



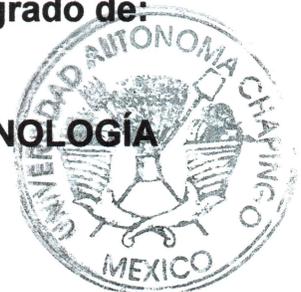
# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA

**VIABILIDAD DE *Lactobacillus plantarum* ENTRAMPADO  
EMPLEANDO FRUCTANOS DE AGAVE, BAJO CONDICIONES  
GASTROINTESTINALES SIMULADAS  
TESIS**

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**



Presenta:

**DIANA EDITH LÓPEZ VÁZQUEZ**

COMISIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de: **ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO, DR.**



Chapingo, Estado de México, diciembre 2019

**VIABILIDAD DE *Lactobacillus plantarum* ENTRAMPADO EMPLEANDO  
FRUCTANOS DE AGAVE, BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES  
SIMULADAS**

Tesis realizada por **DIANA EDITH LÓPEZ VÁZQUEZ**, bajo la supervisión del  
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito  
parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR:



---

DR. ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO

CODIRECTORA:



---

DRA. LANDY HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

ASESOR:



---

DR. CÉSAR ÁLVAREZ SANTIAGO

## CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	2
LISTA DE FIGURAS .....	3
AGRADECIMIENTOS.....	5
DEDICATORIAS .....	6
DATOS BIOGRÁFICOS.....	7
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Probióticos.....	3
2.1.1 <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	5
2.2 Prebióticos.....	6
2.2.1 Fructanos de agave .....	7
2.3 Condiciones gastrointestinales .....	9
2.4 Sistemas de protección a probióticos .....	11
2.5 Entrampamiento de probióticos mediante geles .....	12
2.5.1 Almidón como agente gelificante.....	13
2.6 Literatura citada.....	15
3. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE <i>Agave salmiana</i> ....	19
RESUMEN .....	19
ABSTRACT .....	20
3.1 Introducción .....	21
3.2 Materiales y métodos .....	22
3.2.1 Materiales.....	22
3.2.2 Composición químico proximal de la piña de <i>Agave salmiana</i> .....	23
3.2.3 Obtención de fructanos a partir de <i>Agave salmiana</i> .....	23
3.2.4 Caracterización de fructanos de agave .....	24
3.3 Análisis de datos .....	26
3.4 Resultados y discusión.....	26
3.4.1 Análisis proximal de la piña de <i>Agave salmiana</i> .....	26

3.4.2	Caracterización de fructanos de <i>Agave salmiana</i> .....	28
3.5	Conclusiones .....	33
3.6	Literatura citada.....	34
4.	VIABILIDAD DE <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp-115 ENTRAMPADO EN GELES ADICIONADOS CON PREBIÓTICOS DE <i>Agave salmiana</i> .....	37
	RESUMEN .....	37
	ABSTRACT .....	38
4.1	Introducción .....	39
4.2	Materiales y métodos .....	41
4.2.1	Cultivo de <i>L. plantarum</i> Lp-115 y preparación del concentrado celular ...	41
4.2.2	Elaboración de geles para el entrapamiento de <i>L. plantarum</i> Lp-115...	42
4.2.3	Eficiencia de entrapamiento de <i>L. plantarum</i> Lp-115 .....	43
4.2.4	Propiedades reológicas de los geles.....	43
4.2.5	Morfología y tamaño de poro de los geles .....	43
4.2.6	Viabilidad de <i>L. plantarum</i> Lp-115 entrapado después de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas .....	44
4.3	Análisis de datos .....	44
4.4	Resultados y discusión.....	45
4.4.1	Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> Lp-115.....	45
4.4.2	Eficiencia de entrapamiento de <i>L. plantarum</i> Lp-115 .....	47
4.4.3	Propiedades reológicas de los geles.....	48
4.4.4	Microestructura y tamaño de poro de los geles .....	54
4.4.5	Viabilidad en condiciones gástricas simuladas de los probióticos entrapados en geles .....	58
4.5	Conclusiones .....	60
4.6	Literatura citada.....	61

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Principales microorganismos empleados como probióticos en la industria alimentaria.....	4
Cuadro 2.	Fuente y clasificación de prebióticos. ....	6

Cuadro 3. Composición química proximal de la piña de <i>Agave salmiana</i> . .....	27
Cuadro 4. Composición química de los fructanos de <i>Agave salmiana</i> . .....	28
Cuadro 5. Valores medios ( $\pm$ DE) de la eficiencia de atrapamiento de <i>L. plantarum</i> Lp-115 en geles de almidón y fructanos de <i>Agave salmiana</i> . .....	47
Cuadro 6. Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros reológicos del modelo de Carreau. ....	50
Cuadro 7. Parámetros reológicos del barrido de amplitud, determinados en la zona viscoelástica lineal de los geles. ....	53
Cuadro 8. Valores medios ( $\pm$ DE) del tamaño de poro de cada variación del gel. ....	55
Cuadro 9. Viabilidad de células de <i>Lactobacillus plantarum</i> Lp-115 libres y atrapadas en los diferentes geles de almidón y fructanos de <i>Agave salmiana</i> , después de su exposición a condiciones gastrointestinales. ....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de fructanos de agave .....	8
Figura 2. Estructura química de fructanos tipo inulina.....	9
Figura 3. Representación esquemática de las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal. ....	10
Figura 4. Estructura química del almidón. ....	14
Figura 5. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos totales. ....	30
Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores. ....	31
Figura 7. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de fructanos de Agave salmiana. ....	32
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> Lp-115, en caldo MRS a 37 °C. ....	46
Figura 9. Geles de almidón-fructanos de <i>Agave salmiana</i> entrapando a <i>L. plantarum</i> Lp-115, utilizando diferentes concentraciones de fructanos: a) 0%, b) 0.5 %, c) 1 % y d) 1.5 % (p/p). ....	48
Figura 10. Curva de flujo de geles de almidón (A) con <i>L. plantarum</i> Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de <i>Agave salmiana</i> (F) :0, 0.5, 1 y 1.5 %p/p. ....	49
Figura 11. Variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) como función del % de deformación de geles de almidón(A) con <i>L. plantarum</i> Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de <i>Agave salmiana</i> (F): 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p)...	52
Figura 12. Variación del módulo de pérdida ( $G''$ ) como función del % de deformación de geles de almidón (A) con <i>L. plantarum</i> Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de <i>Agave salmiana</i> (F): 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p)...	53
Figura 13. Micrografías MEB de geles de (A) almidón con <i>L. plantarum</i> Lp-115 a diferentes concentraciones de (F) fructanos de <i>Agave salmiana</i> ; a) 0 %, b) 0.5 %, c) 1 % y d) 1.5 % (p/p). Magnificación 150 x, barra de escala 100 $\mu$ m. ....	55

Figura 14. Micrografías MEB de geles de almidón (A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F); a) 0 %, b) 0.5 %, c) 1 % y d) 1.5 % (p/p). Magnificación 8000 x, barra de escala 2  $\mu\text{m}$ .....57

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la culminación de esta investigación.

A mi *alma mater*, la Universidad Autónoma Chapingo y en particular al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por sus valiosos recursos y profesores de alta excelencia académica.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano, por permitirme formar parte de su valioso equipo de trabajo, por confiar en mí y apoyarme en todo momento con sus conocimientos para la culminación satisfactoria de este trabajo de investigación.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez, por brindarme su amistad y su apoyo incondicional especialmente durante la fase microbiológica.

Al Dr. César Ramírez Santiago, por el apoyo brindado para concluir con este trabajo.

A todos mis amigos y también a los compañeros de laboratorio que estuvieron ahí para darme ánimos y no decaer.

## DEDICATORIAS

*En primer lugar, a Dios, mi ser supremo que me dio la fuerza para lograr un objetivo más en mi vida. Infinitas gracias...*

*A mi madre, que siempre me ha dado todo su amor y apoyo incondicional.*

*A mi esposo, por estar conmigo, por su ayuda y amor que me brinda.*

*A mis hermosas hermanas, Sonia y Alicia, las quiero.*

*A mis amigos, con los que puedo contar.*

*Gracias, gracias, gracias...*

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Diana Edith López Vázquez originaria de la Ciudad de México nació el 17 de noviembre de 1992. Sus estudios de educación básica los realizó en el municipio de Texcoco, Estado de México. Posteriormente de 2007-2010, cursó su formación media superior en la Universidad Autónoma Chapingo y en 2014 concluyó la licenciatura en el Departamento de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Autónoma Chapingo. Del periodo de 2015 al 2016, impartió cursos de buenas prácticas de manufacturas en la Granja Pecuaria de N.C.P.G. Papagayos, San Luis Potosí.

## RESUMEN GENERAL

### VIABILIDAD DE *Lactobacillus plantarum* ENTRAMPADO EMPLEANDO FRUCTANOS DE AGAVE, BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS

En la presente investigación se llevó a cabo la extracción y caracterización fisicoquímica de fructanos de agave (*Agave salmiana*). El rendimiento obtenido fue de 13.94 % (p/p) y presentaron contenidos de carbohidratos totales de 93.4 % (p/p), de los cuales el 23 % lo conforman fructooligosacáridos, 1.1 % azúcares reductores y el resto de otros azúcares no identificados. Los espectros obtenidos por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier de las muestras de fructanos mostraron banda de absorción en  $1410\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a la deformación de  $\text{CH}_2\text{-OH}$  en el anillo de fructosa, mientras que la absorción a  $1015\text{ cm}^{-1}$  se asignó a las vibraciones de estiramiento de C-O y C-C del anillo de fructanos. Con objeto de proteger a *Lactobacillus plantarum* Lp-115 de las condiciones gastrointestinales simuladas (GIS) y proveer de fuente de carbono para el microorganismo, se elaboraron geles de almidón (A) (2.5 % p/p) y variando la concentración de fructanos de *Agave salmiana* (F) (0, 0.5, 1 y 1.5 % p/p). Los geles del tratamiento con 1.0% de fructanos presentaron estructuras complejas donde se integró el microorganismo: con eficiencias de entrapamiento de 96.71 %, con los menores tamaños de poro (13  $\mu\text{m}$ ) y confirieron una mejor protección a *L. plantarum* Lp-115 bajo condiciones GIS, presentando la mayor viabilidad ( $9.26 \pm 0.18\text{ log UFC g}^{-1}$ ) después de la exposición a pH 2 y ( $6.81 \pm 0.85\text{ log UFC g}^{-1}$ ) después de la exposición consecutiva a sales biliares, en comparación a células libres ( $8.06 \pm 0.28\text{ log UFC g}^{-1}$  y  $5.77 \pm 0.32\text{ log UFC g}^{-1}$ , respectivamente). Micrografías electrónicas de barrido mostraron que las células de *L. plantarum* Lp-115 fueron entrapadas en las matrices de los biopolímeros A-F.

**Palabras clave:** *Agave salmiana*, *Lactobacillus plantarum* Lp-115, fructanos de agave, prebiótico, condiciones gastrointestinales simuladas.

## GENERAL ABSTRACT

### VIABILITY OF *Lactobacillus plantarum* ENTRAPPED USING AGAVE FRUCTANS, UNDER SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS

In the present investigation the extraction and physicochemical characterization of agave fructans (*Agave salmiana*) was carried out. The yield obtained was 13.94% (w/w) and presented total carbohydrate contents of 93.4%, of which 23% is made up of fructooligosaccharides, 1.1% reducing sugars and the rest of other unidentified sugars. The spectra obtained by Fourier Transformed Infrared spectroscopy of fructan samples showed an absorption band at 1410  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to deformation of  $\text{CH}_2\text{-OH}$  in the fructose ring, meanwhile the absorption at 1015  $\text{cm}^{-1}$  was assigned to the C-O and C-C stretching vibrations of the fructans ring. In order to protect *Lactobacillus plantarum* Lp-115 from simulated gastrointestinal conditions (SIG) and provide a carbon source for the microorganism, gels of starch (A) (2.5% w/w) and varying the concentration of *Agave salmiana* fructans (F) (0, 0.5, 1 and 1.5% w / w). were made. Gels of the treatment with 1.0% of F presented complex structures where the microorganism was integrated: with entrapment efficiency of 96.71%, with the smallest pore sizes (13  $\mu\text{m}$ ) and they conferred a better protection to *L. plantarum* Lp-115 under SIG conditions, presenting the higher viability ( $9.26 \pm 0.18 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) after exposure to pH 2, and of ( $6.81 \pm 0.85 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) after consecutive exposure to bile salts, in comparison with free cells ( $8.06 \pm 0.28 \log \text{CFU g}^{-1}$  and  $5.77 \pm 0.32 \log \text{CFU g}^{-1}$ , respectively). Scanning electron micrographs showed that *L. plantarum* Lp-115 cells were entrapped in the A-F biopolymers matrices.

**Key words:** *Agave salmiana*, *Lactobacillus plantarum* Lp-115, agave fructans, prebiotic, simulated gastrointestinal conditions.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El creciente interés de los consumidores en los productos alimenticios saludables ha generado motivación hacia la investigación dirigida al desarrollo de alimentos funcionales. Entre ellos, los probióticos se destacan y se describen como "organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped" (FAO / OMS, 2002). Sin embargo, existen diversos factores que afectan la viabilidad de los probióticos cuando son agregados a los productos alimenticios, incluido el pH bajo, la presencia de oxígeno, las condiciones de procesamiento y el almacenamiento a bajas temperaturas (Espitia, Batista, Azeredo y Otonide, 2016), provocan una disminución considerable de células probióticas. Además, la supervivencia de estos durante su paso a través del tracto gastrointestinal humano sigue siendo un reto importante para la entrega efectiva de estas bacterias benéficas (Anal y Singh, 2007). Según Kailasapathy y Masondole (2005) el nivel recomendado del consumo de probióticos es de  $10^8$ - $10^9$  UFC día<sup>-1</sup>, equivalente a 100 g<sup>-1</sup> de un producto alimenticio conteniendo  $10^6$ - $10^7$  UFC g<sup>-1</sup>.

Una alternativa para mantener la viabilidad del probiótico es mediante el entrapamiento en matrices formadas por polisacáridos. Uno de estos polisacáridos es el almidón que es ampliamente utilizado en la industria alimentaria por su bajo costo, alta biodegradabilidad y su gran capacidad de retención de agua, sin embargo, los geles producidos por almidones nativos presentan alta sinéresis y retrogradación. Por lo que una estrategia simple e interesante, para evitar estos defectos, es mediante la incorporación de un carbohidrato que le permita formar una mayor reestructuración. Ye *et al.*, (2018) mencionan que la adición de inulina, puede prevenir la sinéresis y la retrogradación de los geles además de mejorar las propiedades sensoriales y fisicoquímicas del gel de almidón.

Además, una forma de mejorar la estabilidad de los probióticos es agregar prebióticos a la formulación de micropartículas (Poletto *et al.*, 2019). Un prebiótico se define como "un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped y puede conferir un beneficio para la salud" (Gibson *et al.*, 2017). Los prebióticos, que generalmente se utilizan consiste en inulina, oligosacáridos y almidón resistente (Valcheva y Dieleman, 2016). Sin embargo, estudios recientes han encontrado que los fructanos de *Agave salmiana* tiene potencial prebiótico, mejorando el crecimiento de bacterias probióticas especialmente del género *Lactobacillus* (Martinez-Gutierrez *et al.*, 2017). Dentro de estas bacterias destaca *Lactobacillus plantarum*, bacteria Gram-positiva que se encuentra en una variedad de ambientes, incluyendo lácteos, carne, pescado y algunas verduras y lo más importante es que se considera un microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro) (Rodríguez-Huezo *et al.*, 2014).

Es por ello que en la presente investigación tuvo como objetivo general evaluar la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* Lp-115 entrampado en geles de almidón de maíz y fructanos de *Agave salmiana* como fuente prebiótica, bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

El documento consta de cuatro capítulos: el presente capítulo que corresponde a la introducción acerca de la importancia de la protección de probióticos mediante el uso de biopolímeros naturales para el entrampamiento; el capítulo dos presenta el estado del arte acerca de los probióticos, prebióticos y sistemas de protección a probióticos; el capítulo tres se presenta la obtención y caracterización de fructanos de *Agave salmiana*, empleados como fuente prebiótica para *L. plantarum* Lp-115 y por último el capítulo cuatro, aborda el efecto protector de los fructanos extraídos de *Agave salmiana* sobre los microorganismos entrampados de las matrices biopoliméricas almidón-fructanos durante las condiciones gastrointestinales simuladas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Probióticos

La palabra "probióticos" se deriva de las palabras griegas *pro* y *biotós* que se traduce como "para la vida" (Hamilton-Miller, Gibson y Bruck, 2003). La definición de probióticos ha cambiado a lo largo de los años, siendo la actualmente aceptada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO/ OMS, 2002) como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren un beneficio para la salud al huésped". De acuerdo con Shah (2007) los niveles de dosis de probióticos dependen de la cepa, pero es importante que estas bacterias se encuentren presentes en el alimento en un nivel mínimo de  $10^6$  -  $10^8$  UFC g<sup>-1</sup>.

Los principales beneficios que ofrecen los probióticos a la salud mediante la ingestión de alimentos y han sido probados científicamente son: propiedades anticancerígenas; propiedades antihipertensivas; efectos benéficos sobre el metabolismo mineral (especialmente con respecto a hueso); atenuación de los síntomas de la enfermedad intestinal y el síndrome de Crohn; reducción de la diarrea aguda, ayudando a disminuir su dolor, severidad y duración; reducción de los síntomas de las alergias alimentarias y reducción de niveles de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) (Granato *et al.*, 2010).

En la industria alimentaria generalmente se utilizan probióticos como bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (FAO/OMS, 2001), sin embargo, también pueden utilizarse otros microorganismos que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Principales microorganismos empleados como probióticos en la industria alimentaria.

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	Levaduras y mohos
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. sporogenes</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueck</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. francium</i>	<i>S. diacetylactis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermeius</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>			<i>Candida pintolopesii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. longum</i>			
<i>L. helveticus</i>	<i>B. breve</i>			
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. lactis</i>			
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. essensis</i>			
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. laterosporus</i>			
<i>L. fermentum</i>				
<i>L. lactis</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. paracasei</i>				

Fuente: Amara y Shbil (2015).

El efecto benéfico de los probióticos dependerá de la especie, la cepa, la cantidad de microorganismos que alcancen su sitio activo, el ambiente en el que se encuentra, la salud y etapa fisiológica del huésped para que el probiótico pueda proliferar y colonizar el colon (Manzano, Estupiñán y Elpidia, 2012).

### 2.1.1 *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* es un microorganismo gram positivo, perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas que se encuentra comúnmente en la mucosa gastrointestinal. Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. No utilizan el indol, no hidrolizan gelatina, catalasa y oxidasa. El crecimiento óptimo se sitúa entre 35-39 °C (Collado, 2004). Los tamaños de las células tienden a ser de 0.9- 1.2 × 3.0-8.0 μm; están dispuestas de forma aislada, en parejas o en cadenas cortas. *L. plantarum* es una bacteria que puede ser encontrada en diversos ambientes, como productos lácteos, carne y en diversas fermentaciones vegetales.

*Latobacillus plantarum*, es un probiótico que confiere una amplia variedad de beneficios para la salud que incluyen: tratamiento y prevención de infecciones entéricas, síndromes post-antibióticos, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y cáncer colorrectal; pueden inhibir el desarrollo de la obesidad al reducir el tejido adiposo mesentérico (Park *et al.*, 2017); favorecer el metabolismo de los lípidos (Kim, Hong, Choi y Kim, 2014) y reducción de lípidos en sangre (Li *et al.*, 2019).

Por otro lado, Mohanty, Panda, Kumar y Ray, (2019) evaluaron la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* DM69 contra el patógeno *Salmonella enterica*, se observó que el compuesto microbiano inhibe en un 75 % la adhesión e invasión de *S. enterica* en células de colon, puesto que *L. plantarum* tiene una buena capacidad potencial de colonización en el revestimiento epitelial intestinal.

Otra función que debe subrayarse de *L. plantarum* es la capacidad para producir bacteriocinas potentes y diversas, que son péptidos antimicrobianos con posibles aplicaciones como conservantes de alimentos o agentes complementarios de antibióticos (Seddik *et al.*, 2017).

En este sentido, teniendo en cuenta todas estas características de *L. plantarum* es un probiótico con aplicaciones prometedoras, por lo que resulta necesario asegurar que este microorganismo sobreviva en el tracto gastrointestinal para que ejerza los efectos benéficos en el huésped.

## 2.2 Prebióticos

El concepto prebiótico es más reciente que los probióticos y fue propuesto por primera vez por Gibson y Roberfroid en 1995. La Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, por sus siglas en inglés) define un prebiótico como "un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped y puede conferir un beneficio para la salud". Esta definición de consenso también se aplica a los prebióticos para su uso en animales, en los cuales las estrategias centradas en la microbiota para mantener la salud y prevenir enfermedades son igualmente relevantes que en los humanos (Gibson *et al.*, 2017).

Existen diferentes fuentes de las que se pueden obtener prebióticos a partir de diferentes alimentos que se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Fuente y clasificación de prebióticos.

Clase de prebiótico	Tipos de prebióticos	Fuentes de obtención
1. Polioles (alcoholes de azúcar)	Lactulosa	Lactosa (leche)
	Xilitol, sorbitol, manitol, lactilol	
2. Oligosacáridos	FOS	Espárragos, remolacha azucarera, ajo, achicoria, cebolla, alcachofa de Jerusalén, trigo, miel, plátano, cebada, tomate y centeno
	GOS	Leche humana y leche de vaca
	XOS	Brotos de bambú, frutas, verduras, leche, miel y salvado de trigo.
	Isomalto-oligosacaridos	Miso, soja, salsa, sake, todos los alimentos ricos en almidón
	Oligosacaridos de rafinosa	Semillas de legumbres, lentejas, guisantes, frijoles, garbanzos, malva compuesta y mostaza
	Oligosacáridos de soya	Soya
	Isomaltulosa	Miel, jugo de caña de azúcar
	Arabinoxilooligosacáridos	Salvado de trigo
	Inulinas	Ajo, cebolla, espárragos, achicoria, alcachofa y trigo.
	Oligosacáridos, galactosil lactosa y pirodextrinas	
Fibras	Celulosa, dextrinas, pectinas, beta-glucanos, ceras y lignina, Fructanos tipo inulina	Granos, legumbres, harinas, papas, verduras y frutas.
	Alimentos derivados de las Legumbres	
Otros	Legumbres	Fibra de legumbres

---

Extracto acuoso de arándano Mora india, setas, fruta del dragón y raíz de yacón	Té verde que contiene selenio y té verde de China
---	--

---

Fuente: Mohanty, Misra, Mohapatra y Sahu (2018).

Los criterios que caracterizan a un prebiótico son los siguientes: a) debe resistir a la acidez gástrica y las enzimas de los mamíferos; b) ser susceptible a la fermentación por bacterias intestinales; y c) la capacidad de mejorar la viabilidad y la actividad de microorganismos beneficiosos (Rastall y Gibson, 2006).

Los prebióticos pasan del intestino delgado al colon y se vuelven accesibles para las bacterias probióticas sin ser utilizados por otras bacterias intestinales. Los componentes finales esenciales del metabolismo de los carbohidratos son los ácidos grasos de cadena corta, en particular: ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, que son utilizadas por el organismo huésped como fuente de energía (Al-sheraji, Ismail, Yazid y Mustafa, 2013).

### **2.2.1 Fructanos de agave**

Los fructanos están presentes naturalmente en muchas plantas como hidratos de carbono de reserva, los cuales aumentan la tolerancia al frío y la sequía de plantas (Ritsema y Smeekens, 2003). Entre las plantas que almacenan fructanos, las que tiene mayor importancia económica son: cereales (cebada, trigo y avena), verduras (dalias y tulipanes), gramíneas forrajeras (*Lolium* y *Festuca*), y plantas de agave (Sánchez y Hope, 1953; Vijn y Smeekens, 1999). Debido a la configuración beta de los enlaces entre los monómeros de fructosa, los fructanos tipo inulina resisten la hidrólisis enzimática por las enzimas digestivas humanas salivales y del intestino delgado, específicas para enlaces alfa-glicosídicos. Como resultado, los fructanos tipo inulina son indigeribles y se fermentan en el colon (Ritsema y Smeekens, 2003; Roberfroid *et al.*, 2010).

En México, los fructanos se obtienen de plantas de agave y principalmente se utiliza el *Agave tequilana* Weber var. Azul para su producción. Sin embargo, existe un interés creciente por aprovechar otras especies del género *Agave*, siendo una alternativa el *Agave salmiana*, que es una planta que tiene gran

importancia cultural y económica, de la cual se obtiene una bebida fermentada llamada “pulque” .No obstante, en los últimos años los productores de este cultivo lo han abandonado debido al bajo consumo del pulque, por lo que se buscan nuevas alternativas de uso que se le puedan dar a este cultivo y una de ellas es mediante la obtención de ingredientes funcionales como lo son los fructanos.

Los fructanos de agave son moléculas derivadas del agave, que poseen una configuración ramificada (Figura 1) a diferencia de la configuración lineal presente en la inulina comercial (Figura 2), lo que les podría otorgar diferentes propiedades y aplicaciones tecnológicas.

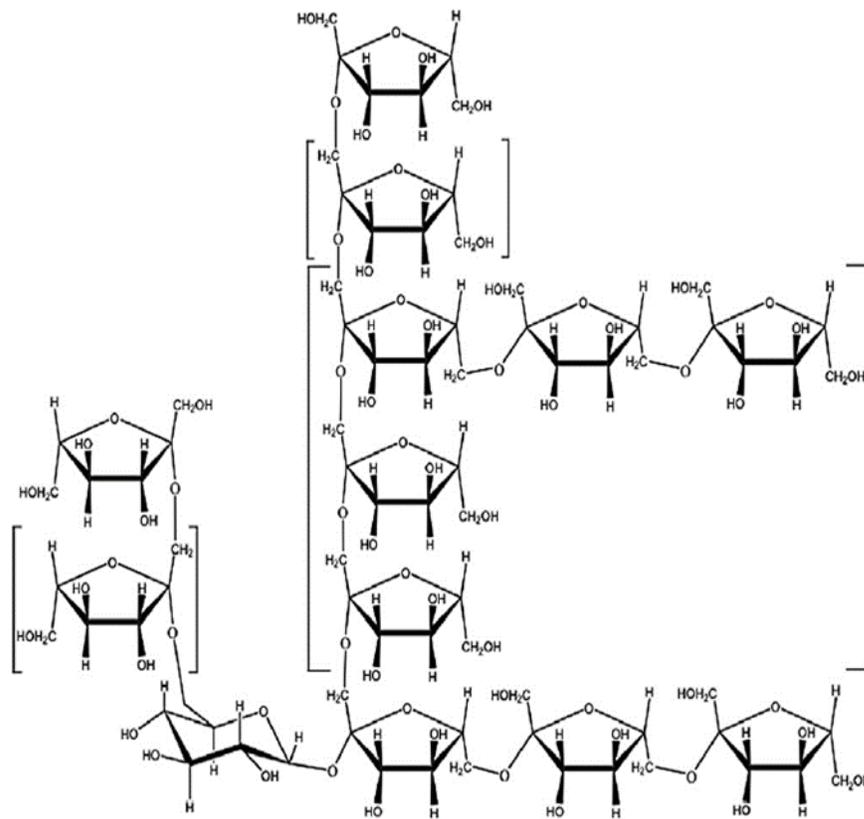


Figura 1. Estructura química de fructanos de agave  
Fuente: Mancilla-Margalli y López (2006).

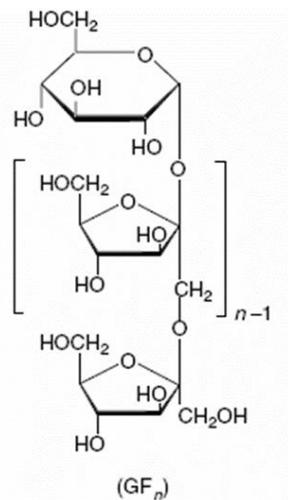


Figura 2. Estructura química de fructanos tipo inulina.  
Fuente: Mancilla-Margalli y López (2006).

Por otro lado, los fructanos son empleados por sus propiedades prebióticas y de mejora de la salud en la formulación de alimentos funcionales (Peshev y Van den Ende, 2014). La evidencia de la actividad prebiótica de fructanos de agave extraídos de *Agave tequilana* se demostró por Gómez *et al.*, (2010) en la cual se observó un gran aumento en el número de bifidobacterias y lactobacilos como consecuencia de los efectos de estos azúcares sobre la ecología microbiana del tracto digestivo humano. Por otro lado, Martínez-Gutierrez *et al.*, (2017) encontraron que los fructanos de *Agave salmiana* propician un mejor crecimiento en cepas probióticas, especialmente en *Lactobacillus acidophilus*. Cabe mencionar que los fructanos de *Agave salmiana* presentaron efecto fisiometabólico positivo, puesto que tienen la capacidad de regular el apetito y disminuir de ingesta alimenticia generando una disminución en su masa corporal (Castillo *et al.*, 2018).

### 2.3 Condiciones gastrointestinales

Para el suministro de probióticos, es necesario conocer la fisiología gastrointestinal con la finalidad de desarrollar sistemas de protección que favorezcan la estabilidad de estos microorganismos en las condiciones hostiles del tracto digestivo (Chai *et al.*, 2018).

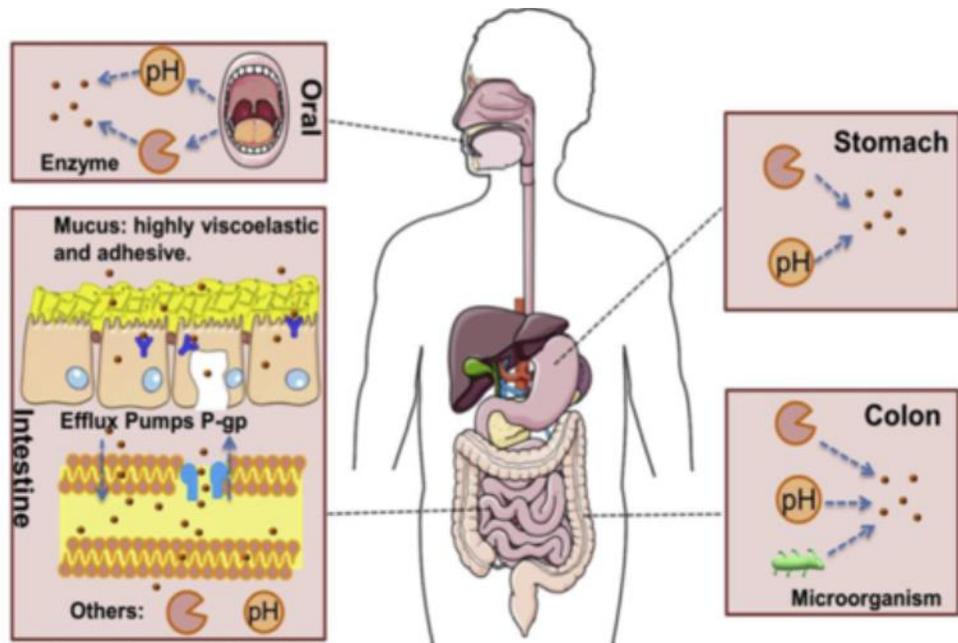


Figura 3. Representación esquemática de las condiciones físicoquímicas y fisiológicas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal.  
Fuente: Chai *et al.*, 2018.

La cavidad oral es la primera barrera para los probióticos después de la ingestión. Las condiciones orales típicas son: pH neutro (7.4), la fuerza iónica, la temperatura, la velocidad de flujo, las fuerzas de fricción y las enzimas salivales (principalmente amilasa). Dichas condiciones afectan a las bacterias ingeridas ya que pueden sufrir cambios apreciables en su composición y estructura (McClements, 2013).

Después de la ingestión, el probiótico pasará rápidamente a través del esófago (10–14 s) y llegará al estómago; en este punto hay secreción ácida de las células parietales que está conformado principalmente por ácido clorhídrico y otras enzimas (como la pepsina que tiene capacidad proteolítica), provocando la mayor pérdida de viabilidad de las bacterias (Cook, Tzortzis, Charalampopoulos y Khutoryanskiy, 2012). El jugo gástrico puro puede tener un pH de 1.0 que al mezclarse con mucinas y bicarbonato se obtiene un valor cercano a 2.5. Los alimentos se digieren físicamente en una masa espesa y semifluida llamada quimo, que se activa con fluidos gástricos muy ácidos (pH 1-2) o con enzimas

digestivas múltiples (por ejemplo, proteasas, amilasas y lipasas). Además, también puede producirse una digestión química simple en el estómago, lo que permite que el quimo se digiera más a fondo en macromoléculas, como proteínas, grasas y polisacáridos, antes de transferir al intestino delgado (Chai *et al.*, 2018).

Después de pasar a través del estómago, los microorganismos ingresarán al intestino delgado, cuyo tránsito se puede variar de 3.2 a 9.5 h. El pH del intestino delgado se encuentra en el rango de pH 6.15–7.35 en la región proximal, aumentando a pH 6.80–7.88 en el intestino delgado distal. Después de pasar por el intestino delgado, los probióticos alcanzarán el intestino grueso, en cuyo punto el pH baja ligeramente a pH 5.26-6.72 en el colon ascendente y pH 5.20-7.02 en el colon descendente (Cook *et al.*, 2012).

En el intestino humano, otro componente a considerar es la sal biliar, ya que puede alterar la membrana bacteriana de las bacterias gram-positivas (como las bacterias del ácido láctico), lo que reduce la supervivencia bacteriana durante la transición a través del intestino (Huq *et al.*, 2017).

Si bien los alimentos ingeridos son degradados y absorbidos principalmente por el estómago y el intestino delgado algunos componentes, como la fibra dietética, no son digeribles debido a su composición y estructura especiales (Chai *et al.*, 2018).

Todos los factores mencionados, como son los cambios de pH, las enzimas digestivas además de la cantidad de oxígeno, entre otros, pueden afectar la supervivencia de los microorganismos probióticos. Por lo que es necesario protegerlos y una forma eficiente de realizarlo es mediante el entrapamiento con materiales poliméricos de fuente natural (Liu, Chen, Cheng y Selornulya, 2016).

## **2.4 Sistemas de protección a probióticos**

Se ha evidenciado diversas tecnologías como sistemas de protección a probióticos siendo principalmente la microencapsulación y el entrapamiento. Comúnmente suelen utilizarse ambos términos indistintamente. La

encapsulación hace referencia al proceso de formación de cápsulas, que están conformadas por una membrana (semipermeable o no permeable), la cual rodea al probiótico (Shori, 2017). Mientras que el entrapamiento se refiere a la captura de un probiótico mediante la inmovilización dentro o a lo largo de una matriz preservando su viabilidad (Vidhyalakshmi *et al*, 2009; Kailasapathy, 2002).

Existen diversos métodos para proteger las bacterias probióticas y pueden ser clasificados en tres grupos principales:

1. Procesos físicos: secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión.
2. Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
3. Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

Cada tecnología presenta sus propias características, para ello es indispensable conocer todos los factores que afectan la viabilidad de los probióticos durante su procesamiento, por lo que la selección de una técnica se basará en la protección y en los mecanismos de liberación controlada en un sitio específico de los probióticos (Martín, Lara-Villoslada, Ruiz y Morales, 2015).

## **2.5 Entrapamiento de probióticos mediante geles**

Los geles biopoliméricos hechos de proteínas y / o polisacáridos proporcionan una fuente renovable para la nutrición, estabilización de la interfaz, aplicaciones de liberación controlada, etc. Consisten en moléculas de biopolímeros reticulados física, química o enzimáticamente que atrapan y retienen el agua dentro de la red de partículas. Se pueden formar a partir de biopolímeros simples o mixtos utilizando una variedad de métodos basados en mecanismos de asociación molecular y procesos mecánicos. El tipo de biopolímero y el método de gelación determinan las propiedades principales de los geles resultantes (Farjami y Madadlou, 2017).

Los microorganismos probióticos pueden ser atrapados a través de la inmovilización efectiva del gel dentro de una red. El sistema de atrapamiento de probióticos altamente reconocido es mediante la gelación del alginato. Sin embargo, la utilización de alginato genera geles muy porosos, lo cual repercute en las propiedades de barrera (Gouin, 2004), por lo que generalmente se utilizan en combinación otros biopolímeros para disminuir el tamaño de poro. Otro biopolímero atractivo para el atrapamiento mediante geles es el almidón, debido a su bajo costo, biodegradabilidad y abundancia (Mahmood *et al.*, 2017).

### **2.5.1 Almidón como agente gelificante**

El almidón es el polisacárido de almacenamiento más abundante en plantas, y existe como gránulos en el cloroplasto de hojas verdes y el amiloplasto de semillas, legumbres y tubérculos. Los almidones son polisacáridos químicamente consisten en una serie de monosacáridos o moléculas de glucosa unidas con  $\alpha$ -D- (1–4) o  $\alpha$ -D- (1–6) enlaces. El almidón incluye dos componentes estructurales principales, amilosa y amilopectina. La estructura del almidón se muestra en la Figura 4. La relativa proporción de estos componentes difiere en función de la fuente de almidón (maíz, papa, tapioca, trigo) y efectos sobre el orden molecular y la cristalinidad del polisacárido. La amilosa es lineal o ligeramente ramificada, mientras que la amilopectina es altamente ramificada. Alrededor del 70 % de la masa del gránulo de almidón se considera amorfo y alrededor del 30 % como cristalino. Las regiones amorfas consisten en la parte principal de amilosa y una cantidad considerable de amilopectina. La región cristalina contiene principalmente la amilopectina (Ismail, Irani y Ahmad, 2013).

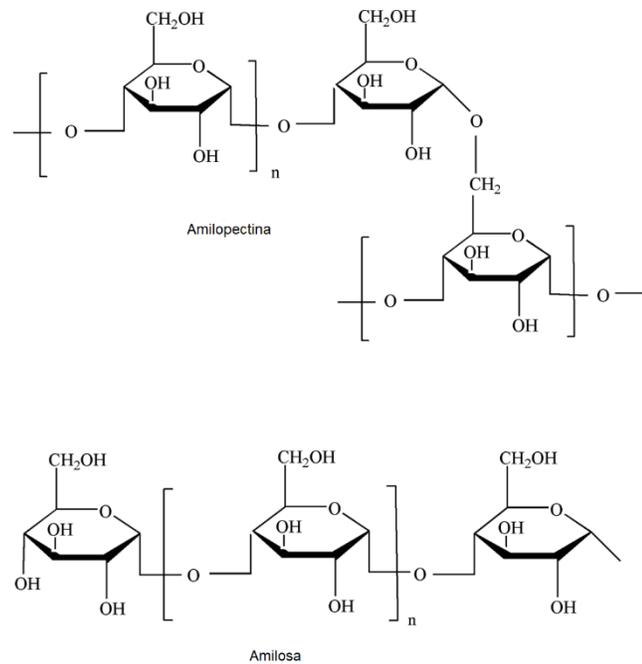


Figura 4. Estructura química del almidón.  
Fuente: Ismail, Irani y Ahmad (2013).

El almidón se usa ampliamente en las industrias farmacéuticas y de alimentos como rellenos, estabilizantes, espesantes, aglutinantes, así como agentes de gelificación, carga y retención de agua (Ismail, Irani y Ahmad, 2013).

La formación de geles basados en almidón implica primero la gelatinización del almidón y luego la retrogradación para formar una red tridimensional. El primer paso es necesario para romper la estructura cristalina del almidón para facilitar la interacción cadena-cadena del polímero. El enfoque típico implica la solubilización y el calentamiento en agua. El contenido de amilosa puede influir en las propiedades de gelatinización y retrogradación de los almidones, definiendo así su aplicación de uso final. El alto contenido de amilosa tiende a promover la retrogradación, formando una estructura cristalina más organizada y rígida, mientras que una matriz baja en amilosa puede dar como resultado una estructura más abierta que tiende a desintegrarse en agua. Las características como la viscosidad inicial y final, las temperaturas de la pasta, la descomposición y la retrogradación están influenciadas por la relación de amilosa y amilopectina (Ratnayake y Jackson, 2008).

## 2.6 Literatura citada

- Al-sheraji, S. H., Ismail, A., Yazid, M., & Mustafa, S. (2013). Prebiotics as functional foods : A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542–1553. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(2), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.001>
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 240-251.
- Chai, J., Jiang, P., Wang, P., Jiang, Y., Li, D., Bao, W., Liu, B., Liu, B., Zhao, L., Norde, W., Yuan, Q., Ren, F., & Li, Y. (2018). The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods: Physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and responsive strategies. *Trends in Food Science and Technology*, 78(November 2017), 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.003>
- Espitia, J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C., & Otonide, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, 90, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.026>.
- Farjami, T., & Madadlou, A. (2017). Fabrication methods of biopolymeric microgels and microgel-based hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 62, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.017>
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), (2002). Health and nutritional properties of Probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live lactic acid bacteria, Córdoba, Argentina. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & Verbeke, K. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (7) ,330- 347.

- Granato, D., Branco, D. F., Gomez, C. A., Foseca, F. J. and Shah, N. P. (2010). Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.9 (5), 455-470.
- Hamilton-Miller, J. M., Gibson, G. R., & Bruck, W. (2019). Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic.' <https://doi.org/10.1079/BJN2003954>
- Huq, T., Frascini, C., Khan, A., Riedl, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2017). Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *Carbohydrate Polymers*, 168, 61–69. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.03.032>
- Ismail, H., Irani, M., & Ahmad, Z. (2013). Starch-based hydrogels: Present status and applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62(7), 411–420. <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.719141>
- Kailasapathy, K., & Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60(3), 252.
- Kim, Y., Hammerman, P. S., Kim, J., Yoon, J. A., Lee, Y., Sun, J. M., ... & Lawrence, M. S. (2014). Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients. *Journal of clinical oncology*, 32(2), 121.
- Li, Y., Liu, T., Zhang, X., Zhao, M., Zhang, H., & Feng, F. (2019). *Lactobacillus plantarum* helps to suppress body weight gain, improve serum lipid profile and ameliorate low-grade inflammation in mice administered with glycerol monolaurate. *Journal of Functional Foods*, 53, 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.12.015>
- Ma, S., Zhu, P., & Wang, M. (2019). Effects of konjac glucomannan on pasting and rheological properties of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 89, 234–240. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.10.045>
- Mancilla-Margalli, N. A., M. G. López. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7832–7839.
- Manzano, C. A., Estupiñán, D. G., & Poveda, E. E. (2012). Efectos clínicos de los probióticos: Qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutricion*, 39(1), 98–110. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000100010>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>

- McClements, D. J. (2013). Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption, and potential toxicity. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 409–423. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.008>
- Mohanty, D., Misra, S., Mohapatra, S., & Sahu, P. S. (2018). Food Bioscience Prebiotics and synbiotics : Recent concepts in nutrition., 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.008>
- Mohanty, D., Panda, S., Kumar, S., & Ray, P. (2019). In vitro evaluation of adherence and anti-infective property of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM 69 against *Salmonella enterica*. *Microbial Pathogenesis*, 126, 212–217. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.11.014>
- Park, S., Ji, Y., Jung, H. Y., Park, H., Kang, J., Choi, S. H., ... & Holzapfel, W. H. (2017). *Lactobacillus plantarum* HAC01 regulates gut microbiota and adipose tissue accumulation in a diet-induced obesity murine model. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(4), 1605-1614.
- Poletto, G., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Barin, J. S., ... de Menezes, C. R. (2019). Study of viability and storage stability of *Lactobacillus acidophilus* when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. *Food Hydrocolloids*, 95, 238–244.
- Rastall, B., & Gibson, G. (2006). *Prebiotics: Development and application*. Wiley.
- Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2008). Chapter 5 Starch Gelatinization. *Advances in Food and Nutrition Research*, 55(08), 221–268. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)00405-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)00405-1)
- Ritsema T., S. Smekens. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223–230.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Estrada-Fernández, A. G., García-Almendárez, B. E., Ludeña-Urquizo, F., Campos-Montiel, R. G., & Pimentel-González, D. J. (2014). Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 768–773. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.004>
- Sánchez-Marroquín, A., P. H. Hope. 1953. Agave juice: fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1: 246–249.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>
- Shimada, H., Takiguchi, N., Kainuma, O., Soda, H., Ikeda, A., Cho, A., ... & Nagata, M. (2010). High preoperative neutrophil-lymphocyte ratio predicts poor survival in patients with gastric cancer. *Gastric cancer*, 13(3), 170-176.

- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. HAYATI Journal of Biosciences, 24(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.12.008>
- Vidhyalakshmi, R., Bhagyaraj, R., Subhasree, R. S. (2009). Encapsulation “The future of probiotic”. Advances in Biological Research. 3(3-4): 96-103.
- Ye, J., Yang, R., Liu, C., Luo, S., Chen, J., Hu, X., & Wu, J. (2018). Improvement in freeze-thaw stability of rice starch gel by inulin and its mechanism. Food Chemistry, 268, 324–333. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.086>

### 3. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRUCTANOS DE *Agave salmiana*

#### RESUMEN

Los fructanos son polímeros de fructosa que presentan actividad prebiótica y amplias propiedades funcionales. Aunque en México ya se extraen industrialmente a partir de *Agave tequilana*, escaso son los estudios en donde se empleen las piñas de *Agave salmiana* para la extracción de fructanos mediante sonicación. El objetivo principal de esta investigación consistió en obtener fructanos de *Agave salmiana* aplicando sonicación a 50 % de amplitud, así como su posterior caracterización. Se caracterizó la materia prima (piña de Agave), demostrándose que es el órgano principal de reserva de carbohidratos cuyo valor fue de  $21.84 \pm 0.01$  %. Posteriormente se evaluó el rendimiento, análisis proximal, contenido de carbohidratos, fructooligosacáridos, azúcares reductores y glucosa. Además, para la confirmación del carbohidrato se caracterizó por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). El análisis FT-IR señaló la absorción a  $1410 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la deformación de  $\text{CH}_2\text{-OH}$  en el anillo de fructosa, mientras que la absorción a  $1015 \text{ cm}^{-1}$  se asignó a las vibraciones de estiramiento de C-O y C-C del anillo de fructanos. Estas técnicas revelaron que los fructanos de *A. salmiana* obtenidos presentan características similares a las extraídas de otras fuentes comerciales como *Agave tequilana* o *Agave atrovirens*, lo que extiende la importancia económica de esta especie

**Palabras clave:** *Agave salmiana*, fructanos de agave, caracterización, prebiótico.

## EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF *Agave salmiana* FRUCTANS

### ABSTRACT

Fructans are fructose polymers that have prebiotic activity and extensive functional properties. Although in Mexico they are already extracted industrially from *Agave tequilana*, there are no studies where pineapples of *Agave salmiana* are used for the extraction of fructans by sonication. The main objective of this research is to obtain fructans from *Agave salmiana* by applying sonication at 50% amplitude, as well as its subsequent characterization. The raw material (agave pineapple) was characterized, demonstrating that it is the main carbohydrate reserve organ whose value was  $21.84 \pm 0.01\%$ . Subsequently, performance, proximal analysis, carbohydrate content, fructooligosaccharides, reducing sugars and glucose are evaluated. Moreover, its polysaccharide structure was confirmed by Fourier Transformed Infrared (FT-IR) spectroscopy. FT-IR analysis pointed out absorption at  $1420 \text{ cm}^{-1}$ , corresponding to deformation of  $\text{CH}_2\text{-OH}$  lying on fructose ring, while absorption at  $1075 \text{ cm}^{-1}$  was assigned to C-O and C-C stretching vibrations of fructanos ring. These techniques revealed that *Agave salmiana* contain fructans with features similar to those extracted from other commercial sources such as *Agave tequilana* or *Agave atrovirens*, which extends the economic importance of this species beyond its simple use as a fiber source.

**Key words:** *Agave salmiana*, agave fructans, characterization, prebiotic.

### 3.1 Introducción

El maguey o agave pulquero (*Agave salmiana*) es una planta suculenta, monocotiledónea y perene. En México, se usa principalmente para la producción de una bebida fermentada denominada pulque. Sin embargo, durante las últimas décadas ha disminuido considerablemente el consumo del pulque por otras bebidas alcohólicas y su bajo precio de cotización ha generado la desmotivación y el abandono del cultivo de agave, por parte de los productores. El cultivo de maguey tiene gran importancia económica y social, específicamente para la región de Otumba, Estado de México, por lo que es necesario darle diferentes formas de uso, con la finalidad de aprovechar su potencial en la obtención de otros productos que actualmente son altamente demandados principalmente por la industria alimenticia, como es el caso de los alimentos funcionales.

La demanda de productos que beneficien la salud ha surgido como consecuencia del aumento de algunas enfermedades crónicas, como son la obesidad, la diabetes, la hipertensión, entre otras. Muchas de estas enfermedades están relacionadas con la falta de actividad física, la mala alimentación, el consumo de productos con alto contenido calórico y el escaso aporte de fibra en la dieta (Marquina y Santos, 2003).

Por lo que el consumidor solicita alimentos que contengan ingredientes saludables y sean de calidad. Por su parte, los tecnólogos en alimentos están en la constante búsqueda de fuentes naturales de las que se pueda extraer ingredientes que causen un efecto benéfico al consumidor, siendo una opción el agave, pues diversas investigaciones han demostrado que posee una cantidad importante de fructanos principalmente en la base de las hojas y tallo conocida como “piña” (Montañez-Soto *et al.*, 2011; Mellado-Mojica y López, 2012).

Los fructanos de agave se conforman por una mezcla compleja de neofructanos altamente ramificados con enlaces tanto  $\beta$ - (2-1) como  $\beta$ - (2-6) entre los grupos de fructosa (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006). Debido a su configuración, los fructanos son resistentes a la hidrólisis enzimática por acción de las enzimas digestivas humanas y, por lo tanto, pasan sin digerirse al colon

donde son fermentados por la microflora colónica. Este efecto prebiótico ofrece nuevos usos alternativos para los fructanos de agave como ingredientes funcionales en la industria alimentaria (López y Urías-Silvas, 2007).

De manera convencional los fructanos se extraen utilizando agua caliente (70 - 80 °C) debido a su alta solubilidad en estas condiciones. Sin embargo, este método requiere altos consumos de energía y largos tiempos de extracción (Zhu *et al.*, 2016). Una de las tecnologías emergentes para obtener compuestos bioactivos es la sonicación, que tiene como propósito disminuir el uso de solventes, tiempos de proceso, por lo tanto, contribuye a la disminución del consumo de energía (Narváez-Flores *et al.*, 2015). La sonicación consiste en generar ultrasonidos que pueden atravesar un medio líquido o un líquido que contiene materiales sólidos, produciendo un fenómeno llamado cavitación, es decir, la producción de burbujas, su crecimiento y luego su colapso. El fenómeno de la cavitación aumenta la difusión de la biomasa, la ruptura celular y finalmente la penetración del solvente (Zhu *et al.*, 2016).

Narváez-Flores *et al.*, (2015) han demostrado el uso eficiente de la sonicación aplicada en la extracción de fructanos de *Agave tequilana*. Sin embargo, son escasos los estudios en donde se aprovechen las piñas de *Agave salmiana* para la obtención de ingredientes funcionales. Por lo que el objetivo de este estudio consistió en extraer fructanos de *Agave salmiana* y su caracterización fisicoquímica, con la finalidad de utilizarlos como fuente prebiótica.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Materiales**

Se colectaron piñas de agave pulquero (*Agave salmiana*) de la variedad Manso, provenientes de la comunidad de Belém, Otumba, Estado de México, México, con coordenadas GPS de 19 ° 37 ' 15 " N y 98 ° 49 ' 19 " W y una elevación sobre el nivel del mar de 2360 m. Las plantas fueron cosechadas en el mes de agosto de 2018, cuando alcanzaron la edad de 10 años. Se utilizaron los siguientes reactivos: Ácido 3, 5 dinitro-salicílico (DNS; Sigma-Aldrich, U.S.A), ácido

clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), D- fructosa (Química Meyer, México), fenol (Golden Bell Reactivos, México). El agua utilizada en todos los experimentos fue agua destilada y desionizada.

### **3.2.2 Composición químico proximal de la piña de *Agave salmiana***

Se realizó la determinación del contenido de humedad (método termogravimétrico), cenizas, proteína (método Kjeldahl), grasas (método de Gerber) y carbohidratos totales procedentes de la piña de *Agave salmiana* (AOAC, 1995).

### **3.2.3 Obtención de fructanos a partir de *Agave salmiana***

Los fructanos se obtuvieron a partir de la piña de *Agave salmiana*, mediante la metodología descrita por Sánchez *et al.*, (2017) con ligeras modificaciones. Para ello, la piña se lavó, troceó y molió en una licuadora (Oster 465-15, México) durante 3 min, la muestra triturada se colocó en refractarios de vidrio para secarla a 50 °C en una estufa de aire forzado (RIOSSA, modelo HCF-S2-D, Wisconsin Oven Distributors, LLC., WI, EUA).

Para la extracción de fructanos, se realizó una dispersión empleando una relación 1:6 (p/p) de agave seco: agua destilada, se dejó en agitación a  $25 \pm 1$  °C durante 1 h. Posteriormente la mezcla obtenida se filtró en papel de 12  $\mu$ , el filtrado se sometió a la extracción utilizando un sonicador (Ultrasonic processor, Model VCX 130PB 500 Newtown, CT, EUA) equipado con una punta de 8 mm de diámetro, operado a una amplitud de 50 % durante 5 min a  $40 \pm 1$  °C. Durante el proceso de extracción se utilizó un baño de agua para mantener la temperatura. El extracto obtenido se filtró con papel Whatman No. 1 y se colocó en moldes de vidrio revestidos con papel horno para secarlos en una estufa con aire forzado (RIOSSA, modelo HCF-S2-D, Wisconsin Oven Distributors, LLC., WI, EUA) a  $40 \pm 1$  °C durante 72 h. Los fructanos de *Agave salmiana* se retiraron de los moldes, se trituraron en una licuadora y almacenaron en recipientes de vidrio, sellados herméticamente a temperatura ambiente ( $20 \pm 1$  °C), para su posterior caracterización.

### 3.2.4 Caracterización de fructanos de agave

#### Rendimiento

El rendimiento de los fructanos obtenidos se determinó mediante la Ecuación (1):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso de fructanos (g)}}{\text{Peso de la piña de Agave salmiana (g)}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

#### Análisis químico proximal

Se determinó a los fructanos de agave el contenido de proteína (método Kjeldahl), grasa (método de Gerber), cenizas, fibra y humedad por método gravimétrico (AOAC, 1995). Cada determinación se realizó por triplicado.

#### Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales presentes en los fructanos de *Agave salmiana* se realizó mediante el método propuesto por Dobuis (1956), utilizando soluciones de fructosa (100-500 mg L<sup>-1</sup>) para generar la curva estándar. La muestra se trató de la misma forma que los estándares. Se utilizó 1 mL de la muestra se mezcló con 1 mL de solución al 5 % (p/v) de fenol en un tubo de ensayo. Posteriormente a la mezcla, se le añadió 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se dejó enfriar durante 20 min en un baño de agua a temperatura ambiente para el desarrollo de color y se leyó a 490 nm en espectrofotómetro UV (Spectrophotometer CS-200PC® Globe™, 340-1000 nm, Spectronics Instruments Inc., Rochester, NY, EUA). Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

#### Fructooligosacáridos (FOS)

Para cuantificar los FOS presentes en las muestras de fructanos se utilizó la metodología descrita por Montañez-Soto *et al.*, (2011). Se preparó una dilución de fructanos al 1 % (p/v) y se le adicionó invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* incubándose a 55 °C con agitación constante durante 90 min con la finalidad de llevar a cabo la hidrólisis. Posteriormente, la muestra producto de la hidrólisis fue

colocada en baño maría a ebullición durante 3 min y enfriada utilizando un baño de hielo. La detección espectrofotométrica se realizó a 575 nm utilizando un espectrofotómetro UV (Spectrophotometer CS-200PC® Globe™, 340-1000 nm, Spectronics Instruments Inc., Rochester, NY, EUA). Cada ensayo se realizó por triplicado.

### **Azúcares reductores**

La cuantificación de los azúcares reductores directos en la muestra se determinó por el método de Miller (1959), mediante la construcción de una curva estándar, para ello se prepararon soluciones de 200-1000 mg L<sup>-1</sup>, utilizando fructosa como estándar. Se tomó 1 mL de cada solución y se colocaron en tubos de ensaye, se les adicionó 1 mL de ácido 3, 5 dinitro-salicílico y se agitaron vigorosamente para homogenizar la mezcla de reacción. En seguida se colocaron en un baño maría a 100 °C durante 5 min e inmediatamente después se enfriaron a chorro de agua y se le adicionaron 10 mL de agua destilada. Se homogenizó la mezcla de reacción y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro (Espectrofotómetro UV, Spectrophotometer CS-200PC® Globe™, 340-1000 nm, Spectronics Instruments Inc., Rochester, NY, EUA) a una longitud de onda de 540 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

### **Glucosa**

El contenido de glucosa en las muestras se determinó de acuerdo con el método enzimático propuesto por Trinder (1969), utilizando una curva de calibración de glucosa con concentraciones entre 100 a 500 mg L<sup>-1</sup>. Dispersiones de fructanos al 1 % (p/v) fueron preparadas y mezcladas con glucosa oxidasa. Posteriormente, esta mezcla fue colocada en baño maría a 37 ± 1 °C durante 10 min. La detección espectrofotométrica se realizó a 575 nm utilizando un espectrofotómetro UV (Spectrophotometer CS-200PC® Globe™, 340-1000 nm, Spectronics Instruments Inc., Rochester, NY, EUA).

## Fructosa

Montañez-Soto *et al.*, (2011) determinaron que el contenido de azúcares reductores directos está dado por la suma de glucosa y fructosa en las muestras de fructanos, por lo tanto, la determinación de fructosa se llevó a cabo por diferencia (Ecuación 2 y 3).

$$\text{ARD} = \text{G} + \text{F} \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{F} = \text{ARD} - \text{G} \dots\dots\dots(3)$$

### Análisis infrarrojo por transformada de Fourier (FT- IR)

El análisis FT-IR de los fructanos de *Agave salmiana* se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro de infrarrojos, equipado con un ATR (reflectancia total atenuada). La muestra se presionó uniformemente para obtener una tableta y el espectro se analizó en el rango de 4 000-400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  (Apolinário *et al.*, 2017).

### 3.3 Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), y en los casos pertinentes, a pruebas de comparación de medias de Tukey con una significancia de  $p \leq 0.05$ . Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

### 3.4 Resultados y discusión

#### 3.4.1 Análisis proximal de la piña de *Agave salmiana*

El análisis químico proximal de la piña de *Agave salmiana* se muestra en el Cuadro 3, se demuestra que después del contenido de humedad, los carbohidratos conforman la mayor parte de la materia de la piña del *Agave salmiana*, seguida de la fibra cruda, cenizas, proteína y grasa. Se encontró una

composición similar a lo reportado por Vargas (2009) y Martínez-Gutiérrez *et al.*, (2017).

Cuadro 3. Composición química proximal de la piña de *Agave salmiana*.

Parámetro	Media $\pm$ DE (%BH <sup>y</sup> )
Humedad	72.50 $\pm$ 0.01 <sup>z</sup>
Cenizas	1.72 $\pm$ 0.03
Grasas	0.13 $\pm$ 0.03
Proteína	0.55 $\pm$ 0.10
Fibra cruda	3.26 $\pm$ 0.01
Carbohidratos	21.84 $\pm$ 0.01

<sup>z</sup> Desviación estándar

<sup>y</sup> % expresado en base húmeda (%BH)

Los valores obtenidos son el resultado de tres repeticiones.

El alto contenido de carbohidratos (21.84  $\pm$  0.01 %) se debe a que la piña es el órgano principal de reserva (Montañez-Soto *et al.*, 2011) y allí acumula los carbohidratos, siendo este valor similar a lo encontrado en *Agave tequilana* Weber var. Azul (23.02 %). Jiménez-Muñoz *et al.* 2016, señalan que en general los carbohidratos en agaves están constituidos por fructanos, como principales carbohidratos de reserva, también se pueden encontrar sacarosa, fructosa y glucosa. Dichos carbohidratos tienen diversas funciones en las plantas como: participación en procesos de protección, almacenamiento de energía, estabilización de la presión intracelular y formación de compuestos de difusión para un almacenamiento más eficiente de los productos originados por el proceso fotosintético.

El segundo componente de mayor abundancia fue la fibra cruda (3.26  $\pm$  0.01 %), el cual está conformado fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. La fibra cruda y pequeñas cantidades de sustancias nitrogenadas constituyen las estructuras celulares de los vegetales (Jiménez-Muñoz *et al.*, 2016).

El contenido de cenizas encontradas fue de 1.72 %, este valor se encuentra asociado posiblemente a la capacidad de acumular sales minerales debido a sus dimensiones en comparación de otros agaves, por ejemplo, Sánchez-Madrigal *et*

*al.*, (2017) encontraron 0.96 % de cenizas en *Agave tequilana* Weber. También se le puede atribuir a que la toma de muestra en época de lluvia con mayor probabilidad de incrementar las sales disponibles en los suelos (Jiménez-Muñoz *et al.*, 2016). En cuanto al contenido en proteínas resulta ser del 0.55%, siendo similar al que reporta Montañez-Soto *et al.*, (2011) de 0.62% en *Agave tequilana* Weber var. Azul.

El contenido de grasa resulta ser un valor relativamente bajo (0.13 %), de acuerdo con Vargas (2009), indica que la presencia de grasas en los agaves se atribuye a la presencia de terpenos y ácidos grasos, constituidos principalmente por linoleico, palmítico y oleico.

### 3.4.2 Caracterización de fructanos de *Agave salmiana*

Los resultados obtenidos del análisis químico proximal y el contenido de azúcares presentes en los fructanos de agave se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Composición química de los fructanos de *Agave salmiana*.

Parámetro	Media ± DE (% BH) <sup>y</sup>
Rendimiento	13.94 ± 0.67
Humedad	4.18 ± 0.45
Cenizas	0.64 ± 0.01
Grasas	0.33 ± 0.09
Proteína	1.34 ± 0.01
Fibra cruda	0.11 ± 0.01
Carbohidratos	93.4 ± 0.12
De los cuales:	
Fructooligosacáridos	23.33 ± 0.15
Azúcares reductores:	1.10 ± 0.03
Fructosa	0.62 ± 0.00
Glucosa	0.11 ± 0.03

<sup>z</sup> Desviación estándar

<sup>y</sup> % expresado en base húmeda (%BH)

Los valores obtenidos son el resultado de tres repeticiones.

## **Rendimiento**

Al polvo obtenido se le denominó fructanos de *Agave salmiana* (F), cuyo rendimiento en polvo fue de  $13.94 \pm 0.19$  % en base húmeda, estos resultados fueron similares a los reportados por Ávila-Fernández *et al.*, (2011) quienes obtuvieron rendimientos de 15 - 20 % a partir de piñas de *Agave tequilana* Weber.

El alto rendimiento obtenido, se puede atribuir al hecho que una intensificación del fenómeno de cavitación provocó modificaciones y rupturas en la pared celular de la planta, favoreciendo la transferencia o liberación de carbohidratos (Martin *et al.*, 2015). Además, que durante el proceso de sonicación se liberaron otros compuestos presentes de la pared celular de las fibras de agave, ya que como se puede observar en el Cuadro 4 se encontraron ligeras cantidades de proteínas, cenizas, grasas y fibra cruda, indicando con ello que se obtuvo un producto con impurezas.

Por otro lado, los resultados obtenidos indican rendimientos altos en comparación con otras especies vegetales como plátano (*Musa x paradisiaca*) (0.2 %), cebolla (*Allium cepa*) (1-5 %) y ajo (*Allium sativum*) (4 %) (Meyer *et al.*, 2011) y semejantes a especies utilizadas como fuente de extracción a nivel industrial, como lo es la dalia (*Dhalia spp.*) de la cual se obtiene un 15-20 % de fructanos (Madrigal y Sangronis, 2007).

## **Humedad**

Los fructanos de *Agave salmiana* tuvieron una humedad del 4.18 %. Resultados ligeramente mayores (5 %) fueron reportados por Godínez- Hernández *et al.*, (2016), en fructanos obtenidos de piñas de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck.

La Norma Mexicana NMX-F-591-SCFI-2010, establece que el contenido máximo de humedad en fructanos comerciales debe ser del 5 %, los resultados generados en el presente trabajo se encuentran dentro de este parámetro. Cabe destacar que debido al bajo contenido de humedad que presentaron los fructanos de agave analizados, se favorece su conservación durante tiempos prolongados de almacenamiento (Vargas, 2009).

## Carbohidratos totales

En la en la Figura 5 se muestra la curva de calibración y ecuación empleadas para la cuantificación de carbohidratos totales en muestras de fructanos de *Agave salmiana*.

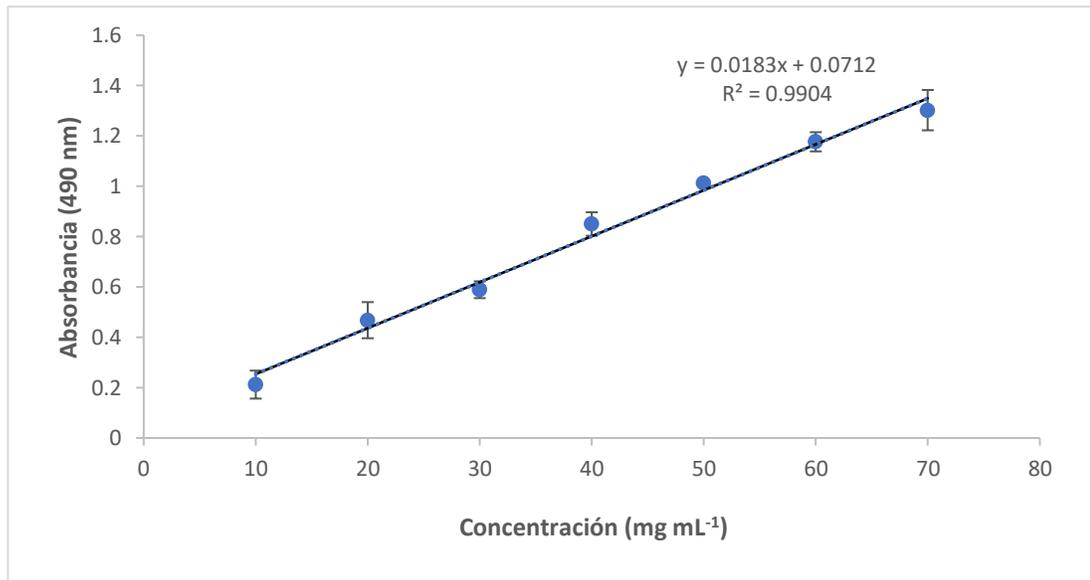


Figura 5. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos totales.

El valor obtenido para el contenido de carbohidratos para la muestra de fructanos de agave fue de 93.4 %, indicando con ello que la mayor fracción está constituida fructooligosacáridos y seguida por azúcares reductores (glucosa y fructosa),

## Azúcares reductores

En la Figura 6 se puede apreciar la curva patrón empleada para la cuantificación de azúcares reductores.

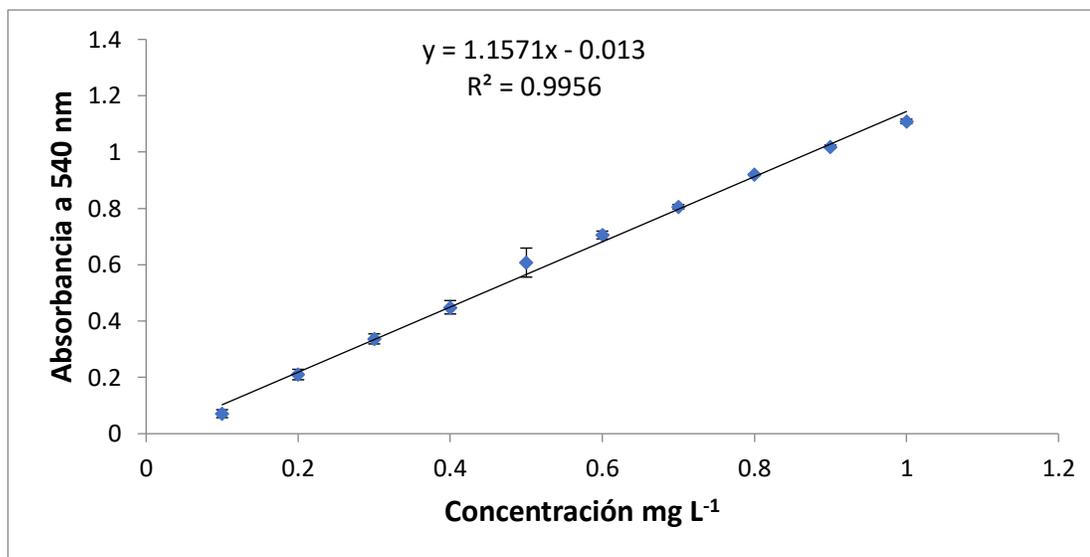


Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores.

Este parámetro hace referencia al contenido de azúcares reductores que se encuentran en estado libre en la muestra, el cual está conformado por glucosa y fructosa (Vargas, 2009). El valor obtenido para azúcares reductores fue de 1.1 %, dicho valor se puede atribuir a que, durante el proceso de sonicación, existe un proceso de depolimerización en la molécula del fructano. Esto puede atribuirse al efecto de degradación debido a la ecografía, que causa la escisión de los enlaces glicosídicos de los polisacáridos tanto estructurales como ramificados como la pectina, la celulosa o las hemicelulosas contenidas en la pared celular del agave (Contreras-Hernández *et al.*, 2018).

Se encontraron resultados similares a los reportados por Apolinário *et al.*, (2017) presentes en *Agave sisalana* quienes obtuvieron 2.77 % en su muestra; pero diferentes a lo reportado por Morales y Martínez (2007), quienes encontraron 38.17 % de azúcares reductores en fructanos extraídos de pencas de *Agave atrovirens* Karw. Por su parte, Montañez-Soto *et al.*, (2011) encontraron un valor de 12% en fructanos de *Agave tequilana* Weber (12 %). La cantidad de azúcares reductores pudo variar debido a los procesos de obtención, ya que estos autores utilizaron el método de difusión en agua caliente (80° C), lo cual puede producir hidrólisis en la muestra y por ende aumentar el contenido de azúcares reductores.

## Fructooligosacáridos (FOS)

Los fructooligosacáridos (FOS) son fructanos con un grado de polimerización  $\leq 10$ , y son producidos ya sea por la transfructosilación de la sacarosa o por hidrólisis enzimática parcial de fructanos tipo inulina (Ramírez, 2010). La cantidad encontrada de FOS fue de 23.33 %, Mellado-Mojica y López (2012) realizaron un estudio en el cual demostraron que durante el desarrollo vegetal de *A. tequilana* el contenido de fructanos y estructuras varían durante los primeros 5 años, siendo los carbohidratos de almacenamiento más abundantes los FOS, mientras que de 6 a 7 años las planta contienen cadenas largas denominadas agavinas. Por este motivo se encontró menor cantidad de FOS en la muestra ya que la edad de las piñas de agave empleadas en la presente investigación fue de 10 años.

## Análisis infrarrojo por transformada de Fourier (FT- IR)

La espectroscopía FTIR se realizó con la finalidad de identificar los principales grupos funcionales presentes en la estructura química de los fructanos obtenidos de *Agave salmiana*, el espectro se muestra en la Figura 7.

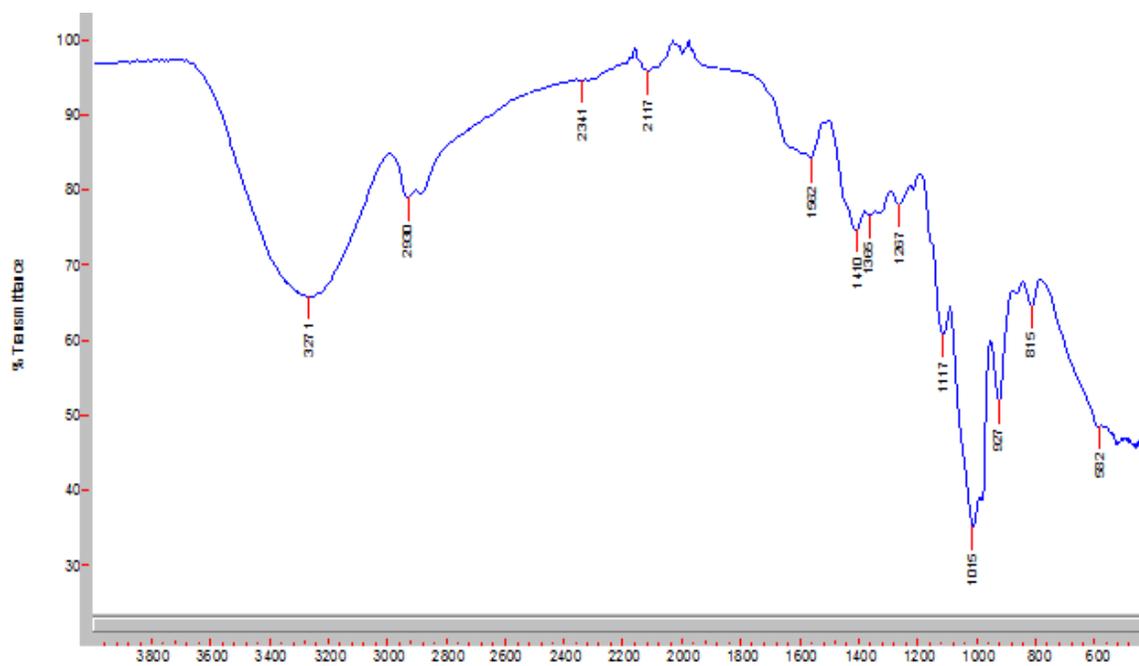


Figura 7. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) de fructanos de *Agave salmiana*.

En particular, el mayor pico de estiramiento mostró una banda alrededor de 3271  $\text{cm}^{-1}$  indicando la presencia de grupos hidroxilo (-OH) de carbohidratos, mientras que la banda pequeña de alrededor de 2930  $\text{cm}^{-1}$  fue atribuida a la extensión C-H. El pico de absorción relativamente fuerte a alrededor de 1562  $\text{cm}^{-1}$ , se debe probablemente a la absorción de algunas impurezas comúnmente encontradas en por ejemplo algunos polisacáridos como la lignina (Cui *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2017). Estos resultados confirman que el polvo obtenido consistió en fructanos no totalmente puros. Por otro lado, la banda de absorción en 1410  $\text{cm}^{-1}$  se puede asignar a la deformación de  $\text{CH}_2\text{-OH}$  que se encuentra en el anillo de fructosa (Panchev *et al.*, 2011), aquellos entre 1267 y 815  $\text{cm}^{-1}$  son típicos de una estructura de polisacárido con enlaces C-O-C entre monómeros (Dalonso *et al.*, 2009), y que a 1015  $\text{cm}^{-1}$  puede asignarse a C - O y C-C a las vibraciones de estiramiento del anillo de inulina piranosa (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). Los datos de FT-IR fueron similares a los que presentan a fructanos tipo inulina de *Agave sisalana* (Apolinário *et al.*, 2017).

### 3.5 Conclusiones

La composición de la piña de *Agave salmiana* demostró ser una fuente promisoría para la obtención de ingredientes con aplicaciones funcionales, puesto que representa el órgano principal de reserva de carbohidratos, del cual se pueden obtener prebióticos como lo son los fructanos.

El rendimiento en polvo de los fructanos obtenidos a partir de la piña de *Agave salmiana* fue de  $13.94 \pm 0.19$  % en base húmeda, resultando ser comparables con otras especies de agave.

El análisis de carbohidratos demuestra la presencia de glucosa ( $0.11 \pm 0.03\%$ ), fructosa ( $0.62 \pm 0.00$  %), fructooligosacáridos ( $23.33 \pm 0.15$ ) en la muestra en polvo de fructanos de agave. Por su parte el análisis químico proximal demostró que se obtuvieron una pequeña cantidad de impurezas como: cenizas ( $0.64 \pm$

0.01 %), grasas ( $0.33 \pm 0.09$ ), proteína ( $1.34 \pm 0.01$  %) y fibra cruda ( $0.11 \pm 0.01$  %).

El análisis FT-IR señaló la absorción a  $1410\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la deformación de  $\text{CH}_2\text{-OH}$  en el anillo de fructosa, mientras que la absorción a  $1015\text{ cm}^{-1}$  se asignó a las vibraciones de estiramiento de C-O y C-C del anillo de fructanos.

### 3.6 Literatura citada

- Apolinário, A. C., de Carvalho, E. M., de Lima Damasceno, B. P. G., da Silva, P. C. D., Converti, A., Pessoa, A., & da Silva, J. A. (2017). Extraction, isolation and characterization of inulin from *Agave sisalana* boles. *Industrial Crops and Products*, 108, 355–362.
- Association Official methods of analysis of AOAC International. (1998). Maryland, E. U.: AOAC International.
- Carrillo-Navas, H., Hernández-Jaimes, C., Utrilla-Coello, R. G., Meraz, M., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2014). Viscoelastic relaxation spectra of some native starch gels. *Food Hydrocolloids*, 37, 25–33.
- Castro, G., Valvuená, E., Sanchez, E., Briñez, W., Vera, H. y Leal M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Revista científica*, septiembre-octubre, año/vol. XVII, número 005, Maracaibo, Venezuela, pp. 582-588.
- Contreras-Hernández, M. G., Ochoa-Martínez, L. A., Rutiaga-Quiñones, J. G., Rocha-Guzmán, N. E., Lara-Ceniceros, T. E., Contreras-Esquivel, J. C., ... Rutiaga-Quiñones, O. M. (2018). Effect of ultrasound pre-treatment on the physicochemical composition of *Agave durangensis* leaves and potential enzyme production. *Bioresource Technology*, 249, 439–446.
- Cui, G., Zhang, W., Wang, Q., Zhang, A., Mu, H., Bai, H., Duan, J., 2014. Extraction optimization, characterization and immunity activity of polysaccharides from *Fructus Jujubae*. *Carbohydr. Polym.* 111, 245–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.041>.
- Dalonso, N., Ignowski, E., Mariane, C., Monteiro, A., Gelsleichter, M., Wagner, T.M., Luciane, M., Silveira, L., Abatti, D., Silva, K., 2009. Extraction and characterization of carbohydrates present in the garlic (*Allium sativum* L.): proposal of alternative methods (in Portuguese). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 29, 793–797. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000400014>.
- Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

- Gómez-Ordóñez, E., Rupérez, P., 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocoll.* 25, 1514–1520. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>.
- Jiménez-Muñoz, E., Prieto-García, F., Prieto-Méndez, J., Acevedo-Sandoval, O. A., & Rodríguez-Laguna, R. (2016). Caracterización fisicoquímica de cuatro especies de agaves con potencialidad en la obtención de pulpa de celulosa para elaboración de papel. *DYNA (Colombia)*, 83(197), 233–243.
- Le, B., & Yang, S. H. (2018). Efficacy of *Lactobacillus plantarum* in prevention of inflammatory bowel disease. *Toxicology Reports*, 5, 314–317. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2018.02.007>
- Madrigal, L. y Sangronis. E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves n alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de nutrición. Venezuela.* 57 (4):4887-396
- Martinez-Gutierrez, F., Ratering, S., Juárez-Flores, B., Godínez-Hernandez, C., Geissler-Plaum, R., Prell, F., Zorn, H., Czermak, P., Schnell, S. (2017). Potential use of *Agave salmiana* as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. *LWT Food Science Technology* 84,151–159.
- Mellado-Mojica, E., & López, M.G. (2012). Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber Blue variety along its developmental cycle in the field. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60 (47), 11704–11713.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramírez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana weber azul*. *Bioagro* 23:3, 199-206.
- Narváez-Flores, M., Sánchez-Madrigal, M.Á., Quintero-Ramos, A., Paredes-Lizárraga, M.A., González-Laredo, R.F., Ruiz-Gutiérrez, M.G., Piñón-Castillo, H.A., Meléndez- Pizarro, C.O. (2015). Ultrasound assisted extraction modeling of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) at different temperatures and ultrasound powers. *Food Bioproducts Process*, 96: 232–239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2015.08.007>.
- Panchev, I., Delchev, N., Kovacheva, D., Slavov, A., 2011. Physicochemical characteristics of inulins obtained from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 233, 889–896. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1584-8>.
- Rodríguez-Huezo, M.E, Durán-Lugo, R., Prado-Barragán, L.A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J. & Vernon-Carter E.J. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as

thermoprotective prebiotic,  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.09.001>

40:1299–1306.

- Sánchez- Madrigal., Amaya, C., Quintero, A., Báez, J., Núñez, M., Ruiz, M., & Grazón, J. (2017). Ultrasound-assisted extraction of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) at different ultrasound powers and solid-liquid ratios. *Food Science And*, 37(June), 261–268.
- Souza, F. N., Gebara, C., Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gigante, M. L., & Grosso, C. R. F. (2012). Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Research International*, 49, 560–566.
- Tang, C., Chen, Y., Liu, J., Shen, T., Cao, Z., Shan, J., Ying, H., 2017. Sustainable biobutanol production using alkali-catalyzed organosolv pretreated cornstalks. *Ind. Crops Prod.* 95, 383–392. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.048>.
- Valcheva, R., & Dieleman, L. A. (2016). Prebióticos: Definição e mecanismos de proteção. *Best Practice & Research Gastroenterologia Clínica*, 30(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.008>.
- Vargas Vázquez, C. G. (2009). Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Tesis de maestría, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR-IPN-Michoacán, 123 p.
- Zhu, Z., He, J., Liu, G., Barba, F. J., Koubaa, M., Ding, L., ... Vorobiev, E. (2016). Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.0>

#### 4. VIABILIDAD DE *Lactobacillus plantarum* Lp-115 ENTRAMPADO EN GELES ADICIONADOS CON PREBIÓTICOS DE *Agave salmiana*

##### RESUMEN

Células de *Lactobacillus plantarum* Lp-115 fueron entrampadas en geles de almidón (A; 2.5 % p/p) y se incorporaron diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F; 0, 0.5, 1 y 1.5 % p/p) con objeto de proteger de las condiciones gastrointestinales simuladas (GIS) y proveer una fuente de carbono al probiótico. Los geles con 1.0% p/p de F presentaron: estructuras complejas donde se integró el microorganismo, la mejor eficiencia de entrampamiento (96.71 %), los menores tamaños de poro (13  $\mu\text{m}$ ) y confirieron una mejor protección a *L. plantarum* Lp-115 bajo condiciones GIS, presentando la mayor viabilidad ( $9.26 \pm 0.18 \log \text{UFC g}^{-1}$ ) después de la exposición a pH 2 y ( $6.81 \pm 0.85 \log \text{UFC g}^{-1}$ ) después de la exposición consecutiva a sales biliares, en comparación a células libres ( $8.06 \pm 0.28 \log \text{UFC g}^{-1}$  y  $5.77 \pm 0.32 \log \text{UFC g}^{-1}$ , respectivamente). Micrografías electrónicas de barrido mostraron que las células de *L. plantarum* Lp-115 fueron entrampadas en las matrices de los biopolímeros A-F.

**Palabras clave:** *Agave salmiana*, fructanos de agave, prebiótico, condiciones gastrointestinales simuladas.

## VIABILITY OF *Lactobacillus plantarum* Lp-115 ENTRAPPED IN GELS ADDITIONED WITH PREBIOTICS OF *Agave salmiana*

### ABSTRACT

*Lactobacillus plantarum* Lp-115 cells were entrapped in starch gels (A; 2.5% w/w) and different concentrations of *Agave salmiana* fructans (F; 0, 0.5, 1 and 1.5% w/w) were incorporated in order to protect from simulated gastrointestinal conditions (SIG) and provide a source of carbon to the probiotic. The gels with 1.0% w/w of F presented: complex structures where the microorganism was integrated, the best entrapment efficiency (96.71%), the smallest pore sizes (13  $\mu\text{m}$ ) and conferred a better protection to *L. plantarum* Lp-115 under SIG conditions, presenting the higher viability ( $9.26 \pm 0.18 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) after exposure to pH 2 and ( $6.81 \pm 0.85 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) after consecutive exposure to bile salts, in comparison with free cells ( $8.06 \pm 0.28 \log \text{CFU g}^{-1}$  and  $5.77 \pm 0.32 \log \text{CFU g}^{-1}$ , respectively). Scanning electron micrographs showed that *L. plantarum* Lp-115 cells were entrapped in the A-F biopolymers matrices.

**Keywords:** *Agave salmiana*, agave fructans, prebiotic, simulated gastrointestinal conditions.

## 4.1 Introducción

La fabricación de productos funcionales basados en probióticos con la finalidad de mejorar la salud del humano es objeto de una extensa investigación entre la comunidad científica e industrial (Cho y Blaser, 2012). Los probióticos son suplementos dietéticos microbianos vivos que se han postulado para desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la salud debido a los múltiples efectos beneficiosos que ejercen sobre el sistema del huésped cuando se ingieren en cantidades adecuadas (FAO/OMS, 2002).

Sin embargo, los probióticos ingeridos deben sobrevivir las severas condiciones del estómago y llegar al intestino en grandes cantidades para poder ejercer una influencia beneficiosa en la salud y fisiología del huésped (López-Rubio, Sanz y Lagaron, 2009). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO/OMS, 2002) el nivel mínimo de probióticos debería ser de  $10^6$  -  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  para lograr los resultados terapéuticos deseados.

*Lactobacillus plantarum* es una bacteria ácido láctica ampliamente utilizada por su carácter probiótico. Cabe destacar que existen pocos estudios en donde se utilicen específicamente la cepa de *L. plantarum* Lp-115. Esta bacteria Gram positiva, ha demostrado ofrecer grandes beneficios sobre los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y lo más importante es que se considera un microorganismo generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (Rodríguez- Huevo *et al.*, 2014).

Es por ello que los tecnólogos en alimentos están en la constante búsqueda de tecnologías eficientes e innovadoras que aseguren la viabilidad de los probióticos contra factores como: oxígeno, temperatura, humedad, almacenamiento y además logren sobrevivir a las condiciones del tracto digestivo del ser humano (Heidebach, Forst y Kulozik, 2010). El entrapamiento de es una técnica que se ha utilizado ampliamente para atrapar células probióticas en matrices transportadoras, la cual puede mejorar la protección de las células contra condiciones gastrointestinales adversas, facilitar la liberación gradual de células en el intestino y aumentar la estabilidad y la viabilidad de las células probióticas

en diferentes condiciones durante el tiempo de procesamiento y almacenamiento. Los carbohidratos como quitosano, alginato,  $\kappa$ -carragenano, pectina y almidón, se han utilizado generalmente como matrices prometedoras para entrapamiento de probióticos.

El almidón es un polisacárido barato, abundante y comestible con propiedades fantásticas como biodegradabilidad, biocompatibilidad y rentabilidad y tiene una larga historia como excipiente en las formulaciones de medicamentos (Kanmani *et al.*, 2004). El almidón se aplica en la industria alimentaria como formador de gel, emulsionante coloidal y agente espesante. Sin embargo, los almidones nativos se degradan casi completamente por las enzimas pancreáticas después de la ingestión oral, lo que promueve la absorción del intestino delgado hacia la circulación sistémica. Para abordar este desafío, el almidón se ha combinado con otros biomateriales como los prebióticos (Ye *et al.*, 2018).

Además, una forma de mejorar la estabilidad de los probióticos es agregar prebióticos a la formulación de matrices biopoliméricas (Poletto *et al.*, 2019). Un prebiótico se define como un "ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y por lo tanto mejora la salud del huésped" (Roberfroid *et al.*, 2010). Los prebióticos típicos son la fibra dietética, que generalmente consiste en inulina, oligosacáridos y almidón resistente (Poletto *et al.*, 2019). Sin embargo, Martínez-Gutiérrez *et al.*, (2017) encontraron que los fructanos de *Agave salmiana* tienen potencial prebiótico ya que pueden ser fácilmente digeridos por las bacterias del género *Bifidum* y *Lactobacillus*. Debido a la estructura química de los fructanos de agave, son capaces de resistir a las enzimas gástricas e intestinales, como la proteasa y la amilasa, que son activas en el tracto gastrointestinal superior. Esta ventaja significativa hace que los fructanos especialmente de *Agave salmiana*, sean un ingrediente funcional prometedor para la administración de componentes bioactivos específicos del colon, de los cuales son escasos el número de estudios con respecto a este tema.

Por lo tanto, en la presente investigación se formuló una matriz a partir de geles de almidón incorporados con fructanos de *Agave salmiana*, con el objetivo de entrapar además de proveer una fuente de carbono y favorecer la viabilidad de *L. plantarum* Lp-115 en condiciones gastrointestinales simuladas.

## **4.2 Materiales y métodos**

Caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) y medio de cultivo agar MRS se adquirieron de BD DIFCO Becton Dickinson and Company, Detroit, MI, EUA); fructanos de *Agave salmiana* (se extrajeron de piñas de maguey pulquero que tenían 10 años de edad); almidón nativo de maíz (S-4126, contenido de humedad < 15 %, contenido de amilosa 26.7 %), sales biliares (B-8756, mezcla 1: 1 de colato de sodio y desoxicolato de sodio) se adquirieron de Sigma- Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA). En todos los experimentos se utilizó agua destilada y desionizada.

### **4.2.1 Cultivo de *L. plantarum* Lp-115 y preparación del concentrado celular**

#### **Curva de crecimiento de *L. plantarum* Lp-115**

La determinación de la curva de crecimiento de *L. plantarum* Lp-115 se realizó por triplicado, utilizando como medio de cultivo caldo MRS estéril (121 °C, 15 min). El cultivo liofilizado de *L. plantarum* Lp-115 (1 g) se inoculó en 99 mL de medio de cultivo y se colocó en incubación a 37 °C. Las mediciones se realizaron cada 2 h, desde el inicio de la inoculación hasta las 30 h de incubación. El número de células de *L. plantarum* Lp-115 presente en los cultivos se determinó por triplicado por recuento en placa usando agar MRS. Lo anterior con el fin de construir la curva de crecimiento de *L. plantarum* Lp-115 y con ello se determinaron las fases de crecimiento, y tiempo de cosecha con la finalidad de entrapar células en etapa de crecimiento logarítmico tardío (Sandoval-Castilla, 2010).

## **Preparación del concentrado celular**

A partir de un cultivo liofilizado de *L. plantarum* Lp-115 ATCC:SD5209 se reactivó utilizando un gramo inoculándose en 99 mL de caldo de MRS estéril. El cultivo obtenido se subcultivó (37 °C, 18 h) dos veces en caldo MRS estéril usando 1 % (p/v) de inóculo para realizar la activación y adaptación del microorganismo. Posteriormente, las células activadas se centrifugaron a 15 800 ×g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en medio de conservación estéril (50 % p/v caldo MRS y 50 % p/v glicerol), guardándose en viales a -5 °C (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

Para la obtención del concentrado celular (CC), se tomó un vial (1 mL) con el cultivo activado y se inoculó en 99 mL de caldo MRS estéril durante 10 h de incubación a 37 °C; este tiempo de incubación permitió que el microorganismo se encontrara en fase logarítmica tardía de crecimiento. El cultivo fue cosechado por centrifugación (4 000 ×g, 10 min, 4 °C) (centrífuga Eppendorf, Modelo 5810 R, EUA) y se lavó por duplicado con solución fisiológica (0.85 % p/p de NaCl), obteniéndose así el CC.

### **4.2.2 Elaboración de geles para el entrapamiento de *L. plantarum* Lp-115**

Se prepararon dispersiones de almidón de maíz (A) al 2.5 % (p/p), adicionando fructanos de *Agave salmiana* (F) en diferentes concentraciones (0, 0.5, 1 y 1.5 % p/p), agitando durante 15 min a 20 ± 1 °C. Cada una de las dispersiones se colocaron en baño María a 90 ± 1 °C durante 20 min con agitación suave, para lograr la formación del gel. Al término del calentamiento (cuando el gel alcanzó una temperatura de 37 °C), se agregó el concentrado celular a los tratamientos respectivos y posteriormente se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas. Los tratamientos se codificaron como AF<sub>0</sub>, AF<sub>0.5</sub>, AF<sub>1</sub> y AF<sub>1.5</sub>, donde A: indica almidón al 2.5 % p/p, F: indica fructanos de *Agave salmiana* y los subíndices indican las concentraciones (0, 0.5, 1 y 1.5 % p/p) de fructanos de agave.

#### 4.2.3 Eficiencia de entrapamiento de *L. plantarum* Lp-115

Para determinar la eficiencia de entrapamiento (EE), un gramo de cada gel se resuspendió en tampón fosfato estéril (9 mL, 0.1 M, pH 7.2) y homogeneizó durante 2 h a 25 °C, con la finalidad de desestabilizar el gel y liberar las células atrapadas. El número de células viables en la dispersión se determinó por conteo en placa usando agar MRS e incubando a 37 ° C durante 48 h.

La EE se determinó utilizando la Ecuación (4) descrita por Poletto *et al.*, (2019).

$$EE = \frac{N}{N_0} \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

Donde: N es el número de células viables (log UFC g<sup>-1</sup>) liberadas de los geles y N<sub>0</sub> es el número de células viables (log UFC g<sup>-1</sup>) en el concentrado celular utilizado para el entrapamiento.

#### 4.2.4 Propiedades reológicas de los geles

Las propiedades reológicas de los geles se determinaron en un reómetro Physica MCR 301 (Dynamic Shear Rheometer, Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania), utilizando una geometría cono-plato (1°, 50 mm de diámetro). 1.5 g de gel se colocaron cuidadosamente en el plato a temperatura ambiente y dejaron reposar por 30 min para permitir la recuperación de la estructura. Las muestras fueron sometidas a barridos de amplitud (0.01-100 % de deformación, 1 Hz) para caracterizar la región viscoelástica lineal de los geles. Posteriormente, se sometieron a un barrido de tasa de corte (10<sup>-3</sup> a 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>) registrándose la viscosidad aparente de los geles (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014). La temperatura se mantuvo a 4 °C en todos los experimentos, mediante un sistema de medición y control de temperatura Physica TEK 150P.

#### 4.2.5 Morfología y tamaño de poro de los geles

Para estudiar la morfología de los geles con probióticos, las muestras fueron previamente liofilizadas. Los geles se colocaron en nitrógeno líquido por 10 minutos y se liofilizaron en un equipo FreeCZone 2.5 (Labconco Corporation, Kansas, E.U.A.) en condiciones de presión y temperatura de 0.015 bar y -50 °C,

respectivamente. Las muestras liofilizadas se colocaron en un portamuestras de aluminio con cinta de carbón de doble adhesivo y luego se recubrieron con oro en un Sputter Ion de capa fina, JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). La observación microestructural de los geles se realizó en un microscopio electrónico de barrido (MEB) (JEOL JSM6360LV), operado a 15 kV con un aumento de 1 800x (Zhang, Gu, Zhu y Hong, 2018).

Para determinar el tamaño de poro, se procesaron cinco micrografías con un aumento de 1 800x, de cada variación del gel con el software ImageJ (1.50I, imagej.nih.gov) (Leal-Egaña, Dietrich-Braumann, Díaz- Cuenca, Nowicki, y Bader, 2011).

#### **4.2.6 Viabilidad de *L. plantarum* Lp-115 entrampado después de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas**

Para determinar la viabilidad de *L. plantarum* Lp-115 se siguió la metodología propuesta por Dafe *et al.*, (2017). Por lo cual se colocaron por separado 1 g de cada variación de gel en tubos conteniendo 9 mL de solución de jugo gástrico simulado (pH 2.0, HCl 0.1 N). Las muestras se incubaron a 37 °C por 2 h en una incubadora (Riossa, México). Posteriormente, los geles fueron lavados con solución salina estéril y se depositaron respectivamente en 9 mL de una solución estéril de sales biliares (0.5 % p/p) a pH 6.5. Los geles se incubaron a 37 °C por 2 h. Al final del periodo de incubación, los geles se colocaron en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) y se cultivaron en agar MRS a 37 °C por 48 h.

#### **4.3 Análisis de datos**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), y en los casos pertinentes, a pruebas de comparación de medias de Tukey con una significancia de  $p \leq 0.05$ . Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

## 4.4 Resultados y discusión

### 4.4.1 Cinética de crecimiento de *L. plantarum* Lp-115

En la Figura 8 se ilustra la cinética de crecimiento del probiótico *L. plantarum* Lp-115, en la cual se aprecian las diferentes fases de crecimiento.

Las fases identificadas fueron: a) fase de adaptación o de latencia, con una duración de 0-4 h, en donde las bacterias comienzan a reiniciar su ciclo celular después de un periodo de ayuno nutricional, aquí las bacterias sintetizan ARN, enzimas y otras moléculas; (b) fase de crecimiento logarítmica o exponencial, que comprendió después de 4-12 h, es un tiempo que se caracteriza principalmente por la duplicación celular, en donde la formación del número de bacterias que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población actual; (c) fase estacionaria, la cual se presentó de 12-22 h, en ésta el crecimiento de las bacterias se mantiene constante como consecuencia de la disminución de nutrientes y la acumulación algunas sustancias que resultan ser tóxicas para las bacterias como los ácidos grasos de cadena corta: ácido láctico, acetato, propionato y butirato o bacteriocinas (Pankasemsuk, Apichartsrangkoon, Worametachanon y Techarang, 2016). Posteriormente se identificó d) la fase de muerte (22-30 h), la cual se caracteriza por una disminución de bacterias ya que las bacterias quedan sin nutrientes y por lo tanto mueren (Castro *et al.*, 2008).

Los datos de los recuentos de UFC de *L. plantarum* Lp-115 en placa con respecto al tiempo de incubación dio como resultado un ajuste adecuado de ( $R^2 = 0.9110$ ) al modelo logístico de crecimiento. Dicho modelo representa el crecimiento de una población microbiana cuando la densidad de la misma ejerce cierta presión sobre la tasa intrínseca de crecimiento, resultando así una curva en forma sigmoideal (Cervantes y Carrara, 2017). El modelo logístico está representado por la Ecuación (5):

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \dots \dots \dots (5)$$

Donde:  $y$ : población microbiana en un tiempo dado;  $A_1$ : asíntota mínima;  $A_2$ : asíntota máxima;  $\frac{x}{x_0}$ : punto de inflexión y  $p$ : pendiente.

Los valores obtenidos para los parámetros del modelo de logístico crecimiento para *L. plantarum* Lp-115 fueron:  $A_1$ : 7.439 es el inicio del crecimiento de las bacterias;  $A_2$ : 9.447 es la máxima población microbiana;  $\frac{x}{x_0}$ : 5.489 es el inicio de la fase de crecimiento logarítmico y  $p$ : 5.929 es la inclinación de la pendiente.

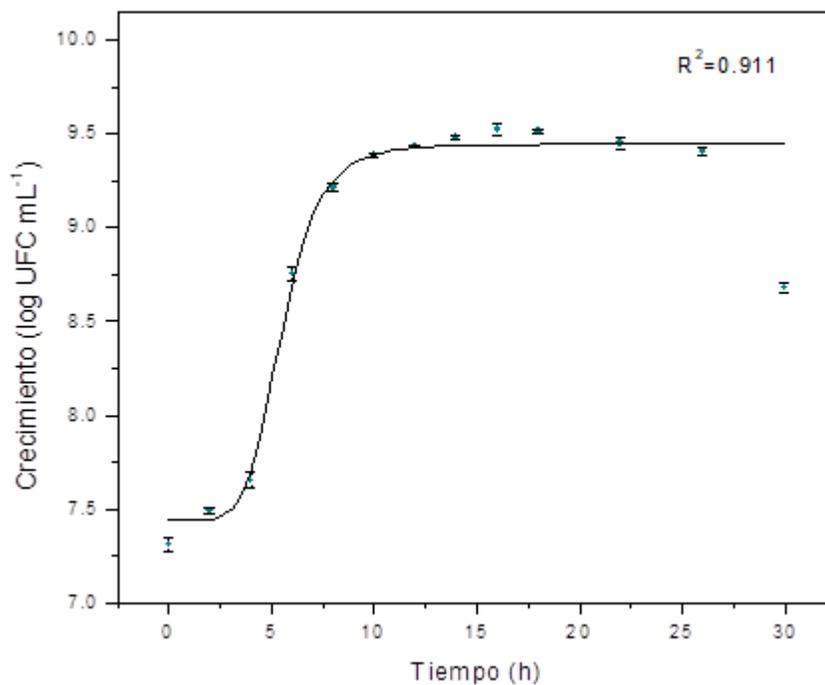


Figura 8. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* Lp-115, en caldo MRS a 37 °C.

Con los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento, se decidió cosechar a *L. plantarum* Lp-115 a las 10 h de incubación, tiempo que corresponde a la fase de crecimiento logarítmica tardía, en donde se obtuvo una elevada concentración de células ( $9.39 \pm 0.01$  log UFC mL<sup>-1</sup>) y así evitar la muerte de las células durante el proceso de entrapamiento (Sheu y Marshall, 1993).

#### 4.4.2 Eficiencia de entrapamiento de *L. plantarum* Lp-115

Los datos del porcentaje de eficiencia de entrapamiento (EE) son mostrados en el Cuadro 5. Se puede observar que la técnica de gelificación del almidón con o sin la adición de fructanos de *Agave salmiana* promovió una alta EE (%) de *L. plantarum* Lp-115 (83.07-96.71 %) con diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Las mejores EE se observaron en los tratamientos en los que se incorporó F en una concentración de 1 y 1.5 % (p/p) siendo de 96.50 y 96.71 % respectivamente, esto en comparación con el tratamiento control en el que únicamente se utilizó almidón que obtuvo la menor eficiencia (83.07 %).

Cuadro 5. Valores medios ( $\pm$  DE) de la eficiencia de entrapamiento de *L. plantarum* Lp-115 en geles de almidón y fructanos de *Agave salmiana*.

Tratamiento	EE (%)
AF <sub>0</sub>	83.07 $\pm$ 0.33 c <sup>z</sup>
AF <sub>0.5</sub>	88.99 $\pm$ 0.32 b
AF <sub>1</sub>	96.50 $\pm$ 0.31 a
A <sub>1.5</sub>	96.71 $\pm$ 0.42 a

<sup>z</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup> Geles de almidón (A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F): 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p).

La alta EE observada en los geles AF<sub>1</sub> y A<sub>1.5</sub> puede deberse a diversos factores, entre ellos, debido a que las bacterias fueron cosechadas en la etapa logarítmica tardía, por lo que su crecimiento continúa. Otro factor a considerar, se le atribuye al efecto prebiótico reconocido para los fructanos de agave, a mayor concentración, provocó un incremento en la eficiencia de entrapamiento de *L. plantarum* Lp-115, lo cual demuestra ser beneficioso al promover su crecimiento. Por otro lado, se le puede atribuir a la resistencia natural del microorganismo y las condiciones en las que se realizó el entrapamiento (37 °C), sin utilizar disolventes orgánicos (Souza *et al.*, 2012). La suma de todos estos factores provocó que la carga celular en los geles con fructanos fueran mayores en comparación con el gel AF<sub>0</sub>, que sólo contiene almidón.

Resultados similares fueron obtenidos por Poletto *et al.*, (2019) quienes entramparon *L. acidophilus* 16/LA110/05 B mediante la técnica de gelificación iónica externa en donde se utilizaron diferentes fuentes prebióticas: almidón de maíz resistente, salvado de arroz e inulina; el promedio de la EE varió de 76.17, 94.87 y 96.75 %, respectivamente.

Nunes *et al.*, (2018) produjeron micropartículas de goma arábica que contenían los prebióticos inulina, almidón resistente y trehalosa mediante la técnica de secado por pulverización e informaron que, entre las matrices de encapsulación estudiadas, el almidón resistente y la inulina produjeron la mejor viabilidad de *L. acidophilus*, dando las tasas de supervivencia más altas del 94.26 % y 93.12 %, respectivamente.

#### 4.4.3 Propiedades reológicas de los geles

##### Curvas de flujo

En la Figura 9 se ilustran los geles obtenidos a partir de almidón- fructanos de *Agave salmiana* entrampando a *L. plantarum* Lp-115, variándose la concentración de fructanos (0.5, 1 y 1.5 % p/p) y un control (0% p/p, sin fructanos). A dichos geles se les evaluaron sus propiedades reológicas con la finalidad de obtener información relevante sobre las características estructurales, la relación entre su composición química y propiedades viscoelásticas (Pang *et al.*, 2019).

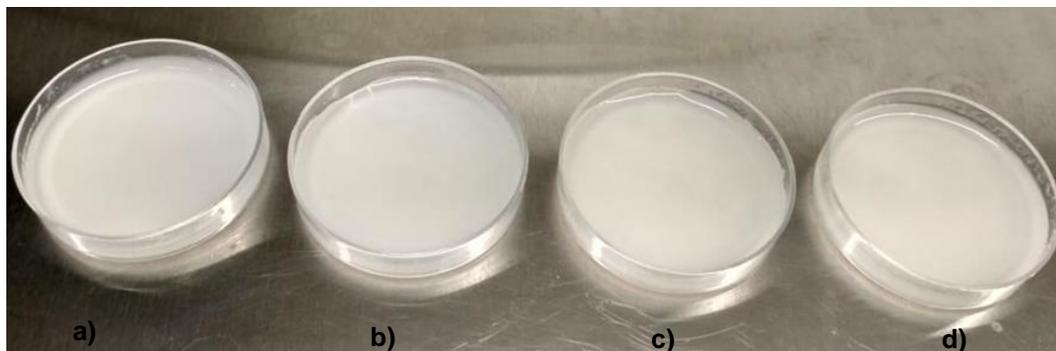


Figura 9. Geles de almidón-fructanos de *Agave salmiana* entrampando a *L. plantarum* Lp-115, utilizando diferentes concentraciones de fructanos: a) 0%, b) 0.5 %, c) 1 % y d) 1.5 % (p/p).

La Figura 10 muestra las variaciones de la viscosidad aparente como función de la tasa de corte para los distintos geles elaborados. Se observa un patrón similar para los cuatro geles, en el que se pueden distinguir: a) una región newtoniana, a bajas tasas de corte ( $0.001 - 0.01 \text{ s}^{-1}$ ), en donde la viscosidad aparente apenas cambia con el esfuerzo aplicado b) una región de adelgazamiento al corte a tasas de corte relativamente altas ( $0.01 - 1000 \text{ s}^{-1}$ ). En este régimen, como la velocidad de corte produce un patrón de flujo más fuerte, las partículas hinchadas se alinean a lo largo de la dirección del flujo; reduciendo de esta forma el arrastre experimentado por la microestructura (Carrillo-Navas *et al.*, 2014).

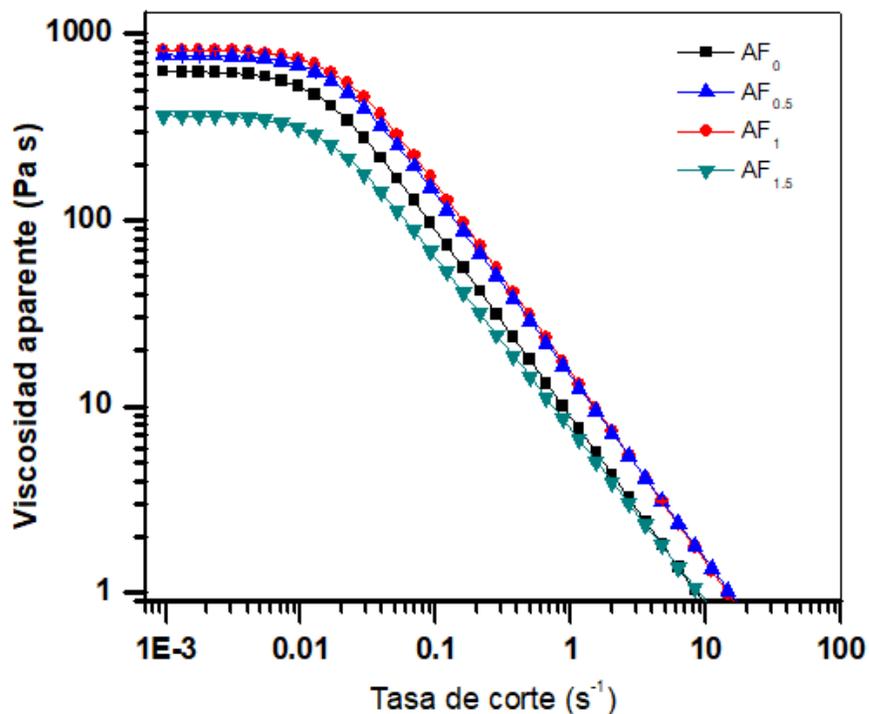


Figura 10. Curva de flujo de geles de almidón (A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F) :0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p).

En cuanto a la magnitud de la viscosidad, se puede observar que conforme aumentó la concentración de F de 0.5 a 1 % (p/p) la viscosidad aumentó, sin embargo, al adicionar hasta 1.5 % p/p la viscosidad disminuyó ligeramente. Carrillo-Navas *et al.*, (2014) menciona que la viscosidad aparente surge como una combinación de diversos factores, incluida la concentración y el peso

molecular medio de la amilosa lixiviada en la fase continua, el tamaño y la forma de los gránulos hinchados.

Las curvas de flujo de los geles analizados se ajustaron al modelo de Ellis, el cual representa un fluido que a baja velocidad de deformación sigue la ley de Newton de la viscosidad y alta velocidad de deformación obedece la ley de la potencia, dicho modelo se describe a partir de la Ecuación (6):

$$\eta = \frac{\eta_0}{(1+(\lambda\dot{\gamma})^2)^p} \dots\dots\dots(6)$$

Donde:

$\eta$ : viscosidad aparente

$\eta_0$ : viscosidad inicial o cero

$\lambda$ : tiempo de relajación

$\dot{\gamma}$ : tasa de corte

$p$ : índice de adelgazamiento al corte

Los valores de los parámetros reológicos del modelo de Ellis se resumen en el Cuadro 6. Los valores altos del coeficiente de determinación  $R^2$  (0.99) demuestran que el modelo seleccionado se ajusta bien a las curvas experimentales.

Cuadro 6. Valores medios ( $\pm$  DE) de los parámetros reológicos del modelo de Ellis.

Tratamiento	$\eta_0$ (Pa·s)	$\lambda$ (s)	$p$
AF <sub>0</sub>	643.44 $\pm$ 29.87 b <sup>z</sup>	76.08 $\pm$ 2.80 a	0.48 $\pm$ 0.00a
AF <sub>0.5</sub>	777.37 $\pm$ 7.52 a	68.79 $\pm$ 3.01 ab	0.49 $\pm$ 0.01a
AF <sub>1.0</sub>	822.92 $\pm$ 9.05 a	63.52 $\pm$ 3.38 ab	0.49 $\pm$ 0.01a
AF <sub>1.5</sub>	367.24 $\pm$ 13.19 c	56.06 $\pm$ 4.46 b	0.46 $\pm$ 0.01a

<sup>z</sup>Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup> Geles de almidón (A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F): 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p).

Se puede observar que  $\eta_0$  fue mayor al incorporar fructanos al 0.5 y 1.0 %, en comparación con el control, indicando con ello que la viscosidad se ve afectada por la adición de fructanos. Por otra parte, los tiempos de relajación ( $\lambda$ ) se relaciona con la ruptura y el tiempo de recuperación de los enlaces del sistema. Todos los geles con fructanos presentaron el valor de  $\lambda$  significativamente ( $p < 0.05$ ) más bajo, y el gel con almidón tuvo el valor de  $\lambda$  más alto. Al disminuir  $\lambda$ , el gel requiere menor tiempo y menor energía para que la estructura del gel se recupere (Cuevas- Bernardino *et al.*, 2018).

El parámetro  $p$  es un exponente adimensional que está relacionado con el índice de comportamiento de flujo y refleja qué tanto se acercan los geles a un comportamiento newtoniano. Si  $p = 1$  el sistema se comporta como fluido newtoniano,  $p < 1$  el fluido presenta un comportamiento de adelgazamiento al corte y  $p > 1$  el fluido presenta un comportamiento de espesamiento al corte (Rao, 2007). En este caso, todos los geles presentaron valores de  $p$  menores de 1; es decir, presentaron un comportamiento pseudoplástico de adelgazamiento al corte, el cual puede ser considerado como el resultado de modificaciones estructurales en la red macromolecular. Esto significa que al incrementar la tasa de corte se rompe un mayor número de enlaces e interacciones intermoleculares, con respecto a la formación de nuevos enlaces. El esfuerzo aplicado obliga a que las moléculas se alineen en dirección al flujo y la viscosidad aparente disminuye (Cuevas- Bernardino *et al.*, 2018).

### **Barridos de amplitud**

Las evaluaciones de pruebas oscilatorias se usan generalmente para explorar el comportamiento viscoelástico de geles de almidón, los cuales se reconocen como materiales viscoelásticos, por lo tanto, las mediciones dinámicas son métodos adecuados para evaluar las propiedades reológicas de los geles (Irani *et al.*, 2019).

En la Figura 11 y 12, se muestra el comportamiento de los módulos de almacenamiento y de pérdida de los diferentes geles. El módulo de almacenamiento ( $G'$ ), es una medida de la energía almacenada en el gel y recuperada de ella por ciclo de deformación por corte sinusoidal (Karim *et al.*, 2000). Los barridos de deformación mostraron que la adición de F en diferentes concentraciones afectó la respuesta viscoelástica de los geles de almidón y *L. plantarum* Lp-115.

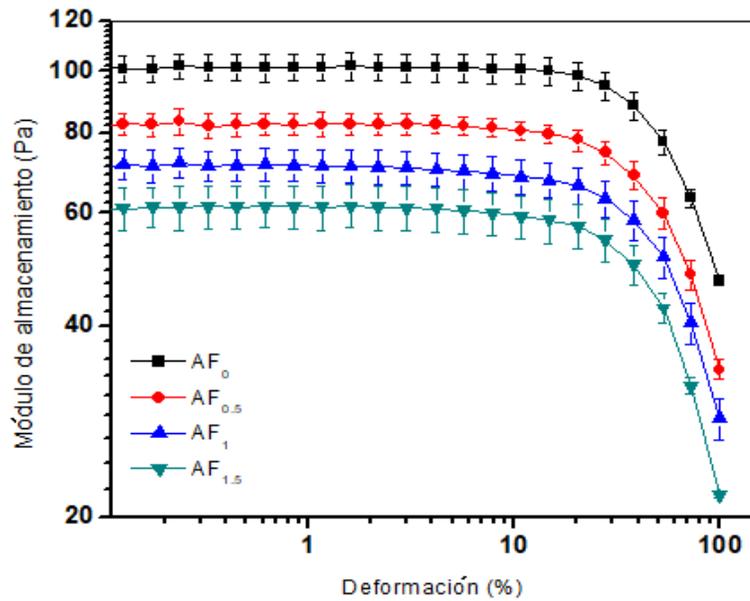


Figura 11. Variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) como función del % de deformación de geles de almidón(A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F): 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p).

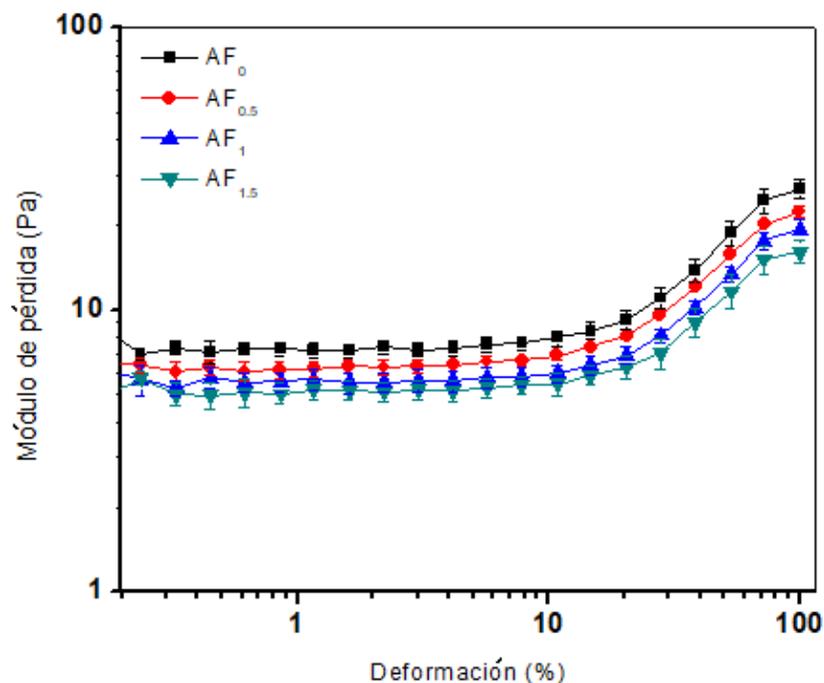


Figura 12. Variación del módulo de pérdida ( $G''$ ) como función del % de deformación de gels de almidón (A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F): 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p).

En el Cuadro 7, se observa que el módulo de almacenamiento (valores de  $G'$ ) de los diferentes gels, en la zona viscoelástica lineal, se afectó en el siguiente orden:  $AF_{1.5} < AF_1 < AF_{0.5} < AF_0$ .

Cuadro 7. Parámetros reológicos del barrido de amplitud, determinados en la zona viscoelástica lineal de los gels.

Tratamiento	$G'$	$G''$
AF <sub>0</sub>	101.59 ± 0.96 a <sup>z</sup>	7.25 ± 0.55 a
AF <sub>0.5</sub>	82.41 ± 0.72 b	6.14 ± 0.33 b
AF <sub>1</sub>	71.30 ± 0.50 c	5.57 ± 0.88 bc
AF <sub>1.5</sub>	61.52 ± 0.55 d	5.26 ± 0.34 c

<sup>z</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

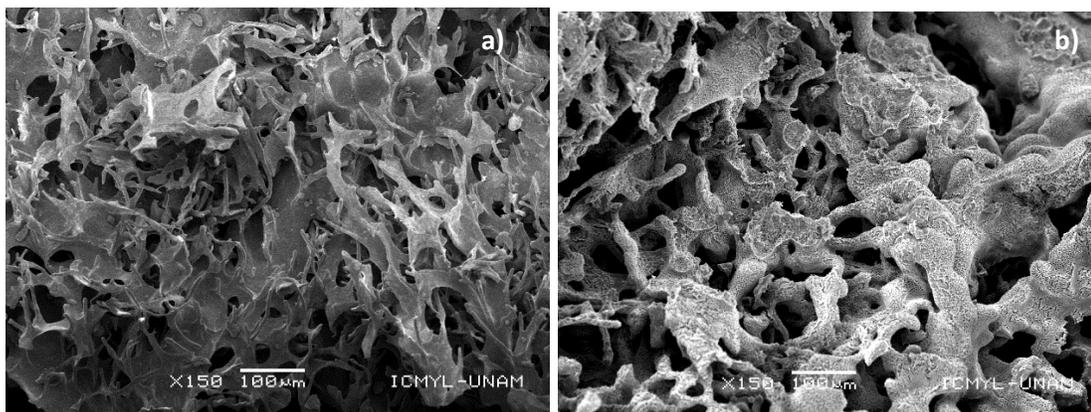
<sup>y</sup> Gels de (A) almidón con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de (F) fructanos de *Agave salmiana*: 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p).

Las variaciones de geles mostraron tendencias similares, pudiendo identificarse tres regiones de comportamiento: Región I, a deformaciones de 0.018 hasta alrededor de 3.01 %, en la que los valores de ambos módulos permanecieron prácticamente constantes, por lo que fue identificada como región viscoelástica lineal (RVL); b) Región II, a deformaciones mayores de 3.01 % hasta aproximadamente 20.4 %, en la que los valores de ambos módulos disminuyeron de forma no lineal y c) Región III, a valores de deformación mayores de 10.8 % en la que los valores de  $G'$  y  $G''$  sufrieron disminución pronunciada. Es en esta última región donde ocurre una ruptura y restructuración de enlaces a diferentes velocidades, dependiendo de la estructura de los geles.

Los valores del módulo de pérdida ( $G''$ ) (Figura 12) exhibidos por los diferentes geles en la RVL fueron inferiores a los mostrados por el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), y varió en el siguiente orden:  $AF_{1.5} < AF_1 < AF_{0.5} < AF_0$ . A un porcentaje de deformación determinado en la RVL, el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) fue significativamente mayor que el módulo de pérdida ( $G''$ ) en el rango de amplitud medido y no se produjo un cruce, por lo que todas las muestras se comportan como un gel débil y la deformación será elástica y recuperable (Irani *et al.*, 2019).

#### 4.4.4 Microestructura y tamaño de poro de los geles

Las características microestructurales de los geles de almidón con *L. plantarum* Lp-115 y su respectiva variación en la concentración de F, se muestran en las micrografías de las Figuras 13 y 14.



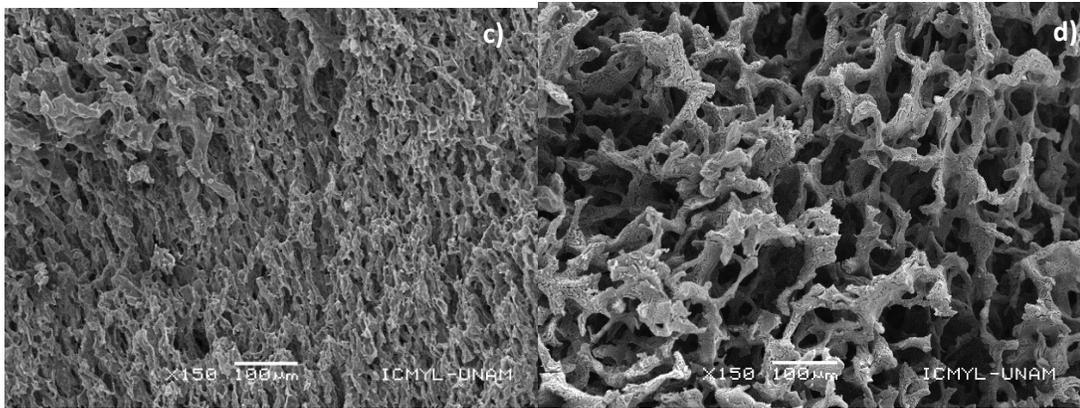


Figura 13. Micrografías MEB de geles de (A) almidón con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de (F) fructanos de *Agave salmiana*; a) 0 %, b) 0.5 %, c) 1 % y d) 1.5 % (p/p). Magnificación 150 x, barra de escala 100 µm.

En general, los diferentes geles presentaron una red tridimensional de polisacáridos con morfología porosa. En la Figura 13 a), el gel control AF<sub>0</sub>, mostró una red tridimensional parecida a un panal, esta característica microestructural es responsable de la elasticidad y la capacidad de retención de agua de los geles de almidón la cual se forma debido a la hinchazón de los gránulos y la lixiviación de las cadenas de almidón durante el tratamiento térmico (Hedayati y Niakousari, 2018). En la Figura 13c), se observa que el AF<sub>1.0</sub> promovió una disminución en el tamaño de poro, una red más estructurada, uniforme y regular en comparación con los geles AF<sub>0.5</sub> (Figura 13b) y AF<sub>1.5</sub> (Figura 13d), siendo este último el que presentó una red más abierta y menos estructurada, con espacios intersticiales más amplios.

Estos resultados se pueden corroborar con el Cuadro 8 encontrándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el tamaño de poro en los diferentes geles.

Cuadro 8. Valores medios ( $\pm$  DE) del tamaño de poro de cada variación del gel.

Tratamiento	Tamaño de poro (µm)
AF <sub>0</sub> <sup>y</sup>	21 $\pm$ 0.12 b <sup>z</sup>
AF <sub>0.5</sub>	23 $\pm$ 0.11 b
AF <sub>1.0</sub>	13 $\pm$ 0.05 c
AF <sub>1.5</sub>	38 $\pm$ 0.12 a

<sup>z</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup> Geles de almidón (A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F): 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p).

El gel AF<sub>1.5</sub> fue el que presentó mayor tamaño de poro ( $38 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ), indicando que, posiblemente, el exceso de F pudo haber promovido la competencia entre los biopolímeros, aumentando la separación de microfase, que se acentuó con el tiempo de gelación, dando como resultado una estructura con propiedades menos cohesivas. Silva y Sato (2017), encontraron un efecto similar al aumentar la concentración de FOS durante la elaboración de geles de alginato-gelatina.

Mientras que el gel AF<sub>1</sub> promovió el menor tamaño de poro, siendo este valor de  $13 \pm 0.05 \mu\text{m}$ . Esta red interconectada pudo haberse formado a través de puentes de hidrógeno entre la asociación de A-F, lo que indica que posiblemente F actúa sobre la red del gel de almidón, llenando los espacios intersticiales, reduciendo los efectos de la separación de fases y formando una red más interconectada, con una reducción significativa de poros, en comparación de los geles AF<sub>0</sub> y AF<sub>0.5</sub>. La porosidad de la matriz de entrapamiento es un factor importante, ya que a una matriz menos porosa puede conferir una mayor protección a las bacterias cuando son sometidas a ambientes adversos, como lo son las condiciones gastrointestinales (Martin *et al.*, 2013).

Debido a que los geles fueron liofilizados para la observación en MEB, se eliminó el agua, originando espacios intersticiales obteniéndose matrices muy frágiles para manipular, por lo que en la (Figura 14a) es posible observar algunos vestigios de *L. plantarum* Lp-115 sobre la superficie de la red de almidón. Las micrografías representadas en la Figura 14b, c y d) demuestran el entrapamiento de *L. plantarum* Lp-115, lo que indica que la formación de los geles se llevó a cabo bajo condiciones adecuadas.

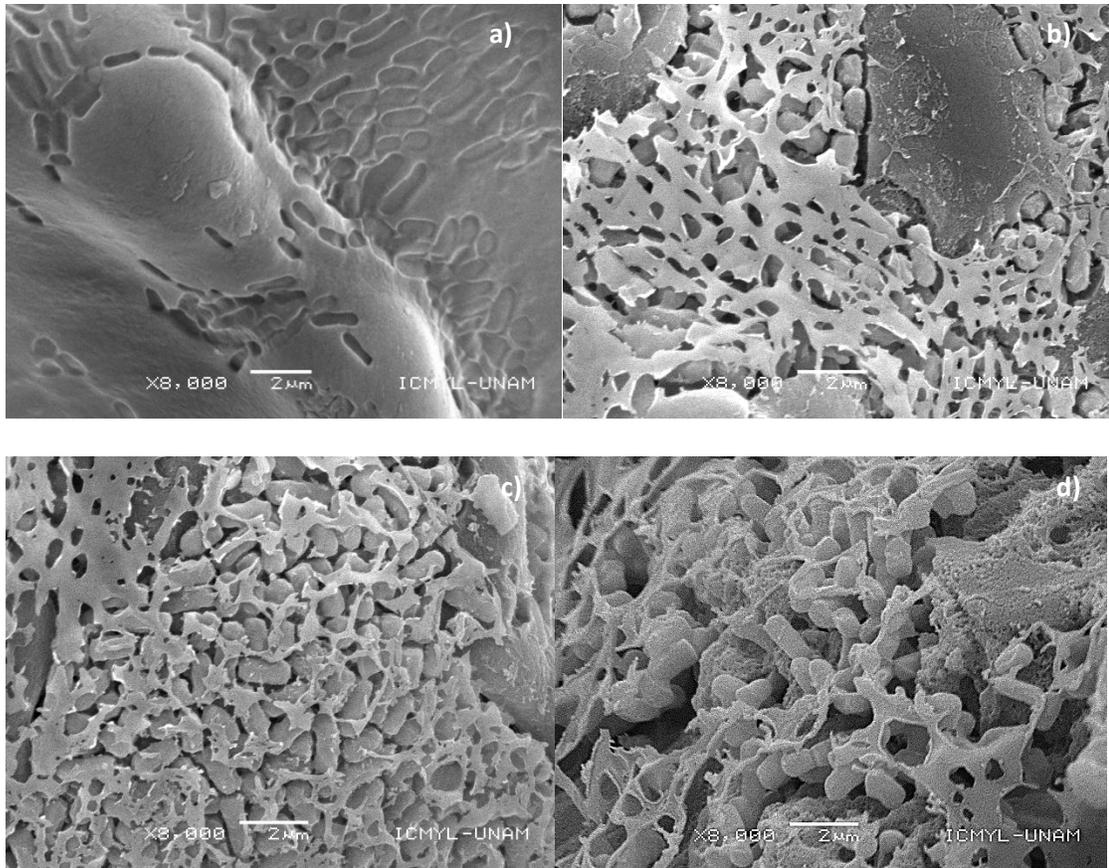


Figura 14. Micrografías MEB de geles de almidón (A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F); a) 0 %, b) 0.5 %, c) 1 % y d) 1.5 % (p/p). Magnificación 8000 x, barra de escala 2  $\mu$ m.

Además, se puede ver que en los geles AF<sub>0.5</sub>, AF<sub>1.0</sub> y AF<sub>1.5</sub> las bacterias se encuentran adheridas a la superficie del almidón y están cubiertas por una capa delgada de material polimérico compuesto por una red de F (Figura 14b, c y d). Estas imágenes muestran que la presencia de la bacteria durante la gelación parece causar cambios locales en el gel con la aparición del fenómeno de "espacio vacío" también observado en los productos lácteos fermentados. Este fenómeno consiste en la formación de cavidades en la matriz debido a la presencia de bacterias en estos espacios (Martin *et al.*, 2013).

Los datos del tamaño de poro están en estrecha concordancia con los parámetros reológicos, específicamente con la viscosidad, ya que el tratamiento AF<sub>1.0</sub> mostró el menor tamaño de poro y mayor viscosidad.

#### 4.4.5 Viabilidad en condiciones gástricas simuladas de los probióticos entrampados en geles

El Cuadro 9 muestra que los recuentos iniciales para las células de *L. plantarum* Lp-115 libres y entrampadas no fueron significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Cuadro 9. Viabilidad de células de *Lactobacillus plantarum* Lp-115 libres y entrampadas en los diferentes geles de almidón y fructanos de *Agave salmiana*, después de su exposición a condiciones gastrointestinales.

Tratamiento	Células iniciales (log UFC g <sup>-1</sup> )	Células después de exposición a jugo gástrico simulado (log UFC g <sup>-1</sup> )	Células después de exposición a jugo gástrico simulado y sales biliares (log UFC g <sup>-1</sup> )
Células libres	9.63 ± 0.11 a <sup>z</sup>	8.06 ± 0.28 c	5.77 ± 0.32 c
AF <sub>0</sub> <sup>y</sup>	9.64 ± 0.08 a	8.50 ± 0.16 bc	6.14 ± 0.16 bc
AF <sub>0.5</sub>	9.63 ± 0.10 a	9.07 ± 0.16 a	6.22 ± 0.12 b
AF <sub>1.0</sub>	9.62 ± 0.13 a	9.26 ± 0.18 a	6.81 ± 0.85 a
AF <sub>1.5</sub>	9.63 ± 0.09 a	8.66 ± 0.14 b	6.39 ± 0.12 b

<sup>z</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup> Geles de almidón (A) con *L. plantarum* Lp-115 a diferentes concentraciones de fructanos de *Agave salmiana* (F): 0, 0.5, 1 y 1.5 % (p/p).

La viabilidad de las células entrampadas después de la exposición secuencial a condiciones ácidas y sales biliares, decreció significativamente en todos los casos. Sin embargo, la composición de la matriz de entrampamiento proporcionó diferentes grados de protección a las células de *L. plantarum* Lp-115 resultando en valores de viabilidad significativamente diferentes (Cuadro 9). La viabilidad de las células de *L. plantarum* Lp-115 entrampadas fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) que para las células libres cuando se expusieron a condiciones simuladas de jugo gástrico. El número de células libres viables respecto a la cuenta inicial, después de ser expuestas a bajo pH, disminuyendo 1.57 ciclos logarítmicos (de

9.63 log UFC g<sup>-1</sup> a 8.06 log UFC g<sup>-1</sup>), y decreció 3.86 ciclos logarítmicos después de la exposición subsecuente de las células a sales biliares (5.77 log UFC g<sup>-1</sup>). La viabilidad de las células atrapadas después de su exposición a bajo pH fue significativamente mayor que aquella de las células libres, sufriendo disminuciones en los recuentos celulares que oscilaron entre 0.36 y 1.14 ciclos logarítmicos, dependiendo de la matriz del gel en el que fueron atrapadas.

Los resultados indicaron que las matrices constituidas por almidón y fructanos, permitieron obtener mejor protección contra las sales biliares a *L. plantarum* Lp-115, que en la matriz que solo se utilizó almidón. Diversos estudios han demostrado la eficacia y protección de probióticos durante la exposición a condiciones gastrointestinales al utilizar prebióticos. Etchepare *et al.*, (2016) produjeron microcápsulas para atrapar *Lactobacillus acidophilus* en matrices de alginato y alginato-almidón de maíz resistente, esta última proporcionó los mejores recuentos celulares de 6.87 log UFC g<sup>-1</sup> cuando se expusieron a condiciones gastrointestinales en comparación con solo alginato (6.11 log UFC g<sup>-1</sup>). Por su parte, Silva *et al.*, (2017) encapsularon *L. acidophilus* en alginato-gelatina y alginato-gelatina-fructooligosacáridos, encontraron que la adición de fructooligosacáridos promovió la formación de una red más interconectada, lo que contribuyó a una mejor protección de las células en condiciones gastrointestinales. Del mismo modo, Nunes *et al.*, (2018) produjeron micropartículas de *L. acidophilus* La-5 que contenían inulina, almidón resistente de maíz y trehalosa por secado por aspersión y observaron que las micropartículas con almidón de maíz resistente y trehalosa permitieron mayor protección del probiótico en comparación con las células libres.

Los geles con un contenido de 1.0 % de F pueden proporcionar una mejor protección a las células de *L. plantarum*, debido a que un mayor número de sitios de unión estuvieron disponibles. Las explicaciones anteriores concuerdan con los datos reológicos, ya que se pudo observar que la viscosidad afecta el tamaño de poro provocando su disminución, lo cual se corrobora con las micrografías.

También se pudo observar que el tratamiento AF<sub>1.0</sub>, fue el que confirió mayor protección en condiciones gastrointestinales simuladas.

#### **4.5 Conclusiones**

Se entrampó *Lactobacillus plantarum* Lp-115 utilizando almidón y fructanos de *Agave salmiana*, se observó que la mayor eficiencia de entrampamiento se obtuvo al incorporar 1 y 1.5 % p/p de fructanos, siendo de 96.50 y 96.71 % respectivamente, en comparación del gel que se empleó únicamente almidón cuya eficiencia fue de 83.07 %.

Las propiedades reológicas se vieron afectadas por el tipo y la concentración de biopolímero en los geles empleados para el entrampamiento, encontrándose que la adición de fructanos en una concentración del 1.0 % (p/p) presentó la mayor viscosidad aparente. En todos los casos, las muestras se comportaron como un gel débil.

La microestructura interna de todos los geles mostró una red tridimensional parecida a un panal, pudiendo observarse la presencia de células de *L. plantarum* Lp-115.

Se demostró que la incorporación de fructanos de *Agave salmiana* en los geles de almidón pueden reducir la porosidad en el gel y mejorar la protección de los probióticos contra condiciones gastrointestinales simuladas. Siendo el mejor tratamiento el gel con un contenido de 1% de fructanos, debido a que presentó mayor EE, mayor viscosidad, además provocó mayor disminución del tamaño de poro en los geles, indicando con ello mayor integridad microestructural y en consecuencia la mejor protección celular en condiciones gastrointestinales.

#### 4.6 Literatura citada

- Carrillo-Navas, H., Hernández-Jaimes, C., Utrilla-Coello, R. G., Meraz, M., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2014). Viscoelastic relaxation spectra of some native starch gels. *Food Hydrocolloids*, 37, 25–33.
- Castro, G., Valvuenza, E., Sanchez, E., Briñez, W., Vera, H. y Leal M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Revista científica*, septiembre-octubre, año/vol. XVII, número 005, Maracaibo, Venezuela, pp. 582-588.
- Cuevas-Bernardino, J. C., Pérez-Alonso, C., Nieto-Ángel, R., & Aguirre-andujano, E. (2019). Microencapsulation of grape seed oil by spray drying using whey protein and hawthorn pectin. *Microencapsulación de aceite de semilla de uva mediante secado por aspersión utilizando proteína de suero lácteo y pectina de tejocote*. 11,127–145. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2019.01.005>
- Cervantes S, A., & Carrara, X. C. (2017). Introducción a los modelos matemáticos de crecimiento con aplicaciones en sistemas biológicos. *Introduccion a Los Modelos y Aplicaciones Microbianas*, 158. Retrieved from [http://www.sisal.unam.mx/labeco/LAB\\_ECOLOGIA/Produccion\\_academica\\_de\\_Xavier\\_files/PAPIME\\_Manual\\_Modelos.pdf](http://www.sisal.unam.mx/labeco/LAB_ECOLOGIA/Produccion_academica_de_Xavier_files/PAPIME_Manual_Modelos.pdf)
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260.
- Dafe, A., Etemadi, H., Dilmaghani, A., & Mahdavinia, G. R. (2017). Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.060>
- Etchepare, de Araújo M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, É. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S., ... de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 511–517. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.08.039>
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), (2002). Health and nutritional properties of Probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live lactic acid bacteria, Córdoba, Argentina. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
- Hedayati, S., & Niakousari, M. (2018). Microstructure, pasting and textural properties of wheat starch-corn starch citrate composites. *Food Hydrocolloids*, 81, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.024>

- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19, 77-84.
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Ramírez-Santiago, C., Rodríguez-Huezo, M. E., & Meraz, M. (2017). Microstructure and rheology of yogurt added with protein-L. plantarum-polysaccharide coacervate and stevia in substitution of milk-Fat and sucrose. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(1), 77-89.
- Irani, M., Razavi, S. M. A., Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P., & Patterson, C. A. (2019). Viscoelastic and textural properties of canary seed starch gels in comparison with wheat starch gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 270–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.216>
- Le, B., & Yang, S. H. (2018). Efficacy of *Lactobacillus plantarum* in prevention of inflammatory bowel disease. *Toxicology Reports*, 5, 314–317.
- Leal-Egaña, A., Dietrich-Braumann, U., Díaz-Cuenca, A., Nowicki, M., & Bader, A. (2011). Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 24 (1-7). DOI: 10.1186/1477-3155-9-24
- López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., & Lagaron, J. M. (2012). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living *Bifidobacteria* in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 28, 159–167.
- Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.019>
- Martinez-Gutierrez, F., Ratering, S., Juárez-Flores, B., Godinez-Hernandez, C., Geissler-Plaum, R., Prell, F., Zorn, H., Czermak, P., Schnell, S. (2017). Potential use of *Agave salmiana* as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. *LWT Food Science Technology* 84, 151–159.
- Nunes, G. L., Etchepare, M. de A., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Jacob Lopes, E., Barin, J. S., ... de Menezes, C. R. (2018). Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>
- Pang, Z., Xu, R., Luo, T., Che, X., Bansal, N., & Liu, X. (2019). Physicochemical properties of modified starch under yogurt manufacturing conditions and its relation to the properties of yogurt. *Journal of Food Engineering*, 245(April 2018), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.003>
- Pankasemsuk, T., Apichartsrangkoon, A., Worametrachanon, S., & Techarang, J. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* 01 by alginate along with hi-

- maize starch for exposure to a simulated gut model. *Food Bioscience*, 16, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.001>
- Poletto, G., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Barin, J. S., ... de Menezes, C. R. (2019). Study of viability and storage stability of *Lactobacillus acidophilus* when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. *Food Hydrocolloids*, 95, 238–244.
- Rao, M. A. (1999). *Rheology of fluid and semisolid foods*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., ... & Guarner, F. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), S1-S63.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Estrada-Fernández, A. G., García-Almendárez, B. E., Ludeña-Urquizo, F., Campos-Montiel, R. G., & Pimentel-González, D. J. (2014). Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 768–773. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.004>
- Sandoval-Castilla, O. (2010). *Empaques bioactivos de liberación específica en el colon y su aplicación en productos lácteos fermentados*. (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.). Consultada en <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=14858&docs=UAMI14858.pdf>
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T. (1993). Microencapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557-561.
- Silva, K. C. G., & Sato, A. C. K. (2017). Biopolymer gels containing fructooligosaccharides. *Food Research International*, 101, 88–95. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.08.042>
- Souza, C. H. B., Buriti, F. C. A., Behrens, J. H. and Saad, S. M. I. (2007). Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 43 (5), 871-877.
- Ye, J., Yang, R., Liu, C., Luo, S., Chen, J., Hu, X., & Wu, J. (2018). Improvement in freeze-thaw stability of rice starch gel by inulin and its mechanism. *Food Chemistry*, 268, 324–333. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.086>
- Zhang, Y., Gu, Z., Zhu, L., & Hong, Y. (2018). Comparative study on the interaction between native corn starch and different hydrocolloids during gelatinization. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05>