

Supervivencia de *Saccharomyces cerevisiae* microencapsulado después del proceso de congelación.

Ortíz-Villegas J.^{a*}, Pérez-Alonso C.^a, Alvarez-Ramirez J.^b, Carrillo-Navas H.^c, Guadarrama-Lezama A.Y.^{a*}

^aFacultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México. ayguadarramal@uaemex.mx

^bDepartamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Ciudad de México, 09340 México.

^cMalvern Panalytical México, Laguna de Términos No. 221 - Torre A, Oficina 1403, Col. Granada, C.P. 11520, Ciudad de México, México.

RESUMEN:

Se prepararon complejos coacervados de proteína de suero de leche (WPI)-*Saccharomyces cerevisiae* (Y) microencapsulados por secado por aspersión. La interacción óptima en la que se formó el complejo coacervado fue a una relación 1:13 (WPI-Y) y pH de 3.28. El complejo coacervado (WPI-Y) se secó por secado por aspersión utilizando 10 y 20% de maltodextrina (MD) y subsecuentemente fue congelado a -18°C. Se llevaron a cabo estudios de DSC y SEM para caracterizar los materiales puros y los complejos coacervados. Los análisis de DSC mostraron que el complejo coacervado secado por aspersión fue protegido mejor cuando se utilizó la mayor concentración de MD, reflejado en el pico de desnaturalización de las proteínas y en valor de entalpia más alto. La morfología de los complejos coacervados presentaron partículas de forma esférica con concavidades y después del proceso de congelación estas estructuras presentaron fracturas en la superficie. La supervivencia de la levadura en el complejo coacervado fue mayor cuando había mayor contenido de sólidos totales. Los complejos fueron estables después del proceso de congelación, por lo que pueden ser utilizados para producir masas congeladas con características similares a las frescas..

ABSTRACT:

Complex coacervate from whey protein isolate (WPI)-*Saccharomyces cerevisiae* (Y) was prepared for microencapsulation by spray-drying. The optimum WPI-Y complex coacervate reached the best interaction for a ratio and pH of 1:13 and 3.28, respectively. The complex coacervate was spray-dried with 10% and 20% w/w of maltodextrin (MD) and subsequently frozen at -18 °C. DSC and SEM analyses were carried out to characterize the pure materials and spray-dried WPI-Y complex coacervates. Thermograms of DSC reflected that the spray-dried WPI-Y complex coacervates were better protected when MD concentration was increased because the denaturation peak temperature of proteins and enthalpies were higher. After the freezing process, reduced decrease in the peaks intensity of the amides in the spray-dried WPI-Y complex coacervate with 20% w/w of total solids content was observed. Morphology of all spray-dried complex coacervates exhibited particles of spherical shapes with concavities, and after freezing process displayed fractures in the surface. Yeast survival was higher in the spray-dried WPI-Y complex coacervate with higher concentration of MD. Therefore, WPI-Y complex coacervates were stable after freezing process and can be used to stabilize Y in order to produce frozen dough with similar characteristics that fresh dough..

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, complejo coacervado, potencial zeta, microencapsulación, congelación, supervivencia de levadura.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, complex coacervate, zeta potential, microencapsulation, freezing, survival yeast.

Área: Otros

INTRODUCCIÓN

El proceso de congelación es ampliamente utilizado en la producción a gran escala de productos de panificación. Este proceso ofrece diversas ventajas, entre las cuales se encuentran la de reducir los tiempos de

producción, obtener productos semi-elaborados de fácil manejo y el almacenamiento de masas a grande escala y distribución. Sin embargo, el principal problema del deterioro de las masas es durante su almacenamiento (Bot, 2003; Ribotta, Pérez, Leon, & Anon, 2004; Rosell and Gomez, 2007; Selomulyo and Zhou, 2007). La pérdida de la firmeza de la masa es reducida por la migración del agua y distribución de esta, así como a los fenómenos de recristalización (Giannou, Kessoglou, & Tzia, 2003; Räsänen, Blanshard, Mitchell, Derbyshire, & Autio, 1998). El segundo principal problema está relacionado con la reducción de la capacidad gasificante causada por la disminución de la actividad y viabilidad de levadura.

El tiempo de almacenamiento efectivo destinado para la producción de pan puede ser reducido drásticamente. La solución de los problemas relacionados con la pérdida de la firmeza de la masa y la disminución de la capacidad gasificante debería prolongar los tiempos de almacenamiento, preservando las propiedades texturales y reológicas de la masa. Se ha propuesto la inclusión de diferentes tipos de aditivos para preservar la calidad y frescura de las masas congeladas en la industria de la panificación, por ejemplo: la incorporación de ácido mono y di-acetiltartarico, y goma guar han mejorado las propiedades de textura y volumen de pan fabricado con masa congelada, aunque no se observaron mejoras en los parámetros reológicos (Ribotta et al., 2004). La adición de manteca vegetal y emulsificantes también han presentado efectos beneficios en las características de textura de masa congelada (Kim, Huang, Du, Pan, & Chung, 2008; Matuda, Parra, Lugao, & Tadini, 2005).

El problema de preservar la funcionalidad y actividad de levadura durante la congelación en almacenamiento es un desafío. Largos periodos de tiempo pueden permitir la reducción de levadura y por consecuencia el deterioro de la calidad de pan elaborado con masa congelada. La tecnología de microencapsulación es una alternativa para proteger la levadura de los efectos adversos de largos periodos de almacenamiento en congelación (Đorđević et al., 2015). Los coloidosomas han sido explorados como vehículos para la encapsulación de células de levadura, ofreciendo una capacidad aceptable para metabolizar la glucosa (Keen, Slater, & Routh, 2011). También se ha mostrado que el almidón de maíz y maltodextrina usados como materiales acarreadores para secado por aspersión logran la supervivencia de las células (85% aproximadamente) (Chandralekha et al., 2016). La coacervación compleja también es una alternativa viable para la encapsulación de células viables. La coacervación compleja con aislado de proteína de suero de leche y goma Arábica ha mostrado preservar *L. paracasei* por un tiempo relativamente largo (alrededor de 45 días) (Bosnea, Moschakis, & Biliaderis, 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Se adquirió levadura seca para pan (*Saccharomyces cerevisiae*) (Y) de la marca Nevada (Safmex S.A. de C.V., Toluca, México). El aislado de proteína de suero de leche (WPI) se obtuvo de Ingredientes Hilmar (Hilmar, CA, USA) y se compró maltodextrina DE 10 (MD) de la marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos los reactivos fueron grado analítico. Se utilizó agua desionizada para la preparación de las soluciones.

2.2 Preparación de soluciones WPI, Y y complejos coacervados

Las soluciones de WPI (1.0% p/p) y Y (0.1% p/p) fueron preparadas por la disolución de los polvos en agua desionizada y dispersadas por agitación suave durante 24 horas, para asegurar la completa hidratación de los materiales a 6.76 y 4.63 respectivamente. El pH de la solución fue ajustado a 3.0 con solución de HCl 0.1M. Posteriormente, la solución de Y (0.1%p/p) fue adicionada a la solución de WPI para obtener el complejo coacervado.

2.3. Mediciones de potencial zeta

Las mediciones de potencial zeta fueron realizadas con un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). El pH de las soluciones WPI y Y (20mL) fueron ajustadas a 2.0 y 10.0 con HCL o NaOH (0.1M) para determinar el comportamiento de los materiales. El efecto de la interacción del complejo (WPI-Y) en el potencial zeta fue obtenido por variar la relación de la masa de 1:1 a 1:20. El promedio de los valores de potencial zeta fueron obtenidos del equipo y software.

2.4 Medidas de turbidez

Las medidas de turbidez fueron realizadas con el complejo coacervado (WPI-Y) a la relación óptima encontrada con las mediciones de potencial zeta. Para la determinación de la turbidez se utilizó una celda de cuarzo de 3mL y fue colocada en un espectrofotómetro UV/Vis modelo VE-5600UV (Científica Vela Quin S.A. de C.V., Ciudad de México, México). La absorbancia se midió a 236nm a temperatura ambiente y pH en que el complejo coacervado fue ajustado de 2 a 6. El pH óptimo (pH_{opt}) corresponde al valor de pH en el cual se observa la densidad óptica más alta (236 nm).

2.5. Secado por aspersión del complejo coacervado

Se prepararon soluciones de 10% o 20% p/p de maltodextrina 10DE (MD) como material encapsulante. Las soluciones fueron secadas en un secador por aspersión Nichols/Niro (Turbo Spray PLA, NY, USA) tipo planta piloto. La solución fue alimentada al secador en un flujo de 40mL min^{-1} a temperatura ambiente a través de una boquilla. Las temperaturas de entrada y salida del aire de secado fueron 150°C y 80°C respectivamente, inyectando aire comprimido a 4 bar. El polvo obtenido fue colocado en bolsas herméticas de plástico y almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso.

2.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los experimentos de DSC se llevaron a cabo para la levadura (Y) y los complejos WPI-Y con la inclusión de 10% y 20% de MD en un calorímetro modelo 204 F1 Phoenix (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Alemania) calibrado con indio. Las muestras (4-5 mg) fueron colocadas en contenedores de aluminio y selladas herméticamente. Los contenedores fueron colocados en el calorímetro y equilibrados a 25°C por 2 minutos, subsecuentemente fueron enfriados a -40°C a una velocidad de $5.0^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y se mantuvo en dicha temperatura por 2 minutos, después se llevaron a 40°C . Un contenedor de aluminio vacío fue usado como referencia. Los valores correspondientes al pico máximo de temperatura (T_p , $^{\circ}\text{C}$) y la entalpía (ΔH , J g⁻¹) de las transiciones térmicas fueron calculados por el software Universal Analysis 2000.

2.7. Proceso de congelación de Y y complejos coacervados (WPI-Y)

La levadura (Y) y los complejos (WPI-Y) a diferentes concentraciones de material encapsulante (10% y 20% w/w) fueron congelados, en un congelador de aire comprimido modelo BK-5 (Tecnomac, Castel MAC SpA, Castelfranco Veneto, Italia) con temperatura de aire de convección de -40°C por 20 minutos hasta que la temperatura de los polvos alcanzó -18°C . Después del congelamiento, los polvos fueron transferidos en contenedores de plástico sin aire y almacenados a -18°C en un refrigerador hasta el momento de su descongelación y uso.

2.8. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La levadura, la proteína y los complejos coacervados (WPI-Y) fueron colocados en dados de metal sobre una cinta de carbono adhesiva y posteriormente cubiertas con 15nm de oro para ser examinadas en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6380 LV, Jeol Ltd., Akishima, Japón) en un voltaje de aceleración de 5kV. Las micrografías fueron tomadas a 2000x de magnificación.

2.9. Supervivencia de células de levadura (Y)

El número de células de levadura fue determinado por el método de conteo en placa para Y y los complejos coacervados (WPI-Y), para lo cual 1 g de cada polvo fue dispersado en 99mL de solución salina de peptona estéril (0.1% p/v), mezclada y diluida. 1.0mL de cada muestra hidratada se dispersó en agar papa dextrosa (PDA) como medio de cultivo. Las muestras fueron incubadas de 5-7 días. Se cuantificó el número de colonias de levadura (CFU/g) y el valor promedio de cada determinación fue reportado como la supervivencia de las células de levadura.

2.10. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron hechos por triplicado y los valores fueron reportados expresados como el valor promedio \pm SD (desviación estándar). El análisis estadístico fue hecho con el programa SPSS Statistics 19.0.

Para determinar la diferencia significativa entre valores se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de Tuckey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto del pH en el potencial zeta de Y, WPI y la formación de complejos (Y-WPI)

La figura 1 presenta el potencial zeta de Y, WPI y los complejos coacervados (WPI-Y) en función del pH. El carácter catiónico de la WPI aumentó después de su punto isoeléctrico ($\text{pH} = 4.2$) en todos los valores de pH. El máximo valor de carácter iónico de la WPI se presentó a 18 mV y $\text{pH} = 3.0$. El carácter anfoterico de la proteína puede ser explicado debido a su composición en grupos amino y carboxilo. La levadura (Y) adquirió un carácter aniónico en la mayor parte del intervalo de pH en el cual se realizó la prueba. En la figura (1b) se muestra la curva de titulación de los complejos coacervados a diferentes relaciones de masa. El potencial zeta cambio de positivo a negativo conforme la concentración de Y incrementaba. La relación 1:13 (WPI-Y) y $\text{pH} = 3.27$ fue donde ambos materiales presentaron una fuerte atracción electrostática induciendo la neutralización de cargas (potencial zeta cero). Los resultados encontrados en este trabajo concuerdan con otros trabajos (Eratte, Wang, Dowling, Barrow, & Adhikari, 2014; Liu, Shim, Shen, Wang, & Reaney, 2017) donde se reporta que los materiales anionicos (goma Arábica, goma de semilla de lino) pueden neutralizar proteínas catiónicas como WPI para formar complejos coacervados en función de las relaciones másicas.

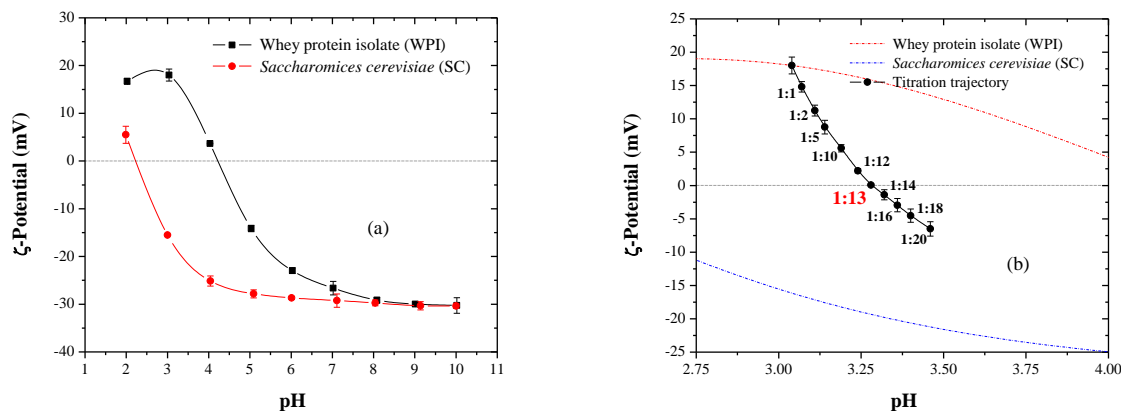


Figura 1. Potencial zeta de levadura (Y), proteína de suero de leche (WPI) y complejos coacervados (WPI-Y).

3.2 Determinación del pH óptimo de los complejos por turbidez

Se evaluó el efecto del pH en la turbidez con la finalidad de estimar el pH óptimo donde se formó el complejo coacervado, el cual corresponde con la relación de masa óptima determinada por las mediciones de potencial zeta. A medida que el pH disminuyó a un valor menor de 3.28, la turbidez incrementó de forma abrupta, en el cual se obtuvo el punto máximo de interacción (pH_{opt}) de los complejos (Y-WPI). Esta fase corresponde a la formación de complejos insolubles con cargas de neutralización y soluciones turbias. Este valor de pH óptimo concuerda con los valores de potencial zeta obtenidos ($\text{pH} = 3.27$).

3.3 Transiciones térmicas de Y y los complejos coacervados Y-WPI

Los termogramas de Y y los complejos coacervados (Y-WPI) se muestran en la figura 2. Se puede observar que el pico endotérmico de cada muestra puede ser asociado con el pico de la temperatura de desnaturalización (T_d) de proteínas (tabla I).

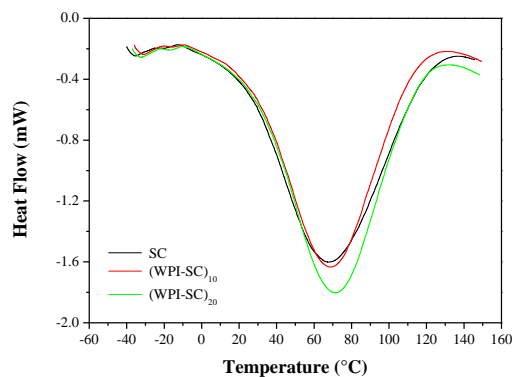


Figura 2. Termogramas de la levadura y los complejos

El incremento en T_d de los complejos coacervados con respecto a Y puede ser asociado con un re-arreglo molecular de las proteínas de Y, mejorando las interacciones moleculares y la resistencia de las proteínas a la formación de cristales de hielo debido a que los materiales de pared ejercen un efecto protector (Pan & Wu, 2014). En las muestras donde se utilizó una concentración alta de material de pared para obtener los complejos coacervados por secado por aspersión se presentó mayor temperatura de desnaturalización (tabla I). La entalpía de desnaturalización (ΔH) representa la cantidad de energía requerida para degradar la estructura nativa de Y y los complejos coacervados (tabla I). Los resultados muestran que la desnaturalización de las proteínas en los complejos coacervados requirieron mayor energía para degradarse comparada con la levadura pura (Y). Esto significa que los complejos coacervados permitieron una mejor estabilidad térmica de las proteínas después del proceso de congelación. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos por trabajos previos (Chang, Gupta, Timilsena, & Adhikari, 2016; Duhoranimana et al., 2017).

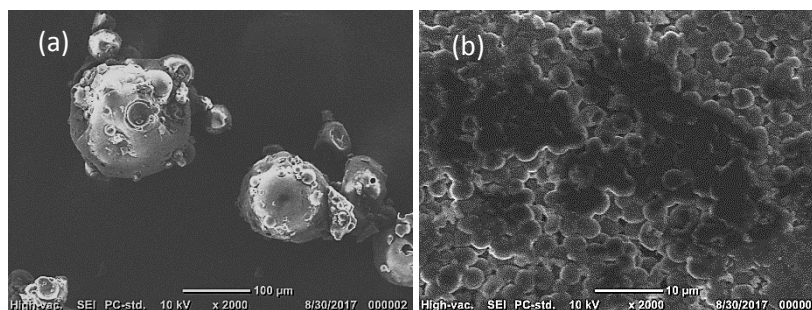
Tabla I. Transiciones térmicas de levadura (Y) y los complejos coacervados secados por aspersión (Y-WPI)

Muestras	T_d (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
Y	67.87 ± 1.02 ^a	15.25 ± 0.23 ^a
(WPI-SC) ₁₀	69.10 ± 1.17 ^a	18.20 ± 0.31 ^b
(WPI-SC) ₂₀	71.61 ± 1.29 ^b	23.07 ± 0.44 ^c

Los valores son promedios ± desviación estándar, de triplicados. Superíndices con diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

3.4 Morfología de los materiales puros y complejos coacervados (Y-WPI)

La figura 3 muestra las imágenes de SEM de los materiales puros (Y y WPI) y los complejos coacervados (Y-WPI). La estructura externa de los materiales puros y los complejos, mostraron forma esférica con superficies irregulares y partículas tipo burbujas, libres de fracturas y poros en la superficie (figuras 3a-3d) (Ahmad, Kausmann, Imtiaz-ul-Islam, & Langrish, 2013; Sultana et al., 2017). El proceso de congelación presentó un efecto destructivo de las estructuras originales debido al agua adsorbida en la superficie.



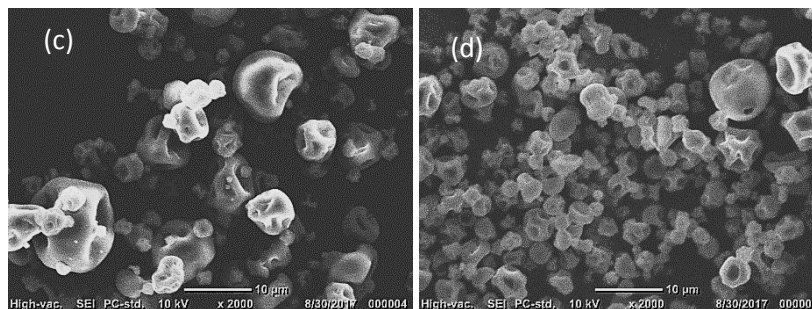


Figura 3. Micrografías de SEM de (a) WPI, (b) Y (c) (WPI-SC)_{10%} complejo coacervado (d) (WPI-SC)_{20%} complejo coacervado.

La morfología de los complejos coacervados secados por aspersión presentaron fracturas superficiales, sin embargo el efecto fue menos notable cuando se utilizó una concentración de maltodextrina del 20% en la formación del complejo coacervado.

3.5 Supervivencia de Y y complejos coacervados (Y-WPI) secados por aspersión

Después del proceso de congelación el número de unidades formadoras de colonias (UFC) disminuyó de 30×10^7 CFU/g a 25×10^7 CFU/g debido a que la membrana de las células se rompen produciendo la inactivación y muerte de Y. El porcentaje de preservación de la levadura fue mayor cuando la concentración de MD fue del 20% (77%) que cuando se utilizó 10% de MD en la obtención del complejo coacervado en polvo (33%), esto puede ser debido a la reducción del efecto de la temperatura durante el proceso de secado por aspersión cuando se utilizó una mayor concentración de MD (Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015). Chandralekha et al. (2015) también estudiaron el efecto de diferentes materiales acarreadores para encapsular levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por secado por aspersión y liofilización en la supervivencia de dicho microorganismo, encontrando que se presentó una mejor protección cuando se utilizó una mezcla de WPI y almidón de maíz como materiales acarreadores en el proceso de secado por aspersión.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron que es posible proteger levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) mediante la formación de complejos coacervados secados por aspersión con la adición de 10% y 20% de MD y después del proceso de congelación. Los complejos formados con 20% de MD fueron mejor protegidos después del proceso de congelación, en comparación de los elaborados con 10% de MD. Los análisis de DSC mostraron que la temperatura de desnaturalización y las entalpías de desnaturalización fueron mayores cuando se utilizó mayor concentración de MD. Las micrografías obtenidas por SEM de los complejos coacervados mostraron estructuras de forma regular, aunque después del proceso de congelación algunas partículas mostraron fracturas. Este trabajo ofrece una alternativa de encapsular levadura y que ésta puede ser incluida en forma de polvo en masas congeladas que presenten características similares a las masas frescas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, J., Kausmann, T., Imtiaz-ul-Islam, M., & Langrish, T.A.G. (2013). The effect of fats in whey protein isolate powder. *Drying Technology*, 31(6), 619-632.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 685-690.
- Bosnea, L.A., Moschakis, T., & Biliaderis, C.G. (2017). Microencapsulated cells of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in biopolymer complex coacervates and their function in a yogurt matrix. *Food & Function*, 8(2), 554-562.

- Bot, A. (2003). Differential scanning calorimetric study on the effects of frozen storage on gluten and dough. *Cereal Chemistry*, 80(4), 366-370.
- Chang, P.G., Gupta, R., Timilsena, Y.P., & Adhikari, B. (2016). Optimisation of the complex coacervation between canola protein isolate and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 191, 58-66.
- Chandralekha, A., Tavanandi, A.H., Amrutha, N., Hebbar, H.U., Raghavarao, K.S.M.S., & Gadre, R. (2016). Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life. *Drying Technology*, 34(11), 1307-1318.
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarški, B., & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.
- Duhoranimana, E., Karangwa, E., Lai, L., Xu, X., Yu, J., Xia, S., Zhang, X., Muhoza, B., & Habinshuti, I. (2017). Effect of sodium carboxymethyl cellulose on complex coacervates formation with gelatin: Coacervates characterization, stabilization and formation mechanism. *Food Hydrocolloids*, 69, 111-120.
- Eratte, D., Wang, B., Dowling, K., Barrow, C.J., & Adhikari, B.P. (2014). Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. *Food & Function*, 5(11), 2743-2750.
- Giannou, V., Kessoglou, V., & Tzia, C. (2003). Quality and safety characteristics of bread made from frozen dough. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 99-108.
- Keen, P.H., Slater, N.K., & Routh, A.F. (2011). Encapsulation of yeast cells in colloidosomes. *Langmuir*, 28(2), 1169-1174.
- Kim, Y.S., Huang, W., Du, G., Pan, Z., & Chung, O. (2008). Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. *Food Research International*, 41(9), 903-908.
- Liu, J., Shim, Y.Y., Shen, J., Wang, Y., & Reaney, M.J. (2017). Whey protein isolate and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum electrostatic coacervates: Turbidity and rheology. *Food Hydrocolloids*, 64, 18-27.
- Matuda, T.G., Parra, D.F., Lugao, A.B., & Tadini, C.C. (2005). Influence of vegetable shortening and emulsifiers on the unfrozen water content and textural properties of frozen French bread dough. *LWT-Food Science and Technology*, 38(3), 275-280.
- Pan, S., & Wu, S. (2014). Effect of chitoooligosaccharides on the denaturation of weever myofibrillar protein during frozen storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 549-552.
- Ribotta, P.D., Pérez, G.T., Leon, A.E., & Anon, M.C. (2004). Effect of emulsifier and guar gum on micro structural, rheological and baking performance of frozen bread dough. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 305-313.
- Rosell, C.M., & Gómez, M. (2007). Frozen dough and partially baked bread: an update. *Food Reviews International*, 23(3), 303-319.
- Selomulyo, V.O., & Zhou, W. (2007). Frozen bread dough: Effects of freezing storage and dough improvers. *Journal of Cereal Science*, 45(1), 1-17.
- Räsänen, J., Blanshard, J.M.V., Mitchell, J.R., Derbyshire, W., & Autio, K. (1998). Properties of frozen wheat doughs at subzero temperatures. *Journal of Cereal Science*, 28(1), 1-14.
- Sultana, A., Miyamoto, A., Hy, Q.L., Tanaka, Y., Fushimi, Y., & Yoshii, H. (2017). Microencapsulation of flavors by spray drying using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Engineering*, 199, 36-41.