



VIABILIDAD DE *Saccharomyces boulardii* BAJO CONDICIONES DE ACIDEZ *In vitro*

VIABILITY OF *Saccharomyces boulardii* UNDER ACIDIC CONDITIONS *In vitro*

Rafael Zamora-Vega¹, Héctor Eduardo Martínez-Flores^{1*}, José Luis Montañez-Soto²

¹ Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

² Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán. CIIDIR IPN Michoacán. Justo Sierra 28. Col. Centro. Jiquilpan, Michoacán, México.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la acidez *in vitro* sobre la supervivencia de *Saccharomyces boulardii* encapsulada. Para la encapsulación se estudió la relación entre las propiedades texturales de dos tipos de geles, uno de alginato (Alg) y otro de alginato-inulina-mucílago de nopal *Opuntia ficus-indica* (Alg-Inu-Muc). La levadura probiótica fue expuesta por 3 h a condiciones de acidez a pH de 2,0 y 6,5, simulando las condiciones de estómago y colon, respectivamente. Se observó que los geles de Alg presentaron mayor dureza. La mezcla Alg-Inu-Muc disminuyó la fuerza del gel, formando una matriz de gel más cohesiva. A pH de 6,5, el microorganismo encapsulado con la mezcla de Alg-Inu-Muc presentó supervivencia de 92,93, 94,11 y 89,08%, a tiempos de exposición de 60, 120 y 180 min, respectivamente. A valores de pH de 2,0 se mantuvo la viabilidad de 87,79, 82,65 y 76,87%. En ambos casos se logró una supervivencia mayor respecto a su viabilidad inicial, conservando una viabilidad de 10⁷ UFC/mL, por lo que resulta adecuado para considerarse como un microorganismo probiótico.

Palabras clave: *Saccharomyces boulardii*, probióticos, hidrocoloides, supervivencia celular.

ABSTRACT

The effect of acidity *in vitro* on survival of *Saccharomyces boulardii* encapsulated was evaluated. It was studied the relationship between the texture properties of two types of gels composed of either alginate (Alg) or a blend of alginate-inulin-mucilage from nopal *Opuntia ficus-indica* (Alg-Inu-Muc) to encapsulate the yeast. The probiotic yeast was exposed to acidic conditions at pH 2.0 and 6.5 conditions simulating stomach and colon respectively, during an exposure period of 3 h. It was observed in the texture profile analysis of the gels with Alg greater hardness. The blend Alg-Inu-Muc decreased the gel strength, forming a more cohesive gel matrix. At pH 6.5, the microorganism encapsulated with Alg-Inu-Muc blend had a survival of 92.93, 94.11 and 89.08% at exposure times of 60, 120 and 180 min, respectively. Viability at pH 2.0 was 87.79, 82.65 and 76.87%, respectively. In both cases of pH it was maintained a viability of 10⁷ UFC/mL, making it suitable to be considered as a probiotic microorganism.

Keywords: *Saccharomyces boulardii*, hydrocolloids, probiotic, cell survival.

INTRODUCCIÓN

En la flora intestinal humana existen más de 400 especies de microorganismos que conviven en armonía sintetizando sustancias beneficiosas que contribuyen a la absorción de nutrientes, favoreciendo el metabolismo colónico de la fibra, mejorando la digestibilidad y neutralizando sustancias potencialmente patógenas. El intestino ofrece substratos y las condiciones para su desarrollo permitiendo así que la flora promueva una mejor función intestinal (Manning *et al.*, 2004).

En la vida intrauterina el tracto intestinal es estéril, y es después del nacimiento cuando la flora intestinal se desarrolla. Durante los primeros días de vida las bifidobacterias colonizan el intestino protegiendo de infecciones al organismo humano. La flora microbiana humana ejerce importantes funciones inmunológicas, metabólicas, tróficas, y protectoras, en el cual se refleja un modelo de simbiosis entre el huésped y los microorganismos intestinales (Buccigrossi *et al.*, 2013). Sin embargo, la flora intestinal es vulnerable a determinadas condiciones. En los adultos varía notablemente ya que dependen de varios factores como la alimentación, los genes, el medio que habita, tratamientos con antibióticos, estrés, medicamentos, infecciones, edad, clima, intervenciones quirúrgicas en estómago o intestino y de algunas enfermedades como las hepáticas, renales y cáncer (Manning *et al.*, 2004).

Tener una flora estable y bien equilibrada es una garantía de buena salud ya que evita la colonización y sobre desarrollo de microorganismos patógenos mediante varios mecanismos como la competencia y la síntesis de bacteriocinas. El desequilibrio de la flora puede prevenirse con la administración de cultivos microbianos vivos, los cuales reciben el nombre de probióticos (Steidler *et al.*, 2000).

Los probióticos se indican como "organismos vivos que al ser ingerido en cantidades suficientes, proporcionan un efecto benéfico sobre la salud del huésped, mejorando su balance microbiano intestinal" (Ceapa *et al.*, 2013; O'Riordan *et al.*, 2001). Un probiótico ideal deberá de poseer la mayoría de las siguientes características: la habilidad de adherirse a las células, multiplicarse, y producir peróxido de hidrógeno, ácidos, bacteriocinas contra el crecimiento de patógenos, ser seguro, no-invasivo, no-carcinogénico, no-patógeno, y co-agregarse para formar una flora normal balanceada (Khan *et al.*, 2013).

*Autor para envío de correspondencia: Héctor Eduardo Martínez-Flores
Correo electrónico: hedu65@hotmail.com

Recibido: 03 de septiembre de 2013

Aceptado: 16 de octubre de 2013

Los microorganismos probióticos por lo general son benéficos al ser humano, sin embargo, de manera natural poseen poca resistencia durante su paso por el tracto gastrointestinal, resultando en una baja viabilidad al momento de llegar al colon. No obstante, las bacterias y levaduras pueden ser manipuladas de tal manera que se les proteja ante condiciones adversas, una forma de hacerlo es por medio de la encapsulación.

Ramos-Clamont *et al.* (2013), mencionan que uno de esos procesos es la microencapsulación, la cual es considerada como una forma especial de empaque de una sustancia o microorganismo que provee un medio para envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas (Pedroza, 2002).

Las microcápsulas son de geometría esférica con una fase interna continua rodeada por una pared también continua conocida como estructura de partícula simple, mientras que otras pueden tener una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared formando estructuras agregadas (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005).

Así, la levadura *Saccharomyces boulardii* es considerado como probiótico; ya que cuando recorre el tracto gastrointestinal, genera efectos fármaco dinámicos semejantes a los efectos fisiológicos de la flora intestinal normal (Miranda, 2009). *S. boulardii* induce una protección contra los agentes patógenos entéricos, modulando la respuesta inmune del huésped inhibiendo las toxinas bacterianas y mejorando los factores tróficos como el incremento de las enzimas de la membrana del borde en cepillo y transportadores de nutrientes (Tranquilino *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Chen *et al.* (2009), se demostró que la ingestión oral de *S. boulardii* en ratas redujo la formación colónica y apoptosis y disminuyó el crecimiento de tumores y displasia en colon. Dumas *et al.* (2013) proporcionaron los fármacos claritromicina (CLA) y metotrexato (MTX) y evaluaron su efecto en el tránsito intestinal y el daño oxidativo en ratas. Las ratas fueron divididas en dos grupos recibiendo una dosis individual de MTX (20 mg/kg por día) o de CLA (20 mg/kg por día) durante una semana. El análisis histológico mostró que *S. boulardii* protegió los tejidos intestinales contra los efectos antiinflamatorios de ambos agentes. Esos descubrimientos sugieren que *S. boulardii* atenúa el daño intestinal y la inflamación hepática al aumentar el estado antioxidativo de los tejidos al inhibir la infiltración de neutrófilos causantes de elevar la oxidación lipídica. Khan *et al.* (2012) realizaron estudios con 400 niños, que presentaban síntomas de diarrea aguda. La variable de respuesta fue la consistencia, frecuencia y duración de la diarrea una vez que les fue administrada la levadura *S. boulardii*. Se reportó una diferencia estadística significativa desde el segundo día de aplicar la levadura en relación a la consistencia y frecuencia de la diarrea y también mostró reducción en la duración de la diarrea en 1.1 día en relación al grupo sin adición de la levadura. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la acidez *in vitro* sobre la viabilidad del microorganismo probiótico

Saccharomyces boulardii encapsulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

La cepa de *S. boulardii* (CDBB-L-1483 ATCC-MYC-797) fue donada por el CINVESTAV-IPN (México, D.F.).

Encapsulación del microorganismo

La encapsulación de la levadura probiótica fue basada en la formación de una emulsión agua en aceite (W/O), que consistió en preparar 100 mL de una dispersión (fase acuosa) de la formulación de hidrocoloides con una mezcla de alginato de sodio al 1%, inulina al 0.05% y mucílago de nopal *Opuntia ficus-indica* al 0.05% adicionando el botón celular, de manera separada se mezclaron 200 mL de aceite de canola (Aceite capullo, México) con 2.5 gr de Span 85 (fase oleosa), los cuales se agregaron a la fase acuosa permitiendo la formación de la emulsión W/O. Posteriormente se agregaron 40 mL del mismo aceite, mezclado con ácido acético glacial (0.35 M) para iniciar el proceso de gelificación (Zamora, *et al.*, 2011).

Análisis de textura

Las propiedades texturales fueron determinadas mediante un análisis de perfil de textura y pruebas de penetración, con la finalidad de evaluar el efecto de éstas sobre el proceso de encapsulación. Los geles de las diferentes mezclas de hidrocoloides se formaron dentro de una funda sintética de celulosa de 20 mm de diámetro para poder realizar el análisis de perfil de textura. Se analizó un gel formado con los diferentes tipos de hidrocoloides (Alginato de sodio, Mucílago de nopal e Inulina), y otro como control solo con alginato de sodio al 1% con la finalidad de estudiar propiedades texturales como dureza, cohesividad, elasticidad y resiliencia, para observar la capacidad de recuperación de la estructura del gel formado después de aplicada una fuerza de compresibilidad y valorar si puede resistir diferentes condiciones de acidez. A las suspensiones de los hidrocoloides se les fue agregando CaCO_3 (0,04 M) que fue disuelto por agitación magnética para la posterior adición de ácido acético (0,35 M), que originó la formación final del gel. Los geles moldeados fueron removidos de la funda y rebanados en cilindros de 20 mm de altura. El análisis de perfil de textura fue realizado mediante un analizador de textura Brookfield LFRA, EUA.

Estudio de viabilidad *in vitro*

El análisis se basó en estudiar la tolerancia a la acidez del organismo probiótico encapsulado ya sea con alginato de sodio o con alginato de sodio, mucílago de nopal e inulina, utilizando el método de Ding *et al.* (2007). Se utilizó agua peptonada ajustada con HCl 6 M simulando al pH estomacal (pH 2,0) y del colon (pH 6,5). Inicialmente el microorganismo se proliferó en caldo nutritivo por 48 h, lográndose una viabilidad de aproximadamente 10^{10} UFC/ml, la cual fue inoculada en el caldo peptonado modificado tomando muestras en intervalos de 0, 60, 120 y 180 min para la enumeración.

La viabilidad de *S. boulardii* se determinó por el método de vaciado en placa, las placas fueron incubadas a 30°C por 72 h. Para el organismo probiótico encapsulado, las células fueron previamente liberadas de las cápsulas por secuestro de iones calcio utilizando tampón de fosfato 1 M a pH 7,0. La tolerancia a la acidez se determinó comparando la concentración final de microorganismos (log UFC/mL) después de 3h de ser expuesta a las condiciones de acidez con el recuento inicial a las cero horas. Todas las pruebas se realizaron en 4 repeticiones para calcular el promedio y el error estándar.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa SAS (V.9.0) mediante un Análisis de Varianza diseño de bloques al azar; y la diferencia significativa entre las medias de los tratamientos por Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de textura es presentado en las Figuras 1 y 2. Se observa en la Figura la dureza y cohesividad de las diferentes muestras, donde la dureza de la muestra preparada con el gel de alginato de sodio (Alg), provocó que se formara una estructura más dura que el gel hecho con la mezcla de alginato de sodio, mucílago de nopal e inulina (Alg/Muc/Inu). Con respecto a la cohesividad, existió una ligera diferencia entre ambas muestras por lo que la fuerza de las uniones internas que mantienen la integridad del gel fue similar así como se muestra también con el resorteo. En relación a la resiliencia y elasticidad (Figura 2), en el primer parámetro se muestra un valor mayor en el gel hecho a base de Alg comparado con el de la mezcla de los hidrocoloides. Lo anterior, puede ser

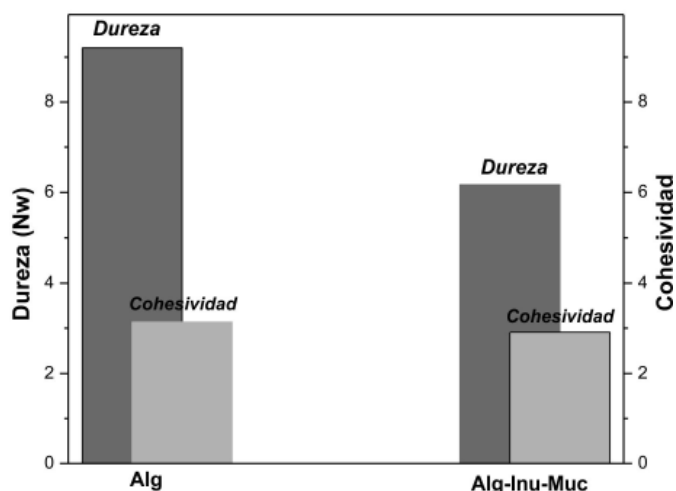


Figura 1. Dureza y cohesividad medida en los gels de alginato (Alg) y de la mezcla alginato-inulina-mucílago (Alg-Inu-Muc)

Figure 1. Hardness and cohesiveness measured in gels of alginate (Alg) and blend of alginate-inulin-mucilage (Alg-Muc-Inu)

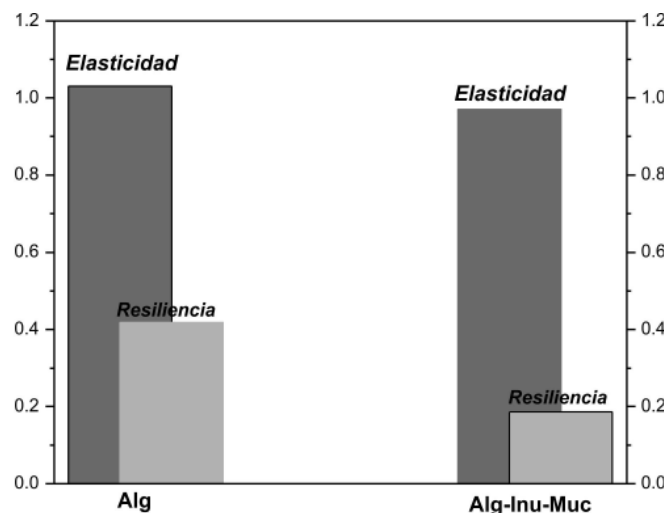


Figura 2. Elasticidad y Resiliencia medida en los gels de alginato (Alg) y de la mezcla alginato-inulina-mucílago (Alg-Inu-Muc)

Figure 2. Springing and resilience measured in gels of alginate (Alg) and blend of alginate-inulin-mucilage (Alg-Inu-Muc).

debido a que el gel formado con solamente con Ag es por naturaleza un material duro y esta dureza disminuyó con la adición de otros hidrocoloides. Cabe mencionar que la resiliencia nos proporciona información referente a la capacidad que tiene un material de regresar a su forma original después de que una fuerza que actúa sobre él ha sido retirada, ya sea para estirarlo o comprimirlo. Para este estudio se decidió seleccionar los materiales de Alg/Muc/Inu para encapsular la levadura ya que lo que se busca es la propiedad de que el material para encapsular no sea tan duro pero que permita resistir la condición de acidez, y permita liberarse el microorganismo gradualmente en el intestino grueso.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del efecto de las condiciones ácidas ($\text{pH}=2.0$) sobre la viabilidad del organismo probiótico encapsulado con Alg/Muc/Inu, donde se observa que la viabilidad de la levadura se mantuvo en 87.79, 82.65 y 76.87% a los 60, 120 y 180 min, respectivamente después de ser expuesta a la condición de acidez respectivamente, apreciándose el efecto protector de la microcápsula sobre el microorganismo, manteniéndolo en una viabilidad de 10^7 UFC/mL. Viabilidad mínima necesaria para ser considerado a un microorganismo como probiótico, tal como lo establece la FAO (2001).

Ding y Shah (2007), estudiaron la viabilidad de 8 cepas de bacterias probióticas encapsuladas con alginato de sodio, las cuales fueron expuestas a condiciones de acidez *in vitro*, resultando una mejor viabilidad comparadas con el control. Los resultados de este estudio coinciden con otros estudios similares (Audet *et al*, 1988; Jankowski *et al*, 1997; Krasaekoopt *et al*, 2003; Doleys y Lacroix, 2004), donde se ha encontrado que la microencapsulación con alginato en combinación con otros polímeros aumenta considerablemente la supervivencia de los microorganismos probióticos en condiciones de acidez.

Tabla 1. Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* encapsulada con alginato de sodio, inulina y mucilago de nopal *Opuntia ficus-indica* a valores de pH 2,0 y 6,5

Table 1. Viability of *Saccharomyces boulardii* encapsulated with alginate-inulin-mucilage from nopal *Opuntia ficus-indica* at pH values of 2,0 and 6,5

pH	Log UFC/mL a diferentes tiempos de exposición			
	0	60	120	180
pH 2.0	9.34±0.06A	8.20±0.26A	7.72±0.42B	7.18±0.29B
pH 6.5	9.34±0.06B	8.68±0.09A	8.79±0.13A	8.32±0.08A

Medias en la misma fila con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

También en la misma tabla, se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad del organismo probiótico encapsulado, bajo las condiciones de pH de 6.5. En cuanto al microorganismo encapsulado, la viabilidad de la levadura se mantuvo un 92.93, 94.11 y 89.08% a los tiempos de exposición de 60, 120 y 180 min, respectivamente. Siendo estos valores un poco mayores comparados con los obtenidos a valor de pH de 2.0. Cabe mencionar que haciendo un análisis particular del porcentaje de viabilidad de la levadura encapsulada en relación a los valores de pH estudiados en función al tiempo, se observa que durante la primera hora de exposición la viabilidad tanto a pH de 2.0 como de 6.5 es la misma, es decir, existe pérdida de la viabilidad sin embargo, no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre esa diferencia. A partir de la segunda hora existe una disminución significativa entre la levadura encapsulada y evaluada a pH de 2.0 comparada con la evaluada a pH 6.5. Para la tercera hora de exposición el cambio se hace más notorio a pH de 2.0 comparado con el pH de 6.5. No obstante es importante resaltar que en ambos casos, la levadura se mantiene viva en una concentración de 10^7 UFC/mL. Es importante mencionar que, Ramos-Clamont (2013) indica que la Federación Internacional de Lácteos recomienda un mínimo de $\log 10^7$ UFC estén vivos en el momento que se consuma el alimento. Es decir, la mayor parte de la levadura se mantiene viable tanto en la condición de acidez fuerte (pH 2,0) como en la de pH ligeramente ácido (pH 6,5).

CONCLUSIONES

Se concluye que las microcápsulas elaboradas a base de alginato de sodio, inulina y mucilago de nopal, ayudan a la levadura *Saccharomyces boulardii* a mantenerse viables tanto en condiciones de acidez cercanas a la neutralidad (pH 6,5) como bajo condiciones de alta acidez (pH 2,0). Por lo que el uso de hidrocoloides, inulina y mucilago representan una excelente alternativa ofreciendo mejores propiedades texturales al combinarse con alginato de sodio durante el proceso de encapsulación.

BIBLIOGRAFÍA

- Audet, P.; Paquin, C.; Lacroix, C. (1988) Immobilized growing lactic acid bacteria with karrageenan-locust bean gum gel. *Applied Microbiology Biotechnology*. 29: 11–8.
- Buccigrossi, V.; Nicastro, E.; Guarino, A. (2013) Functions of intestinal microflora in children. *Current Opinion in Gastroenterology*. 29: 31-38
- Barbosa, C. G.V.; Ortega, R. E.; Juliano, P.; Yan, H. (2005) Encapsulation Processes. Capítulo 8 en: *Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality*. Springer US editor, pp. 199-219, New York.
- Ceapa, C.; Wopereis, H.; Rezaiki, L.; Kleerebezem, M.; Knol, J.; Oozeer, R. (2013) Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 27: 139-155.
- Chen, X.; Fruehauf, J.; Goldsmith, J.D.; Xu, H.; Katchar, K.K.; Koon, H.W.; Zhao, D.; Kokkotou, E.G.; Pothoulakis, C.; Kelly, C.P.; (2009) *Saccharomyces boulardii* inhibits EGF receptor signalling and intestinal tumor growth in Apc (min) mice. *Gastroenterology*. 137, 914-923.
- Ding, W.; Shah, P. (2007) Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated bacteria. *Journal of Food Science*. 72: 446-450.
- Doleyres, Y.; Lacroix, C. (2005) Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*. 15: 973-988.
- Duman, D.G.; Kumral, Z.N.O.; Ercan, F.; Deniz, M.; Can, G.; Çalayan, B. (2013) *Saccharomyces boulardii* ameliorates clarithromycin-and methotrexate-induced intestinal and hepatic injury in rats. *British Journal of Nutrition*. 110: 493-499.
- FAO/OMS. (2001) Probióticos en los alimentos. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>. 10/01/10.
- Jankowski, T.; Zielinska, M.; Wysakowska, A.; (1997) Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnology Techniques*. 11: 31–4.
- Kailasapathy, K.; Rybka, S. (1997) *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* — Their therapeutic potential and survival in yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*. 52: 28–35.
- Kailasapathy, K. (2002) Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 3: 39-48.
- Khan, A.A.; Khurshid, M.; Khan, S.; Alshamsan, A. (2013) Gut microbiota and probiotics: current status and their role in cancer therapeutics. *Drug Development Research*. 74: 365-375.
- Khan, A.; Javed, T.; Chishti, A.L. (2012) Clinical efficacy of use of probiotic “*Saccharomyces boulardii*” In children with acute watery diarrhea. *Pakistan Paediatric Journal*. 36: 122-127
- Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13: 3-13.
- Manning, T.S.; Gibson, G.R. (2004) Microbial-gut interactions in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18: 287–298.
- Mcfarland, L.V.; Bernasconi, P. (1993) *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 6: 57-171.

- Miranda, A. (2009). Percepción e impacto en los consumidores de probióticos. Universidad Isalud. Licenciatura en Nutrición. Tesina Nutrición.
- O’Riordan, K.; Andrews, D.; Buckle, K.; Conway, P. (2001) Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 1059-1066.
- Pedroza, I.R. (2002) Alimentos microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. En: *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Ed. by Cruz L., Ricque D., Tapia M., Gaxiola M. y Simoes, N. Quintana Roo, México.
- Ramos, C.M.G.; Hernández, L.E.; Fernández, S.G.; Froto, M.L.; Vázquez, M. L. (2013) Estrategias para mejorar la sobrevivencia de probióticos en helados. Strategies to improve the survival of probiotic in ice cream. *BIOTECNIA*. XV(2): 31-38.
- SAS/STAT (2000) Guide for personal computers. Version 8. Statistical Analysis System (SAS) Institute in Company. Cary electronic version available on CD.
- Steidler, L.; Hans, W.; Schotte, L.; Neiryck, S.; Obermeier F.F. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*. 289: 1352-5.
- Tranquilino, R.E. (2012) Elaboración de una bebida funcional tipo yogur a partir de inulina, aceites vegetales y *Saccharomyces boulardii*. Tesis de licenciatura. Facultad de Quimicofarmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México.
- Zamora, V.R. (2011) Elaboración de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e inulina. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán. Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Mich., México.