

ENCAPSULACIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL 1, UTILIZANDO EMULSIONES DE PRODUCTOS DE REACCIÓN DE MAILLARD Y ACEITE DE GIRASOL MEDIANTE GELIFICACIÓN DE ALGINATO DE CALCIO

Paula A., Loyeau

Instituto de Tecnología en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral

Área: Ingeniería

Sub-Área: Alimentos

Grupo: Y

Palabras clave: probióticos, conjugados de Maillard, encapsulación.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la alimentación a nivel mundial se inclina fuertemente al consumo de alimentos que además de aportar efectos nutricionales, aporten otros beneficios. Estos son denominados “alimentos funcionales”, y colaboran a mejorar el estado de salud, bienestar o reducir el riesgo de una enfermedad (ANMAT). Una de las tendencias de impulsar al mercado este tipo de alimentos se basa en adicionarles bacterias probióticas, las cuales, según la Organización Mundial de la Salud y la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2002), son microorganismos vivos que al ser administrados en dosis adecuadas producen un efecto benéfico en el consumidor más allá de la nutrición. Algunos de los efectos comprobados asociados al consumo de probióticos comprenden la estimulación de la función inmune, digestión de distintos ingredientes, regulación de niveles de colesterol y actividad frente al cáncer de colon (Zacarías y col., 2014).

La incorporación de bacterias probióticas a productos alimenticios a menudo está limitada por su inestabilidad e impacto en las propiedades organolépticas. Por lo tanto, lograr el modo de preservarlas viables y que sean incorporadas en el orden de 10^6 - 10^8 UFC/g de producto (Champagne y col., 2011), se convierte en un desafío. Una de las técnicas para lograrlo es la encapsulación de las bacterias utilizando secadores spray, con diferentes materiales de pared o matrices como por ejemplo: pectina, maltodextrina (Slavutsky y col., 2016), leche (Paez y col., 2013) y proteínas de suero lácteo (Doherty y col., 2011). Ha sido comprobado que el secado spray de proteínas de suero lácteo genera microcápsulas con buenas características; sin embargo, el proceso implica el uso de un rango de temperaturas, que puede representar un riesgo para la viabilidad de los probióticos (Beaulieu y col., 2002; O’Riordan y col., 2001).

Otro método de encapsulación consiste en la gelificación de un material biopolimérico con el objetivo de retener y proteger a las bacterias del medio circundante; el mismo puede ser llevado a cabo por distintos procesos físicos o químicos (Morais y col., 2012). Un método efectivo y de bajo costo (Zou y col., 2011) para lograr el entrapamiento de probióticos a temperatura ambiente y sin el agregado de sustancias que puedan ser perjudiciales para estos microorganismos ni para el ser humano, consiste en la gelificación del alginato con calcio (iónica). Estos geles son impermeables a moléculas solubles en agua, cuyos pesos moleculares son

mayores a 5000Da, como así también a lípidos que permanezcan en la matriz del gel (aún de bajo peso molecular) (Villena, Morales Hernández, Gallardo y Ruiz, 2009).

Si bien se han utilizado una amplia gama de matrices biopoliméricas para el entrapamiento y encapsulación de bacterias probióticas, generalmente el uso de más de un compuesto resulta en mejores propiedades funcionales. En el caso de los productos de la Reacción de Maillard (PRM) generados a partir de proteínas y polisacáridos, han mostrado propiedades funcionales mejoradas respecto a los compuestos de partida. Como ser mejores propiedades emulsionantes (Zhu y col., 2011), antioxidantes (Chaula y col., 2009) así como en la calidad nutricional y solubilidad (Wang e Ismail, 2012). Por lo tanto habiendo establecido como objetivo principal mantener la viabilidad bacteriana de los probióticos para que estos lleguen vivos al intestino y puedan ejercer su acción benéfica, se propone aprovechar las propiedades emulsionantes de los PRM para generar emulsiones y con ellas lograr la síntesis de partículas cargadas con bacterias probióticas mediante la gelificación iónica del alginato con calcio.

METODOLOGÍA

Materiales

Se utilizó un aislado de proteínas de suero lácteo (WPI, por sus siglas en inglés: Whey Protein Isolate) provisto por Davisco Foods Internacional Inc. (Minnesota, Estados Unidos), siendo su composición centesimal: 0,4 % de grasa, 2,0 % de cenizas, 4,8 % de humedad y menos del 0,5 % de Lactosa. Según el ensayo de Kjeldhal, el contenido de proteínas alcanza el 97,9 % base seca. Los dextranos (DX) de 6 y 70 kDa fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Se utilizaron cultivos autóctonos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, aisladas de leche materna, las cuales demostraron potencial probiótico en estudios en animales de laboratorio (Gregoret y col., 2013).

Todos los demás reactivos utilizados en este trabajo fueron grado analítico.

Generación conjugados WPI/DX

Los productos de reacción de Maillard (PRM) de WPI y DX de 6 y 70kDa se realizaron mediante disolución (relación de concentración WPI:DX 1:0,6) y deshidratados en secador spray (Yamato ADL311S, Japón), siendo las temperaturas de entrada y salida, T_e 130°C y T_s 71°C, respectivamente. Posteriormente, los polvos se colocaron en estufa a 60 °C por 5 días, en a_w 0,65 (Spotti y col., 2013) para provocar la reacción de Maillard. A estos sistemas conjugados se los denominó C-WPI/DX 6 y C-WPI/DX 70.

Los sistemas WPI/DX fueron disueltos con los probióticos *B. animalis* subsp. *lactis* INL1. Para lo cual, las bacterias se cosecharon mediante centrifugación (6000rpm, 10 min, 8°C), en fase estacionaria tardía en caldo MRS-C (caldo MRS con cisteína), se lavaron 2 veces con buffer PBS y se resuspendieron en distintas soluciones de C-WPI/DX 6 y C-WPI/DX 70 al 10% (p/v), que se deshidrataron en secador spray (T_e 130°C, T_s 71°C). Los sistemas obtenidos, nombrados E-WPI/DX 6 y E-WPI/DX 70 fueron conservados entre -18 y -20 °C hasta el momento de su uso. Estas muestras fueron ensayadas para determinar su estabilidad gastrointestinal simulada in vitro según Saito y col. (2014).

Generación de las emulsiones

Los sistemas E-WPI/DX 6 y E-WPI/DX 70 (conteniendo las bacterias probióticas) se mezclaron con aceite de girasol comercial (10%), y fueron emulsionados con un sistema acuoso del conjugado correspondiente sin carga microbiana (Em-WPI/DX 6 y Em-WPI/DX 70) al 3%p/p. Para la obtención de las emulsiones se utilizó un homogeneizador Ultra-turrax (IKA T25; China) a 9000rpm durante 5min. El pH de las emulsiones fue regulado a 5,0 y luego se agregó alginato de sodio en una concentración final de 0,8% p/v.

Se utilizó WPI nativo como control; el cual mezclado con aceite de girasol y emulsionado con una solución de WPI nativo al 3% p/v, en las mismas condiciones que los sistemas WPI/DX, generó la emulsión nombrada como: Em-Control.

Caracterización de la emulsión

La apariencia y la presencia de las bacterias dentro del glóbulo graso de las emulsiones se observó mediante microscopía óptica (Leica DME, EC 3; Estados Unidos). El índice de Cremado, como medida de la estabilidad de las emulsiones, se determinó midiendo la fase crema de 10 ml de emulsión al cabo de 48hs. Se calculó el índice del siguiente modo:

$$IC(\%) = \frac{H_c}{H_0} \times 100$$

Donde IC es el Índice de cremado (%), Hc es la altura del pico de cremado y H₀ es la altura inicial de la emulsión.

Obtención de las miniesferas

Las miniesferas fueron obtenidas atomizando las emulsiones con alginato de sodio a través de un atomizador, sobre una solución de CaCl₂ al 2,5% (p/v) bajo agitación permanente. El tamaño de las esferas se controló mediante el flujo de aire y el caudal de la bomba. Luego, se realizaron 3 lavados de 10min con agua destilada, para retirar el excedente CaCl₂. El proceso de obtención de las esferas se esquematiza en la Figura 1.

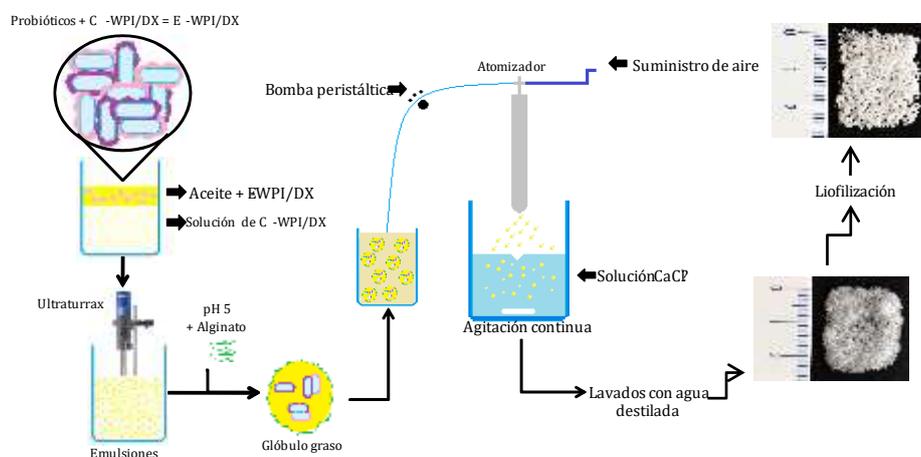


Figura 1. Esquema representativo del equipamiento utilizado para la producción de las miniesferas.

Caracterización de las miniesferas

Las miniesferas fueron secadas mediante un liofilizador FTS (μ P; Estados Unidos). Para elegir el método de liofilización adecuado, las miniesferas control fueron fraccionadas. Una fracción se liofilizó con agua (igual volumen de cápsulas que agua), y la otra fracción sin agua, y se determinó aceite libre. Para ello se pesaron 0,5 g, se agregaron 5ml de hexano, que luego de filtrarse se evaporó en rotavapor Buchi (modelo R-124; Suiza) a 60°C – 5min. La cantidad de aceite libre no encapsulado se calculó por gravimetría, luego de secado a 105 °C.

El mejor método para liofilizar las miniesferas fue sin agua, por lo que los sistemas WPI/DX 6 y WPI/DX 70 fueron liofilizadas de esta forma. Todas las miniesferas fueron observadas por microscopía óptica antes y después de la liofilización.

La determinación de la carga microbiana se realizó antes y después de la liofilización. Para ello se sometieron a ruptura (1 min - 10000 rpm) en Ultra-turraxT8 (IKA Labortechnik; China) para las miniesferas liofilizadas. Se sembró en MRS-C (medio MRS con cisteína) previa dilución seriada en agua de peptona. Las placas fueron incubadas en jarra de anaerobiosis a 37 °C durante 48hs, y luego se procedió al recuento (Log UFC/g).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de los conjugados PRM (conjugados WPI/DX)

La presencia de los PRM se comprobó mediante la medida de la intensidad de fluorescencia con λ_{ex} 365nm, y λ_{em} 400-500nm (Matiacevich y Buera, 2006), ya que estos PRM poseen una emisión características en este rango de λ . En la Figura 2, se presentan los valores de intensidades de fluorescencia del WPI nativo y de los PRM.

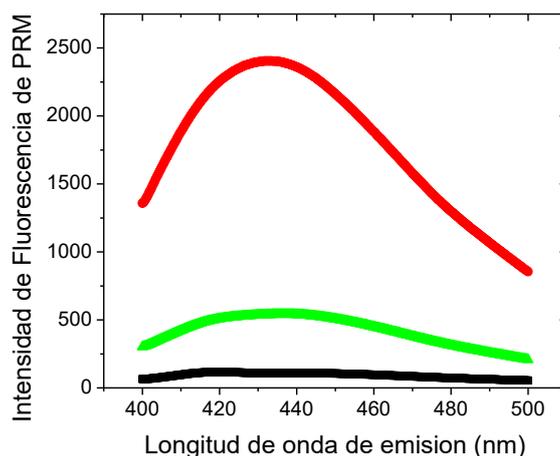


Figura 2. Fluorescencia de productos de reacción de Maillard (λ_{ex} 365 nm) de sistemas WPI nativo (■) y sistemas conjugados: C-WPI/DX 6kDa (■) y C-WPI/DX70kDa (■).

La emisión de fluorescencia del WPI nativo es insignificante con respecto a los sistemas conjugados WPI/DX, indicando que no se producen PRM sin la presencia de DX. Para los sistemas conjugados WPI/DX, la intensidad de la emisión de

fluorescencia aumenta a medida que disminuye el peso molecular del DX.

Estabilidad gastrointestinal de sistemas encapsulados PRM-bacterias probióticas

Estos sistemas WPI/DX fueron usados para encapsular las bacterias *B. animalis* subsp. *lactis* INL 1 mediante secado spray. La viabilidad de estos sistemas luego de cada etapa de digestión gastrointestinal se muestra en la Figura 3. Se observó un decaimiento en la viabilidad luego de cada etapa. Las bacterias encapsuladas en WPI/DX mostraron en comparación a la cepa libre un mayor recuento en la etapa SBD; esto podría deberse a que el sistema WPI/DX ofrece protección a la cepa, lo cual no ocurre cuando la cepa se encuentra libre y el grado de stress se profundiza, evidenciándose en un descenso rápido de la viabilidad entre las etapas de t 90 y t final. En el resto de las etapas, la cepa libre mostró mayores valores UFC/ml. Debido a estos resultados, se procedió a la encapsulación de los sistemas bacteria-WPI/DX mediante emulsión y gelificación iónica con alginato de calcio.

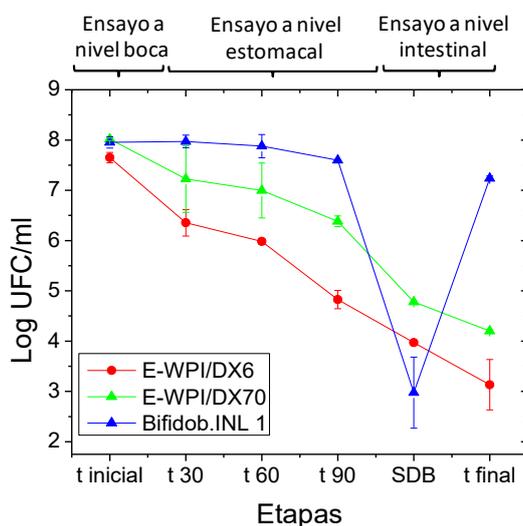


Figura 3. Recuento de *B. animalis* subsp. *lactis* INL 1 al tiempo inicial (t inicial), luego de 30, 60 y 90 min de digestión gástrica (t30, t60 y t90, respectivamente). SBD y t final comprenden los recuentos luego del proceso intestinal: SBD "Shock Duodenal de Bilis" al 1%, y t final, luego de 1 hora y media de un shock duodenal de bilis al 0,3%.

Caracterización de las emulsiones aceite en agua (O/W) conteniendo encapsulados PRM-bacterias probióticas

La apariencia de las emulsiones fue observada mediante microscopía óptica (Figura 4) donde pueden observarse partículas en el interior de las gotas de aceite (flechas blancas). Es evidente que el tamaño de las gotas de aceite es menor en los conjugados que en la emulsión de WPI. Yang y col. (2015), también han observado menor tamaño de gotas en emulsiones de conjugados de aislados de proteína de soja con respecto a la proteína sola.

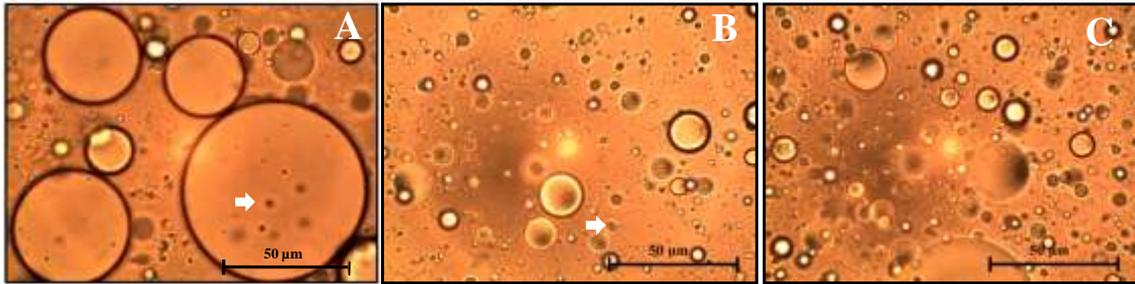


Figura 4. Microscopía óptica de emulsiones de WPI (Em-control) (A), WPI y DX 6 (Em-WPI/DX 6) (B) y WPI y DX 70 (Em-WPI/DX 70) (C) tomadas en magnificación de 100x.

Por otro lado, la desestabilización de las emulsiones se estudió mediante el índice de cremado. El cremado es un efecto que se evidencia en emulsiones desestabilizadas, donde las gotas de aceite con una densidad menor a la de la fase continua ascienden a la superficie. Estos valores se presentan en la Tabla 1. Dado que a mayor índice de cremado, mayor es la inestabilidad del sistema, es evidente que las emulsiones basadas en conjugados son más estables que la emulsión de WPI, siendo la más estable la de WPI/DX 70.

Tabla 1. Índice de cremado de las emulsiones de WPI y WPI conjugado con DX de 6 y 70 kDa, cargadas con bacterias probióticas.

Emulsiones	IC (%)
WPI	15,00± 0,00 ^a
WPI/DX 6	9,25 ± 0,35 ^b
WPI/DX 70	7,50 ± 0,70 ^c

Los valores presentados corresponden al promedio con su desviación estándar. Las letras superíndices indican diferencias significativas según el test de diferencias mínimas significativas (LSD) ($p < 0,05$).

Caracterización de las miniesferas

En la Figura 5, se muestran las miniesferas observadas mediante microscopía óptica antes (Fila A) y después de la liofilización (Fila B).

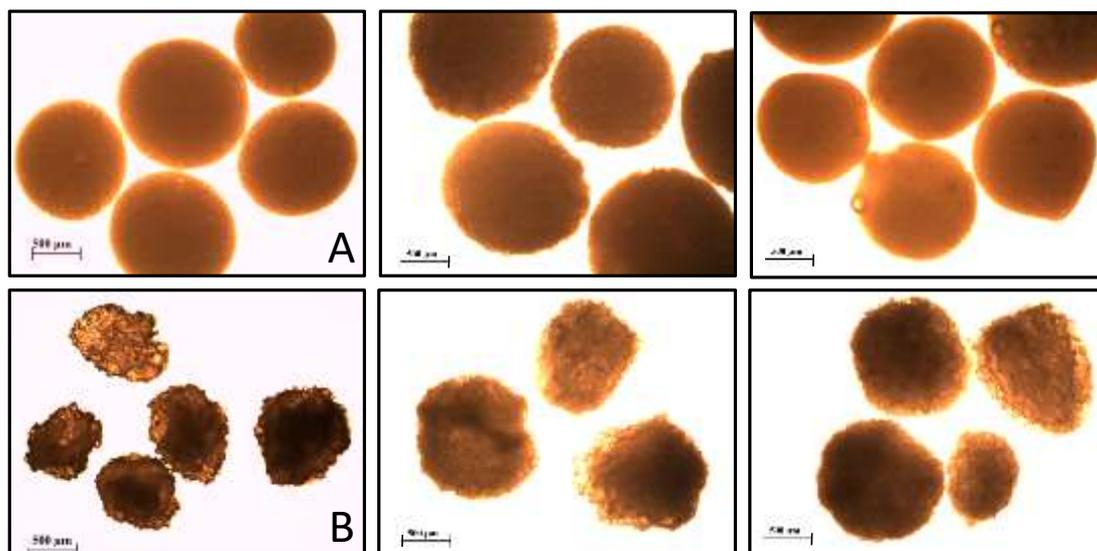


Figura 5. Fotografías de miniesferas, hidratadas (Fila A) y liofilizadas (Fila B). Las columnas de izquierda a derecha corresponden a los sistemas de WPI (Control), de WPI y DX 6 (WPI/DX 6) y WPI y DX 70 (WPI/DX 70).

Antes de la liofilización, todos los sistemas presentan partículas esféricas. En cuanto a las partículas liofilizadas, fue notable la prevalencia de las formas esféricas en los sistemas conjugados, mientras que las del sistema control parecieron sufrir cierto colapso, perdiendo simetría. Tasch Halkemy col., (2016) también observaron partículas de morfología similar pero menor tamaño, al sintetizar microcápsulas mediante emulsificación y gelificación interna utilizando alginato de calcio y liofilización. Las topografías superficiales de las partículas pueden definirse como ásperas, acorde a Doherty y col. (2011).

Los diámetros de las partículas se muestran en la Tabla 2. El sistema WPI/DX6 no presenta diferencias en los diámetros medios entre miniesferas hidratadas y liofilizadas; mientras los diámetros medios del sistema WPI/DX70 disminuyen al liofilizarse. El hecho de que el diámetro medio de las miniesferas liofilizadas resultara mayor que el de las hidratadas podría deberse a una deformación axial, es decir, a un alargamiento en una dirección, consecuencia del vacío generado durante el proceso de liofilizado. En cuanto a los sistemas WPI/DX, las partículas mantuvieron la tendencia esférica.

Tabla 2. Diámetros medios (y su desviación estándar) para las miniesferas antes y después de la liofilización.

Estado	Diámetros medios (μm) \pm SD		
	Control	WPI/DX6	WPI/DX70
Hidratadas	1199,5 \pm 125,8 ^{bB}	1419,1 \pm 143,3 ^{cA}	1430,1 \pm 144,06 ^{cB}
Liofilizadas	1004,5 \pm 125,7 ^{aA}	1412,8 \pm 194,4 ^{cA}	1198,5 \pm 171,1 ^{bA}

Las letras minúsculas comparan las fracciones entre filas (hidratadas y liofilizadas) y las mayúsculas por columnas (sistemas: Control, WPI/X 6 y WPI/DX 70) según test LSD ($p < 0,05$).

Aceite libre/aceite encapsulado

Los resultados de aceite libre se muestran en la Figura 6. Debido al pequeño porcentaje de aceite libre detectado en las esferas hidratadas (M1) (0,24%), se puede concluir que la totalidad quedó encapsulado dentro de las miniesferas.

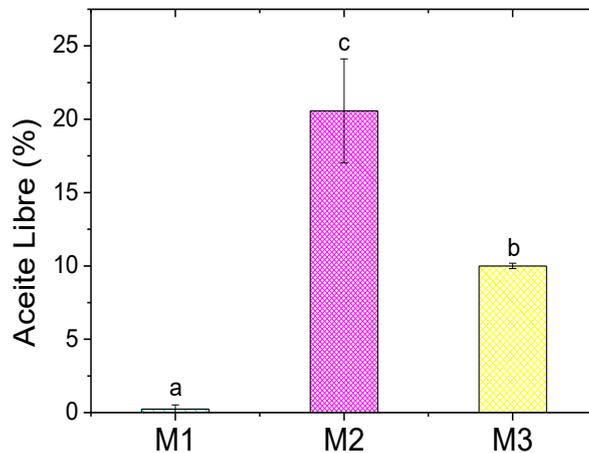


Figura 6. Aceite Libre (%) para las miniesferas de WPI hidratadas (M1); y liofilizadas con (M2) y sin (M3) agua. Las diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD ($p < 0,05$).

Al comparar el aceite libre entre M2 (liofilizada con agua) y M3 (sin agua), es evidente que el proceso llevado a cabo en presencia de agua, es menos favorable. Esto podría deberse a que durante la etapa de congelado, previo a la liofilización, los cristales de hielo formados en la capa de agua circundante podrían romper las estructuras de las miniesferas liberando el aceite retenido.

Recuentos bacterianos de las miniesferas sintetizadas

En la Figura 7, se pueden observar los recuentos bacterianos posteriores a la síntesis de las miniesferas y luego del secado de las mismas mediante liofilización. Los recuentos bacterianos se ven disminuidos notablemente luego del proceso de síntesis. El descenso es 2,07 Log UFC/g para el sistema WPI/DX 6 y 2,87 para WPI/DX 70. Mientras que luego del proceso de liofilización, los recuentos prácticamente no se ven afectados, lo cual resulta coherente dado que dicho método es uno de los más utilizados para la conservación de bacterias.

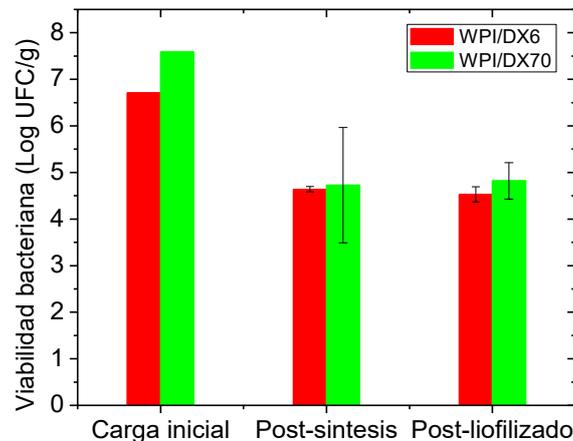


Figura 7. Recuentos de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 en unidades de Log UFC/g (carga inicial) luego de la síntesis de las miniesferas y luego de su liofilizado.

CONCLUSIONES

La encapsulación de bacterias probióticas con WPI y WPI/DX mediante secado spray no resultó en una mejor protección a las bacterias según estudios de simulación gastrointestinal in vitro. Los sistemas WPI/DX-bacterias fueron posteriormente encapsulados mediante emulsificación y gelificación iónica con alginato de calcio mediante la creación de esferas. Las emulsiones cargadas de probióticos mostraron ser más estables en sistemas WPI/DX, según el índice de cremado. Las miniesferas de WPI/DX fueron más estables luego de la liofilización que las de WPI. La síntesis de las miniesferas, pero no así el proceso de liofilización, tienen un efecto negativo sobre la viabilidad celular. Concretamente, el proceso de síntesis disminuye 3,30 Log UFC/g para el sistema WPI/DX 6 mientras que para WPI/DX 70 lo hace en 4,08. La viabilidad de estos sistemas in vitro está siendo actualmente estudiada.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del sistema de becas doctorales del CONICET y el financiamiento del proyecto PICT-2016-2600: “Encapsulación de aceite de Chía y bacterias probióticas utilizando productos de la reacción de Maillard (PRM) de proteínas de suero lácteo y dextranos”.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Beaulieu, L., Savoie, L., Paquin, P., Subirade, M.,** (2002). Elaboration and Characterization of Whey Protein Beads by an Emulsification/Cold Gelation Process: Application for the Protection of Retinol. *Biomacromolecules*, 3, 239-248.
- Champagne, C.P., Paul Ross, R., Saarela, M., Flemming Hansen, K., Charalampopoulos, D.,** (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 185–193.
- Chawla, S.P., Chander, R., Sharma, A.,** (2009). Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins. *Food Chemistry*, 116, 122–128.

- Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Brodkorb, A.,** (2011). Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*, 25, 1604–1617.
- Gregoret, V., Perezlindo, M.J., Vinderola, G., Reinheimer, J., Binetti, A.,** (2013). Comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. *Food Microbiology*, 34:19-28.
- Matiacevich, S. B., Buera, M. P.** (2006). A Critical Evaluation of Fluorescence as a Potential Marker for the Maillard Reaction. *Food Chemistry*, 95, 423-430.
- O’Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., Conway P.,** (2011). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1059-1066.
- Páez, R., Lavari, L., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., Reinheimer, J., Vinderola, C.G.,**(2013). Study of the effects of spray-drying on the functionality of probiotic lactobacilli. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 155-161.
- Picot, A. y Lacroix, C.** (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal* 14, 505–515.
- Saito, V.S.T., dos Santos, T.F., Vinderola, C.G., Romano, C., Nicoli, J.R., Araújo, L.S., Costa, M.M., Andrioli, J.L., Uetanabaro, A.P.T.,** (2014). Viability and Resistance of *Lactobacilli* Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yoghurt. *Journal of Food Science*, 79 (2), M208-M213.
- Slavutsky, A., Chávez, M., Favaro-Trindade, C., Bertuzzi, M.,** 2016. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in a pilot-plant spray dryer. Effect of process parameters on cell viability. *Journal of Food Process Engineering* 00 00–00 VC Wiley Periodicals, Inc. 1-9.
- Spotti, J., Perduca, M., Rubiolo, A., Carrara, C.,**(2013). Gel Mechanical Properties of Milk Whey Protein-Dextran Conjugates obtained by Maillard Reaction. *Food Hydrocolloids* 32, 204-210.
- Tasch Holkem, A., Raddatz, G. C., Lorenzoni Nunes G., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Ferreira Grosso, C. R., Ragagnin de Menezes, C.,** 2016. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 302-308.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J.,** (2008). Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1678-1688.
- Villena, M.M.J., Morales Hernández, M.E., Gallardo, L.V., Ruiz Martínez, M.A.,**(2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica*, 50 (1), 43-50.
- Wang, Q., Ismail, B.,** (2012). Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey protein. *International Dairy Journal* 25, 112-122.
- Zacarias, M.F., Reinheimer, J. Forzani, L., Grangrette, C., Vinderola, G.,**(2014). Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella Typhimurium* infection on mice. *Beneficial microbes*, 5(4), 427-436.
- Zhu, D., Damodaran, S., Lucey, J.A.,** (2011). Physicochemical and Emulsifying Properties of Whey Protein Isolate (WPI)-Dextran Conjugates Produced in Aqueous Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2988–2994.
- Zou, Q., Zhao, J., Liu, X, Tian, T., Zhang, H., Zhang, H., Chen, W.,**(2011). Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1672–1678