encapsular probióticos.

Ventajas	Desventajas
Proceso simple y barato	Es susceptible a la acidez del ambiente que lo rodea.
Facilidad para formar gel, en las matrices con células bacterianas	La presencia de iones causa deterioro en el alginato

No es tóxico para el ser humano (seguro y biocompatible) Existe pérdida de la solubilidad mecánica
 Apropriada para células bacterianas con tamaño de 1-3 μm .

Fuente: Hinestroza y López, 2008.

2.5 Materiales de encapsulación y/o de cobertura

La selección del material apropiado para la encapsulación es uno de los pasos más importantes en el proceso de encapsulación.

El material de cobertura debe reunir ciertas propiedades que dependen de las características del material a encapsular, entre ellas están: poseer baja viscosidad a altas concentraciones, baja higroscopicidad para facilitar su manipulación y evitar la aglomeración, capacidad de emulsificar y estabilizar el material encapsulante, ser insoluble y no reactivo con el material encapsulante, máxima protección contra condiciones adversas (luz, pH, oxígeno, humedad y otros ingredientes reactivos) (Pérez *et al.*, 2013; Amin *et al.*, 2013).

Los materiales más utilizados para la encapsulación de alimentos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Materiales para la encapsulación de alimentos.

Origen	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos
Plantas	Derivados de plantas: goma arábica, karaya, mesquite Extractos de plantas: galactomananos, aceite de soya, polisacáridos	Gluten	Ácidos grasos/alcoholes, glicéridos, fosfolípidos,
Algas marinas	Carragenina, alginato		
Bacterias y animales	Xantana, gellan, dextrano, quitosano	Caseínas, proteínas de suero de leche, gelatina	Ácidos grasos/alcoholes glicéridos, fosfolípidos.

Fuente: Jan y Nedovic, 2010.

2.5.1 Características del alginato

Los alginatos son sales de ácido algínico que pueden estar formados por Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , forman sales con diferentes grados de solubilidad en agua a lo que confieren su viscosidad. Son extraídos de varias especies de algas marinas, además se pueden formar por residuos de los ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico.

El alginato es comúnmente utilizado en la industria farmacéutica y biotecnológica como agente espesante y estabilizador coloidal. Es la matriz de encapsulación más ampliamente utilizada para varios alimentos y compuestos no alimenticios (Romero *et al.*, 2013). Para la encapsulación de probióticos se utiliza en concentraciones de 0.5 - 4 % (Pérez *et al.*, 2013).

2.5.1.1 Ventajas y desventajas de la utilización de alginato

La ventaja de utilizar alginato como material encapsulante es que no es tóxico, forma matrices suaves con cloruro de calcio para atrapar bacterias probióticas, la viabilidad de las bacterias encapsuladas no se ve afectada durante su vida útil.

Los alginatos son capaces de formar geles más firmes con buena estabilidad mecánica y fácil liberación de bacterias encapsuladas cuando son suspendidas en un tampón alcalino (Amin *et al.*, 2013).

Las desventajas de este medio de cobertura es que existen dificultades en su aplicación a nivel industrial, susceptibles al ambiente de acidez que lo rodea, pérdida a la estabilidad mecánica, formación de poros en la superficie de la cápsula y difusión relativamente rápida de la humedad, aunque pueden ser eficientemente compensados al mezclar con otros polímeros (Hinestroza y López, 2008; Pérez *et al.*, 2013), debido a esto su mezcla con materiales con actividad prebiótica podría resultar en el incremento de la viabilidad, entre otras propiedades, ingredientes como el aguamiel podrían mejorar estas propiedades.

Capítulo 3. Aguamiel

3.1 Generalidades

México es el centro de origen del género *Agave spp.* con un total de 159 especies endémicas, representando el 75 % de todas las especies (Huerta *et al.*, 2014).

El aguamiel es la savia del maguey (*Agave*), es un producto que fue conocido desde la época de los antiguos pobladores de México, quienes lo utilizaban como materia prima para la elaboración de bebidas fermentadas, también se toma como bebida refrescante, atole y se produce miel, se consume como endulzante y golosina. Tanto en forma de aguamiel como de pulque, se considera una bebida con propiedades alimenticias nutricionales por los azúcares, aminoácidos esenciales, sales minerales y vitaminas. Algunas de las vitaminas y nutrientes encontrados son: vitamina C, hierro, fósforo, tiamina, riboflavina, calcio y niacina (Cortés y Basurto, 2005; Escalante, 2008; Sampedro, 2009). Sustancias funcionales del *Agave* son polisacáridos con actividad prebiótica como la inulina y los fructanos.

3.2 Características fisicoquímicas del aguamiel

El aspecto del aguamiel es líquido, de olor característico, de colores que varían de blanco tenue a amarillo claro, e incluso transparente (Cortés, 2009), es altamente inestable a temperatura ambiente, fácilmente se fermenta motivo por el cual no se puede transportar tan fácilmente (Bautista, 2006).

Presenta un pH promedio cercano a la neutralidad (6.8), una proporción de sólidos solubles de 7 a 14 °Brix, con un % de humedad elevado (86 %). El contenido de proteína soluble es de 5.3 %. Es rico en carbohidratos como inulina, sacarosa y fructosa (Ramírez, 2010). La sacarosa es el azúcar que está presente en mayor proporción, aunque hay otros polisacáridos compuestos por glucosa y fructosa como los fructo-oligosacáridos (FOS) (Flores *et al.*, 2008). La presencia de FOS y fibra dietética soluble mejoran el sistema digestivo y la capacidad de eliminación de grasas y toxinas que dañan el cuerpo humano. Este producto por sí mismo es un estimulante del crecimiento de la flora intestinal (Yáñez *et al.*, 2014). Debido a esto, el aguamiel es clasificado como prebiótico.

3.3 Prebióticos

Los prebióticos se definieron en 1995 como ingredientes alimentarios no digeribles que afectan de manera benéfica al hospedador por estimulación selectiva del crecimiento de ciertos microorganismos en el tracto gastrointestinal.

Para que una sustancia pueda ser definida como prebiótico debe cumplir los siguientes requisitos:

- Ser de origen vegetal
- Formar parte de un conjunto muy heterogéneo de moléculas complejas
- No ser digerida por las enzimas digestivas
- Ser parcialmente fermentada por las bacterias colónicas
- Ser osmóticamente activa (Torres, 2006; Ramos *et al.*, 2012).

La utilización de prebióticos por bacterias colónicas genera en numerosos casos, la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales poseen un gran impacto sobre el intestino grueso, el metabolismo de micronutrientes y prevención de enfermedades, como la disminución del riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Hernández y Jiménez, 2010).

Capítulo 4. Simulación gástrica

4.1 Generalidades

Los modelos de simulación gastrointestinal *in vitro* se emplean para evaluar las transformaciones que sufren los alimentos e ingredientes alimentarios durante el tránsito por el tracto gastrointestinal, ya que permiten considerar regiones de difícil acceso fisiológico (estómago, intestino, colon) y las distintas variables fisiológicas, por ejemplo: variaciones de pH, fluidos gastrointestinales, cambios de microbiota, etc.

En los últimos años, se han desarrollado sistemas modelo sencillos basados en fermentaciones estáticas en “batch”, y más avanzados, como simuladores dinámicos del tracto gastrointestinal que pretenden reflejar la mayoría de los parámetros fisiológicos que pueden influir en la microbiota intestinal y su actividad metabólica (Cueva *et al.*, 2013).

4.2 Ventajas de su aplicación

Gracias a esta tecnología se puede comprobar qué compuestos funcionales presentes y/o incorporados en diferentes matrices (medicamentos, alimentos) puede ser potencialmente

absorbido por el sistema digestivo (bioaccesibilidad) y cuáles de ellos son realmente metabolizados por el organismo, llegando al plasma sanguíneo y produciendo en él, el efecto buscado (biodisponibilidad).

La aplicación de modelos de digestión *in vitro* supone una gran ventaja, principalmente para el sector industrial, entre estas ventajas se puede considerar:

- Conclusiones precisas y evidencias científico-técnicas sobre la efectividad de sus productos o ingredientes adicionados.
- Ayuda útil para la selección de compuestos, además de facilitar el diseño de nuevas formulaciones y técnicas que aumenten la efectividad de los principios activos. Un ejemplo de ello es la microencapsulación.
- Rapidez en la obtención de los resultados.
- Ahorro de costos frente a métodos *in vivo* (con humanos y/o animales).
- Mayor reproducibilidad que en los ensayos *in vivo*, porque se controlan en mayor medida las variables externas que pueden intervenir (AINIA, 2015).

4.3 Estudios de la simulación gástrica en probióticos

Existen un gran número de investigaciones que evalúan el comportamiento de los probióticos en simulaciones gástricas, la Tabla 4 presenta algunos de estos estudios.

Tabla 4. Estudios del efecto de la simulación gástrica en probióticos.

Autores	Investigación realizada
Michida et al. (2006)	Efecto de extractos de cereales y fibra de cereales en la viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> bajo condiciones del tracto gastrointestinal.
Mokarram et al. (2009)	Influencia de la cobertura de múltiples recubrimientos de alginato en la supervivencia de bacterias probióticas en jugo gástrico y el intestinal simulado.
Chávarri et al. (2010)	Microencapsulación de un probiótico y prebiótico en cápsulas de alginato-quitosano en condiciones gastro-intestinales simuladas.
Ortakci et al. (2012)	Supervivencia del probiótico <i>Lactobacillus paracasei</i> LBC-1e microencapsulado durante la fabricación de queso mozzarella y simulación de la digestión gástrica.

Sin embargo, pocos estudios reportan el uso de aguamiel como prebiótico o en especies como *L. casei* o *L. rhamnosus*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 1 se muestra el diagrama general de trabajo.

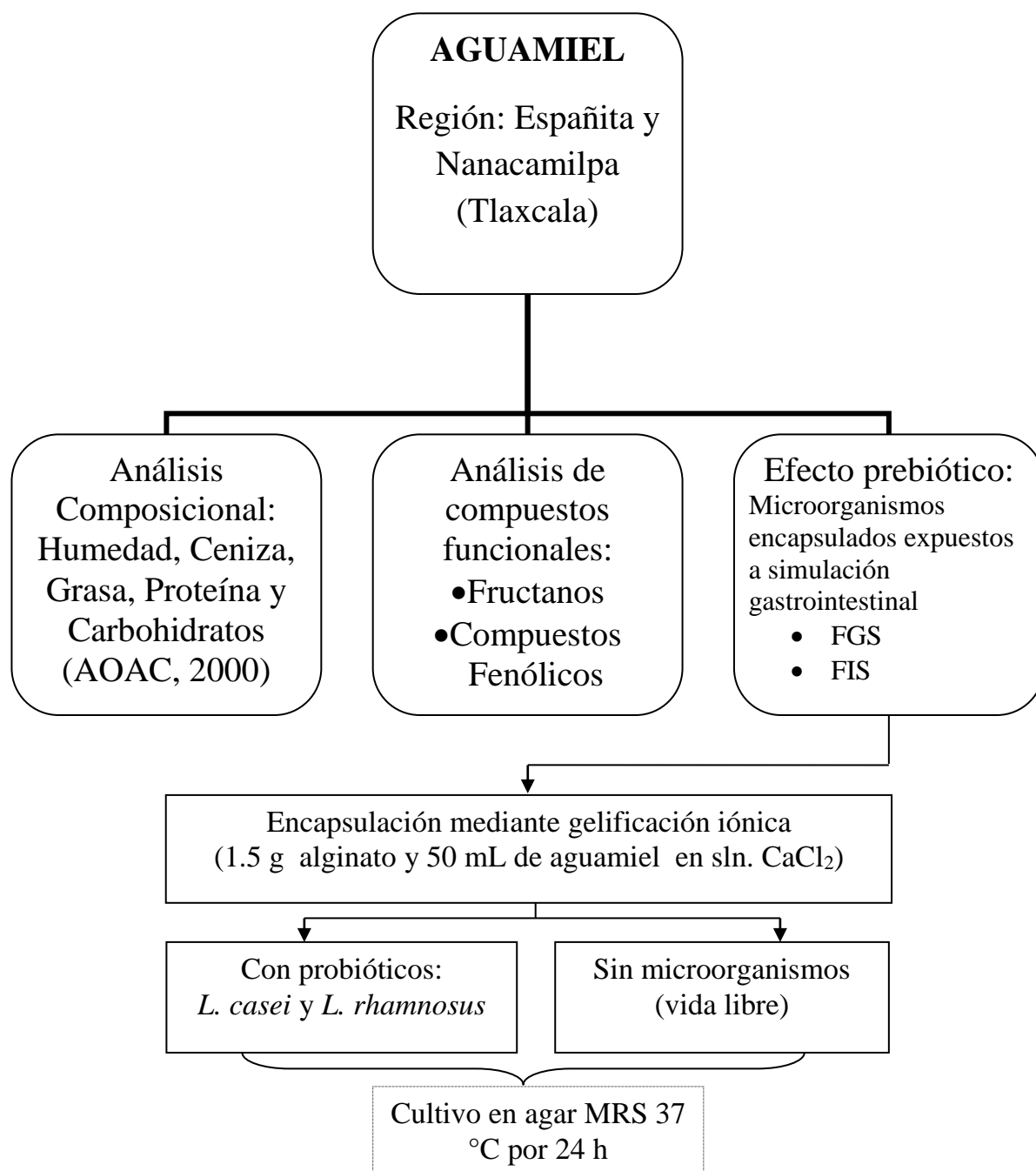


Figura 1. Diagrama general de trabajo

7.1 Materia prima

El aguamiel que se utilizó para el presente trabajo fue de los municipios de Nanacamilpa y Españita del estado de Tlaxcala. La materia prima fue colectada de un solo lote de *Agave* en el transcurso de la mañana, la muestra se colectó en botellas de plástico y se etiquetó, se colocó en una hielera para su transportación. Tanto en la recolección como a la llegada al laboratorio se les determinó el contenido de sólidos totales, el cual se realizó con un refractómetro modelo PAL α 1 Atago, Japón; siguiendo la metodología 932.12 de la AOAC (2000) y el pH que se determinó siguiendo la metodología 981.12 de la AOAC (2000), utilizando un potenciómetro modelo 310 WPACD.

7.2 Caracterización composicional de aguamiel

7.2.1 Humedad

El contenido de humedad se determinó por el método 30.006 (AOAC, 2002), mediante secado en estufa a peso constante a 105 °C. El % de humedad se calculó empleando la ecuación 1.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{w_f - w_i}{A} \times 100$$

Ec.1

Donde:

w_f = peso de charola con muestra seca (g)

w_i = peso de charola vacía (g)

A= peso de la muestra (g)

7.2.2 Cenizas

Las cenizas se determinaron bajo la norma NMX-F-607-NORMEX-2013, mediante la incineración en mufla Marca Thermocientific (F6010, USA) a 550 °C. El contenido de cenizas se calculó de acuerdo a la ecuación 2.

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{w_f - w_i}{A} \times 100$$

Ec.2

Donde:

w_f : peso del crisol con cenizas (g)

w_i : peso del crisol vacío (g)

A: peso del crisol más muestra (g)

7.2.3 Extracto etéreo (grasa)

Se realizó la extracción de acuerdo a la norma NMX-F-427-1982, con algunas modificaciones. Se pesaron 10 g de aguamiel en un matraz esmerilado, se agregaron 10 mL de HCl concentrado, y se llevó a cabo una digestión en baño maría a 60 °C por 30 min, después de la digestión ácida se dejó enfriar la muestra y posteriormente se realizó la extracción con 10 mL de éter etílico agitando por 90 s, una vez concluido el tiempo de agitación se agregaron 25 mL de éter de petróleo y nuevamente se agitó por 90 s, la mezcla formada se transfirió a un embudo de separación donde las capas de éter-grasa y la muestra se separaron, nuevamente se transfirió al matraz la muestra y se realizó una segunda extracción con la misma cantidad de solventes. La parte de éter-grasa se pasó a un vaso de precipitado de 100 mL previamente puesto a peso constante, se evaporaron los solventes, y el vaso con grasa se puso a peso constante en una estufa a 100 ± 2 °C. El contenido de extracto etéreo por hidrólisis se obtuvo de acuerdo a la ecuación 3.

$$\% \text{ de extracto etereo} = \frac{w_f - w_i}{A} \times 100$$

Ec.3

Donde:

w_f : peso del vaso con grasa (g)

w_i : peso del vaso vacío (g)

A: peso de la muestra (g)

7.2.4 Proteína

La determinación de proteína se realizó de acuerdo a la norma NMX-F-608-NORMEX-2011, y se llevó a cabo en 3 etapas.

7.2.4.1 Digestión

Se pesó 1 g de muestra y se colocó en un matraz Kjeldahl, previamente con 10 g CuSO_4 y K_2SO_4 , se adicionaron 25 mL de H_2SO_4 concentrado y se colocó en el digestor a una temperatura de 400 °C, hasta que la muestra se aclaró y tomó un color verde claro, posteriormente se apagó el equipo y dejó enfriar para realizar la neutralización.

7.2.4.2 Neutralización

Una vez concluida la parte de digestión, se le agregaron al matraz 400 mL de agua destilada, se neutralizó con 50 mL de NaOH concentración 1:1 y una pizca de zinc que ayudó a no ser agresiva la neutralización.

7.2.4.3 Destilación

Para la obtención del nitrógeno se colocó la muestra en el equipo de destilación, el destilado se recolectó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 50 mL de H_3BO_3 al 1%, usando rojo de metilo y verde de bromocresol como indicadores, una vez terminado el proceso de destilación, se tituló con una solución de HCl 0.1 N, hasta el vire del indicador. El cálculo para el contenido de proteína se realizó de acuerdo a la ecuación 4.

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V * N * 0.014 * 100 * F}{A}$$

Ec. 4

Donde:

V: mL de HCl gastados en la muestra

N: normalidad de la solución de HCl

0.014: miliequivalentes del nitrógeno

A: peso de la muestra (g)

F: 6.25 factor de proteína.

7.2.5 Fibra cruda

La determinación de fibra se realizó mediante una hidrólisis acida y básica de acuerdo a la norma NMX-F-613-NORMEX-2003. El cálculo del contenido de fibra cruda se realizó mediante la ecuación 5.

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{(w_f - w_i)}{A} \times 100$$

Ec.5

Donde:

w_f: peso del crisol con residuos seco (g)

w_i: peso del crisol con ceniza (g)

A: peso de la muestra (g)

7.2.6 Azúcares reductores totales y directos

La determinación de azúcares reductores totales (ART) y azúcares reductores directos (ARD), se realizó mediante la técnica volumétrica de Lene y Eynon (NMX-F-312-1978).

Las ecuaciones 6a y 6b expresan el cálculo para la determinación de ART y ARD.

$$ARD = \frac{F.F}{\text{mL gastados de la sni} \cdot \left(\frac{\text{g de muestra}}{250 \text{ mL}} \right)}$$

Ec.6a

$$ART = \frac{F.F}{\text{mL gastados de la sni} \cdot \left(\frac{\text{g de muestra}}{250 \text{ mL}} + \frac{25 \text{ mL de muestra}}{100 \text{ mL de aforo}} \right)}$$

Ec.6b

$$\text{Factor Fehling} = \frac{\text{mL de sacarosa}}{\text{vol. de aforo}} * \text{mL gastados del titulante}$$

7.3 Compuestos funcionales

7.3.1 Fructanos en aguamiel

La determinación del contenido de fructanos en aguamiel se llevó a cabo por el método enzimático-espectrofotométrico 997.03 (AOAC, 2000). Se realizó en 3 etapas: extracción de fructanos, hidrólisis por acción enzimática y medición de fructanos por espectrofotometría.

Se preparó una solución estándar de D-Fructosa (en cuadruplicado), el blanco de reactivos (en duplicado), el control de fructanos y el control de sucrosa con cada sitio de prueba. Se utilizó un blanco de reactivos o cero para el espectrofotómetro.

7.3.1.1 Extracción de fructanos

Se pesó con precisión 1.0 g de aguamiel dentro de un vaso de precipitado de 200 mL, se adicionaron 80 mL de agua destilada caliente a 80 °C, se agitó y se calentó durante 15 min, hasta que los sólidos estuvieran completamente dispersados.

Se enfrió la solución a temperatura ambiente, después se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, aforando con agua destilada. Posteriormente, se filtró la solución a través de un papel filtro Whatman No. 1 y se analizó inmediatamente.

7.3.1.2 Eliminación de sucrosa, almidón y azúcares reductores

Se transfirieron 0.2 mL del filtrado a ser analizado en 2 tubos de vidrio, adicionando 0.2 mL de una solución diluida de sucrasa/amilasa a cada tubo y se incubaron a 40 °C por 30 min.

Posteriormente se adicionaron 0.2 mL de una solución de borohidrato alcalino a cada tubo y se mezcló vigorosamente, se incubó nuevamente a 40 °C por 30 min, para completar la

reducción de azúcares reductores a azúcares-alcoholes. Se agregaron 0.5 mL de $C_2H_4O_2$ 2 M, a cada tubo y se mezcló, se observó una efervescencia. A esta solución se le denominó solución A.

7.3.1.3 Hidrólisis y medición de fructanos

Se transfirió una alícuota de 0.2 mL de la solución A (por triplicado) a tubos de vidrio, se adicionaron 0.1 mL de la solución de fructanasa a dos tubos de prueba, al tercer tubo se le adicionó únicamente 0.1 mL de buffer de acetato, se mezcló el contenido e incubó a 40 °C por 20 min, para completar la hidrólisis de fructanos a fructosa y glucosa.

Se adicionaron 5.0 mL del reactivo PAHBAH a todos los tubos, incluyendo la solución estándar de fructosa, el blanco de reactivos y la muestra control de extractos de fructanos, así como la muestra control de sucrosa, todos los tubos se incubaron en un baño de agua caliente por exactamente 6 min.

Los tubos se retiraron del baño de agua caliente e inmediatamente se colocaron en agua fría (18 a 20 °C) por 5 min, y se procedió a medir la absorbancia de todas las soluciones a 410 nm contra un blanco de reactivos, en un espectrofotómetro marca Thermoscientific Modelo Ge-20, USA.

Se determinó el contenido total de fructanos, usando la Ecuación 7.

$$Total\ de\ fructanos\ \% = Ab * F * 5 * V * \frac{1.1}{0.2} * \frac{100}{A} * \frac{1}{1000} * \frac{162}{180}$$

Ec.7

Dónde:

Ab: absorbancia de 0.2 mL de la solución de reactivos contra el blanco de reactivos

F: factor para convertir los valores de absorbancia a μ g de fructosa (=54.5 μ g de fructosa/valores de absorbancia para 54.5 μ g de fructosa)

5: factor para convertir de 0.2 mL a ensayos de 1.0 mL

V: volumen (mL) del extracto usado (100 mL)

1.1/0.2: 0.2 mL fue tomado para 1.1 mL del análisis de digestión enzimática

A: peso (mg) de la porción de prueba extraída

100/A: factor que expresa fructanos como porcentaje

1/1000: factor para convertir de μg a mg

162/180: factor para convertir la fructosa libre a anhidrofructosa.

7.3.2 *Compuestos fenólicos en aguamiel*

El contenido de compuestos fenólicos en aguamiel se realizó, siguiendo el método propuesto por Gao *et al.* (2000) con modificaciones.

Se usó 1 g de aguamiel y se aforó a 10 mL con etanol (extracto), se agitó por 10 min y después se filtró, en un tubo ámbar se mezclaron 2 mL de agua destilada con 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se añadieron 100 μL de extracto, y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente.

Se preparó un blanco, en el cual se sustituyó la cantidad de reactivo por agua destilada, se añadió 1 mL de solución de Na_2CO_3 al 20% se mezclaron perfectamente y se incubaron durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente.

Transcurrida la hora, se pasó el contenido del tubo a una celda para espectrofotómetro de 4 mL y se midió la absorbancia de la muestra a 765 nm.

Para determinar la cantidad de compuestos fenólicos, se realizó una curva estándar con $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ de la cual se realizó una regresión lineal obteniendo la Ecuación 8 con una $R^2 = 0.9673$.

$$y = 0.0378 x + 0.0678$$

Ec. (8)

7.4 *Curva de crecimiento para Lactobacillus*

7.4.1 *Preparación del medio de cultivo*

Se preparó caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) para determinar el crecimiento de los microorganismos y determinar el tiempo en el que la población se encontraba próxima a su etapa estacionaria (1×10^8 ufc/mL).

La Tabla 5 muestra la formulación del medio MRS, el cual es un medio específico para el desarrollo de BAL.

Tabla 5. Composición del medio MRS.

Componente	Peso (g)
Peptona	10
Extracto de res	10
Dextrosa	20
Polisorbato 80 (tween 80)	1
Citrato de amonio	2
Extracto de levadura	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2
Acetato de sodio	5

Los ingredientes se disuelven en 1 L de agua destilada y se hierven, posteriormente se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

7.4.2 Obtención de curvas de crecimiento

Se preparó el medio de cultivo MRS conforme el apartado 7.5.1. Los caldos estériles fueron inoculados con los microorganismos *Lactobacillus casei* NRRL (B-1922) o *L. rhamnosus* NRRL (B-442), ambos cultivos microbianos fueron donados por el Departamento de Servicios de Investigación de Agricultura de la USDA.

La inoculación se llevó a cabo tomando 3 asadas de cada microorganismo, adicionadas en 100 mL de caldo MRS, una vez realizada la inoculación, se incubaron en una estufa de cultivo a 37 °C durante 36 h, realizándose muestreos cada 4 h.

La siembra microbiana se realizó mediante la técnica de siembra en superficie, en cajas Petri con 15 mL de agar MRS usando 0.1 μL de muestra, los microorganismos se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C por 48 h. Se realizó la cuenta microbiana de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994, y así se determinó el tiempo en que se obtiene una población de 1×10^8 ufc/mL aproximadamente.

7.5 Formación de cápsulas por gelación iónica

7.5.1 Formación de cápsulas

La formación de cápsulas por el método de gelación iónica, se realizó de acuerdo a lo citado por Lira (2013). Se preparó una solución de 1.5 g de alginato de sodio disuelto en 50 mL de aguamiel en agitación durante 10 min a una temperatura de 35 °C, esta solución se hizo pasar a través de una jeringa y las gotas se dejaron caer en una solución de CaCl_2 0.1 M, obteniendo así las cápsulas (Figura 2).



Figura 2. Cápsulas de alginato de sodio con aguamiel, obtenidas mediante gelación iónica.

7.5.2 Encapsulación de microorganismos

Se tomaron 3 asadas de una cuña de agar MRS con *L. casei* o *L. rhamnosus* y se inocularon en 100 mL de caldo MRS, los caldos se incubaron a 37 °C, durante el tiempo previamente determinado en la curva de crecimiento (apartado 7.4.2), posteriormente se vertieron en tubos de centrifuga previamente esterilizados, los cuales fueron sometidos a centrifugación

a 5000 rpm durante 15 min para la obtención de biomasa, la biomasa fue re-suspendida con 0.5 mL de solución isotónica, y finalmente almacenada en refrigeración hasta su uso. La adición de los microorganismos (*L. casei* y/o *L. rhamnosus*) se realizó en la formación de las cápsulas previamente descritas en el apartado 7.5.1. Por cada 100 mL de solución se adicionaron 2 mL de biomasa.

7.6. Evaluación de la supervivencia de microorganismos en un sistema que simule condiciones gastrointestinales.

Para el proceso de simulación gastrointestinal se emplearon cápsulas adicionadas con microorganismos (1 g) y microorganismos sin encapsular, es decir se tomó 1 mL de la biomasa centrifugada de cada microorganismo los cuales se les denominó microorganismos en vida libre.

La evaluación de la supervivencia de los probióticos a través del tracto gastrointestinal, se realizó elaborando un fluido gástrico simulado (FGS) y un fluido intestinal simulado (FIS), es decir un sistema gastrointestinal continuo.

El FGS se preparó con agua destilada estéril a pH de 2, ajustando con HCl 1 N, 2 g de NaCl y 3.2 g de pepsina, aforando a 1L de solución.

Posteriormente se tomó 1 g o 1 mL de los microorganismos encapsulados y sin encapsular y se colocaron en 9 mL de la solución de FGS, se incubó en un baño con temperatura constante (37 °C) y agitación continua de aproximadamente 110 rpm durante 2 h.

En el siguiente paso, se tomó 1 mL de la solución fisiológica de FGS después de 2 h y se transfirió a una solución estéril que contenía 9 mL del FIS, el cual se preparó con agua destilada estéril a pH de 7 (ajustado con NaOH 1 N), que contenía por litro de solución 6.8 g de KH_2PO_4 y 10 g de pancreatina de porcino. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 3 h bajo agitación de 110 rpm, en un baño con temperatura y agitación constante.

El recuento de los microorganismos se realizó tomando alícuotas de 1 mL cada 60 min durante 5 h (2 h en el FGS y 3 h en el FIS), las alícuotas fueron colocadas en 9 mL de agua

peptonada estéril, realizando las diluciones necesarias y sembrando en superficie sobre cajas Petri con agar MRS e incubándolas anaeróbicamente a 37 °C por 48 h.

El conteo de microorganismos se realizó por recuento en placa empleando la NOM-092-SSA1-1994.

7.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente usando el software MINITAB (Versión 16, Lead Technologies Inc. USA.), mediante un análisis de varianza (ANOVA) Y pruebas de comparación de Tukey con nivel de confianza del 95 %.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis químico, composicional y compuestos funcionales de aguamiel

Los resultados *in situ* del pH del aguamiel, no mostró diferencia entre los sitios de muestreo, los valores de aguamiel de Españita y Nanacamilpa fueron $\text{pH } 5.55 \pm 0.06$ y 5.52 ± 0.03 respectivamente, en cuanto a los °Brix si hubo diferencia ($p < 0.05$) siendo para Españita 13.80 ± 0.42 y para Nanacamilpa 10.85 ± 0.07 , sin embargo, estos valores se encuentran dentro de lo reportado por Flores et al. (2006), quienes reportaron que el valor de °Brix para aguamiel se encuentra entre 11.0 y 15.3. Por otro lado, Jurado y Sarzosa (2009), determinaron que los sólidos solubles en aguamiel, pueden variar en un rango de 10.65 a 15 °Brix, las variaciones se pueden deber al tipo de maguey y a su etapa de producción, dependiendo del lugar de siembra y de la especie analizada, pues no todos los suelos son iguales y no todos conservan los nutrientes necesarios para un óptimo aprovechamiento.

Los resultados del análisis composicional de aguamiel de la región de Españita y Nanacamilpa del estado de Tlaxcala, se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis composicional de aguamiel del estado de Tlaxcala.

Componente bh (%)	Españita	Nanacamilpa
Humedad	83.43 ± 0.29 ^a	81.26 ± 0.14 ^b
Ceniza	0.57 ± 0.23 ^a	0.37 ± 0.05 ^a
Extracto etéreo	0.00 ± 0.01 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
Proteína	0.62 ± 0.05 ^a	0.68 ± 0.07 ^a
Fibra Cruda	ND	ND
Azúcares reductores	ND	ND
Carbohidratos *	15.38 ± 0.04 ^a	17.15 ± 0.38 ^b

ND: No detectable; *Carbohidratos fueron calculados por diferencia; (n=3) ± desviación estándar.

Letras diferentes en la misma línea indican diferencia estadística significativa (p < 0.05).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis composicional realizado en aguamiel de la región de Tlaxcala, se observó en mayor concentración el contenido de humedad, coincidiendo con lo reportado por Campos-Mendiola (2002), quien reporta un porcentaje del 86 %, así como Ramírez (2001), quien reporta un porcentaje de humedad del 81.5 % en *Agave atrovirens karw* (manso).

Respecto al contenido de proteína, ambos municipios presentaron un valor menor al 1 %, sin embargo, Lira (2013) analizó el aguamiel del mismo estado y reportó 0.69 %, por otro lado, Ramírez (2010) reporta 3.32 g/L de proteína en *A. salmiana* del estado de México. El aguamiel a pesar de ser considerado una bebida, presenta un alto contenido de proteína y aminoácidos esenciales (Escalante, 2008), la variación obtenida en este trabajo, se debe a que las especies analizadas son diferentes, además de tomar en cuenta la región y las condiciones de análisis en cuanto a la técnica utilizada.

Con respecto al contenido de cenizas ambas muestras no presentaron diferencia significativa (p > 0.05), lo cual coincidió con lo reportado por Silos et al. (2007), quienes reportan el contenido de cenizas de 0.37 %, estos valores podrían referirse a la presencia de minerales en el aguamiel. Sampedro (2009), reporta la presencia de minerales en aguamiel, indicando que el cuerpo humano puede necesitar de estos macroelementos, tales como: fósforo, hierro, calcio, magnesio, zinc y algunas vitaminas principalmente del complejo B y vitamina C.

Se determinó también el contenido de grasa que posee el aguamiel, sin embargo, se encontró que no posee ningún contenido de este componente, la gran mayoría de componentes del aguamiel son agua, minerales y azúcares en forma de inulina.

El análisis de fibra cruda y azúcares reductores no fue detectable por los métodos empleados, es por ello que se recurrió a reportar carbohidratos por diferencia y a realizar el análisis de fructanos.

En cuanto a la cantidad de carbohidratos presentes, éstos están en mayor proporción al igual que el contenido de humedad, incluso son mayores a lo reportado por Bautista (2006), quien reporta 12.03 %. Esto resultados, reflejan que pueden contener una diversidad de azúcares, ente ellos azúcares sencillos, como la glucosa y fructosa, y complejos polisacáridos, como la inulina y fructo-oligosacáridos (FOS). Flores et al. (2006) consideran que el aguamiel es rico en carbohidratos no digeribles, por esta razón, el aguamiel puede ser un prebiótico, debido a que puede presentar este tipo de azúcares.

Los resultados del contenido de fructanos (Figura 3) y compuesto fenólicos (Figura 4), indican diferencia ($p < 0.05$) en el aguamiel de ambas regiones, lo cual demuestra que es importante el lugar de siembra de una especie vegetal, debido a que esto afecta en la cantidad de compuestos identificados, el aguamiel de la región de Españaña presentó el mayor contenido tanto de fructanos como de compuestos fenólicos.

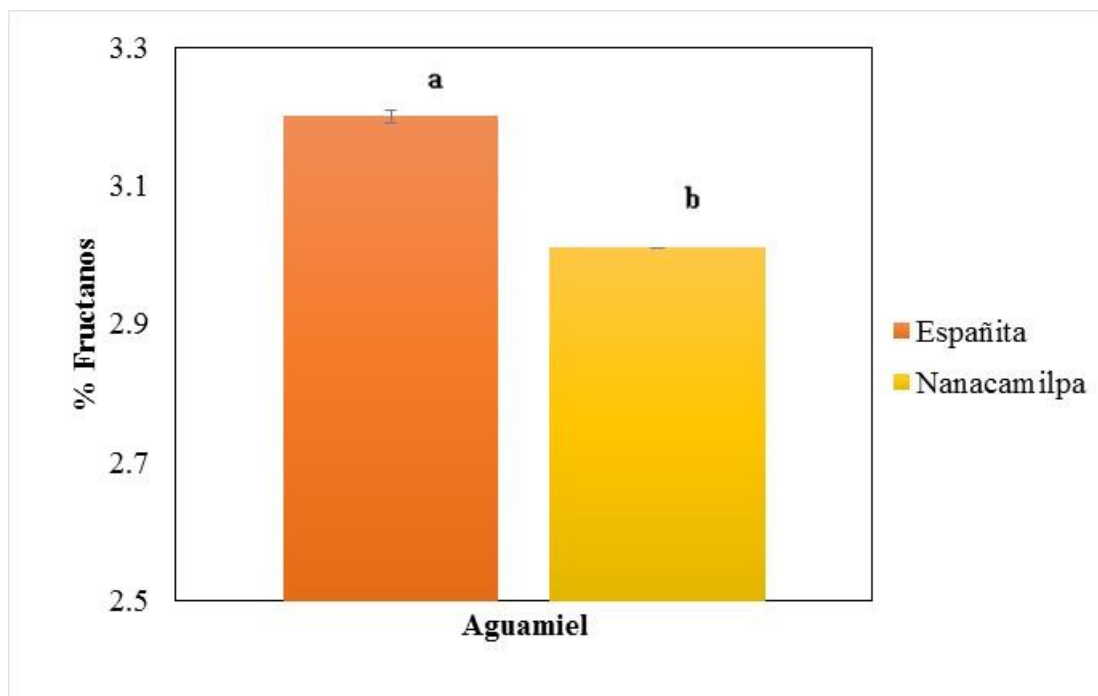


Figura 3. Contenido de fructanos (%) de aguamiel de la región de Españaña y Nanacamilpa, Tlaxcala.

La presencia de fructanos en aguamiel indica su potencial como agente prebiótico, debido a que se consideran prebióticos sustancias como la inulina, fructo-oligosacáridos o fructanos, galacto-oligosacáridos, entre otros (Corcoran, 2004).

La cantidad de fructanos obtenidos en el presente trabajo, difiere con lo reportado por Martínez del Campo (1999), quien reporta una variación de 0.8 a 1.7 % de fructanos en *Agave pulquero*.

Conceição et al. (2014) mencionan que la diferencia de la cantidad y tipo de fructanos presentes en agaves, depende de la especie, el clima, condiciones de crecimiento, proceso de cosecha y tiempo, así como de la técnica utilizada para la cuantificación de fructanos, así también como estos factores afectan el grado de polimerización de los oligosacáridos.

Ortíz et al. (2008) reportan 10 % de fructanos presentes en *A. mapisaga*, en muestra seca, y a su vez menciona que la presencia de fructanos en el aguamiel actúan como termoprotectores en época de sequías para la planta, y a su vez estos son considerados como prebióticos que no se digieren el organismo humano, llegando al colon de manera intacta, promoviendo aquí la proliferación de la flora benéfica.

Arrizo et al. (2010) realizó la determinación del contenido de carbohidratos solubles y fructanos en *A. tequilana* a diferentes edades obteniendo como resultado, que la presencia de fructanos existen en mayor cantidad (60 %) en los Agaves de edades entre 4 y 6 años, y con respecto a los carbohidratos la mayor concentración se determinó cuando el Agave tenían 2 años. En este trabajo el Agave tenía una edad de 6 años, demostrando que a mayor edad del Agave, mayor es la cantidad de componentes.

Por otro lado, la presencia de compuestos fenólicos refleja las propiedades funcionales que posee esta planta, sin embargo, estos valores son menores a lo reportado por Ahumada-Santos et al. (2013), quienes analizaron seis especies de Agave de Sinaloa, México, la diferencia puede deberse a la región, debido a que el estado de Tlaxcala es parte de la región central de México, que se caracteriza por un clima húmedo.

Tovar-Robles et al. (2011) evaluaron la actividad antioxidante y compuestos fenólicos de aguamiel de la especie *Agave salmiana*, reportaron que el aguamiel mostró un 20 % más de actividad antioxidante a la que se encuentra en el café y el jugo de uva, las cuales se

caracterizan por ser bebidas con una alta capacidad antioxidante, con respecto a los compuestos fenólicos reportaron 7.1 $\mu\text{mol GAE/g}$ en base seca, este valor es superior al encontrado en este trabajo, sin embargo, parte importante del aguamiel no sólo son los compuestos fenólicos, sino también la actividad antioxidante evaluada, debido a que puede actuar como termoprotector de la planta, además de generar beneficios en seres humanos, debido a que disminuye el riesgo de enfermedades cerebrovasculares y cáncer (Slavin et al., 2009).

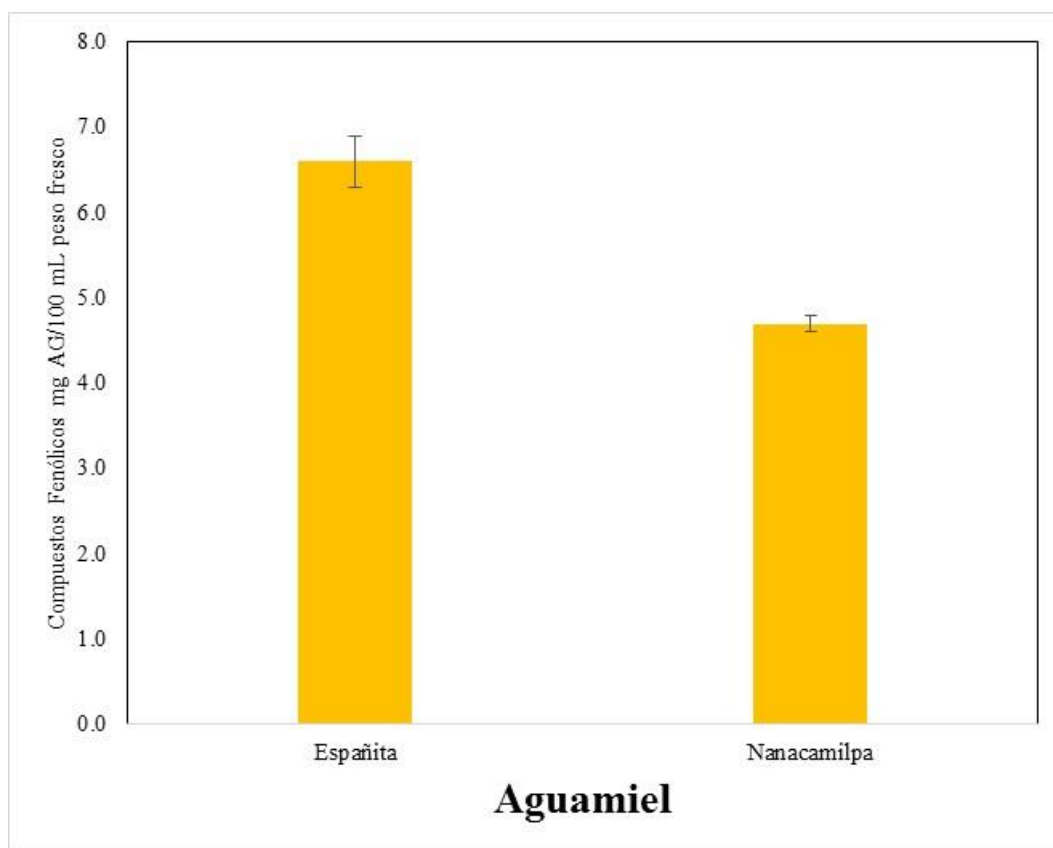


Figura 4. Contenido de compuestos fenólicos (mg AG/100 mL peso fresco) de aguamiel de la región de Españaita y Nanacamilpa, Tlaxcala.

8.2 Curvas de crecimiento de *Lactobacillus* en Agar MRS

Los resultados de las curvas de crecimiento de los probióticos se muestran en la Figura 5.

El crecimiento con capacidad de probiótico de ambos se presenta a partir de las 12 h de incubación, potencializándose a partir de las 24 h, siendo este valor de crecimiento de 9.6×10^8 ufc/mL para *L. casei*, mientras que para *L. rhamnosus* se determinó un crecimiento de 2.3×10^9 ufc/mL.

El máximo crecimiento para *L. casei* fue a las 36 h de incubación alcanzando una población de 1.8×10^{10} ufc/mL, y para *L. rhamnosus* de 1.2×10^{10} ufc/mL.

Sin embargo, conforme el tiempo aumenta empieza el agotamiento de nutrientes, y como consecuencia el descenso de la población de bacterias. Por esta razón se tomó como tiempo de crecimiento a partir de las 24 h, durante la fase exponencial-estacionaria, en la cual las células se encuentran viables y cumplen con la concentración de bacterias para administrarse a un producto alimenticio y considerarse como probiótico, debido a que la población que se requiere para ser probiótico es a partir de 1×10^6 ufc/g o mL y una población suficiente de 1×10^8 ufc/g o mL (Chávarri *et al.*, 2010).

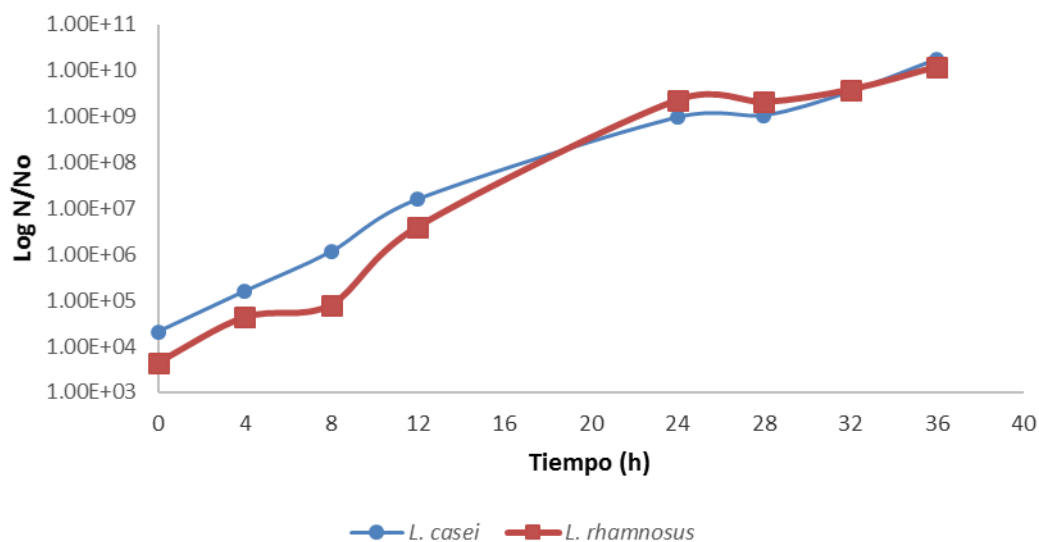


Figura 5. Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* en agar MRS incubados a 37°C durante 36 h.

8.3 Evaluación de la supervivencia de *Lactobacillus* encapsulados y sin encapsular en un sistema que simule condiciones gastrointestinales

La Figura 6 y 7 muestran el comportamiento de *Lactobacillus casei* y *L. rhamnosus* respectivamente, sometidos a condiciones de simulación en fluido gástrico (FGS) e intestinal (FIS).

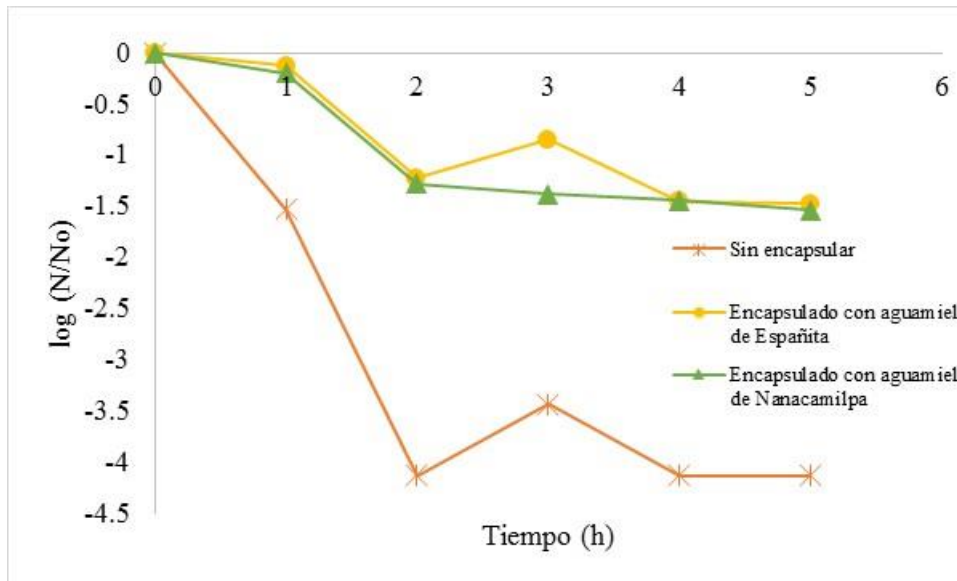


Figura 6. Comportamiento de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado y sin encapsular con aguamiel de la región de España y Nanacamilpa, sometido a condiciones de simulación de FGS (2h) y FIS (3h).

Se observa un descenso de la población de *L. rhamnosus* cuando se expone a los fluidos gástricos y sobre todo sin encapsular, es decir en vida libre, al iniciar el proceso de simulación se contaba con una población de 2.70×10^8 ufc/mL, después del FGS se obtuvo una reducción de 2.0×10^4 ufc/mL, es decir una reducción entre 4 y 4.5 ciclos logarítmicos, sin embargo, al someterse al FIS, se observa una pequeña recuperación de la población, lo cual puede deberse a las condiciones existentes, esto debido a que las condiciones de pH aumentan y de esta forma se ve favorecido el microorganismo al ya no estar en un medio ácido, ya que a pH bajos los *Lactobacillus* pueden llegar a disminuir su crecimiento.

Cortés (2009), reporta que esta población ya no es viable, y que los beneficios que podrían aportar los *Lactobacillus* con esta población al ser consumidos por el ser humano ya no son

confiables, debido a que se debe contar una población de 1×10^6 o 1×10^7 ufc/mL o g, en este caso *L. rhamnosus* se ve afectado después de pasar por el tracto gastrointestinal cuando no es encapsulado. Por el contrario, la encapsulación protege a los microorganismos debido a que *L. rhamnosus* encapsulado con ambos tipos de aguamiel, solo se reduce un ciclo logarítmico. Inicialmente antes del proceso de encapsulación con aguamiel de Española la población fue de 3.0×10^8 ufc/mL, finalizando el tratamiento (5 h) se obtuvo una población de 1.0×10^7 ufc/mL, esta población se considera viable después del tratamiento.

Algo similar sucedió con la encapsulación de este microorganismo, pero con aguamiel de Nanacamilpa, en el cual se observó la reducción de alrededor 1.5 ciclos logarítmicos, para este sistema se inició con una población de 2.5×10^8 ufc/mL finalizando el tratamiento con una población de 7.3×10^6 ufc/mL. A pesar de sufrir una reducción de casi dos ciclos logarítmicos, aún esta población se considera como viable para su consumo.

En la figura 7 se observa que *Lactobacillus casei* en vida libre, también sufrió una reducción en estas condiciones gástricas, inicialmente se tenía una población de 3.8×10^8 ufc/mL, finalizando el proceso se obtuvo una población de 4×10^4 ufc/mL, considerándose que la población es no viable después del tratamiento.

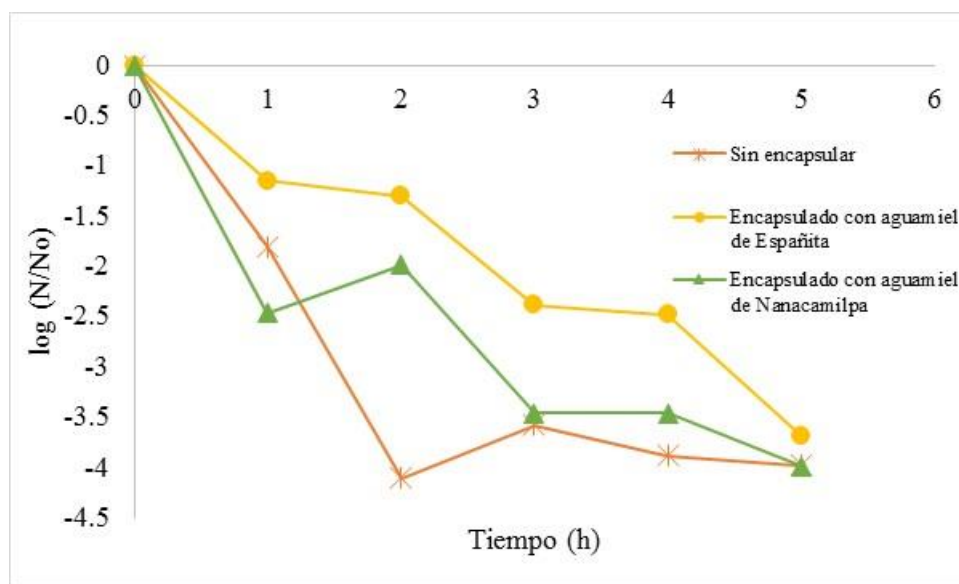


Figura 7. Comportamiento de *Lactobacillus casei* encapsulado y sin encapsular con aguamiel de la región de Española y Nanacamilpa, sometido a condiciones de simulación de FGS (2h) y FIS (3h).

Para el caso de *Lactobacillus casei* encapsulado con aguamiel de Española inicialmente se tenía una población de 2.4×10^8 ufc/mL, al final del proceso se obtuvo 5×10^4 ufc/mL, a pesar de estar encapsulado el microorganismo sufrió un descenso de tres ciclos logarítmicos, motivo por el cual la población ya no es viable, a pesar de que la encapsulación ayudó a la supervivencia a condiciones de FGS, sin embargo en el FIS este microorganismo se vio afectado.

Algo similar sucedió con el *Lactobacillus casei* encapsulado con aguamiel de Nanacamilpa, donde inicialmente se tenía una población de 2.9×10^8 ufc/mL, se redujo la población 4 ciclos logarítmicos, quedando con una población al final del tratamiento de 3×10^4 ufc/mL.

Ding y Shah (2009), evaluaron diversos materiales de encapsulamiento entre ellos goma guar, xantana, algarrobo y alginato de sodio en especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, tras someterlos a pH de 2 y concentraciones de sales biliares, obtuvieron una buena viabilidad de *L. rhamnosus*, así como la encapsulación con alginato de sodio. Comparado con lo obtenido en este trabajo se observó mayor resistencia por parte de *L. rhamnosus*.

Cook et al. (2011) realizaron la encapsulación de probióticos con alginato y quitosano mediante la técnica de liofilización sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas, concluyendo que la combinación de estos polisacáridos promueve la supervivencia de *Bifidobacterias*. En este trabajo se obtuvo una viabilidad cuando se usa alginato y aguamiel en el proceso de encapsulación. Por lo que el alginato es un material encapsulante o de cobertura utilizado por su capacidad de protección para la encapsulación de compuestos bioactivos y probióticos, y por su resistencia a condiciones adversas como lo son las condiciones gastrointestinales.

Además, la adición de aguamiel como prebiótico en la encapsulación de probióticos, ayudo a tener una mayor resistencia a estas condiciones gástricas, los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Santhyabama et al. (2014), quienes realizaron la encapsulación de bacterias probióticas utilizando remolacha azucarera, achicoria y avena como medios prebióticos sobre matrices de alginato, observando una alta viabilidad a condiciones gástricas simuladas, concluyendo que la incorporación de prebióticos y materiales de recubrimiento como el alginato podrían ayudar a proteger en buen estado a los probióticos en alimentos y sistemas gástricos debido a un efecto simbiótico entre ellos.

Krasaekoopt y Watcharapoka (2014), estudiaron el efecto de la adición de inulina y galacto-oligosacáridos en la supervivencia de probióticos microencapsulados con alginato recubiertos con quitosano y sometidos a simulación gástrica, ellos utilizaron la técnica de extrusión para obtener los encapsulados, después de someter a condiciones gástricas simuladas observaron que la adición de prebióticos al sistema de encapsulación brinda un aumento en la resistencia de microorganismos, favoreciendo la supervivencia de la especie *L. casei*, sin embargo, en este trabajo por el contrario, hubo menor resistencia de esta especie, lo cual demuestra que la variabilidad de resistencia entre las especies puede existir.

Finalmente Pak et al. (2012) evaluaron la capacidad fermentativa de 3 cepas de *Lactobacillus*, utilizando diferentes fuentes de carbohidratos, sometiendo a condiciones de resistencia de bilis y jugos gástricos, utilizaron como fuentes de carbohidratos pectina de alto y bajo metoxilo e inulina de Agave obteniendo que la inulina de Agave que actúa como prebiótico, promoviendo el crecimiento de bacterias. Hernández et al. (2012) por su parte menciona que la resistencia a condiciones gastrointestinales depende en gran medida de los hidratos de carbono y de la cepa empleada, estos factores podrían mejorar la supervivencia a través del tracto gastrointestinal y promover su adherencia del cepas probióticas.

Por esta razón, podríamos concluir que la reducción de los probióticos encapsulados con aguamiel como prebiótico en comparación con los de vida libre, permiten su supervivencia de las cepas estudiadas.

IX. CONCLUSIONES

Se identificaron compuestos funcionales en el aguamiel (fructanos y compuestos fenólicos), los cuales fueron mayores en el aguamiel de la región de Españita, Tlaxcala.

El aguamiel de la región de Tlaxcala es útil como agente encapsulante, debido a que permitió encapsular microorganismos en presencia de alginato de sodio mediante la técnica de gelificación iónica.

La supervivencia de las cepas de *Lactobacillus* en condiciones gastrointestinales fue alta, cuando los microorganismos son encapsulados, además de que se presentó una recuperación de las cepas cuando se someten al fluido intestinal.

La cepa de *L. rhamnosus* presentó mayor supervivencia cuando se encapsula y se evalúa a nivel gástrico en presencia de aguamiel, pero sobre todo cuando se utilizó el de la región de España.

El consumo de esta bebida no solo ayuda a promover la viabilidad de probióticos, si no que podría generar efectos benéficos en la salud de los consumidores, debido a la presencia de compuestos fenólicos.

El aprovechamiento de esta especie vegetal representa una alternativa para los agricultores que se dedican al cultivo de esta planta.

El uso del aguamiel como ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales podría tener un impacto en el desarrollo de nuevos productos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahumada, S. Y. P., Montes, A. J., Uribe, B. M. de J., Díaz, C. S. P., López, A. G., Vega, A. R., López, V. J. A., Heredia, J. B. y Delgado, V. F. (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products* 49, 143–149.
2. AINIA. (2015). Disponible en:
<http://tecnoalimentalia.ainia.es/web/tecnoalimentalia/ultimas-tecnologias/articulos/rT64/content/food-digest:-beneficios-de-modelos-in-vitro-que-simulan-la-digestion-gastrointestinal>. Consultado: 02 Noviembre de 2015.
3. Amin. T., Thakur, M., y Jain, S. C. (2013). Micoencapsulation-The future of probiotic cultures. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 3(1):35-43.

4. AOAC. (2000 y 2002). *Official Methods of Analysis*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
5. Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A. y Monsan, P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different age. *Food chemistry*. 122, 123-1.
6. Bautista, C. N. (2006). Estudio químico-bromatológico y elaboración de néctar de aguamiel de *Agave americana* L. (maguey) procedente de Ayacucho. Tesis para obtener el grado de químico farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
7. Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L., y Arias, L. M. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurth natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* 0157:h7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 57(1):52-55.
8. Calero, J., Sánchez, Y. F., Tórrez, R., Hernann, E., y López, K. (2008). Elaboración y Caracterización de microcápsulas gastrorresistentes de Diclofenac obtenidas por Gelación iónica. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León. *Universitas*. 1(2):27-30. UNAN-León.
9. Campos-Mendiola R. (2002). Obtención de una bebida funcional de bifidobacterias utilizando aguamiel como base. Tesis Maestría. E.N.C.B., I.P.N.
10. Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., Villarán, Ma. del C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves

- survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 142,185-189.
11. Conceição, A. A., Bolívar, P. G. de L. D., Esberard, N. E. de M. B., Pessoa, A., Converti, A., y Silva, J. A. (2014). Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polimers*. 101, 368-378.
 12. Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., y Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1024-1039.
 13. Cortés, A. C. (2009). Encapsulación de *Lactobacillus casei* mediante secado por atomización utilizando aguamiel como agente encapsulante. Tesis para obtener el grado de licenciatura ingeniería de alimentos. Universidad de las Américas, Puebla.
 14. Cortés, Z. L. y Basurto, P. F. (2005). GELA Grupo Etnobotánico Latinoamericano. Disponible en: www.ibiologia.unam.mx/gela. Fecha de consulta. 04 de abril de 2015.
 15. Corona, H. R. I., Álvarez, P. E., Lizardi, M. J., Islas, R. A. R., de la Rosa, L. A., y Wall, M. A. (2013). Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol. 12.
 16. Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., y Khutoryanskiy, V. V. (2011). Production and Evaluation of Dry Alginate-Chitosan Microcapsules as an Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. *Biomacromolecules. ACS publications*. 12, 2834-2840.
 17. Cueva, C., Muñoz, G. I., Barroso, E., Jiménez, G. A., Sánchez, P. F., Martín, A. P. J., Requena, T., Bartolomé, B. y Moreno, A. M. V. (2013). Modelos de simulación

gastrointestinal aplicados al estudio de los componentes bioactivos del vino. XII Congreso de los Grupos de Investigación Enológica celebrado en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid (Universidad Politécnica de Madrid).

18. Ding, W. K y Shah, N. P. (2009). Effect of Various Encapsulating Material on the Stability of Probiotic Bacteria. *Journal of food science*. 74(2): 100-107.
19. Escalante, A. (2008). El pulque, una bebida con un gran pasado y ¿un futuro incierto? Academia de ciencias de Morelos, A.C.
20. Flores, M. A., Coyotl, H. J., Hernández, T. M., Velásquez, J. L., Hernández, A. (2006). Gestión de Calidad de una Miel Obtenida a Partir de Aguamiel de Maguey Pulquero (*Agave salmiana*). IV Congreso Internacional XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica.
21. Flores, M. A., Mora, E. R., y Romero, A. L. (2008). Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero (*Agave spp*). Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Disponible en: www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-08-2008/.../A058.pd. Consultado: 05 de marzo de 2015.
22. FAO Y OMS. (2006). Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición. Pp. 1-10, 30.
23. FPT. Fundación Produce Tlaxcala. Agenda de innovación tecnológica. (2013). Pp. 30-35.
24. Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjök, L. y Trajkovsky, V. (2000). Changes in antioxidants effects and their relationships to phytonutrients in fruits of sea during

- maturation buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 4185-4190.
25. Guevara, B. N. A y Jiménez, M. T. (2008). Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2, 36-49
26. Gutiérrez, R. L. A., Gómez, O. A. J., Arias, J. L. M., y Tangerife, P. B. (2007). Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. *Revista Lasillista de Investigación*. 4(2): 37- 42.
27. Jurado S. y Sarzosa X. (2009). Estudio de la cadena agroindustrial de la cabuya en la producción de miel y de licor de cabuya. *Tesis de Ingeniería Agroindustrial*.
28. Hernández, C. P. y Jiménez, M. M.T. (2010). Propiedades funcionales y aplicaciones industriales de los fructo-oligosacáridos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 4, 1-8.
29. Hernández, H. O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A., Sanz, M. L., y Ricke, S. C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food microbiology*. 30, 355-361.
30. Hinestroza, C. L. I. y López, M. A. (2008). Técnicas de encapsulación de microorganismos probióticos con polímeros. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2, 28-35.
31. Huerta, A. S. A., Larralde, C. C. P., y Narváez, Z. J. A. (2014). Application of agave subproducts for production of microbial inulinases. *Revista bio ciencias*. 3(1): 4-16.
32. Jan, Z. N., y A. Nedovic V. (2010). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Editorial Pringar. (pp. 3, 33-36, y 269-280).

33. Jiménez, S. A. (2009). Efecto de diferentes fármacos sobre el crecimiento de *L. casei*. Tesis para obtener el grado de Doctorado en ciencias con especialidad en alimentos. Instituto Politécnico Nacional de México.
34. Krasaekoopt, W. y Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *Food Science and Technology*. 57, 761-766.
35. Lilly, D. M. y Stillwell, R. H. (1965): Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-749.
36. Lira, S. F. (2013). Encapsulación de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* por el método de gelación iónica, utilizando mucilago de la semilla de linaza y aguamiel. Tesis para obtener el grado de químico industrial. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
37. López, C. A. F. (2012). Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de Yerba Mate. Tesis de maestría Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires.
38. Lozano, P. L. M. C. (2011). Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei shirota* en una gelatina de pitaya (*Stenocereus griseus H*). Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias de alimentos. Facultad de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
39. Lupo, P. B., González, A. C., y Maestro, G. A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3(1):130-151.
40. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P.V., y Clark, D. P. (2009) Brock biología de los microorganismos. Editorial PEARSON. Pp. 909-913.

41. Martínez del Campo, M. G. (1999). Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de agave pulquero *Agave atrovirens Karw.* Tesis para obtener el grado de Farmacia Química, UNAM, México.
42. Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S. S., Webb, C., Fukuda, H., y Kondo, A. (2006). Effect of cereal extractus and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 28, 73-78.
43. Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Habibi, N. M. B., y Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*. 42, 1040-1045.
44. Mossiel, A. A., Moreno, B., y Struyk, C. B. (2006). Microbiología de los alimentos. Editorial. ACRIBIA, S.A. 2da. Edición.
45. NMX-F-312-1978. Determinación de Azúcares Reductores Directos y Totales en Alimentos.
46. NMX-F-427-1982. ALIMENTOS. Determinación de grasa (método de hidrólisis acida). Foods. Determination of fat (acid hydrolysis method). Normas mexicanas.
47. NMX-F-607-NORMEX-2013. Determinación de cenizas en alimentos. Método prueba.
48. NMX-F-608-NORMEX-2011. Determinación de proteínas en alimentos. Método prueba.
49. NMX-F-613-NORMEX-2003. Determinación de fibra cruda en alimentos. Método prueba.

50. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
51. Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., y Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: Fibra, Prebiótico, Probiótico y Simbióticos. *DIAETA*. 25, 20-30.
52. Ortiz, B. R. I., Pourcelly, G., Daco, T., Williams, P., Darnier, M., y Pierre, B, M. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) through out the harvest period. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 3682-2687.
53. Ortakci, F., Broadbent, J. R., McManus, W. R., y McMahon, D. J. (2012). Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *Journal of Dairy Science*. 95(11):6274-6281.
54. Pak, D., Muthaiyan, A., Story, R. S., O'Bryan, C. A., Lee, S., Crandall, P. G y Ricke, S. C. (2012) Fermentative Capacity of Three Strains Of *Lactobacillus* Using Different Sources Of Carbohydrates: *In Vitro* Evaluation of Synbiotic Effects, Resistance and Tolerance to Bile and Gstric Juices. *Journal of Food Research*. 2(1): 158-166.
55. Pérez, L. H., Bueno, G. G., Brizuela, H. M. A., Tortoló, C. K., y Gastón, P. C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 47(1):14-25.
56. Ramírez, H. A. (2010). Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*A. salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional.

57. Ramírez, G. Ma. E., Hernández, U. H., Cruz, Ma. T. y Gallardo, N. V. Y. (2001). Caracterización de Fructooligosacáridos en Aguamiel y Jugo del *Agave atrovirens* Karw. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. XIII Congreso Nacional de Ingeniería en Bioquímica y II Congreso Internacional de Ingeniería de Bioquímica.
58. Ramos, C. A., Nader, M. F., y Monteoliva, S. M. (2012). Probióticos y salud. Editorial Díaz de Santos. Pp.3-12
59. Romero, A. G. C., López, M. A., y Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 7(1):87-96.
60. Rodríguez, H. M. E., Lobato, C. C., Reyes, O. J. G., Sandoval, C. O., Pérez, A. C., y Pimentel, G. D. J. (2011). Survivability of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* in liquid and gel-core alginate beads during storage and simulated gastrointestinal conditions. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(2):353-361.
61. Sampedro, A. M. (2009). Estudio e investigación de Shawarmishki (aguamiel), análisis de sus propiedades, su explotación, aplicación culinaria de este producto milenario. Tesis para obtener el grado de Administrador Gastronómico. Universidad Tecnológica Equinocial, Quinto Ecuador.
62. Santhyabama, S., Ranjith, K. M., Bruntha D. P., Vijayabharathi, R., y Brindha, P. V. (2014). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT-Food Science and Technology*. 57, 419-425.

63. Silos E., Tovar, C., Perales, C., Nava, A., Leyva, J., y Valera, L. (2007). Chemical composition and vitro propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 82, 355-359.
64. Slavin, M, Cheng, Z., Luther, M., Kenworthy, W., y Yu, L.L. (2009). Antioxidant properties and phenolic, isoflavone, tocopherol and carotenoid composition of Maryland-grown soybean lines with altered fatty acid profiles. *Food Chemistry*, 114, 20–27.
65. Torres, Ma. R. (2006). Flora intestinal, probióticos y salud. Editorial Formas Finas. Pp. 22-40.
66. Tovar, R. C. L., Perales, S. C., Nava, C. A., Valera, M. L. L., Gómez, L. F. F., Guevara, L. F., Hernández, D. J. L. M., y Silos, E. H. (2011). Effect of aguamiel (*Agave sap*) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*. 10, 106-110.
67. Villena, M. M. J., Morales, H. M. G., Gallardo, L. V., y Ruíz, M. M. A. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ArsPharm*. Departamento de farmacia y tecnología farmacéutica. Facultad de farmacia. Universidad de Grana, España. 50(1):43-50.
68. Webb., G. P. (2006). Complementos nutricionales y alimentos funcionales. Editorial ACRIBIA, S. A. Pp. 264-274.
69. Yáñez, F. J., Salazar, M. J. A., Chaires, M. L., Jiménez, H. J., Márquez, R. M., y Ramos, R. E. G. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería*. Vol. 21.

70. Yañez, M. A. L., Ramírez, M. L. M., y Vera. A. E. (2014). Análisis de los elementos para la implementación de comercio justo en la industrialización del aguamiel en Nanacamilpa, Tlaxcala, México. UPAEP. Asociación latinoamericana de facultades y escuelas de contaduría y administración, Panamá.

71.