

## Evaluación de la Viabilidad de Cepas Probióticas de *Lactobacillus* Encapsuladas en Micropartículas de Pectina para uso en Matrices Vegetales

María C. Tarifa<sup>1,2</sup>[0000-1111-2222-3333]\*, Cristian M. Piqueras<sup>3</sup>[0000-0002-0622-2929], Diego B. Genovese<sup>3</sup>[0000-0002-6677-2471] y Lorena I. Brugnoli<sup>4</sup>[0000-0002-3008-1388]

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Río Negro. CIT Río Negro. Río Negro, Argentina

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones y Transferencia de Río Negro, CIT Río Negro (UNRN-CONICET), 9 de julio 446, Villa Regina, Río Negro, Argentina

<sup>3</sup> Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino La Carrindanga km 7, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

<sup>4</sup> Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur, INBIOSUR (UNS-CONICET), 12 de octubre 991, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

\*mctarifa@unrn.edu.ar

**Abstract.** Las frutas representan un sustrato alternativo con gran potencial para el desarrollo de alimentos funcionales probióticos; sin embargo sus características intrínsecas como la acidez, representan un desafío para la supervivencia de las cepas. En el presente trabajo se propone la co-encapsulación de dos cepas probióticas (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *L. rhamnosus* ATCC 53103) en microgeles de pectina mediante gelación ionotrópica con inulina de distintos orígenes como estrategia para mejorar la viabilidad en condiciones de almacenamiento en refrigeración. Los resultados muestran que el diámetro promedio de las partículas encapsuladas no se vio afectado por los factores analizados, en tanto que la eficiencia de encapsulación fue > 90%. Los recuentos de ambas cepas al cabo de 6 semanas de ensayo fueron mayores a 7 unidades logarítmicas lo cual asegura una concentración de células viables acorde a las normativas vigentes para ser considerado un alimento funcional probiótico.

**Keywords:** *Lactobacillus*, Microencapsulación, Pectina, Inulina.

### 1 Introducción

La inclusión de cultivos probióticos en distintos alimentos se ha realizado tradicionalmente en productos de base láctea, sin embargo la creciente presencia de intolerancias, alergias y distintos regímenes alimentarios, promueven el uso de matrices alternativas no lácteas. En este contexto, las frutas y sus derivados representan sustratos interesantes para la elaboración de un alimento probiótico, ya que además de sus características nutritivas, son aceptadas por todos los grupos etarios y percibidas como alimentos saludables por sí mismos. Sin embargo el principal desafío en el desarrollo de alimentos funcionales a base de frutas es garantizar la supervivencia de las cepas

durante el almacenamiento debido principalmente a su naturaleza ácida. Entre las estrategias propuestas para proteger a los probióticos hasta su llegada al sitio de acción, manteniendo y/o aumentando su viabilidad y actividad están: la fortificación con prebióticos, dando lugar a un alimento simbiótico, y la microencapsulación, utilizando matrices que actúen como una barrera física biocompatible protegiendo a las células bacterianas del ambiente externo [1,2].

La inulina es un carbohidrato de reserva de las plantas, posee propiedades prebióticas y es considerada GRAS. A nivel industrial se la obtiene mayormente de la achicoria; sin embargo un cultivo de creciente interés para su obtención es el topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) debido a su interesante y poco explorado potencial agronómico en Argentina y otras partes del mundo [3]. La pectina, de amplio uso en la industria de alimentos, representa un ingrediente de alto valor funcional que ha ganado atención como agente encapsulante de probióticos debido a su bajo costo, no toxicidad y biocompatibilidad, además de ser resistente a las enzimas gastrointestinales y es fácilmente digerida por las pectinasas generadas por la microbiota colónica [4].

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la microencapsulación en microgeles de pectina con el agregado de inulina de distintos orígenes como estrategia para mejorar la viabilidad de dos cepas probióticas en condiciones de almacenamiento en refrigeración.

## 2 Materiales y Métodos

### 2.1 Materiales

Como prebióticos de interés, se utilizaron inulina comercial (IC) de grado alimentario (Sigma-Aldrich Chemical Co.) e inulina obtenida de *Helianthus tuberosus* (ITub), donada por la Dra. Irene Rubel (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires). La metodología de extracción y caracterización química de ITub se informan en Rubel [5] y Rubel [3].

En la formulación de los microgeles se utilizó pectina de bajo metoxilo Genu Pectin LM104 AS (CPKelco, Limeira, Brasil), con un grado de esterificación del 27% y el 20% de los grupos carboxilos reemplazados por grupos amida (datos del fabricante). Como fase dispersante se utilizó aceite de girasol Molinos Rio de la Plata S.A. (Buenos Aires, Argentina) y como agente entrecruzante se utilizó cloruro de calcio (Anerda S.A., San Fernando, Buenos Aires, Argentina).

### 2.2 Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos cepas de reconocida capacidad probiótica, *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (ATCC, Rockville, MD). Para los ensayos, un vial de cada cepa fue re-suspendido en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Biokar Diagnostics, Beauvais, France), y cultivado durante 24 h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Cada cultivo fue centrifugado a  $5000 \times g$  durante 10 min y el pellet lavado dos veces con solución buffer fosfato (PBS). Para la preparación de los inóculos cada cepa fue re-suspendida en soluciones de PBS+prebiótico (IC e ITub) hasta alcanzar una carga

microbiana de  $\sim 10 \log$  UFC/mL. Las concentraciones bacterianas finales se determinaron por recuento en placa en agar MRS (48h a 37°C). Se utilizaron soluciones de inulina al 1% (p/v) previamente esterilizadas por microfiltración con membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Gamafil S.A., Argentina).

### 2.3 Preparación de las micropartículas

Para la encapsulación de cada combinación probiótico-prebiótico se utilizó el método de gelación ionotrópica mediante la formación de una emulsión agua/aceite utilizando pectina de bajo metoxilo al 2% (p/p) y una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 1% de acuerdo a lo establecido por Holkem [6] con algunas modificaciones. Brevemente, se preparó una solución de pectina en agua destilada estéril bajo agitación magnética (300 rpm, 2 h) a 50°C, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 30°C momento en el cual se incorporó la solución de probióticos y se agitó durante otros 30 min. Para la preparación de la emulsión agua/aceite se mezclaron 20 mL de dicha mezcla con 20 mL de aceite de girasol comercial que contenía Tween 80 (Merck KGaA, Alemania) al 1% (v/v), y se utilizó un sistema de agitación mecánico de paletas planas a 1000 rpm por 4 min. Las micropartículas se obtuvieron mediante goteo de una emulsión de  $\text{CaCl}_2$  de similares características sobre la emulsión agua/aceite original, que contenía los probióticos al mismo tiempo que se mezcló con el sistema de agitación mecánica para lograr la formación de las microesferas de gel. Luego de un paso previo de maduración bajo agitación suave ( $< 300\text{rpm}$ ) durante 1 h aproximadamente las microesferas fueron lavadas con solución al 0,1% de Tween 80.

Se calculó el diámetro promedio en base área ( $D_{32}$ ) siguiendo la siguiente fórmula

$$D_{32} = \frac{\sum_{i=0}^n d_i^3}{\sum_{i=0}^n d_i^2}$$

Donde  $d_i$  es el diámetro de cada partícula y  $n$  es el total de partículas. Para esto se analizaron micrografías digitales tomadas con un microscopio Primo Star-Zeiss de las emulsiones resultantes y se analizaron con el software Image J 1.50i [National Institute of Health (NIH), Bethesda, MD, USA].

### Eficiencia de encapsulación (EE)

La EE se determinó mediante como se indica en Reid [7]:

$$EE = (\text{Log } 10 N / \text{Log } 10 N_0) \times 100$$

Donde  $N$  es el número de células viables encapsuladas y liberadas de las micropartículas y  $N_0$  el número de células libres (suspensiones iniciales) agregadas inmediatamente antes de la encapsulación.

Para su determinación, 0,1 g de micropartículas se suspendieron en citrato de sodio 0,1 % (p/v, pH 6,2) y luego de 20 min bajo agitación suave para lograr la disolución se realizaron diluciones decimales y se procedió al recuento celular en agar MRS a 37°C durante 48h.

### Supervivencia de las células probióticas microencapsuladas bajo condiciones de almacenamiento.

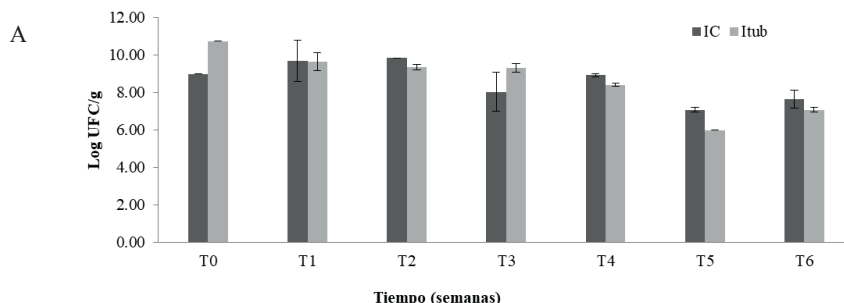
Las cepas co-encapsuladas con los prebióticos fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (4°C) por 6 semanas. Para determinar la supervivencia de las mismas se tomaron muestras semanalmente y se realizaron recuentos en placa en agar MRS a 37°C por 48 h, siguiendo la metodología detallada en el apartado anterior.

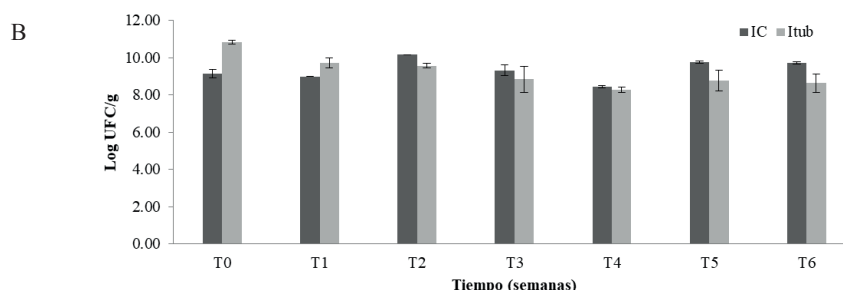
## 3 Resultados y Discusión

Las reglamentaciones nacionales e internacionales establecen que para que un alimento sea considerado probiótico al momento de su consumo debe presentar una carga de células probióticas viables entre  $10^6$  y  $10^9$  UFC/g o mL, por lo tanto mantener su viabilidad es imprescindible. Es por esto que en el presente trabajo se planteó el uso combinado de técnicas de microencapsulación con el agregado de prebióticos como estrategia para la asegurar la viabilidad en condiciones de almacenamiento.

La EE en las condiciones ensayadas fue del  $94 \pm 9$  % para ambas cepas, siendo el diámetro promedio (en base área) de las partículas resultantes de entre 60 y 80  $\mu\text{m}$  para IC y de 90  $\mu\text{m}$  en el caso de ITub, sin encontrarse un efecto significativo entre los factores analizados (la cepa probiótica y el tipo de inulina). En cuanto a la supervivencia al cabo de las 6 semanas a 4°C, *L. casei* presentó recuentos de  $7,65 \pm 0,49$  log UFC/g (IC) y  $7,09 \pm 0,12$  log UFC/g (ITub) mientras que *L. rhamnosus* presentó recuentos de  $9,74 \pm 0,06$  log UFC/g (IC) y  $8,65 \pm 0,49$  log UFC/g (ITub). En las Figuras 1 A y B se puede observar la progresión de ambas cepas a lo largo del tiempo. Como se puede observar tanto IC como ITub presentan un gran potencial simbiótico, manteniéndose niveles de células viables por encima de las recomendadas por las legislaciones. En el caso de ITub se presenta como alternativa no convencional para un aprovechamiento integral de recursos poco explorados como es el caso de los tubérculos de topinambur (*H. tuberosus* L.).

La inmovilización en microgeles de pectina con el agregado de prebiótico brindó un buen soporte de protección bajo condiciones de almacenamiento a temperaturas de refrigeración, siendo el efecto del tipo de prebiótico cepa dependiente. Los resultados muestran un promisorio futuro hacia la administración de los mismos suplementos funcionales en productos a base de frutas asegurando una carga microbiana adecuada en el sitio de acción en el huésped.





**Fig. 1.** Supervivencia de *L. casei* (A) y *L. rhamnosus* (B) co-encapsuladas con Inulina Comercial (IC) e Inulina obtenida de *H. tuberosus* (ITub) a lo largo de 6 semanas a 4°C.

## References

1. Pimentel, T, Madrona, G, Garcia, S., Prudencio, S.: Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT-Food Science and Technology* **63**(1), p. 415-422 (2015).
2. Chen, H., Li, X., Liu, B., Meng, X.: Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, **29**, 248-255 (2017).
3. Rubel, I., et al.: Inulin rich carbohydrates extraction from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers and application of different drying methods. *Food Research International*, **103**, 226-233 (2018).
4. Dafe, A., H. Etemadi, A. Dilmaghani, and G.R. Mahdavinia: Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, **97**, 536-543 (2017).
5. Rubel, I., Pérez, E., Genovese, D., Manrique, G.: In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. *Food Research International*, **62**, 59-65 (2014).
6. Holkem, A., et al.: 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 (2016).
7. Reid, A., et al.: Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>2+</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*, **22**(6), 603-619 (2005).