

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA DESCRIBIR EL CRECIMIENTO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS MICROENCAPSULADO EN UN SISTEMA BINARIO COMPUESTO POR GOMA GELANA

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A MATHEMATICAL MODEL TO DESCRIBE THE GROWTH OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS MICROENCAPSULATED IN A BINARY SYSTEM BASED ON GELLAN GUM

González C. Rafael E., Pérez M. Jaime., Tarón D. Arnulfo.

*Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería. Piedra de Bolívar - Av Del Consulado, Calle 30 N°
48-157., Cartagena D.T y C. Colombia*

Recibido 21 de Octubre 2015; aceptado 30 de Marzo de 2016

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar un modelo matemático que predice el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* micro encapsulado en un sistema gelificante binario compuesto por goma gelana de alto y bajo acilo. Las velocidades de crecimiento de *L. acidophilus* fue extraída de datos experimentales llevado a cabo en el grupo de investigación en Biotecnología, Alimentos y Educación (GIBAE) perteneciente a la Universidad de Cartagena – Colombia. Los datos extraídos del crecimiento fueron usados para desarrollar un modelo relacionando la velocidad de crecimiento de *L. acidophilus* micro encapsulado. La ecuación de Ratkowsky fue utilizada para modelar los datos. Finalmente la exactitud de los factores propuesto por Baranyi y col, (1999) fue usado para analizar el desarrollo del modelo. Los datos

experimentales para el crecimiento de *L. acidophilus* mostraron una discrepancia con las predicciones cercanas al 7.2 % y un bias de 5.2 %. El modelo desarrollado puede ser utilizado para determinar el efecto de las concentraciones iniciales de la bacteria y la temperatura en los procesos de optimización durante la elaboración de alimentos funcionales.

*Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. Correo electrónico: rgonzalezc1@unicartagena.edu.co

Palabras clave: Factor de exactitud, Factor de sesgo, Microencapsulación

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and validate the mathematical model that predicts the growth of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated in a acyl binary system based on high and low acyl gellan gum. Growth rates of *L. acidophilus* were extracted from experimental data carried out at the Research Group on Biotechnology, Food and Education (GIBAE) belonging to the University of Cartagena - Colombia. Data extracted from the growth were used for development model relating the growth rate of microencapsulated *L. acidophilus*. The Ratkowsky equation was used to model the data. Finally the accuracy of the factors proposed by Baranyi et al, (1999) was used to analyze the development of the model. Experimental data for the growth of *L. acidophilus* showed a discrepancy with then predictions close to 7.2% and 5.2% for the bias. The developed model can be used to determine the effect of initial concentrations of bacteria and temperature optimization processes during the development of functional foods.

Keywords: Bias factor; Accuracy factor, Microencapsulation.

INTRODUCCIÓN

La microencapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas son retenidas dentro de una matriz o sistema pared con el propósito de protegerlos frente a condiciones ambientales deletéreas (Shoji y col, 2013) impedir su pérdida y liberarlos gradualmente bajo condiciones controladas (Kailasapathy y Masondole, 2005; Anal y col, 2006). Una microcápsula consiste de una membrana fuerte, delgada, semipermeable y esférica que rodea un núcleo sólido o líquido con un diámetro que varía de unas micras a 1 mm (Goncalves y col, 1992).

En un sentido amplio la encapsulación puede ser utilizada para múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, incluyendo la estabilización del material a encapsular, el control de las reacciones de oxidación, adicionar sabores, colores y olores, aumentando la vida útil protegiendo algunos componentes de importancia nutricional (González, 2011) de reacciones con otros compuestos presentes en el alimento, o para impedir que se presenten reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno.

La microencapsulación ha sido ampliamente utilizada en la protección de bacterias probióticas del *Lactobacillus sp* (González y col, 2014) y *Lactococcus sp* (González y col,

2013). Los lactobacilos son bacterias probióticas que al situarse en el tracto gastrointestinal pueden ejercer efectos benéficos en la salud del huésped. Algunos de estos efectos incluyen: control del colesterol, regulación de infecciones intestinales, mejora del sistema inmunológico, utilización de lactosa y disminución de la actividad anticancerígena (Zhu y col, 2011, Tripathi y Giri, 2014). Por lo cual, resulta atractivo evaluar la respuesta del crecimiento de bacterias probióticas cuando son sometidas a un proceso de microencapsulación resultaría interesante.

En microbiología predictiva, las respuestas microbianas son medidas bajo condiciones definidas y controladas; posteriormente los resultados se resumen en forma de ecuaciones matemáticas, que por interpolación pueden predecir las respuestas frente a nuevas condiciones intrínsecas y extrínsecas (Ross y McMeekin, 1994).

Las investigaciones sobre microbiología predictiva se han enfocado principalmente en el crecimiento de microorganismos patógenos (Castillejo-Rodríguez y col, 2002; Mellefont y col, 2003; Domínguez y Schaffner, 2007) dejando de lado la importancia de estudiar el crecimiento de bacterias benéficas lo cual conllevaría a un

mayor aprovechamiento de estas bacterias en el diseño de nuevos productos alimenticios. Hasta el momento no se han llevado a cabo estudios que permitan inferior como el la multiplicación de las bacterias benéficas dentro de matrices microencapsulantes.

Por lo mencionado anteriormente un modelo que permita predecir el comportamiento de bacterias benéficas microencapsuladas resulta ser de gran utilidad a su aplicación industrial en el desarrollo de alimentos funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo del modelo

Los estudios de donde fueron extraídos los parámetros de crecimiento, corresponden a investigaciones no publicadas propias del grupo de investigación en Biotecnología, Alimentos y Educación (GIBAE) de la Universidad de Cartagena (Colombia). Los parámetros de crecimiento fueron tomados directamente de las curvas de crecimiento (por superposición de línea de regresión sobre la fase exponencial de crecimiento, calculando los valores de tiempo de generación (velocidad de crecimiento = $\text{Log}(2) \times \text{tiempo de generación}$ o de la velocidad de crecimiento específica (velocidad de crecimiento = $\log(2) / \ln(2) \times \text{velocidad de crecimiento específica}$). Donde era necesario aplicar un factor de corrección de $\ln(2)/\log(2)$ para reportar los tiempos de generación antes de ser convertidos a valores de velocidad de crecimiento.

Los datos fueron modelados usándola ecuación de Ratkowsky (Ratkowsky y col, 1982) relacionando la raíz cuadrada de la velocidad de crecimiento bacteriana (GR) (por sus siglas en inglés) y la temperatura de almacenamiento (T):

$$\sqrt{\text{Velocidad de crecimiento}} = b * (T - T_0)$$

(Ecu: 1)

Esta ecuación ha mostrado ser adecuada para el crecimiento bacteriano entre temperaturas mínimas y óptimas de crecimiento (Pooni y Mead, 1984); por consiguiente, solo velocidades de crecimiento para temperaturas entre 5 y 25°C fueron modeladas.

Validación del modelo

Para la micro encapsulación se siguió la metodología propuesta por González y col, (2014). Las mediciones de las velocidades de crecimiento de *L. acidophilus* para la validación de los datos fueron almacenadas

en el laboratorio de microbiología de alimentos de la Universidad de Cartagena. Las bacterias microencapsuladas fueron almacenadas en tubos de vidrio a diferentes temperaturas. Posteriormente, las muestras fueron analizadas para cada punto de tiempo utilizando microbiología tradicional realizando siembras en superficie utilizando agar MRS (Merck) incubando las cajas de Petri a 37°C durante 48 h.

Las curvas de crecimiento fueron obtenidas para temperaturas 5, 10, 15, 20 y 25 °C. El programa de computo DMFit (Institute of Food Research, Norwich, UK) fue usado

para modelar el crecimiento bacteriano de las observaciones experimentales ajustando los datos al modelo de Baranyi y col, (1993).

Evaluación del modelo

Para la evaluación del modelo se determinaron los valores de factor de exactitud (Af) y factor de sesgo (Bf) propuestos por Baranyi y col, (1999) con el fin de analizar el desarrollo del modelo. El factor de sesgo mide la desviación relativa de los valores predichos y observados, y el factor de exactitud es una medida de que tan cerca están las predicciones de las observaciones.

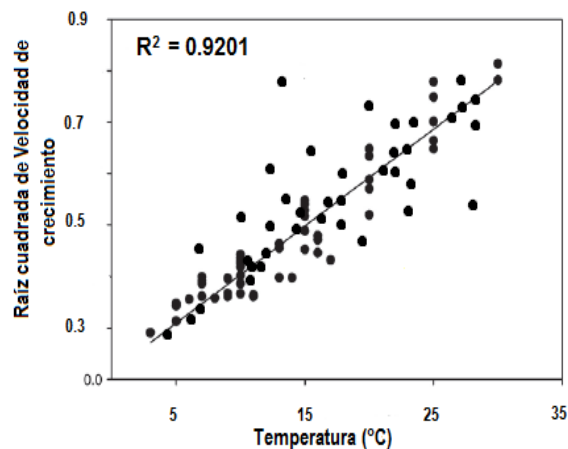
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo del modelo

El factor de corrección Ln2/Log2 fue aplicado a los datos obtenidos; ya que se observaron desviaciones sistemáticas en los datos obtenidos, similares resultados fueron reportados por Baranyi (comunicación personal), en la creación de ComBase (<http://www.combase.cc>) donde un gran número de observaciones fueron extraídas y comparadas de la literatura (Domínguez y Schaffner, 2007). La ecuación de Ratkowsky fue utilizada para modelar los datos entre 5 –

25°C (Fig. 1), las velocidades de crecimiento de las bacterias microencapsuladas entre 5 y 25 °C fueron seleccionadas para desarrollar el modelo. Las velocidades de crecimiento superiores a 25 °C fueron excluidas, ya que el modelo no está diseñado para velocidades de crecimiento a temperaturas superiores a la óptima. El ajuste de los datos a la ecuación de Ratkowsky (Eq. (1)) resultó en una línea recta relacionando la raíz cuadrada de la velocidad de crecimiento y la temperatura (Fig. 1). Los errores estándar para el intercepto y la variable X fueron 0.0245 y 0.0042 respectivamente. Como se puede apreciar en la figura 1 existe una buena

correlación entre el modelo y las observaciones usadas para generarlo ($R^2=$



0.92).

Figura 1. Ecuación de Ratkowsky relacionando las velocidades de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*

Validación del modelo

Las velocidades de crecimiento de *L. acidophilus* microencapsulado almacenadas en el laboratorio en tubos de ensayo a temperaturas entre 5 y 25 °C se presentan en la tabla 1. Comparando los datos experimentales (datos no mostrados) el modelo tiende a predecir las velocidades de crecimiento más rápidamente.

Evaluación del modelo

El factor de sesgo (Bf) y el factor de exactitud (Af) propuestos por Baranyi y col, (1999) fueron utilizados para evaluar el desarrollo del modelo. El factor de exactitud dice que

tan cerca están las predicciones de las observaciones y el factor de sesgo indica si el modelo en promedio sobre o subpredice los valores (Ross, 1996).

Tabla 1. Velocidades de crecimiento de *L. acidophilus* micro encapsulado almacenado a varias temperaturas

Temperatura	Velocidades de crecimiento	
	predicción	experimentales
5	0.0214	0.0234 0.0345
10	0.0943	0.0721 0.5432
15	0.1754	0.1230 0.2159
20	0.2341	0.2087 0.1789
25	0.3454	0.4507 0.4564

Los Bf y Af expresados como porcentajes de discrepancia y bias (Tabla 2), muestran que con respecto a los datos utilizados para generar el modelo, la discrepancia, (7.2 %) y bias (5.2 %) son los menores como era esperado. Las predicciones del modelo también mostraron poca discrepancia con los datos experimentales almacenados para *Lactobacillus acidophilus* (3.8 %). De acuerdo a los porcentajes positivos de bias para ambos juegos de observaciones experimentales (5.2 para *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado), el modelo en promedio predice rápidamente las velocidades de crecimiento y puede ser considerado seguro (Baranyi y col, 1999).

Tabla 2. Evacuación de las predicciones del modelo contra los datos obtenidos previamente en el laboratorio y experimentales usando el % discrepancia y % de bias.

Predicciones del modelo	% discrepancia	% Bias
Vs datos del grupo	3.8	1.4
Vs <i>L. acidophilus</i> microencapsulado	7.2	5.2

Los gráficos de observaciones vs. predicciones pueden ser utilizados para revelar desviaciones sistemáticas que no son mostradas por Af y Bf (Ross, 1996; Baranyi y col, 1999). De hecho, se presentaron mayores velocidades de crecimiento experimentales a 15 y 25 °C como puntos sobre la línea de equivalencia (datos no mostrados). Considerando que la ecuación de Ratkowsky está diseñada para proporcionar predicciones exactas hasta la temperatura óptima para el microorganismo en estudio esta observación no es sorprendente. Aunque *Lactobacillus sp* tiene una temperatura de crecimiento mayor a 25 °C en la presente investigación no se trabajaron temperaturas superiores debido a que la mayoría de productos lácteos fermentados se elaboran a temperaturas de

refrigeración. El modelo presente en este estudio es una simple ecuación lineal que relaciona la velocidad de crecimiento con la temperatura. La validación tiene el propósito de mostrar si los microorganismos se comportaran como se predice en un escenario. Sin embargo, como lo menciona Pin y col, (1999) las predicciones originadas de las observaciones en el laboratorio no necesariamente son validadas en el medio ambiente real.

En este estudio, se propone un modelo sencillo para predecir el crecimiento de *L. acidophilus* micro encapsulado. Datos publicados previamente han sido tradicionalmente para validar modelos predictivos (Ross, 1996; Mellefont y col, 2003). Sin embargo, una de las ventajas de la microbiología predictiva de alimentos es que permite el uso de datos existentes (Ross, 1999), lo que significativamente reduce los costos de generación de nuevos datos. Este tipo de análisis sistemáticos y críticos es referido continuamente con el nombre de meta – análisis y ha incrementado en los últimos años.

CONCLUSIONES

Fue posible desarrollar un modelo matemático que describe el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado en un sistema microencapsulante binario a temperaturas entre 5 y 25 °C utilizando datos obtenidos en la experiencia del grupo de investigación GIBAE de la Universidad de Cartagena y fue validado contra datos experimentales de muestras del microorganismo microencapsulado.

El modelo desarrollado puede ser utilizado para determinar el efecto de la microencapsulación en el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en un rango de temperaturas entre 5 y 25 °C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anal, A. K., Stevens, W. F., Remuñan, L. C. (2006). Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*. 312 (1-2):166-173.
- Baranyi, J., McClure, P.J., Sutherland, J.P., Roberts, T.A., (1993). Modeling bacterial growth responses. *J. Ind. Microbiol.* 12, 190–194.
- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T., (1999). Validating and comparing predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 159–166.
- Castillejo-Rodríguez, A.M., Gimeno, R.M.G., Cosano, G.Z., Alcalá, E.B., Pérez, M.R.R., (2002). Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meat products. *J. Food Prot.* 65, 659–665.
- Dominguez, S., Schaffner, D. (2007). Development and validation of a mathematical model to describe the growth of *Pseudomonas* spp. in raw poultry stored under aerobic conditions, *International Journal of Food Microbiology* 120 (2007) 287–295.
- Goncalves, L. M., Barreto, M. T., Xavier, A. M., Carrondo, M. J., Klein, J. (1992). Inert support for lactic acid fermentation – a technological assessment. *Applied Microbiology Biotechnology* 38:305-311.
- González, C. R, Pérez, M. J. Tarón, D. A. Efecto de plastificantes sobre las propiedades mecánicas de biopelículas

- comestibles a base de goma gelana de alto y bajo acilo. @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. (2015). Vol 13, N° 2. P. 78 – 86.
- González, C. R, Pérez, M. J. Tarón, D. A. Efecto de *Lactobacillus delbrueckii* sobre las propiedades texturales de geles binarios de goma gelana. @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria. (2015). Vol 13, N° 2. P. 94 – 108.
- González, R. Salazar, Pérez, J. (2013). Obtaining size-controlled microcapsules by ionic gelation with high and low acyl gellans containing *Lactococcus lactis*, Rev Col Biotecnol, 15(2), 70-80
- González, R. Urbina, N. Pérez, J. (2014). Efecto de la Microencapsulación sobre las Propiedades Reológicas y Físicoquímicas del Yogurt Blando, Infor Tecnol, 25(6), 45-56
- Kailasapathy, K., Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on textura of Feta cheese. Australian Journal Dairy Technology. 60:252-258.
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2003. Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 82, 45–58.
- Pooni, G.S., Mead, G.C., (1984). Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf-life of non-frozen poultry meat products. Food Microbiol. 1, 67–78.
- Pin, C., Sutherland, J.P., Baranyi, J., (1999). Validating predictive models of food spoilage organisms. J. Appl. Microbiol. 87, 491–499.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A., (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. J. Appl. Bacteriol. 149, 1–5.
- Ross, T., McMeekin, T.A., (1994). Review paper: predictivemicrobiology. Int. J. Food Microbiol. 23, 241–264.
- Ross, T., (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. J. Appl. Bacteriol. 81, 501–508.
- Shoji, A. Oliveira, J.C.C. Balieiro, O. Freitas, M. Thomazini, R.J.B. Heinemann, P.K. Okuro, C.S. Favaro-Trindade. (2013). Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt, Food bioprod proces, 91, 83–88.
- Tripathi, M. y K. Giri (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics

during processing and storage, *J Funct Foods*, 9, 225–241.

Zhu, Y. Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. (2011). Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis, *Can lett*, 309, 119–127.