

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**Casa abierta al tiempo**

**ESTUDIO DEL EMPLEO DE EXOPOLISACÁRIDOS DE KÉFIR COMO  
AGENTES EMULSIONANTES DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAMENTE  
ACTIVAS**

**TESIS**

**PARA OBTENER LA ESPECIALIZACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ISABEL MARLENE MARTÍNEZ DÍAZ**

**Dirección**

**Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaría**

**CoDirección**

**Dra. Angélica Román Guerrero**

**11 de Diciembre de 2019.**

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	2
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	4
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	9
2.1. Exopolisacáridos (EPS).....	9
2.3. Kefirano.....	9
2.4. Carotenoides.....	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	14
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	14
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	15
7.1. Propagación y obtención de los exopolisacáridos.....	15
7.1.1. Preparación del medio e inoculación del cultivo de kéfir.....	15
7.1.2. Purificación del exopolisacárido.....	15
7.2. Caracterización fisicoquímica.....	16
7.2.1. Método Fenol-Sulfúrico.....	16
7.2.2. Método de Bradford.....	16
7.2.3. Determinación de cenizas.....	17
7.2.4 Determinación de humedad.....	17
7.2.5 Determinación de Infrarrojo.....	17

7.2.6. Determinación del peso molecular .....	18
7.2.7. Propiedades térmicas.....	18
7.3. Determinación de propiedades superficiales.....	18
7.3.1. Solubilidad.....	18
7.3.2. Potencial z ( $\zeta$ ).....	19
7.3.3. Tensión interfacial dinámica.....	19
7.4. Formulación de emulsiones (O/W).....	20
7.4.1. Morfología y distribución.....	20
7.4.2. Estabilidad de las emulsiones (O/W).....	20
7.5. Análisis estadístico.....	21
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
8.1. Obtención y caracterización fisicoquímica de los EPS.....	21
8.2. Espectroscopia de infrarrojo de los EPS.....	23
8.3. Determinación de las propiedades térmicas de los EPS.....	25
8.4. Peso molecular de los EPS.....	27
8.5. Evaluación de la actividad superficial.....	29
8.5.1. Solubilidad y potencial z.....	29
8.5.2. Tensión interfacial.....	32
8.6. Formulación de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS.....	36
8.6.1. Emulsiones O/W sin carotenoide.....	36
8.7. Emulsiones O/W estabilizadas con carotenoide .....	43
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>47</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Estructura química del kefirano	10
<b>Figura 2.-</b> Bebidas después de 24 h de fermentación	21
<b>Figura 3.-</b> Espectros de infrarrojo de los EPS	24
<b>Figura 4.-</b> Termogramas de los EPS	26
<b>Figura 5.-</b> Cromatogramas a, b y c	28
<b>Figura 6.-</b> Perfiles de tensión interfacial a, b y c	35
<b>Figura 7.-</b> Histogramas y morfologías de los EPS sin carotenoide	39
<b>Figura 8.-</b> Histogramas y morfologías de los EPS con carotenoide	42
<b>Figuras 9.-</b> Cinética de coalescencia kc: a, b y c sin carotenoide	44
<b>Figuras 10.-</b> Cinética de coalescencia kc: a, b y c con carotenoide	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Fuentes de carotenoides	13
<b>Tabla 2.-</b> Propiedades fisicoquímicas de los EPS	22
<b>Tabla 3.-</b> Tiempos de retención y peso molecular de los EPS	29
<b>Tabla 4.-</b> Efecto del pH sobre la solubilidad	29
<b>Tabla 5.-</b> Potencial z de los EPS	30
<b>Tabla 6.-</b> Diámetro de gota de las emulsiones sin carotenoide	39
<b>Tabla 7.-</b> -Diámetro de gota de las emulsiones con carotenoide	42
<b>Tabla 8.-</b> -Valores de kc de los EPS sin y con carotenoide	43

## RESUMEN

El kefirano es un polisacárido producido por la flora que compone la microbiota de los granos kéfir, su uso es cada vez mayor en la industria alimentaria como un agente emulsificante y texturizante, una de las razones más importantes para la emulsificación de los ingredientes activos es proporcionar una estabilidad mejorada en los productos finales y durante el procesamiento. La emulsificación es una herramienta útil para mejorar el suministro de moléculas bioactivas en los alimentos tales como: carotenoides, compuestos fenólicos, minerales, ácidos grasos, así como células vivas como probióticos; el objetivo del presente trabajo es obtener exopolisacáridos a partir de tres bebidas fermentadas de kéfir y utilizarlas como agentes emulsionantes, el kefirano se produjo a partir de la inoculación de los granos de kéfir en tres medios de cultivo diferentes: leche descremada, bebida de coco y bebida soya, se purificó, se liofilizó, y se realizó la caracterización fisicoquímica, por medio de una serie de técnicas tales como: cuantificación de azúcares por el método Fenol-Sulfúrico, cuantificación de proteínas por el método de Bradford, porcentaje de solubilidad por diferencia de pesos, determinación de espectroscopia de Infrarrojo, determinación de propiedades térmicas por calorimetría, determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión molecular, tensión interfacial dinámica, potencial Z, formulación de la emulsiones y morfología y distribución de tamaño de gota. Se obtuvieron 3 exopolisacáridos liofilizados, los resultados indicaron que existe variación en cuanto a sus características fisicoquímicas el EPS de coco presentó la mayor cantidad de carbohidratos con un valor de 357.40 mg/g<sub>(EPS)</sub>, mientras que de proteína el EPS de soya presentó la mayor cantidad con un valor de 6.90 mg/g<sub>(EPS)</sub>, las principales grupos funcionales presentes en los EPS fueron grupos O-H y -NH<sub>2</sub>, el EPS de coco fue el que presentó el peso molecular más alto con un valor mayor a  $1.0 \times 10^6$  Da, los 3 EPS presentaron el mayor porcentaje de solubilidad a un pH de 3, y a pH 7 el potencial zeta presentó una carga de mayor magnitud para los 3 EPS; se comprobó que la capacidad emulsionante de los EPS en presencia del carotenoide (rodofila) mejoro y se observo que las emulsiones fueron estabilizadas mostrando una variación menor del diámetro de gota al cabo del almacenamiento de 30 días, presentando mejores características de emulsionantes el EPS de soya. Se concluyo que las diferencias existentes en cada una de las características encontradas de los EPS se deben a que cada uno presenta en su composición fuentes de carbono y proteínas diferentes.

# 1. INTRODUCCIÓN

El kefirano es un polisacárido producido por la microbiota del cultivo de kéfir, contiene cantidades aproximadamente iguales de glucosa y galactosa y es soluble en agua (Micheli et al., 1999). La observación microscópica de los granos de kéfir revela que el kefirano encapsula bacterias ácido-lácticas, ácido-acéticas y levaduras involucradas en la fermentación de la leche mejorando las propiedades viscoelásticas de los geles de la leche fermentada (Piermaria et al., 2009). Se han asociado diversas propiedades biológicas a este producto. Por ejemplo, se ha reportado que el kefirano tiene propiedades antimicrobianas y cicatrizantes, además de capacidad de reducir la presión arterial y el colesterol en la sangre, así como la capacidad de retardar el crecimiento de tumores (Vinderola et al., 2006), y como un antígeno oral, induciendo la respuesta de la mucosa intestinal (Medrano et al., 2008).

Su uso es cada vez mayor en la industria alimentaria como un agente emulsificante y texturizante (Micheli et al., 1999). Entre todos los materiales, los más utilizados como agentes emulsificantes en aplicaciones alimentarias son los polisacáridos, las proteínas y los lípidos. Una de las razones más importantes para la emulsificación de los ingredientes activos es proporcionar una estabilidad mejorada en los productos finales y durante el procesamiento. (Nedovic et al., 2011). En este sentido, los sistemas dispersos como las emulsiones, tienen gran aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica, debido a su uso como materiales para la encapsulación, solubilización, secuestro y de liberación controlada de ingredientes activos. Dentro de los materiales emulsificantes y estabilizantes de sistemas dispersos, el grupo de los polisacáridos destaca debido a sus propiedades superficiales. Este tipo de biopolímeros pueden adsorberse en la superficie de un glóbulo de aceite y brindarle estabilidad cinética, principalmente a través de mecanismos de disminución de la tensión interfacial entre ambas fases inmiscibles (agua-aceite) y mejorando la elasticidad de la membrana biopolimérica interfacial que rodea las gotas de fase dispersa. Sin embargo, la mayoría de los polisacáridos estabilizan las emulsiones simplemente aumentando la viscosidad de la fase continua. Los polisacáridos también se pueden asociar mediante enlaces covalentes o interacciones electrostáticas. La combinación de las propiedades de estos biopolímeros en condiciones apropiadas conduce a una mayor estabilidad de las emulsiones.

Las nuevas emulsiones estabilizadas con biopolímeros tienen un gran potencial en el campo alimentario y farmacéutico para la encapsulación, la digestión controlada y la liberación dirigida de componentes activos -(Bouyer et al., 2012).

En el presente trabajo, se plantea utilizar al exopolisacárido producido por los microorganismos presentes en el grano de kéfir (kefirano) como un agente emulsionante y estabilizante de emulsiones tipo aceite-en-agua (O/W), y su aplicación en la encapsulación y protección de moléculas biológicamente activas como carotenoides como compuestos modelo.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Exopolisacáridos

Los exopolisacáridos (EPS) son polisacáridos de cadena larga producidos extracelularmente principalmente por bacterias y microalgas. Consisten en unidades ramificadas y repetitivas de azúcares o derivados de azúcar. Estas unidades son principalmente glucosa y galactosa en proporciones (1:1), manosa, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina y ramnosa. Los EPS, a diferencia de los polisacáridos capsulares estructuralmente similares, no se unen permanentemente a la superficie de la célula microbiana y se secretan en su entorno durante el crecimiento como un líquido viscoso, desempeñan un papel vital en la protección de los microorganismo contra condiciones adversas como la desecación, escasez de nutrientes, presencia de compuestos tóxicos, bacteriófagos y estrés osmótico (Looijesteijn et al., 2001). Además, desempeñan un papel clave en la adhesión inicial y anclaje de las bacterias a las superficies sólidas, el secuestro de cationes, la formación de biopelículas, el reconocimiento celular y la patogenicidad.

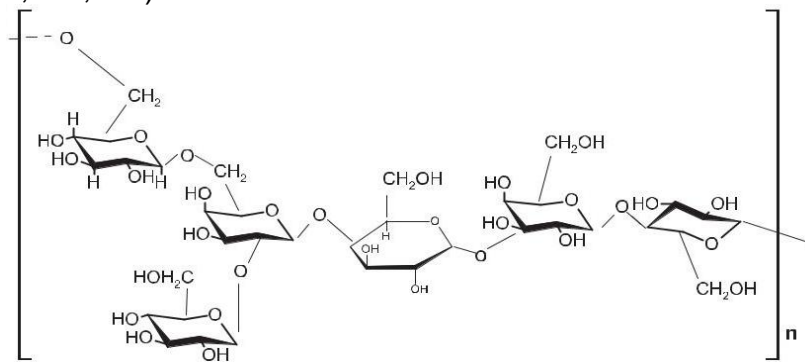
Los EPS se clasifican según su composición en homopolisacáridos (HoPS) los cuales están formados por un sólo tipo de monosacárido; por ejemplo D-glucosa o D-fructosa y se pueden dividir en dos grupos principales: glucanos y fructanos, donde se incluyen dextrano, mutano, alternano, reuterano, pululano, levano, inulina, curdlano, entre otros. Por otra parte, los heteropolisacáridos (HePS) que son mezclas de dos o más monosacáridos y comprenden a las gomas gellan, xantan y a los kefiranos (Jolly et al., 2002). Los EPS son utilizados a nivel industrial en la producción de derivados lácteos fermentados, ya que contribuyen a la textura, reología, sabor, percepción sensorial y estabilidad final del producto (Shene & Bravo, 2006); (Serna & Rodríguez, 2005). Además, los EPS han sido utilizados extensivamente como geles, emulsificantes y suspensiones de estabilizantes. También se les ha atribuido efectos antitumorales, antiúlceras, inmuno-estimulatorios y colesterolémicos (Tavaria et al., 2002).

### 2.2 Kefirano

De manera simplificada, el grano de kéfir o kefirano se puede definir como una mezcla de un polisacárido y péptidos. Este es producido por la microbiota presente en los granos de kéfir, que consiste principalmente de bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA) y levaduras (Kooiman, 1968; Micheli et al., 1999). El polisacárido consiste en proporciones

equimolares de glucosa y galactosa (Micheli et al., 1999). Su peso molecular puede llegar a ser de  $10^7$  Da, con comportamiento newtoniano en soluciones diluidas y pseudoplástico a concentraciones más altas (Piermaria et al., 2008). Tiene propiedades antibacterianas, antimicóticas, antitumorales y puede reducir la presión arterial (Maeda et al., 2004).

Su potencial de aplicación es alto, lo que ha llevado a que sea utilizado en diversos desarrollos tecnológicos. Por ejemplo, la producción del exopolisacárido por *Lactobacillus sp.* KPR 167 aislado de granos de kéfir fue patentado (US Patente US 5,204,247). También se ha patentado el uso del kefirano como material portador para el suministro de moléculas activas (US Patente US 8,088,605).



**Figura 1.-** Estructura Química del Kefirano (Kooiman, 1968).

### 2.3 Emulsiones

Las emulsiones son mezclas de al menos un líquido disperso en otro en forma de gotas, siendo ambos líquidos inmiscibles o poco miscibles entre sí (Tadros & Vincent, 1983). El principal interés de las emulsiones es encapsular una molécula activa hidrofílica o lipofílica dentro de la fase dispersa, asegurando así su protección contra el estrés ambiental y la degradación de agentes como prooxidantes como el oxígeno, luz, enzimas, acidez, temperatura, etc., permitiendo obtener un vehículo de acarreo, protector y con liberación controlada ante estímulos específicos. Las emulsiones se pueden clasificar de acuerdo con la disposición espacial de las fases involucradas; la fase dispersa es aquella que normalmente se encuentra en menor proporción y constituye la gotas de la emulsión, y la fase continua que está constituida por la fase que rodea las gotas y normalmente contiene moléculas con actividad superficial como los tensoactivos, gomas, proteínas y exopolisacáridos, compuestos responsables de brindar estabilidad cinética a las emulsiones, y se denominan como emulsiones aceite-en-agua (O/W) cuando el aceite está en la fase dispersa, o agua-en-aceite, si la fase acuosa es la que constituye las pequeñas gotas de la

emulsión. Dentro de las aplicaciones que tienen las emulsiones, estos sistemas permiten enmascarar olores y sabores desagradables de alimentos o compuestos de interés (Ley, 2008); (Brime et al., 2002), de un medicamento, mejorando la absorción a través de la piel (Kogan & Garti, 2006) o comportarse como sistemas desintoxicantes para atrapar moléculas tóxicas como contaminantes y pesticidas, en la fase interna (Grossiord & Stambouli), 2008). Además, la formación de emulsiones puede ser el paso inicial para obtener sistemas de nano y micropartículas para la focalización de fármacos (Grigoriev et al., 2008). Las emulsiones se pueden clasificar en dos grupos: emulsiones simples y emulsiones múltiples. Se pueden definir dos clases de emulsiones simples, a saber, aceite en agua (O/ W) y agua en aceite (W/O). Las emulsiones múltiples constituyen un sistema más sofisticado. Las más simples son las emulsiones dobles de aceite en agua en aceite (O/W/O) o agua en aceite en agua (W/O/W) (Grossiord & Sellier, 2001).

Las proteínas y los EPS de los alimentos son las dos entidades estructurales clave en los materiales alimenticios. En general, las interacciones entre proteínas y polisacáridos en medios acuosos pueden conducir a sistemas de una o dos fases, este último generalmente se observa mayormente. Los complejos de proteína-polisacárido exhiben mejores propiedades funcionales que las proteínas y los polisacáridos solos. En consecuencia, las interesantes propiedades emulsionantes de estos complejos se pueden aprovechar en diversas aplicaciones en la industria alimentaria (Schmitt et al., 2010).

## **2.4 Carotenoides**

Los carotenoides son compuestos naturales presentes en diversas estructuras de plantas y en gran variedad de animales, algas, hongos y bacterias. Estos pigmentos son responsables del color de flores y frutos (para favorecer la polinización y dispersión de semillas), o de estructuras animales como las plumas y picos de algunos pájaros, el exoesqueleto de crustáceos y el músculo o la piel de algunos peces. Son considerados compuestos indispensables para la vida, fundamentalmente debido a las funciones que llevan a cabo en relación con la fotosíntesis (captación de luz, foto protección). Los antioxidantes naturales presentes en los vegetales y en algunos animales han sido estudiados por su papel en la protección de diversas enfermedades como ciertos tipos de cáncer, enfermedad cardiovascular y la degeneración macular relacionada con la edad. La evidencia

experimental sugiere que estos compuestos son importantes en la protección de macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo. La búsqueda de nuevos y más eficientes antioxidantes al parecer va dirigida a los carotenoides, que a través de su consumo podría disminuir la incidencia de ciertas enfermedades (Meléndez et al., 2007).

Además, representan una fuente de provitamina A, con actividad antioxidante en la célula al actuar en la neutralización de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas como parte del metabolismo celular. Estructura química y propiedades Los carotenoides son tetra terpenos constituidos por múltiples unidades– isoprenoides– con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Son moléculas lipofílicas, con nula solubilidad en agua. La propiedad de absorber luz se deriva de la presencia de 7 o más enlaces dobles conjugados con posibilidad de absorber luz visible, con colores que van del amarillo al rojo. La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones. En presencia de oxidantes fácilmente se forman radicales libres de vida corta. Los radicales libres como el oxígeno  $O_2$  e hidroxilo OH son especies altamente reactivas capaces de iniciar la peroxidación de lípidos, –inactivar proteínas, –o causar daño molecular de ADN o ARN. Se ha demostrado que los carotenoides– inactivan oxígeno singlete, hidroxilo, peróxidos y otros oxidantes mediante un proceso en el que se transfiere la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide. Este puede volver al estado basal liberando calor o modificando la molécula basal. Existen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales (ejemplo  $\beta$  caroteno, licopeno) y las xantofilas que contienen oxígeno en sus anillos terminales (ejemplo luteína) (Carranco et al., 2011).

Los factores que influyen en la presencia de carotenoides son el manejo pre–cosecha, estado de madurez, así como las operaciones de procesado y conservación. Entre éstos la temperatura e intensidad de la luz tienen una gran influencia en el contenido de los carotenoides. Durante el procesamiento y almacenamiento la oxidación y los cambios estructurales al aplicar calor son los principales factores que los alteran. El empaque de alimentos congelados y esterilizados en atmósferas libres de oxígeno ayuda a mantener el contenido de carotenoides. Sin embargo, el tipo de suelo, riego y fertilización no afectan significativamente el contenido de éstos (Gracia et al., 2001).

**Tabla 1.** Fuentes de carotenoides.

<b>Carotenoides</b>	<b>Fuente de alimentos</b>
<b><math>\alpha</math>, <math>\beta</math> caroteno</b>	Zanahoria
<b>Licopeno</b>	Tomate
<b>Luteína/zeaxantina</b>	Alfalfa/maíz / huevo de gallina
<b>Violaxantina/luteína</b>	Naranja
<b>Astaxantina</b>	Salmon/crustáceos/levaduras y algas
<b>Cantaxantina</b>	Crustáceos

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que hoy en día se ha encontrado que los EPS tienen un alto potencial de aplicación en desarrollos tecnológicos en la industria alimentaria por sus propiedades de mejora a la salud; se propone aislar y purificar EPS producidos por el cultivo microbiano de kéfir y utilizarlos como agentes emulsionantes que sean capaces de actuar como un material portador de moléculas activas (carotenoides).

### **4. HIPÓTESIS**

Dadas las características propias de los EPS producidos por los granos de kéfir, estos funcionarán como agentes emulsionantes de compuestos biológicamente activos.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Obtener EPS a partir de 3 bebidas fermentadas por los granos de kéfir (leche, bebida de soya y bebida de coco), y utilizarlas como agentes emulsionantes.

### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Establecer las condiciones de producción de la biomasa (microorganismos) y rendimiento.
- Extraer y purificar los exopolisacáridos producidos por los granos de kéfir.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los exopolisacáridos obtenidos.
- Formular emulsiones aceite-agua y evaluar la estabilidad y funcionalidad de los exopolisacáridos por microscopía.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Propagación y obtención del exopolisacárido

#### 7.1.1 Preparación del medio e inoculación del cultivo de Kéfir

En matraces de 500 mL conteniendo 200 mL agua destilada fueron esterilizados en autoclave a 121 °C (15 psi) durante 15 min, posteriormente se disolvieron 20 g de leche entera en polvo (Alpura®). Se inoculó con, 1 g de los granos de kéfir y se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 24 h. La leche fermentada fue filtrada para separar la biomasa y se, almacenó en refrigeración (4 °C); este procedimiento se repitió hasta obtener la cantidad de exopolisacárido suficiente para los siguientes análisis. El mismo procedimiento se utilizó para el caso de la bebida de coco (Calahua®) y bebida de soya (Ades®), agregando 200 mL de cada una a los matraces.

#### 7.1.2 Purificación del Exopolisacárido

A 500 mL de leche fermentada (bebida de coco y bebida de soya) libre de células, se le adicionaron 83.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 80% (p/v) se mezcló y centrifugó a 10,000 rpm, durante 30 min. Posteriormente el sobrenadante se recolectó y se ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio (NaOH) 4 N. Una vez ajustado el pH, se agregaron tres volúmenes de etanol absoluto; se mezcló y se dejó reposar durante 20 min. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 4,000 rpm, durante 20 min y se re-suspendió el precipitado en 40 mL de agua destilada, y se dializó por 48 h en agitación continua. Las muestras resultantes de la diálisis fueron liofilizadas y almacenadas en refrigeración hasta su posterior uso (Rimada & Abraham, 2003); (Ruas-Madiedo & Reyes-Gavilan, 2005).

## **7.2 Caracterización fisicoquímica**

### **7.2.1 Contenido de azúcares totales**

El contenido de azúcares totales en los EPS obtenidos de las tres bebidas (L, C, y S) fue determinado mediante el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956). Brevemente, se pesaron 2.3 mg de EPS y se adicionaron en 10 mL de agua destilada, posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de la dispersión de EPS y se le añadió 1 mL de una solución de fenol al 5% (p/v), agitando con un vórtex. Posteriormente se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando en un vórtex, las muestras se dejaron reposar hasta que su temperatura alcanzó los  $25 \pm 1$  °C. Cada una de las muestras tratadas fue llevada a un espectrofotómetro (UV/Vis marca único modelo SQ-2800) y la absorbancia fue tomada a una longitud de onda de 490 nm. Las absorbancias medidas fueron comparadas contra una curva de calibración de glucosa a intervalos de concentración de 0 a 100 µg/mL.

### **7.2.2 Contenido de proteínas**

El contenido de proteína en los EPS de las tres bebidas fermentadas (L, S y C) fue evaluado siguiendo el método de Bradford (1976). Se pesaron 2.3 mg de EPS y se adicionaron en 10 mL de agua destilada, posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de la dispersión de EPS y se mezcló con 1 mL del reactivo de Bradford, agitando en un vórtex y dejando reposar en oscuridad por 5 min. La absorbancia de las muestras fue medida en un espectrofotómetro (UV/Vis marca único modelo SQ-2800) a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados obtenidos fueron comparados con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) a intervalos de concentración de 0 a 60 µg/mL.



### **7.2.3 Contenido de cenizas**

Se pesaron 20 mg de EPS obtenido de cada bebida fermentada (L, C y S) y se colocaron en crisoles llevados previamente a peso constante. Las muestras fueron colocadas en una mufla y calcinadas a 550 °C durante 3 h. Las muestras fueron retiradas una vez que se observó la presencia de cenizas blancas o ligeramente grises. Los crisoles fueron colocados en un desecador para permitirles llegar a temperatura ambiente (25 °C). Una vez frías, se pesaron (Kirk et al., 1996).

### **7.2.4 Contenido de humedad**

Se pesaron 20 mg de EPS obtenido de cada bebida fermentada (L, C y S) se colocaron en charolas de aluminio llevadas previamente a peso constante, las muestras se colocaron en un horno a 110 °C durante 3 h, posteriormente se colocaron en un desecador hasta que alcanzaron temperatura ambiente (25 °C) y el peso de la muestra seca se registró. La diferencia entre el peso de la muestra inicial y seca determinó como el contenido de humedad presente en la muestra (Kirk et al., 1996).

### **7.2.5 Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)**

Los EPS obtenidos de cada bebida fermentada (L, S y C) fueron analizados por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), en un FT-IR Frontier (Pekin Elmer, U.S.A) acoplado a un accesorio ATR. Los espectros de cada muestra fueron obtenidos en un intervalo de frecuencia de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , donde los principales grupos funcionales presentes en la estructura de los EPS fueron elucidados (Radhouani et al., 2018).

### **7.2.6 Determinación del Peso Molecular**

El peso molecular (PM) de los EPS obtenidos de cada bebida fermentada (L, S y C) fue obtenido mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) empleando un sistema HPLC. La separación se llevó a cabo utilizando una columna PLaquagel-OH 8 $\mu$ m 300x7.5 mm (Polymer Laboratories Varian Inc), a una temperatura de 40 °C, se utilizó agua desionizada como fase móvil a un flujo de 0.4 mL/min. Los EPS fueron solubilizados en búfer de fosfatos a pH 3 a 0.01M, y se inyectó una alícuota de 1  $\mu$ L de EPS previamente filtrado en una membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m. El peso molecular fue estimado al comparar el tiempo de retención de las señales observadas con una curva estándar de peso molecular de dextranos a intervalos de concentración de 738 a 788000 g/mol (Abid et al., 2018).

### **7.2.7 Propiedades térmicas**

Para el análisis térmico de los EPS, se tomaron muestras de 5 mg de EPS liofilizado y se colocaron en celdas de aluminio, las cuáles fueron selladas herméticamente y debidamente pesadas. Las muestras se colocaron en el portamuestras de un calorímetro diferencial de barrido (DSC) (Q1000, TA Instruments, USA), previamente calibrado con un estándar de Indio<sub>7</sub> y se sometieron a un barrido de temperatura de 20 a 200 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. A partir de los termogramas obtenidos se determinó la temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) y la temperatura de degradación (T<sub>d</sub>) de las muestras- (Abid et al., 2018).

## **7.3 Propiedades superficiales de EPS**

### **7.3.1 Solubilidad de los EPS**

Se pesaron 100 mg de EPS obtenido de cada bebida fermentada (L, S y C) y se dispersaron en 2 mL de agua desionizada empleando agitación magnética. Posteriormente, el pH de la dispersión se ajustó en un intervalo de 3-9 mediante la adición de HCl (0.1N) o NaOH (0.1N), dejando la muestra bajo condiciones de agitación durante al menos 12 h para permitir la completa hidratación del EPS.

Posteriormente, las muestras resultantes fueron centrifugadas a 10, 000 rpm por 10 min (centrífuga Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH, Alemania). La fase del sobrenadante fue decantada y secada en un horno a 50 °C hasta llegar a peso constante. El porcentaje de EPS soluble fue determinado como la fracción másica del EPS presente en el sobrenadante respecto a la cantidad de EPS utilizado al inicio (Abid et al., 2018).

### **7.3.2 Potencial zeta ( $\zeta$ )**

El potencial zeta ( $\zeta$ ) de las dispersiones de los EPS (1% p/p) se determinó a 25 °C empleando un equipo NanoZetasizer NS (Malvern Instruments, R.U), el pH de las dispersiones de EPS, se ajustó a 3.0 y 7.0, debido a que el primero representa el pH donde se observa la mayor solubilidad del EPS y el segundo resulta del pH al cual se obtuvo el EPS dializado (Exarhopoulos et al., 2018).

### **7.3.3 Tensión interfacial dinámica**

Se determinó la tensión interfacial dinámica utilizando el método descrito por Tang y Shen (2015) con ligeras modificaciones, en un tensiómetro de gota pendiente OCA-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Alemania). Brevemente, el montaje de la interfase agua-aceite se preparó colocando aceite vegetal de canola (Capullo<sup>®</sup>), previamente filtrado a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ , en una celda de vidrio óptico de 10x10x10 mm. Por otra parte, se prepararon dispersiones de cada uno de los EPS obtenidos de las bebidas fermentadas (L, S y C) a una concentración de 1.0 % (p/p), los cuales se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Co., Milford) se colocaron en una jeringa de dosificación de 500  $\mu\text{L}$ . Posteriormente la aguja de la jeringa se sumergió en la celda conteniendo el aceite y se procedió a formar una gota de la dispersión acuosa con un volumen 30  $\mu\text{L}$ . La disminución en la tensión interfacial ( $\sigma$ ) se monitoreó durante 180 min (Abid et al., 2018).

## **7.4 Formación de emulsiones O/W**

Se prepararon dispersiones de EPS a un pH de 3 a una concentración del 5% (p/p); y se mantuvieron bajo agitación durante 4 h a temperatura ambiente (25 °C) y se almacenaron a 4 °C por 12 h para asegurar la completa hidratación. Las distintas emulsiones fueron preparadas con una fracción másica de fase dispersa del 5% ( $\phi=0.05$ ), donde la fase dispersa consistió en aceite vegetal de canola solo o en combinación con carotenoides de rodofila fase oleosa (O), la cual se adicionó a la fase continua (W, dispersión de EPS) por goteo a una velocidad de homogeneización de 7,900 rpm en un homogeneizador Ultra-Turrax T10 basic (IKA Works, Staufen, Alemania). Al concluir con la adición de la fase oleosa, la velocidad del homogeneizador se llevó a 11,400 rpm durante 10 min en un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra (Han et al., 2015).

### **7.4.1 Morfología y distribución de las gotas en las emulsiones O/W**

La morfología de las emulsiones O/W se examinaron con un microscopio óptico (OLYMPUS BX4S) bajo un objetivo de 100X, acoplado a una cámara AxioCam (Erc5s). Las emulsiones frescas se diluyeron a razón de 1:10 en agua desionizada, y se colocó una gota de la emulsión entre las láminas de un portaobjetos y cubreobjetos. Se obtuvieron las respectivas micrografías para cada muestra y a través del software de análisis de imágenes ZEN 2012 (Blueedition, System) se determinó el diámetro promedio ( $d_{10}$ ) y la distribución de diámetro de las gotas de las emulsiones estabilizadas con los EPS (Han et al., 2015).

### **7.4.2 Estabilidad de las emulsiones O/W**

El diámetro promedio de gota se monitoreó por 22 y 30 días, el cambio en esta propiedad se ajustó a una cinética de primer orden (Ruíz-Ramos et al., 2006) y se obtuvo la constante de la cinética de coalescencia ( $k_C$ ).

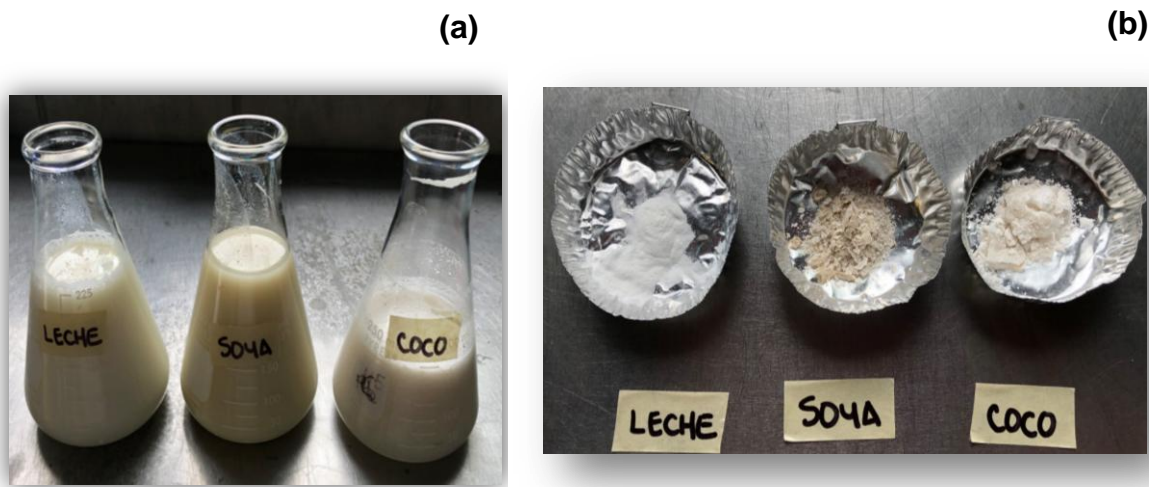
## 7.5 Análisis estadístico

Todas las pruebas fueron realizadas al menos por duplicado. Se realizó un ANOVA y análisis de comparación de medias mediante la prueba de Tuckey a una significancia de  $P < 0.05$ . Los análisis fueron realizados en el software SPSS 15.0 (LEAD Technologies, Inc.).

## 8. Resultados

### 8.1 Obtención y caracterización fisicoquímica de EPS

A partir de las tres bebidas, leche (L), bebida de soya (S) y bebida de coco (C), que se fermentaron con los granos de kéfir, se obtuvieron tres EPS con características diferentes. En la Figura 2 se muestran las imágenes de las bebidas fermentadas (a) y de los EPS liofilizados (b).



**Figura 2.** a) Bebidas después de 24 h de fermentación con granos de kéfir, b) EPS extraídos y purificados de cada una de las bebidas.

Se puede observar que el EPS de L se obtuvo con una coloración blanca y como un polvo fino, mientras que el EPS de C presentó una coloración ligeramente amarilla, y la bebida fermentada de soya (S) presentó una coloración beige.

En la Tabla 2 se muestra la caracterización fisicoquímica de los EPS obtenidos de las tres bebidas fermentadas.

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas de los EPS obtenidos de las bebidas fermentadas por el cultivo de kéfir.

	Leche	Coco	Soya
<b>Rendimiento</b> [mg/500 mL*]	2.20 ± 0.32 a	2.12 ± 0.54 a	5.54 ± 0.26 b
<b>Carbohidratos</b> [mg/g <sub>EPS</sub> ]	233.60 ± 13.04 b	357.40 ± 21.14 c	78.18 ± 16.82 a
<b>Proteína</b> [mg/g <sub>EPS</sub> ]	1.32 ± 0.59 a	5.40 ± 0.78 b	6.90 ± 0.32 c
<b>Humedad</b>	0.17 ± 0.06 a	0.33 ± 0.21 a	0.33 ± 0.06 a
<b>Cenizas</b>	13.23 ± 3.83 a	10.13 ± 0.12 a	11.77 ± 0.49 a

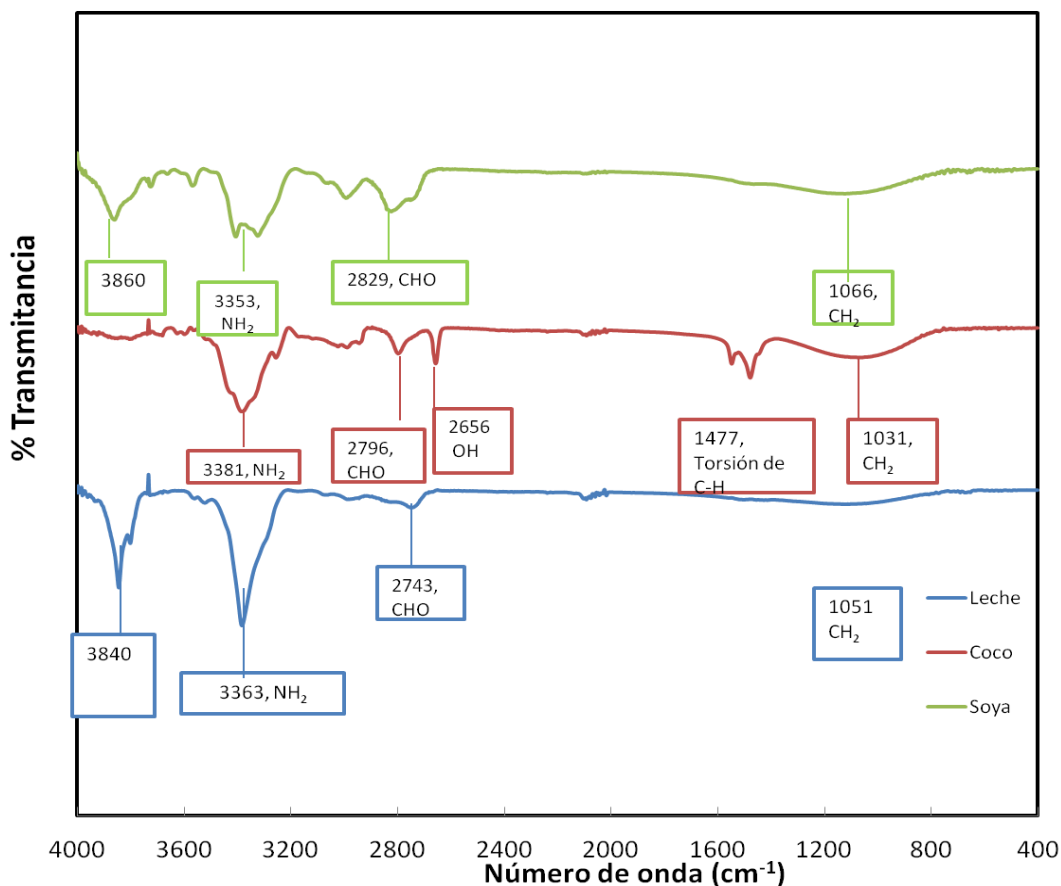
\* Por cada 500 mL de bebida fermentada. Letras diferentes en la misma fila significa diferencia significativa entre muestras (P<0.05).

El EPS obtenido de la bebida de soya mostró el mayor rendimiento en base seca del EPS, mientras que la leche y la bebida de coco no mostraron diferencias significativas, esta diferencia puede deberse a las diferencias en la composición entre las distintas bebidas, debido a que la fuente de carbono y nitrógeno son diferentes entre ellas, afectando la síntesis y estructura del EPS (Font de Valdez et al., 2003; Ruas-Madiedo y Reyes Gavilan, 2005).

Todos los EPS mostraron un alto contenido de carbohidratos totales con una fracción pequeña de proteína, estos resultados concuerdan con lo reportado por diversos autores para este tipo de biopolímeros (Micheli et al., 1999; Raungsomboon et al., 2006). Cabe mencionar que el EPS de la bebida de coco fue el que presentó el mayor contenido de azúcares totales mientras que el EPS de la bebida de soya mostró el menor contenido de azúcares pero el mayor contenido de proteína asociado a la molécula. En términos del contenido de humedad y cenizas, no se observaron diferencias significativas en los contenidos de estas propiedades. Estas características químicas presentes en los EPS nos servirán para que puedan ser utilizados como agentes emulsionantes, ya que como se puede ver en la Tabla 2 cada exopolisacárido presenta diferente composición de acuerdo a las características propias de cada fuente, en el caso del EPS de bebida de coco presento mayor cantidad de azucares totales y esto puede deberse a que en su composición, esta bebida tiene mayor cantidad de carbohidratos complejos tales como pentosanas y galactomananos y de rápida absorción como fructosa, glucosa, galactosa rafinosa entre otros, que durante la purificación hubieran quedado una fracción de carbohidrato presente, en cuanto a la cuantificación de proteínas el que presento mayor cantidad de proteínas fue el EPS de bebida de soya lo cual se puede explicar porque la soya contiene la mayor cantidad de proteínas como aminoácidos tales como triptófano, treonina, isoleucina, leucina, metionina, ácido aspártico, glicina entre muchos otros .

## **8.2- Espectroscopia de Infrarrojo a los EPS**

Se identificaron algunos de los grupos funcionales más representativos presentes en las estructuras de los EPS (Figura 3).



**Figura 3.** Espectro de Infrarrojo de los EPS obtenidos de la fermentación de leche (azul), bebida de coco (rojo) y bebida de soya (verde).

En los tres casos se destacan bandas que corresponden tanto con enlaces O-H como de grupos amino (-NH<sub>2</sub>), las cuales se suelen encontrar superpuestas en la región en torno a 3300 cm<sup>-1</sup>. También se pueden observar en los espectro mostrados, señales que corresponden con estiramientos del enlace C-H, que se pueden deber también a enlaces de este tipo en carbono carbonílico. Sin embargo, no se logran observar las bandas correspondientes a los enlaces C=O, lo cual se puede deber a la metodología seguida para la realización de las determinaciones. Se destacan las bandas de torsión para enlaces C-H, tanto para metilos (1477 cm<sup>-1</sup>) como para metilenos (1066-1031 cm<sup>-1</sup>).

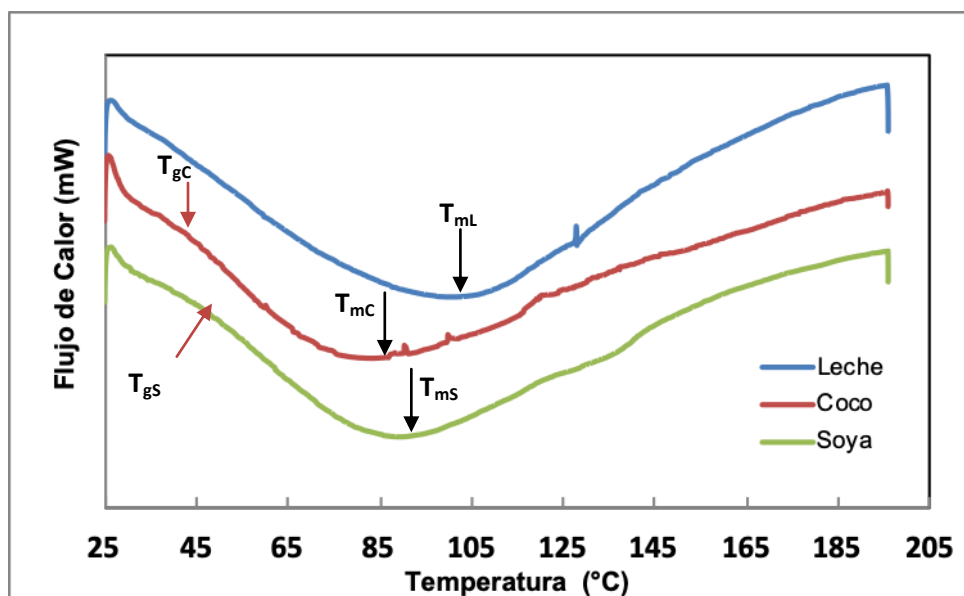


De los espectros obtenidos, el que más información nos proporcionó fue el de la bebida de coco. Este presentó varias bandas características de EPS de kéfir en leche, comparadas con lo reportado por Piermaria et al. (2011) y Hasheminya et al. (2018). En esos trabajos se muestran espectros de IR con señales muy bien definidas para grupos hidroxilo (O-H, 3700–3100  $\text{cm}^{-1}$ ), banda de estiramiento de enlace C-H (3000–2800 y 1100,  $\text{cm}^{-1}$ ), grupos carbonilo (C=O, 1620  $\text{cm}^{-1}$ ), enlaces C-H de grupos metilo ( $\text{CH}_2$ , 1423  $\text{cm}^{-1}$ ), así como señales características de estiramientos de enlaces C-O-C y C-OH (1135–1070,  $\text{cm}^{-1}$ ). Sin embargo, es de destacar que también es clara la presencia de grupos amino ( $\text{NH}_2$ , 3300  $\text{cm}^{-1}$ ), la cual debe tener su explicación en la fracción proteica presente en los productos obtenidos y detectados en el análisis químico de la composición tabla 2.

Finalmente, es importante resaltar que los grupos funcionales en los polisacáridos los hacen flexibles y propensos a diversas modificaciones, lo cual es muy importante para aplicaciones médicas. Además, el kefirano como hidrogel pueden ser de fácil obtención, lo que los convierte en excelentes candidatos para la ingeniería tisular y medicina regenerativa, así como otras aplicaciones de biomateriales. Además de las propiedades químicas, la aplicabilidad del polisacárido en el campo de la ingeniería de tejidos depende en gran medida de su comportamiento físico (Radhouani et al., 2018).

### **8.3. Determinación de propiedades térmicas**

Se determinaron las propiedades térmicas de los EPS por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en la Figura 4 se muestran los termogramas correspondientes.



**Figura 4.** Termograma: Tg (temperatura de transición vítrea), Tm (temperatura de fusión del biopolímero) de los EPS obtenidos de la fermentación de leche (azul), bebida de coco (rojo) y bebida de soya (verde).

Dentro de las propiedades térmicas de los materiales, la temperatura de transición vítrea (Tg), que indica si un polímero se somete a un proceso térmico, en algún momento alcanzará su transición vítrea y sus propiedades mecánicas cambian de las de un material sólido cristalino a las de un material elástico, debido a los cambios en la movilidad de su estructura debido al cambio de temperatura. La ubicación de esta temperatura normalmente se encuentra asociada con un cambio de pendiente en el flujo de calor. En este sentido, los EPS de bebida de coco y de soya mostraron distintos valores de Tg's; para el caso del EPS obtenido de la leche fermentada, no se aprecia bien este cambio de pendiente y no fue posible establecer la presencia de este comportamiento.

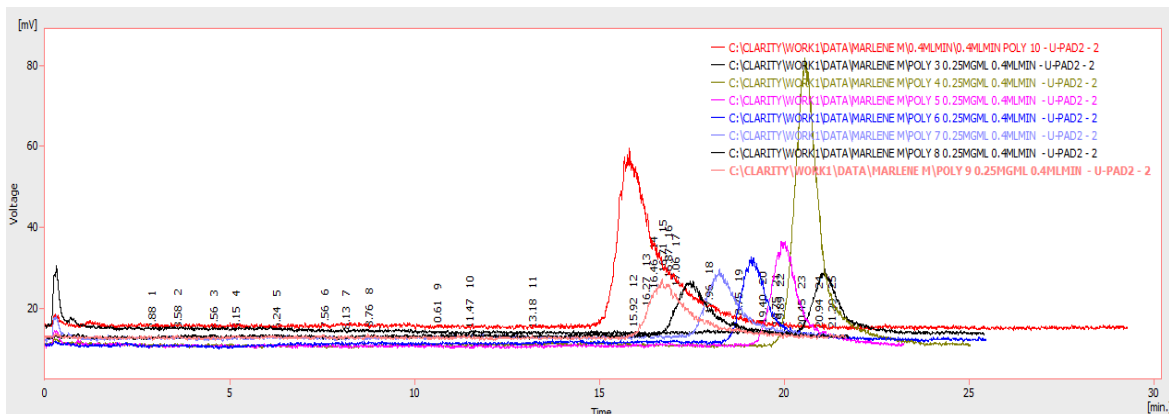
La segunda temperatura importante se encuentra cuando hay presencia de un punto de mínimo flujo de calor, donde la temperatura asociada a este punto mínimo se denomina como la temperatura de fusión del biopolímero (Tm), esta temperatura está relacionada con la movilidad del material de acuerdo con su ordenamiento estructural. Como es sabido, el fenómeno de fusión es un proceso endotérmico que requiere la absorción de calor, lo cual provoca que las regiones

cristalinas presentes en los materiales poliméricos se fundan sin aumentar la energía cinética promedio de las cadenas que ya están en la masa fundida. Este comportamiento se ve reflejado como un pico en la señal de temperatura, donde el área bajo la curva de dicha señal representa el calor latente de fusión. Respecto a los valores de  $T_m$  de los EPS se encontró que fue mayor para el caso de Leche ( $T_{mL} = 100.43 \text{ }^\circ\text{C}$ ), seguido bebida de soya ( $T_{mS} = 87.20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y bebida de coco ( $T_{mC} = 81.40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Estas diferencias en las propiedades térmicas pueden estar relacionadas con las diferencias de composición de los EPS como es la relación en el contenido de carbohidratos-proteína, el tipo de azúcares y aminoácidos que conforman estas estructuras; además de las diferencias en el arreglo estructural que tengan los materiales (Höhne et al., 1996). Los resultados obtenidos son comparables con lo reportado por (Radhouani et al., 2018), quienes reportaron una temperatura de fusión de  $98.7 \text{ }^\circ\text{C}$  para un EPS extraído de una leche fermentada por cultivos de kéfir, y que este pico de naturaleza endotérmica podría estar relacionada con la naturaleza hidrofílica de los grupos funcionales en el EPS.

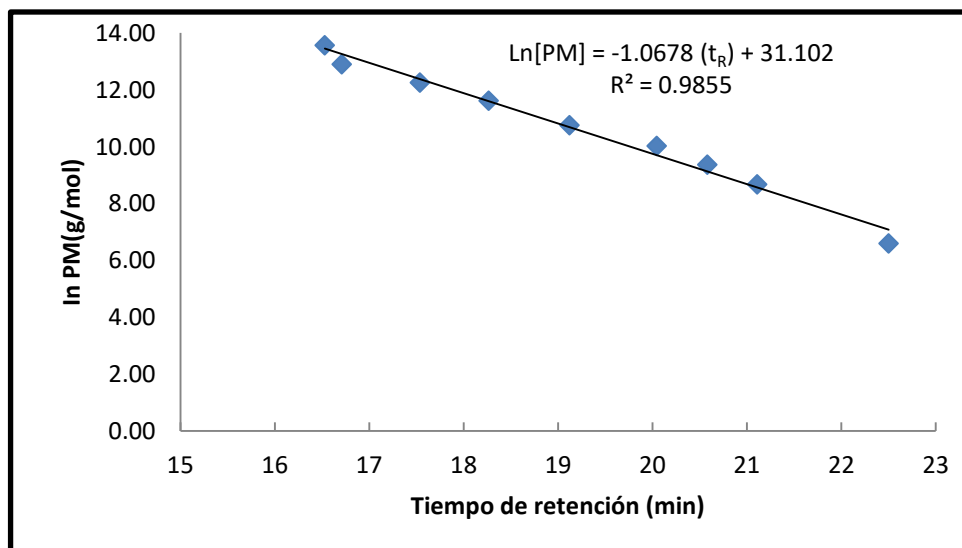
#### 8.4. Peso molecular de los EPS

El peso molecular de los EPS se determinó por cromatografía de exclusión molecular, mediante el uso de una curva de calibración de estándares de carbohidratos de peso molecular conocido. En la Figura 5 se muestra en cromatograma obtenido para los estándares de carbohidratos (Fig. 5a) y la construcción de la curva de PM vs tiempo de retención (Fig. 5b).

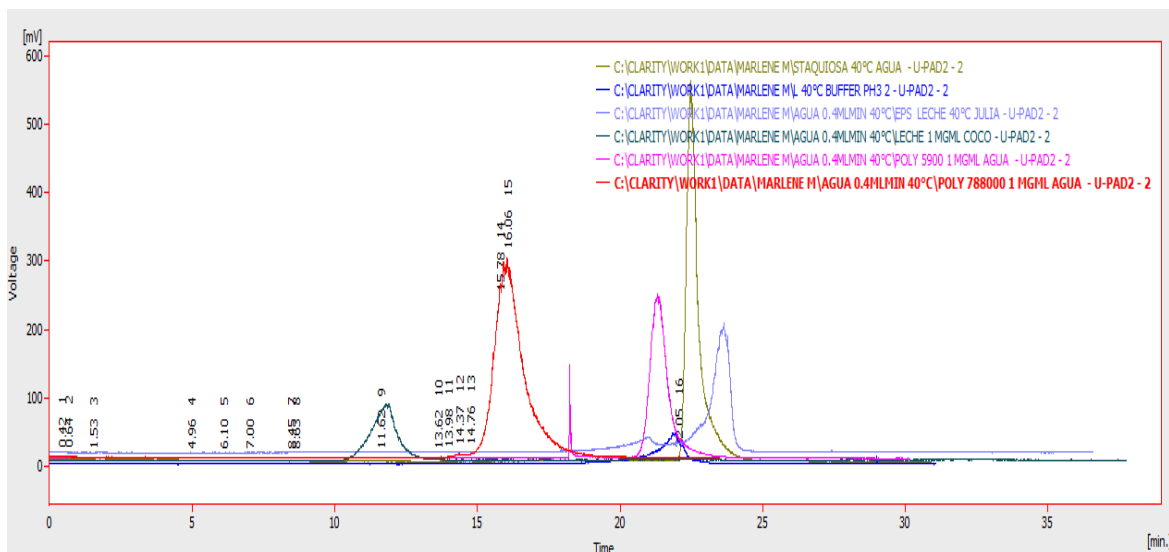
(a)



(b)



(c)



**Figura 5.** a) Cromatograma de estándares de PM utilizados, b) Curva de peso molecular y tiempo de retención, c) Cromatogramas de EPS obtenidos de leche fermentada (azul fuerte), bebida de coco fermentada (verde azulado), estándar de estaquirosa (verde agua), poly 4 (rosa) y poly 10 (rojo).

En la Figura 5c se muestra el cromatograma obtenido para los diferentes EPS obtenidos, se puede observar que existen diferencias en los tiempos de elución para cada muestra, y que algunos de ellos tienen más de un pico, lo cual indica que existen mezclas de polisacáridos de distinto peso molecular presente en cada

una de las muestras analizadas. En la Tabla 3 se muestran los tiempos de retención ( $t_R$ ) de cada una de las muestras y su respectivo PM calculado de acuerdo con la ecuación presente en la Figura 5b, derivada del uso de los estándares de peso molecular conocido.

**Tabla 3.** Tiempos de retención y PM de los EPS

<b>EPS</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b>PM (Da)</b>
<b>Leche</b>	21.84	$9.8 \times 10^5$
<b>Coco</b>	11.82	$> 1.0 \times 10^6$
<b>Soya</b>	22.8	$1.0 \times 10^6$

En el caso del EPS de la bebida de coco se observa que su  $t_R$  fue menor que los valores encontrados con los estándares, por lo que ya que no pudo ser interpolado en la curva de calibración, sin embargo se asume que su PM está por encima del PM más alto considerado en los estándares. El EPS de la bebida de soya y EPS de leche tuvieron menor PM que el de la bebida de coco. Trabajos previos sobre EPS de kéfir han sido reportados con PM que oscilan entre  $5.5 \times 10^4 - 1.0 \times 10^7$  Da (Ahmed et al., 2013; Exarhopoulos et al., 2018; Piermaria et al., 2008). El peso molecular de una sustancia, particularmente un polímero, es una característica química clave que puede influir dramáticamente en las propiedades mecánicas del material, especialmente la viscosidad y el comportamiento reológico, así como en la solubilidad (Radhouani et al., 2018) y en otras propiedades funcionales como su actividad superficial.

## **8.5 Evaluación de la actividad superficial**

### **8.5.1. Solubilidad y potencial zeta de los EPS**

Se determinó solubilidad de los EPS a diferentes pH's (3, 5, 7, 8), con la finalidad de establecer el pH donde las interacciones con medios acuosos resultaran favorecidas. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 4.** Efecto del pH sobre la solubilidad de los EPS obtenidos de diferentes bebidas fermentadas por cultivos de kéfir.

EPS	Solubilidad (%)			
	pH 3.0	pH 5.0	pH 7.0	pH 8.0
<b>Leche</b>	62.49 ± 2.89 a	35.64 ± 0.83 b	44.36 ± 0.53 a	35.66±0.65 a
<b>Coco</b>	63.02 ± 1.32 a	36.91 ± 0.65 b	45.22 ± 0.49 a	37.17 ± 0.40 b
<b>Soya</b>	67.95 ± 1.02 b	31.07 ± 0.19 a	45.28 ± 0.68 a	37.38 ± 0.85 b

Diferentes letras en la misma columna significan diferencias significativas entre medias (P<0.05)

Como se observa en la Tabla 4, los EPS mostraron que a un pH de 3 en agua desionizada, tuvieron el mayor porcentaje de solubilidad para los tres casos, esto puede relacionarse con la capacidad que tienen los polisacáridos de dispersarse en medios acuosos debido a la presencia de interacciones atractivas y repulsivas entre los polisacáridos y los contra iones que se encuentran presentes en el medio dispersante, haciendo que estos puedan mantenerse coloidalmente. Estas características están relacionadas con la composición (relación carbohidratos-proteínas) y tipo de estructura (lineal o ramificada) de los biopolímeros (Dickinson, 2003).

Por otra parte, se determinó el potencial zeta ( $\zeta$ ) de las dispersiones de los EPS a una concentración del 1% (p/p) a pH neutro y pH 3 como se observa en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Potencial zeta de los EPS obtenidos de diferentes bebidas fermentadas por cultivos de kéfir.

EPS	Potencial zeta (mV)	
	pH 3.0	pH 7.0
<b>Leche</b>	-3.88±0.89	-10.89±2.05
<b>Coco</b>	-8.30±0.75	-18.67±2.69
<b>Soya</b>	-3.51±0.76	-14.93±0.95

Se puede observar que a pH 7, el potencial zeta presentó una carga de mayor magnitud que la que se observa a pH 3, esto puede estar relacionado con la composición (relación carbohidrato-proteína) y los grupos funcionales asociados a las proteínas y carbohidratos, que influyen en la carga superficial de las moléculas de los EPS. Esta propiedad permite evaluar el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión (Hunter, 1988) y su relación con la estabilidad de sistemas coloidales. Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeños, un potencial zeta alto le confiere estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la agregación, cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera a la repulsión y se forman flóculos, en lugar de dispersión. Por lo tanto, los coloides con valores altos de potencial zeta se estabilizan electrostáticamente, mientras que, los coloides con bajos potenciales zeta tienden a coagular o flocular o bien a estabilizarse por otro tipo de efectos como los viscosos y estéricos. También la estabilidad de las dispersiones depende del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula coloidal y las fuerzas de atracción de Van der Waals (Batalla et al., 2014). Cabe mencionar que de los resultados obtenidos, el EPS de de la bebida de coco mostró la mayor magnitud de carga independiente del pH. Asimismo, cabe mencionar que la diferencia entre los valores de potencial zeta a los dos pHs evaluados se debe principalmente a la interacción y neutralización parcial de las cargas negativas en la estructura de los polisacáridos, grupos carboxilo asociados a la fracción carbohidrato, con los iones  $H^+$  del medio acuoso, mientras que a valores de pH neutros-alcálinos, el medio se encuentra ionizado negativamente por los  $OH^-$  del medio, potenciando la carga negativa de las moléculas de los EPS.

### **8.5.2 Tensión interfacial dinámica de los EPS**

Debido a que se busca que los EPS obtenidos de las distintas bebidas fermentadas puedan ser empleados como agentes emulsionantes, la determinación de la interacción de los EPS obtenidos de distintas bebidas fermentadas en interfases fluidas agua-aceite se evaluó a través del cambio de la tensión interfacial dinámica.

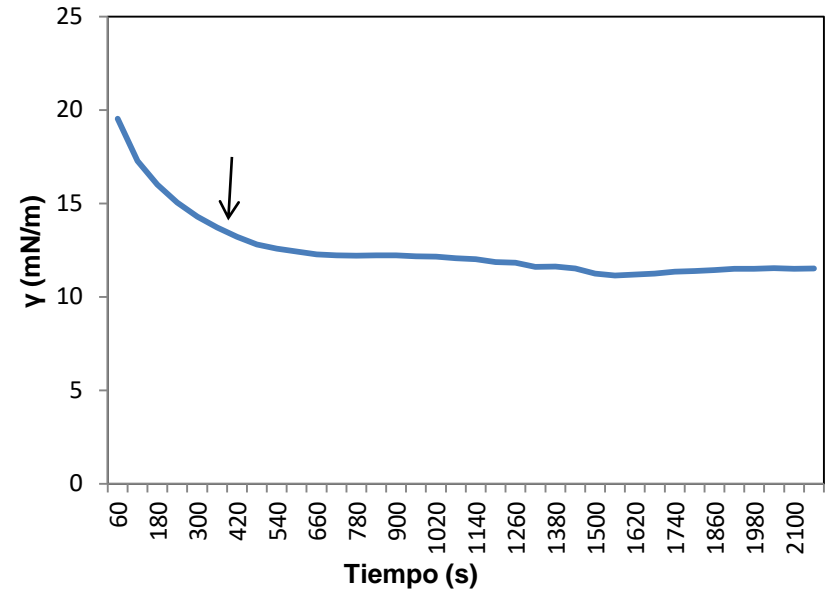
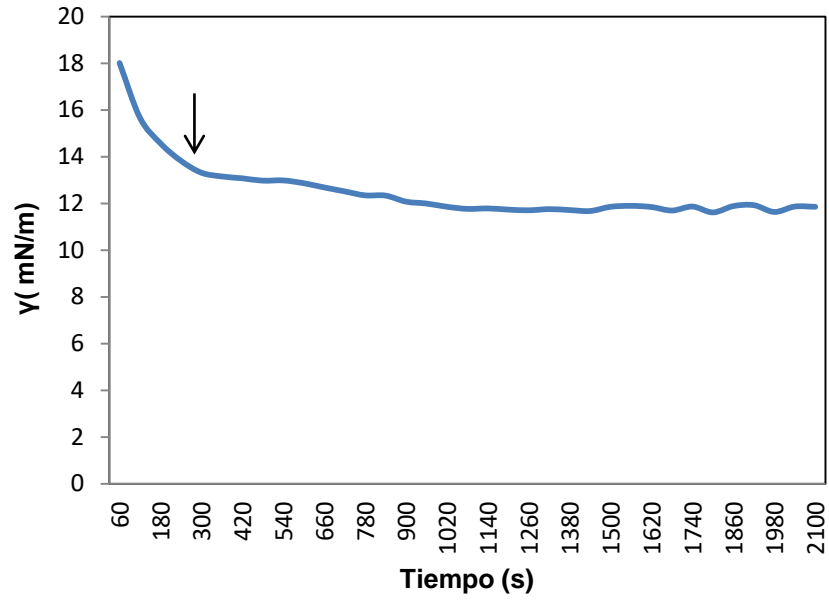


EPS

pH 3.0

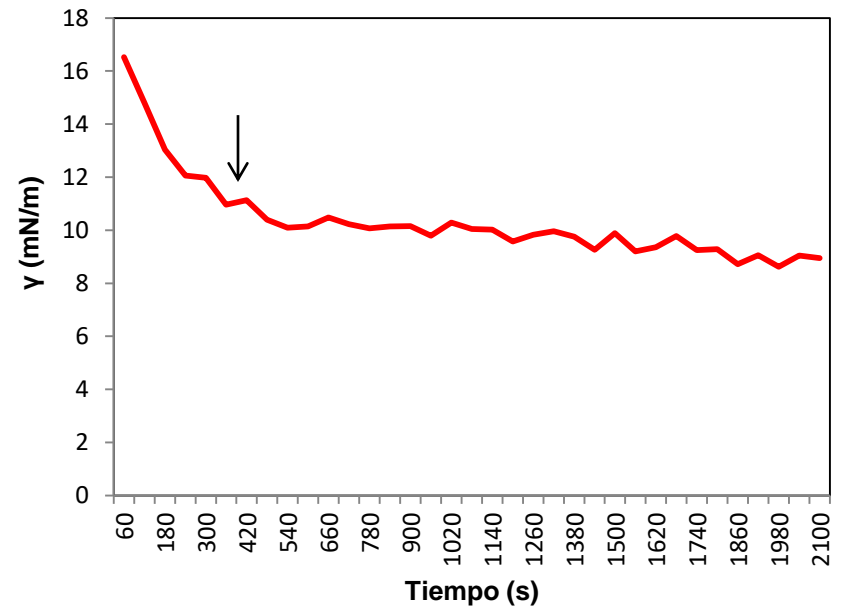
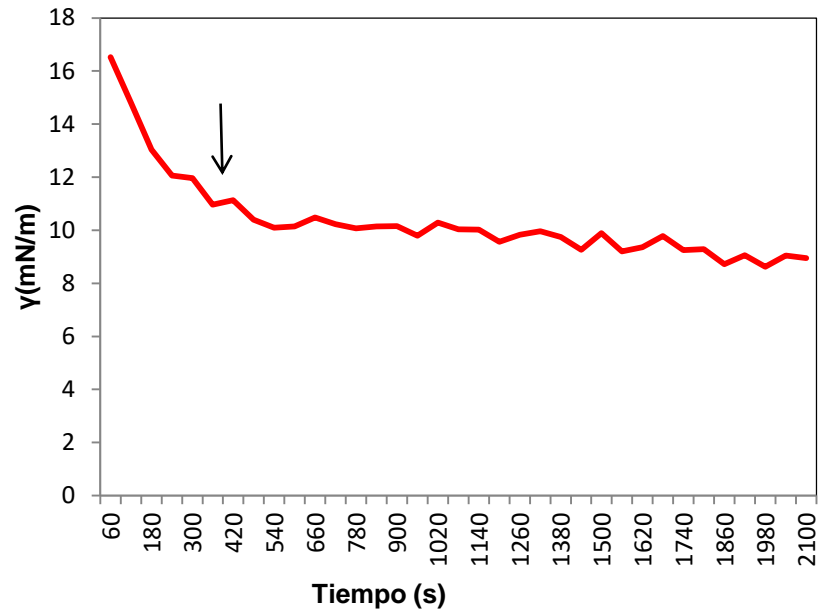
pH 7.0

L



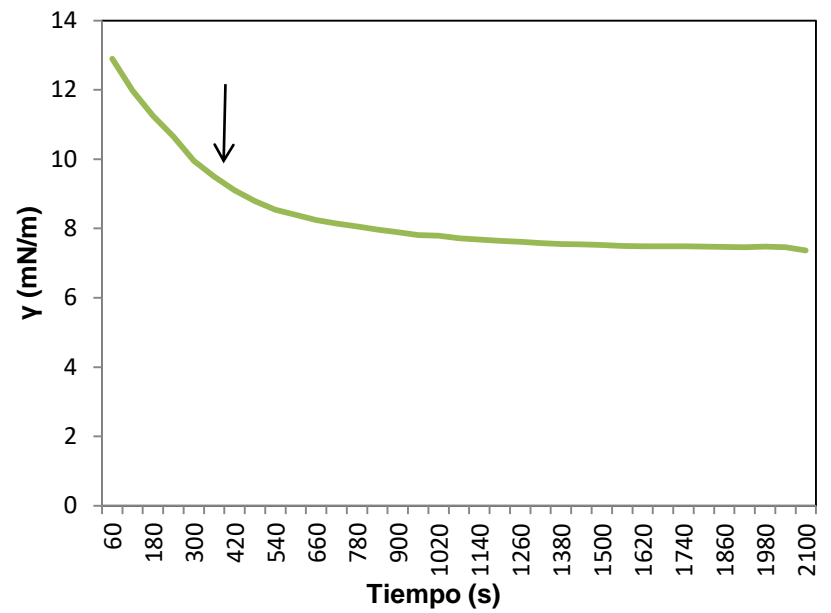
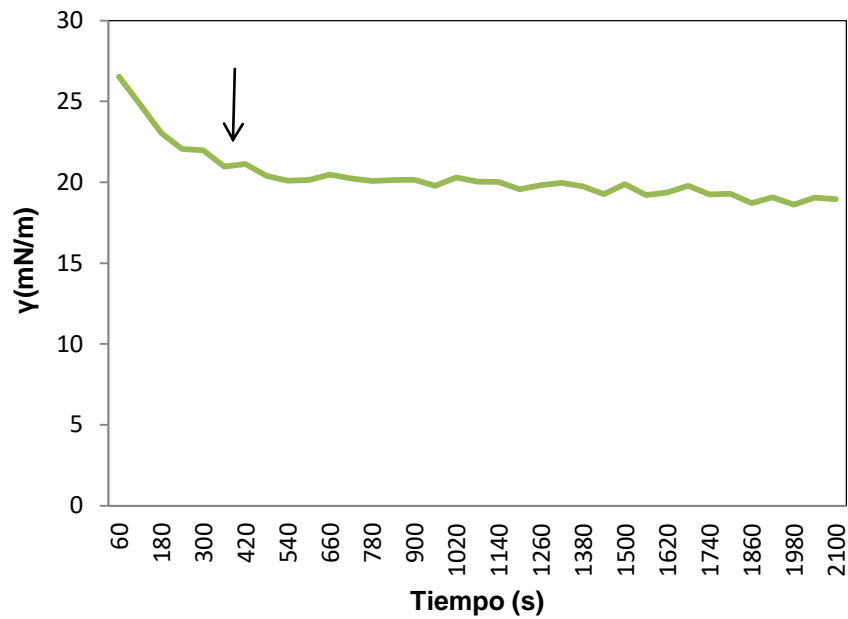
(a)

C



(b)

S



(c)

**Figura 6.** Perfiles de tensión interfacial de EPS obtenidos de distintas bebidas fermentadas, en interfases aceite-agua a pH 3 (izquierda) y pH 7 (derecha).

En la Figura 6 se observa que los tres EPS presentaron disminución en los valores medidos para la tensión interfacial, cuando se presentaron ante aceite vegetal de canola como fase oleosa. Los valores finales de tensión para el EPS de leche fue de 13.72 mN/m, EPS de bebida de coco de 11.13 mN/m y EPS bebida de soya 9.1 mN/m, respectivamente para a una concentración del 1% (p/p) a pH 7.0. Para el caso de pH 3.0, los valores finales fueron para EPS de leche de 13.31 mN/m, EPS de bebida de coco de 1.13 mN/m y EPS de bebida de soya de 21.13 mN/m. Cabe mencionar que en todos los casos, los EPS requirieron de 180 min para alcanzar un valor constante de tensión interfacial, indicando que los EPS se adsorbieron en la interfase agua-aceite. Se han realizado varios trabajos sobre complejos proteínas/polisacáridos, como emulsionantes y estabilizadores y se ha informado que estos complejos pueden mejorar la estabilidad de la emulsión ya que se adhieren firmemente a una interfase como las proteínas y pueden solvatarse en una solución o medio acuoso para obtener una película cargada similar a un gel con un grosor significativo (Gharsallaoui et al., 2010; Humblet-Hua et al., 2013). Además, se ha reportado que en los polisacáridos con una estructura flexible sus moléculas muestran una mejor actividad superficial desde su difusión, reorientación y la reorganización conformacional en la interfaz del medio oleoso o acuoso (Cases et al., 2005). Por otro lado, resultados relacionados con el efecto del pH han mostrado que a pH ácido (pH 3) la tensión interfacial no resulta afectada, lo que hace a los EPS sean prometedores para ser utilizados como emulsionantes en ácido emulsiones como ingredientes en jugos cítricos como el vinagre, salsas y aderezos (Abid et al., 2019).

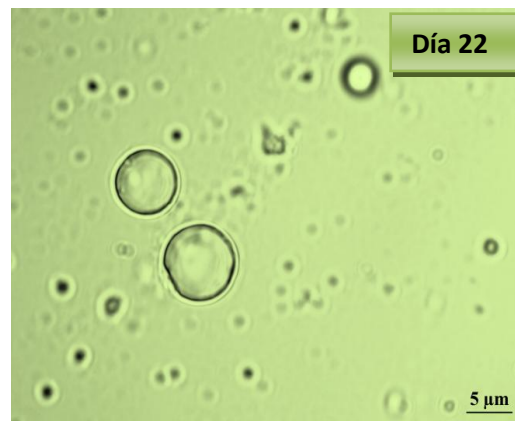
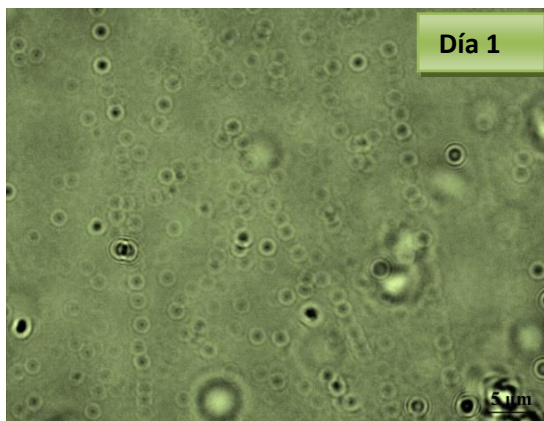
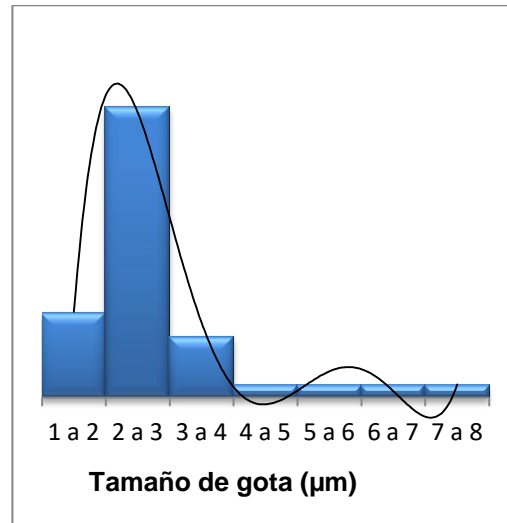
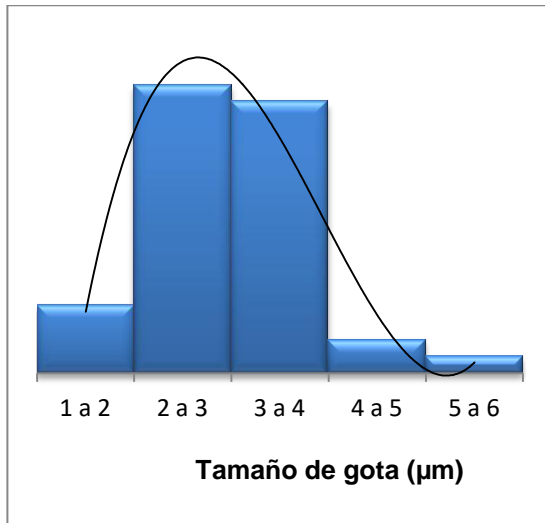
## **8.6 Formación de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS**

### **8.6.1 Emulsiones O/W sin carotenoides**

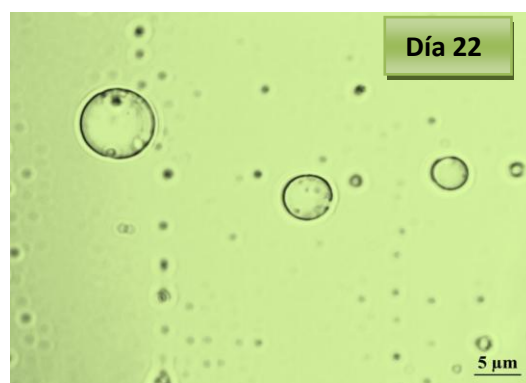
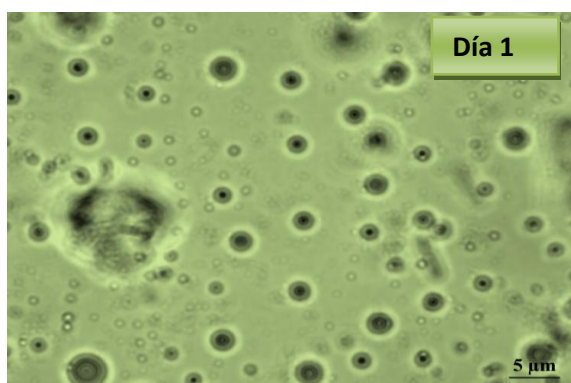
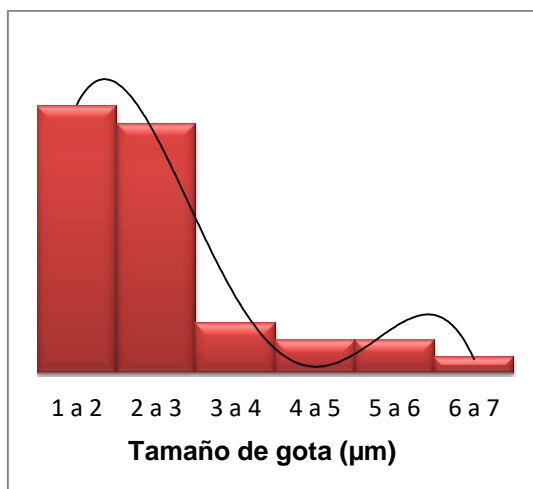
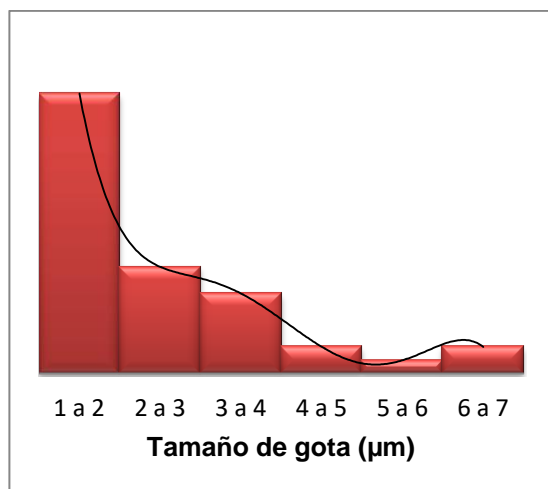
Inicialmente se probó el efecto de los EPS obtenidos de distintas bebidas fermentadas como agentes emulsionantes, por lo que en la Figura 7 se muestran los principales resultados de las emulsiones O/W estabilizadas con los EPS, cabe mencionar que en esta etapa, no se incorporaron compuestos bioactivos debido a que se pretendía evaluar la capacidad de estabilizar las interfases.

En la Figura 7 a, b y c se presentan las micrografías y gráficos de distribución de diámetro de gota (D10) para las emulsiones estabilizadas con los EPS de leche, y bebidas coco y soya fermentadas, a tiempo cero y después de 22 días de almacenamiento.

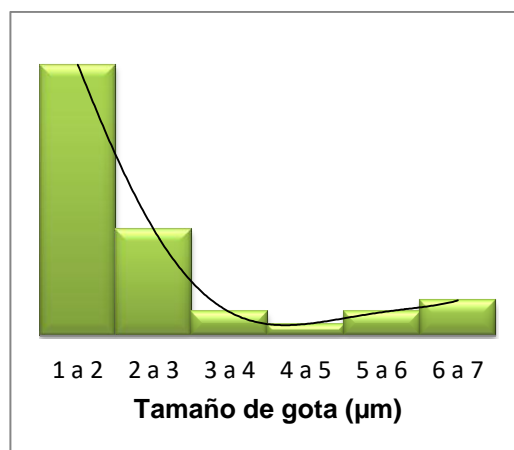
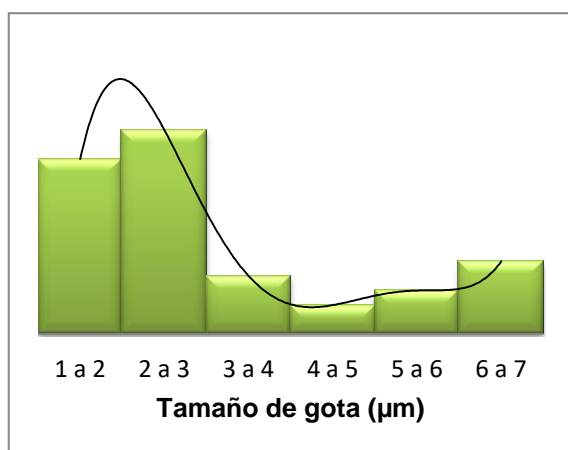
(a)

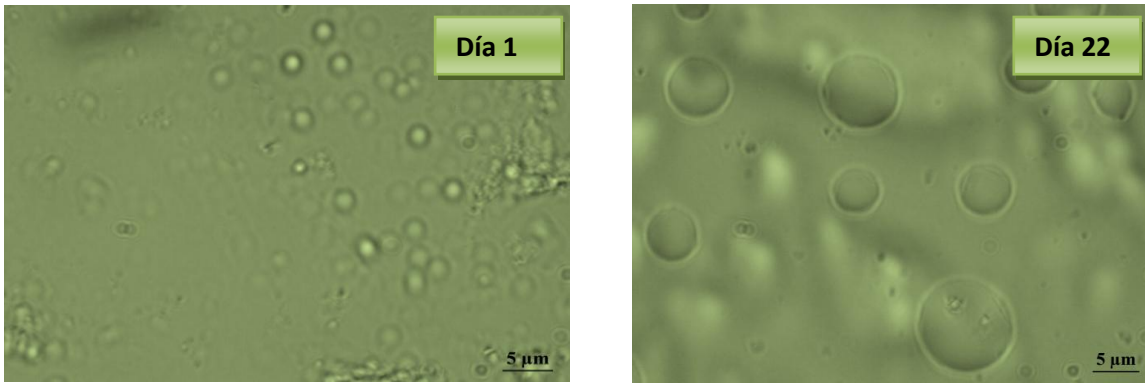


(b)



(c)





**Figura 7.-** Histogramas y morfología de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS de leche (a), EPS de bebida de coco (b) y EPS de bebida de soya (c) y sus cambios después de 22 días de almacenamiento (lado derecho).

Se puede observar que todas las emulsiones O/W presentan una morfología típica de emulsiones estabilizadas con polisacáridos, donde el tipo de polisacárido sí presentó un efecto sobre el diámetro promedio y la distribución de tamaño de gota. Por otra parte, se observa que el diámetro de las gotas aumentó ligeramente conforme pasó el período de los 22 días de almacenamiento (Tabla 6), y que la concentración de gotas en la muestra tratada bajo las mismas condiciones disminuyó, lo cual pudo relacionarse con la presencia de alguna inestabilidad como la floculación y coalescencia, que en combinación conducen al incremento de tamaño de las gotas de aceite.

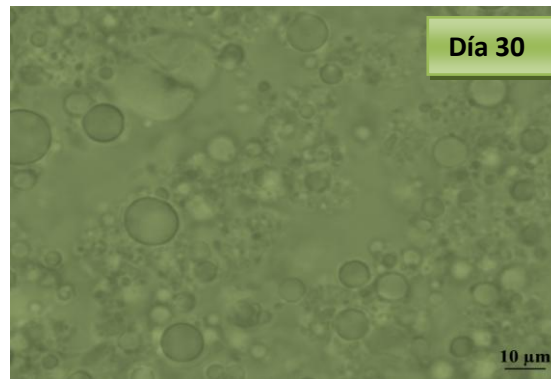
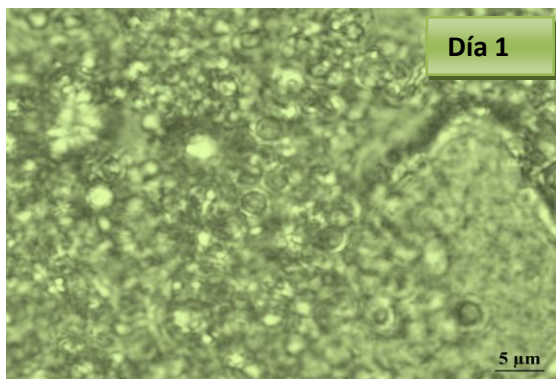
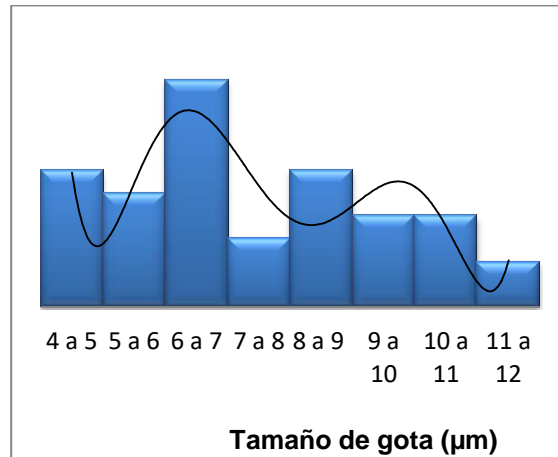
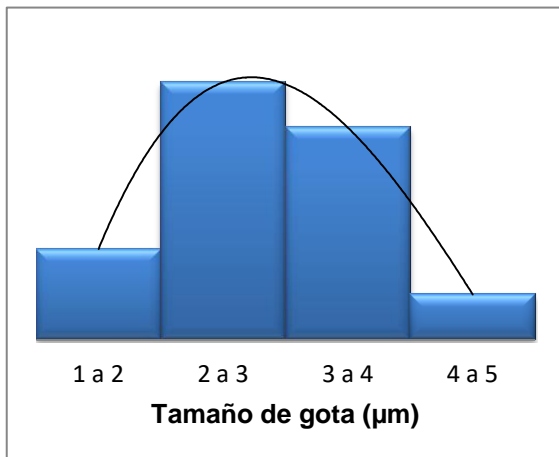
**Tabla 6.** Diámetro de gota (D10) de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS

EPS	D10 [ $\mu\text{m}$ ]	
	Día 0	Día 22
<b>Leche</b>	2.72 $\pm$ 1.22 a	2.96 $\pm$ 0.8 a
<b>Coco</b>	2.44 $\pm$ 1.07 a	2.53 $\pm$ 1.41 a
<b>Soya</b>	2.26 $\pm$ 1.49 a	3.32 $\pm$ 2.12 a

Letras diferentes en la misma fila significan diferencia estadística entre las medias ( $P < 0.05$ )

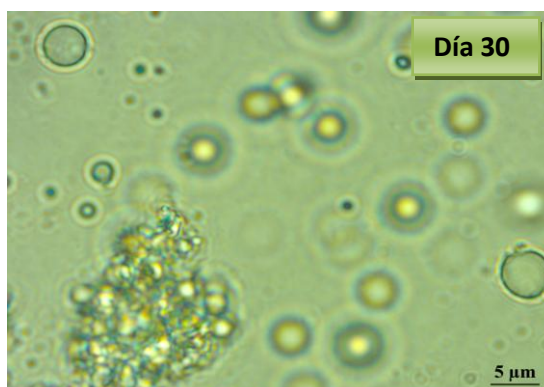
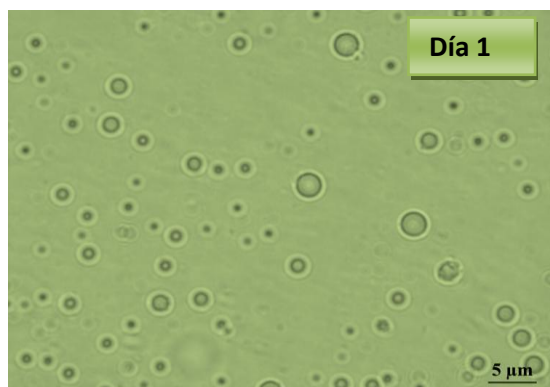
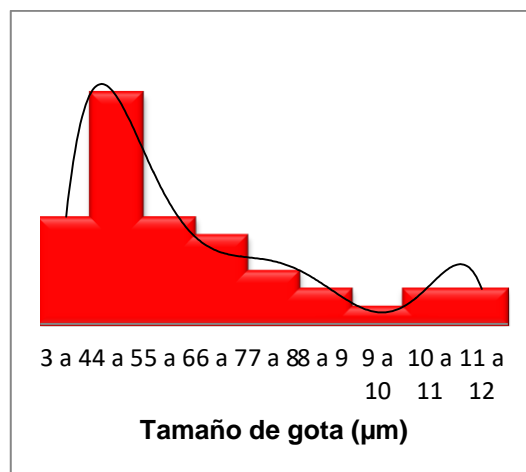
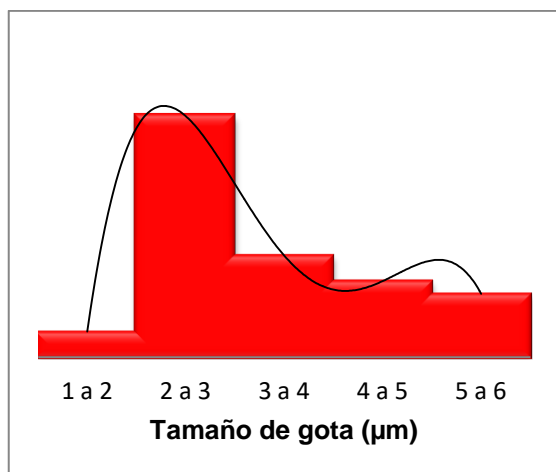
Una vez que se encontró que los EPS mostraron propiedades funcionales para formar y estabilizar emulsiones O/W, se incorporó una oleoresina de chile rojo (rodofila) rica en carotenoides, como modelo de compuestos bioactivos liposolubles, la Figura 8 muestra las distribuciones de diámetro de gota y morfología de estas emulsiones.

(a)

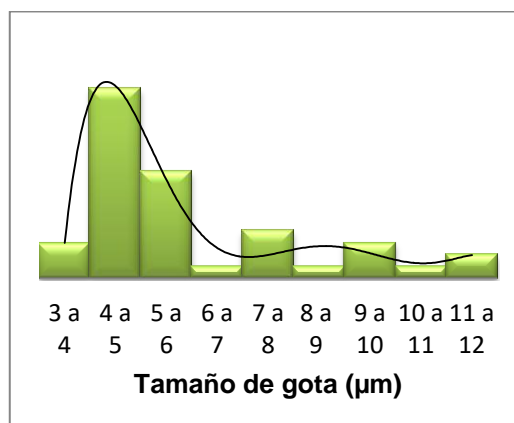
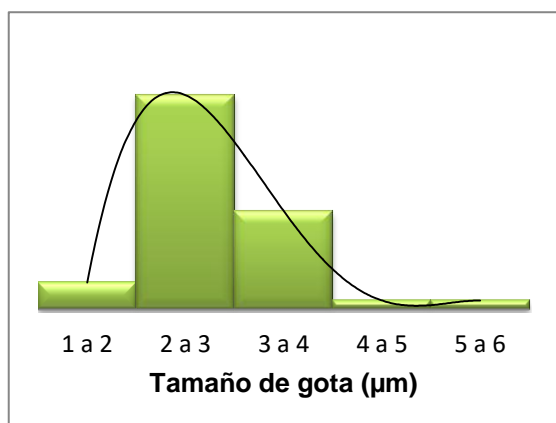


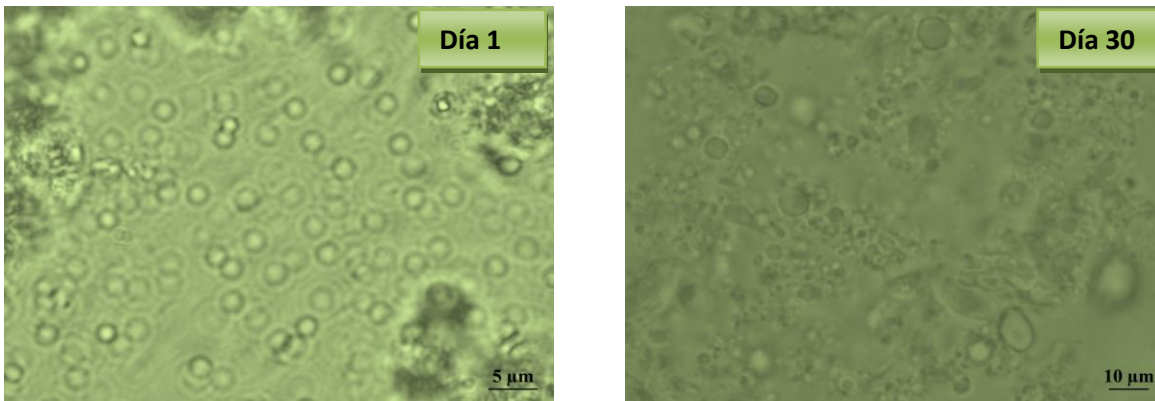


(b)



(c)





**Figura 8.** Histogramas y morfología de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS de leche (a), EPS de bebida de coco (b) y EPS de bebida de soya (c) conteniendo carotenoides y sus cambios después de 30 días de almacenamiento (lado derecho).

Como puede observarse, las emulsiones frescas mostraron tamaños homogéneos y con estructuras compactas, sin embargo al cabo de 30 días de almacenamiento, las gotas de las emulsiones se observan con tamaños más grandes y con algunas estructuras aglomeradas. La Tabla 7 muestra los diámetros de gota de las emulsiones frescas y después de 30 días de almacenamiento.

**Tabla 7.** Diámetro de gota (D10) de las emulsiones O/W estabilizadas con EPS conteniendo carotenoides

EPS	D10 [ $\mu\text{m}$ ]	
	Día 0	Día 22
<b>Leche</b>	2.82±0.71 a	7.47±2.23 b
<b>Coco</b>	3.30±1.17 a	6.25±3.02 b
<b>Soya</b>	2.63±0.50 a	6.10±3.09 b

Letras diferentes en la misma fila significan diferencia estadística entre las medias (P<0.05)

## 8.7 Estabilidad de las emulsiones O/W estabilizadas con carotenoide (rodófila)

En la Figura 7 y 8 se muestran los perfiles de cambio de diámetro de gota de las emulsiones O/W con y sin carotenoides durante el almacenamiento, donde se puede observar que sí hay un cambio ligero en el diámetro de gota de las emulsiones, donde la emulsión estabilizada con EPS de bebida de coco si bien no mostró el menor diámetro de gota cuando la fase oleosa no contiene carotenoides, fue la que presentó el menor cambio respecto a los valores iniciales, esto puede atribuirse a una mejor estabilidad de las emulsiones. Por el contrario, cuando la fase oleosa sí contenía carotenoides, las emulsiones estabilizadas con EPS de bebida de soya mostraron el menor cambio en el diámetro de gota al cabo del almacenamiento (Figura 8b).

Los resultados obtenidos se ajustaron a una cinética de primer como se observa en las figura 9 para las emulsiones estabilizadas con EPS y figura 10 para las emulsiones estabilizadas con carotenoides, de acuerdo con lo reportado por (Ruiz-Ramos et al., 2006), para obtener los valores de las constantes de velocidad asociadas al fenómeno de coalescencia de las gotas ( $k_c$ ), los valores se muestran en la Tabla 8.

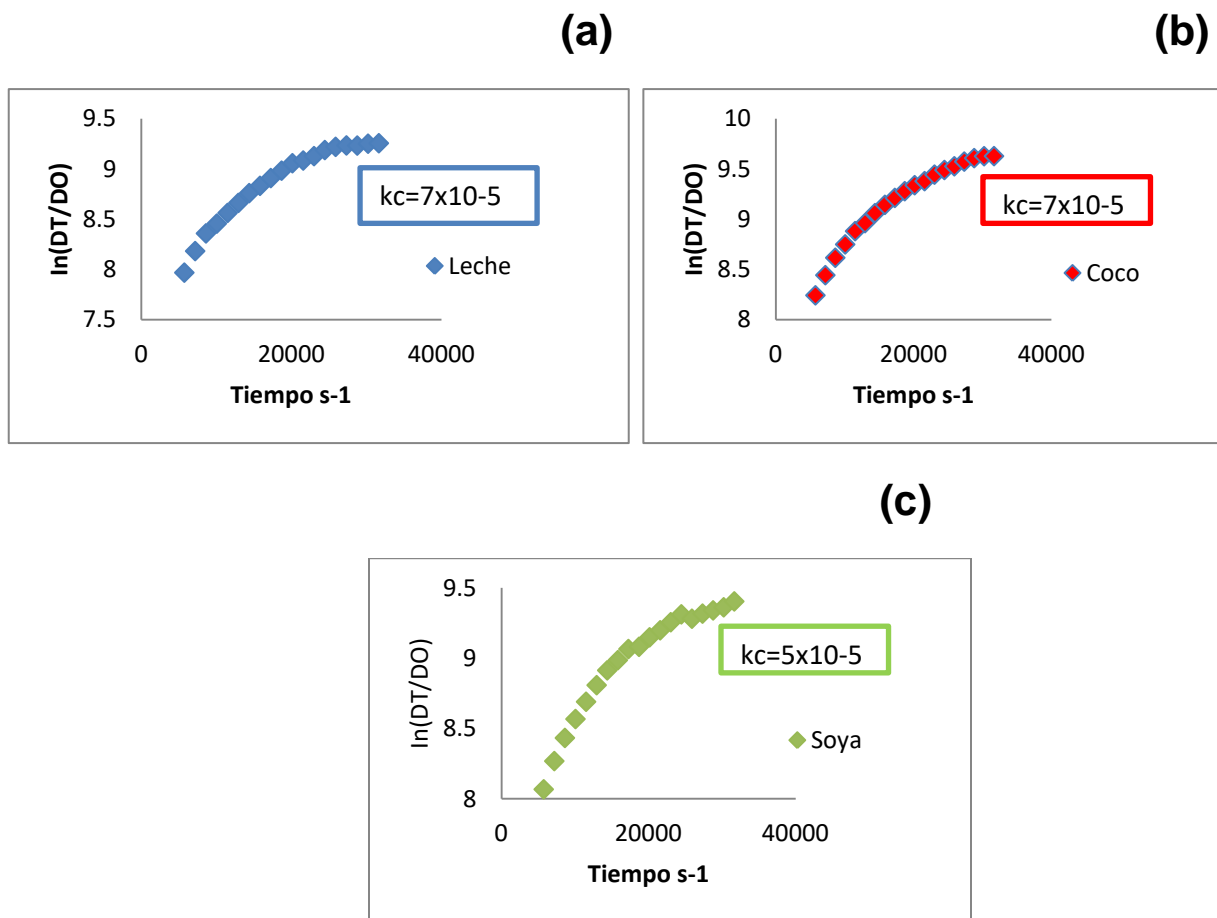
**Tabla 8.** Valores de  $k_c$  para las emulsiones estabilizadas con EPS con y sin carotenoides en la fase dispersa.

EPS	$k_c$ [ $s^{-1}$ ]	
	O/W	O <sub>C</sub> /W
<b>Leche</b>	$7 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$
<b>Coco</b>	$7 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$
<b>Soya</b>	$5 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-5}$

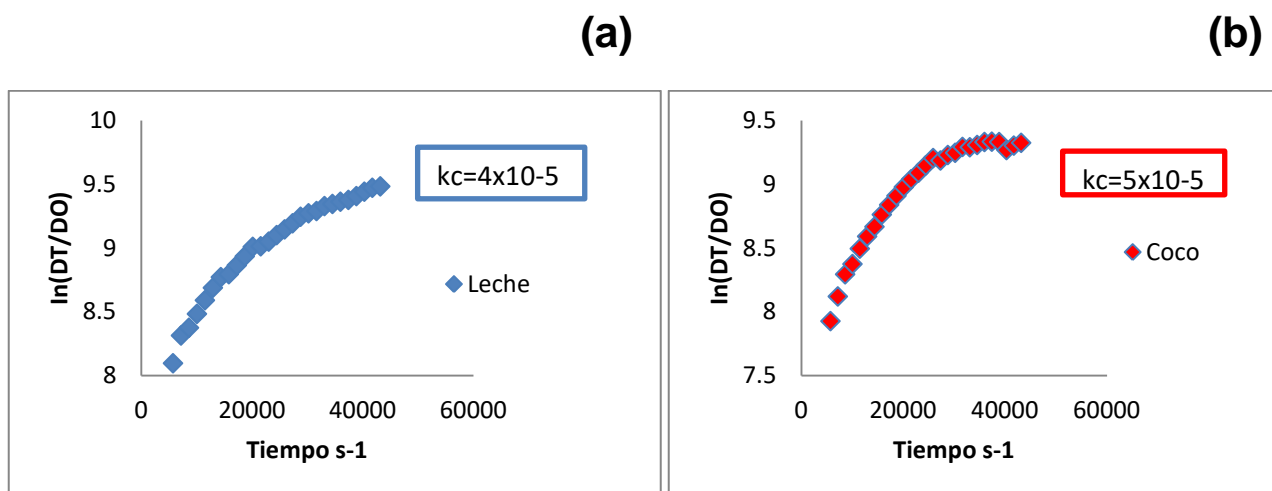
O<sub>C</sub> significa que la fase oleosa contiene carotenoides

Donde se puede observar que los valores de  $k_c$  para EPS de bebida de soya es menor que EPS de la bebida de leche y EPS de la bebida de coco, respectivamente cuando las emulsiones tienen carotenoides, mientras que para los EPS sin carotenoide, el EPS-L < EPS-C < EPS-S, de acuerdo con el comportamiento observado en el cambio de diámetro de gota. Esto indica que la estabilidad contra fenómenos agregativos de inestabilidad como la coalescencia es mejor para el EPS de leche en presencia de carotenoide. Demostrando que este tipo de materiales sí presenta propiedades tecnofuncionales como agentes

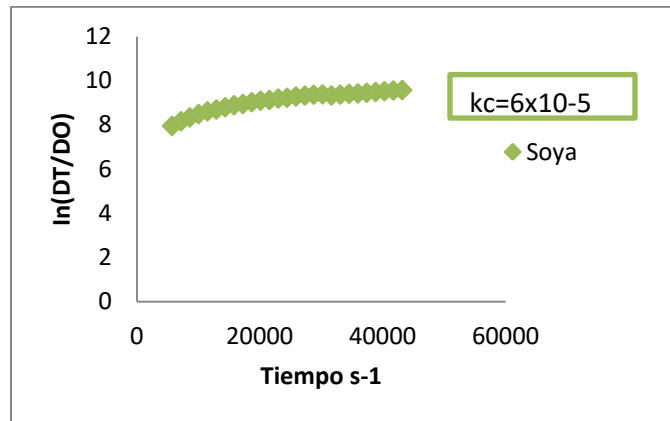
emulsionantes y estabilizantes de emulsiones tipo O/W, y que pueden representar un potencial en el aprovechamiento de algunos subproductos del procesamiento de alimentos lácteos.



**Figura 9.** Cinética de coalescencia valor de  $kc$  para cada emulsión estabilizada con EPS EPS-L (a), EPS-C (b) y EPS-S (c).



(c)



**Figura 10.** Cinética de coalescencia valor de  $k_c$  para cada emulsión estabilizada con ESP y carotenoide (rodofila), EPS-L (a), EPS-C (b) y EPS-S (c).

## 9. Conclusiones

- Se aislaron y purificaron 3 exopolisacáridos obtenidos de tres bebidas diferentes: leche, bebida de coco y bebida de soya
- Se realizó la caracterización fisicoquímica y estructural de los EPS presentando características ligeramente variables
- Se probó que pueden ser un buen agente emulsionante en presencia de caroteno
- Se determinó que el EPS de soya presentó las mejores características como un agente emulsionante
- Estas propiedades presentes en el kefirano pueden demostrar el alto potencial de aplicación a través de diversas áreas de investigación tales como la industria de los alimentos, la medicina, entre muchas otras más

## 10. Bibliografía

- Adachi S, Toba T, Mukai T, et al. (1993). *Lactobacillus* sp. KPB-167 and method of manufacturing viscose polysaccharide employing the same. US Patent US 5, 204,247.
- Almajano, M. P., Carbo´, R., Jime´nez, J. A., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, 55-63.
- Arts, I. C. W., & Hollman, P. C. H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 317s-325s.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured as-semblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38, 902-912.
- Beaudet N, Dupont C, Lemieux P, et al. (2012). Exopolysaccharides delivery systems for active molecules. US Patent US 8,088,605.
- Bell, L. N. (2001). Stability testing of nutraceuticals and functional foods. In R. E. C. Wildman (Ed.), *Handbook of nutraceuticals and functional foods* (pp. 501-516). New York: CRC Press.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108e109, 29-41.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13, 184-196.
- Brime, B., Moreno, M.A., Frutos, G., Ballesteros, M.P., Frutos, P., 2002. Amphotericin B in oil-water lecithin-based microemulsions: formulation and toxicity evaluation. *J. Pharma. Sci.* 91, 1178-1185.
- Carranco Jáuregui ME, Calvo Carrillo MC, Pérez-Gil Romo F, Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, Vol. 61 Nº 3, 2011
- Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 272-283.

- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bio-active food components. *International Dairy Journal*, 20, 292-302.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent developments in micro-encapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
- Dziezak, J. D. (1998). Microencapsulation and encapsulated food ingredients. *Food Technology*, 42, 136-151.
- Fang Z. & Bhandari B. Encapsulation of polyphenols a review. *Trends Food Sci Technol* 2010; 21:510-23.
- Flanagan, J., & Singh, H. (2006). Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 221-237.
- Friberg, S., Larsson, K., & Sjoblom, J. (2004). *Food emulsions*, (4th ed.). New York: Marcel Dekker.
- G. Höhne, W. Hemminger, H-F. Flammersheim, *Differential Scanning Calorimetry, An Introduction for Practitioners*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1996.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213-224.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.
- Gracia Bacallao L, García Gómez LV, y col, Plantas con propiedades antioxidantes, *Rev. Cubana Investí Biomed*, 20(3): 231-5, 2001.
- Grigoriev, D.O., Miller, R., 2009. Mono- and multilayer covered drops as carries. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 48-59.
- Grossiord, J.L Stambouli, M., 2008. Potetialities of W/O/W multiple emulsions in drug delivery and detoxification. In: Aserin, A. (Ed.), *Multiple Emulsions Technology and Applications*. John Wiley and Sons, Inc New Jersey, pp. 209-234.
- Grossiord, J.L., Sellier, M., 2001. W/O/W multiple emulsions: a review of the release mechanisms by break-up of the oily membrane. *STP Pharma. Sci* 11, 331-339.



- Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Product*, 59, 205-215.
- Haslam, E., & Lilley, T. H. (1988). Natural astringency in foods molecular interpretation. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 27, 1-40.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26, 816-835.
- Jolly L, Vincent SJ, Duboc P, Neeser JR (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:367-374.
- K.D. Maglic, A. Cezairliyan, V.E. Peletsky, *Compendium of Thermophysical Property Measurement Methods*, Volume 1, Plumen Press, New York 1984.
- Kamiloglu, S., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2013). The effect of food processing on bioavailability of tomato antioxidants, 3, 65–77. doi:10.3233/JBR-130051.
- Kesic, A., Hodzic, Z., Crnkic, A., Saletovic, M., & Catovic, B. (2010). Bioavailability of antioxidants from tea infusions with honey addition *Bioraspoloživost antioksidanasa iz*, 4(1), 111–116.
- Khaled, Al-T., & Jagdish, S. (2007). Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 1, 65-71.
- Kogan, A., Garti, N., 2006. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 123-126, 369-385.
- Kooiman P. (1968). The chemical structure of kefirin, the water-soluble polysaccharide of kéfir grain. *Carbohydrates*, 7, 200-11.
- Ley, J.P., 2008. Masking bitter taste by molecules. *Chemosens. Percept*, 1, 58-77.
- Looijesteijn PJ, Trapet L, De vries E, Abee T, Hugenholtz J (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* 64:71-80.
- Maeda H, Zhu X, Suzuki S, et al. (2004b). Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefirin produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B. *J Agri Food Chem*, 52, 5533-8.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Re´me´sy, C., & Jime´nez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- McClements, D. J. (2005). *Food emulsions: Principles, practice, and techniques*, (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 577-606.
- Medrano M, Pérez PF, Abraham AG. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int J Food Microbiol* 122:1-7.
- Meléndez-Martínez AJ, Vicario I, Heredia FJ, Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol. 57 N° 2, 2007
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., & Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 69-74.
- Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot R, Remaud-Simeson M (2001). Homopolysaccharide from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11:675-685.
- Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10, 711-719.
- Mozafari, M. R. (2006). Bioactive entrapment and targeting using nanocarrier technologies: an introduction. In M. R. Mozafari (Ed.), *Nanocarrier technologies: Frontiers of nanotherapy* (pp. 1-16). The Netherlands: Springer.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11, 833-844.
- Muñoz, M. E., Galan, A. I., Palacios, E., Diez, M. a, Muguerza, B., Cobaleda, C., Jimenez, R. (2010). Effect of an antioxidant functional food beverage on exercise-induced oxidative stress: a long-term and large-scale clinical intervention study. *Toxicology*, 278(1), 101–11. doi:10.1016/j.tox.2009.10.015.

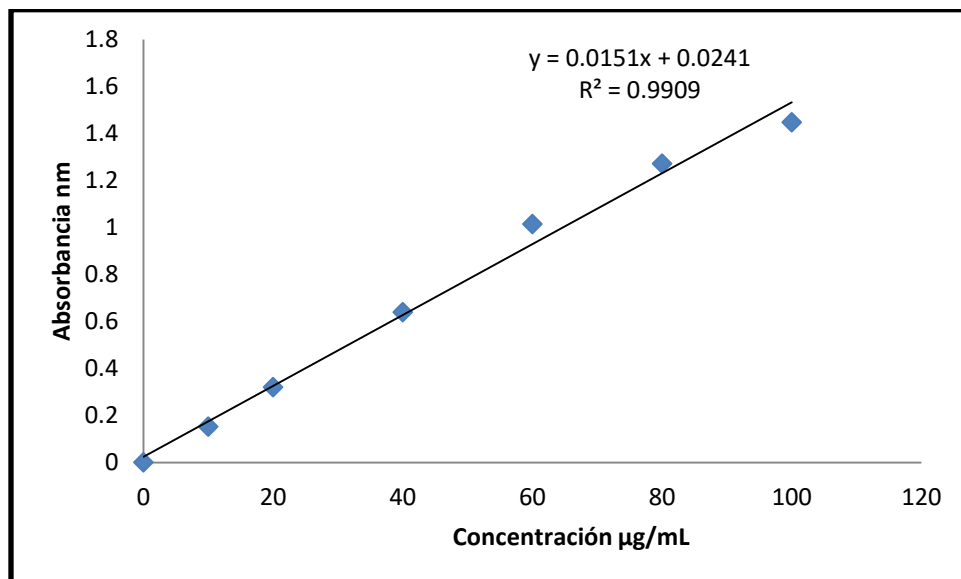
- Nakajima, M., Nabetani, H., Ichikawa, S., & Xu, Q.Y. (2003). Functional emulsions. US Patent, US6538019B1.
- Peter, S., & Given Jr., (2009). Encapsulation of flavors in emulsions for beverages. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14, 43-47.
- Piermaria JA, de la Canal ML, Abraham AG. (2008). Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kéfir grain. *Food Hydrocolloids*, 22, 1520-7.
- Piermaria JA, Pinnotti A, García MA, Abraham AG. (2009). Films based on Kefiran, an exopolysaccharide obtained from Kefir grains: development and characterization. *Food Hydrocoll* 23:684-690.
- Quideau, S., & Feldman, K. S. (1996). Ellagitannin chemistry. *Chemical Reviews*, 96, 475-503.
- Sánchez A, Flores –Cotera L, y col, Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones, *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 41:175-191, 1999.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S-217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(20), 287-306.
- Schrooyen, P. M. M., van der Meer, R., & De Kruif, C. G. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 475-479.
- Serna, L y Rodríguez, S. Producción Biotecnología de ácido láctico. Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2005. vol. 1, p. 55-65.
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547.
- Shene, C and Bravo, S. Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* for exopolisaccharide production in continuous culture. *Enzyme and Microblal Technology*. 2006.vol. 10, p.1006-1015.

- Sohini Ray, Utpal Raychaudhuri, Runu Chakraborty. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience* (p. 76).
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3, 768-780.
- Tadros, T.F., Vicent, B., 1983. Emulsions stability. In: Becher, P. (Ed), *Encyclopedia of Emulsions Technology*, vol. 1. Marcel Dekker, New York, pp. 129-285.
- Tavaria, F. et al. Amino Acid Catabolism and Generation of Volátiles by Lactic Acid Bacteria, *Journal Dairy Science*. 2002. vol. 85, p. 24 - 62
- V. B.F. Mathot, *Calorimetry and Thermal Analysis of Polymers*, Hanser Publishers, Múnich Vienna New York, 1994
- Van der Graaf, S., Schroen, C. G. P. H., & Boom, R. M. (2005). Preparation of double emulsions by membrane emulsification-a review. *Journal of Membrane Science*, 251, 7-15.
- Vilstrup, P. (2001). *Microencapsulation of food ingredients*. Surrey: Leatherhead Pub.
- Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. (2006). Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine* 36:254-260.
- Vos P., Faas M.M., Spasojevic M. & Sikkema J. Review: Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J*. 2010; 20:292-302.
- Vuyst.L. et al. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks, *International Dairy Journal*. 2003. V. I. 13, p. 707-717.
- Wandrey C., Bartkowiak A. & Harding S.E. Materials for Encapsulation In: Zuidam N.J., Nedovic, V.A. (Eds.) *Encapsulation Technologies for Foods Active and Food Processing*, Springer: Dordrecht, The Netherlands; 2009, p. 31-100.
- Zuidam N. J. & Heinrich J. Encapsulation of aroma. In: Zuidam, N, J., Nedovic, V.A (Eds). *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*; Springer: Dordrecht, The Netherlands; 2009, p. 127-60.

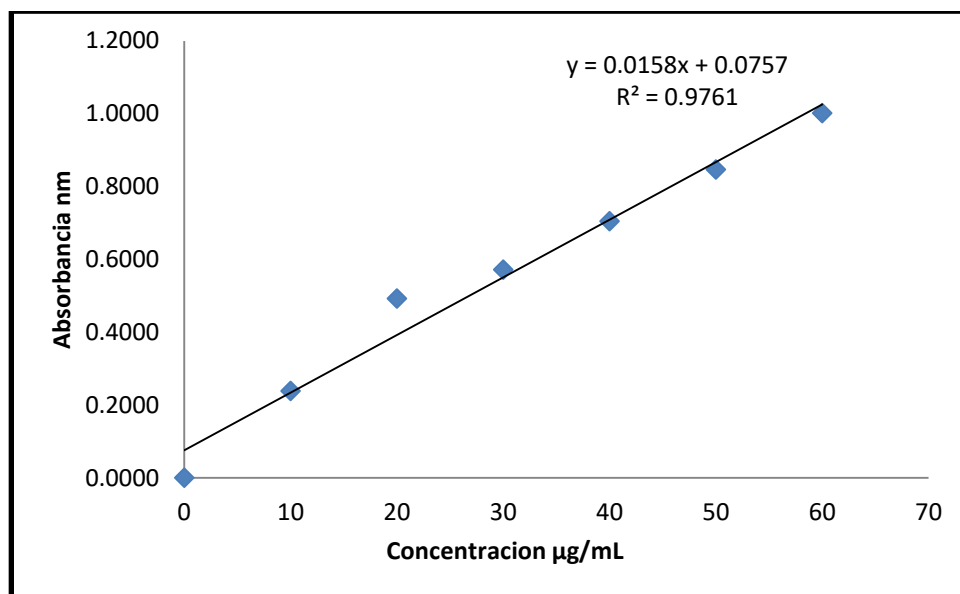
Zuidam, N.J. & Shimoni E. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A., (Eds). Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing, Springer: Dordrecht, The Neatherlands; 2009, p. 3-31.

## 11. Anexos

### CURVAS DE CALIBRACIÓN



Curva de calibración de glucosa para la determinación de azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico.



Curva de calibración de albúmina de suero bovino, obtenida por el método de Bradford.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00203

Matrícula: 2183801490

Estudio del empleo de exopolisacáridos de kéfir como agentes emulsionantes de moléculas biológicamente activas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 11 del mes de diciembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO  
DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lectora la tercera, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA  
DE: ISABEL MARLENE MARTINEZ DIAZ

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ISABEL MARLENE MARTINEZ DIAZ  
ALUMNA

REVISÓ  
*[Signature]*

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

ASESOR

*[Signature]*  
DR. SERGIO ANDRES ALATORRE  
SANTAMARIA

ASESORA

*[Signature]*  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

LECTORA

*[Signature]*  
DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO