

Efecto de la a_w sobre la viabilidad celular de *Lactobacillus rhamnosus* secado por aspersión

K. P. Alfonso Lopez¹, M. P. Rascón Díaz¹, E. Méndez Bolaina¹, E. Flores Andrade¹, E. Bonilla Zavaleta^{1*}
¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Prol. Oriente 6 No. 1009, Rafael Alvarado, C.P.
94340, Orizaba, Veracruz, México
*enbonilla@uv.mx

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

En el presente trabajo *Lactobacillus rhamnosus* fue encapsulado en una emulsión doble adicionado con miel y otra sin miel para protegerlo de temperaturas altas durante el proceso de secado por aspersión. Las microcápsulas obtenidas fueron almacenadas en un intervalo de a_w de 0.115 a 0.846 a una temperatura de 45 °C. Se evaluó el efecto que causa la miel en la encapsulación del microorganismo sobre la viabilidad celular durante un almacenamiento de cinco semanas. Se observó que las microcápsulas con miel tienen una carga microbiana de 1×10^7 UFC/g en una a_w de 0.765, la cual es mayor comparada con las microcápsulas sin miel en el intervalo de a_w de 0.654 a 0.846 ya que no existe presencia del microorganismo. Las micrografías muestran que la adición de miel modifica la estructura de las microcápsulas provocando que al secarse por aspersión la superficie sea más irregular notándose hundimientos en la capa, en comparación a las microcápsulas sin miel.

Palabras clave: secado por aspersión, *Lactobacillus rhamnosus*, micrografías, microcápsulas.

Abstract

In the present work *Lactobacillus rhamnosus* was encapsulated in a double emulsion a) added with honey and b) without honey to protect it from high temperatures during the process of spray drying. The obtained microcapsules were stored in an a_w range from 0.115 to 0.846 at a temperature of 45 °C. It was analyzed the effect that honey causes in the encapsulation of the microorganism on cell viability during a storage of five weeks. It was observed that the microcapsules with honey have a microbial load of 1×10^7 CFU / g in an a_w of 0.765 which is higher compared with microcapsules without honey in a_w of 0.654 to 0.846 since there is no presence of the microorganism. The micrographs show that the addition of honey modifies the structure of the microcapsules, causing the surface to be more irregularly sprayed, observing subsidence in the layer, compared to the microcapsules without honey added.

Key words: spray drying, *Lactobacillus rhamnosus*, micrographs, microcapsules.

Introducción

En la búsqueda de un método para la incorporación de probióticos en los alimentos se han desarrollado técnicas de microencapsulación. La microencapsulación ha sido utilizada como una estrategia para la supervivencia de estos microorganismos y a la vez, para una exitosa microencapsulación. Se han estudiado diversos agentes encapsulantes, y en este trabajo se estudia el efecto de la adición de miel en microcápsulas contenidas de *L. rhamnosus* con la finalidad de lograr una buena viabilidad celular después del sometimiento a procesos térmicos, condiciones de almacenamiento y condiciones que el mismo cuerpo humano presenta [Pérez-Leonard y col., 2013].

La utilización de probióticos en la producción de alimentos funcionales, es con la finalidad de conferir a estos la capacidad de ejercer un efecto benéfico para la salud del consumidor más allá de sus propiedades nutricionales [Gómez y col., 2007]. Sin embargo, muchos reportes indican que la supervivencia de las bacterias probióticas suele ser pobre en los productos finales [Rodríguez-Huezo y col., 2007], sugiriendo el uso de prebióticos que podrían mejorar la viabilidad del microorganismo benéfico [Puupponen-Pimia y col., 2002]. Además, la supervivencia de estas bacterias en el sistema TGI (tracto gastro intestinal) es cuestionable [Kailasapathy y col., 2002]. Por lo anterior, se han aplicado diversas tecnologías que ayuden al probiótico a llegar a su sitio de acción; entre estas tecnologías se encuentra la encapsulación, la cual ha sido reconocida como una alternativa para

aumentar la resistencia del microorganismo a ambientes ácidos, durante su almacenamiento y tránsito por el TGI [Anal y Singh, 2007]

Se usan las isotermas para obtener conocimientos necesarios de las propiedades de sorción de los alimentos. Esta información es importante en el caso de los alimentos deshidratados ya que brindan datos de las propiedades termodinámicas que están asociadas al comportamiento de sorción de agua y que influyen en el diseño y optimización de operaciones unitarias. Además ayudan a predecir los cambios en la estabilidad de los alimentos y en la elección del material de empaque adecuado [Al-Muhtaseb y col., 2002]. El presente trabajo pretende demostrar la viabilidad que tiene el *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado durante el almacenamiento evaluando el efecto que ejerce la actividad de agua y Tg durante el estudio de isotermas de adsorción que permitan proponer las mejores condiciones de almacenamiento de las microcápsulas.

Metodología

Materiales

Las materias primas usadas en este trabajo fueron *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (Danisco, Niebüll, Alemania) obtenido a partir de una cepa liofilizada, inulina (NOBEL FOODS, Authentic & Natural, Guadalajara, México) y aceite de uva (Overseas Food Trading LTD, Fort Lee, NJ, E.U.A.); como agentes emulsificantes, ésteres de polirricinoleato (Grindsted PGPR 90 y Panodan Danisco mexicana. S.A. de C.V., México), caldo para lactobacilos y agar bacteriológico MRS (Becton Dickinson, México, D.F.). Para la inclusión del probiótico en la emulsión se hizo uso de la metodología desarrollada por Pimentel-González *et al.* (2009).

Activación de la cepa bacteriana y condiciones de cultivo

La preparación del caldo MRS para la activación, fue realizada de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (55 g/L); posteriormente se dejó enfriar, y se colocó a esterilización en la autoclave (121 °C, 15 min). El cultivo liofilizado de *L. rhamnosus* LC705 (Danisco, Niebüll, Alemania) se rehidrató con 1% (p/v) de inóculo en 99 mL de caldo MRS estéril y se incubó a 37 °C durante 24 h en condiciones anaerobias.

Formulación de la emulsión doble

La emulsión W_1/O , se efectuó pesando CPS, inulina y agua. Esta solución acuosa fue mezclada en un homogeneizador convencional (2800 rpm) durante 10 min, se le adicionó 0.3 g de carga microbiana, y se volvió a homogeneizar durante 5 min. Obtenida la fase acuosa se separaron 30 g, para posteriormente verterla poco a poco a la fase oleosa (Aceite de uva, Panodan y Grinsted, previamente homogeneizado durante 10 min) y, finalmente, homogeneizar W_1/O durante 10 min. Obteniendo 2.73 % de sólidos totales de biopolímeros.

La emulsión $W_1/O/W_2$, se efectuó pesando CPS y agua. La solución acuosa se mezcló con un homogeneizador convencional (2800 rpm) durante 10 min. Posteriormente, la emulsión W_1/O es vertida poco a poco en la muestra anterior, la cual fue homogeneizada a 2800 rpm al momento de verter la emulsión W_1/O . El tiempo de homogeneización final fue de 10 min conteniendo 12.53% de sólidos totales de biopolímeros. Para la realización de la emulsión doble con miel se mezclaron tanto el CPS, agua y miel del mismo modo que el proceso anteriormente descrito.

Secado por aspersión

Las emulsiones obtenidas se secaron en un aspersor a escala laboratorio Büchi modelo B-290 (Switzerland, Suiza), usando temperaturas de entrada y salida de 180 °C y 90 °C, respectivamente. Las condiciones experimentales tomadas en cuenta para la operación del secador por aspersión fueron la presión de aire comprimido (4.5 bar) y la velocidad de alimentación (12 mL/min).

Viabilidad celular de la emulsión doble

La viabilidad celular del microorganismo probiótico fue evaluada a lo largo de proceso de microencapsulación. Esta determinación se dividió en tres etapas: a) viabilidad del inóculo, b) después de la elaboración de la emulsión doble, c) posterior al proceso de secado y, d) posterior al proceso de almacenamiento. Para el caso del inóculo, a partir de *L. rhamnosus* LC705 1% (v/v) en caldo MRS se tomó una alícuota de 100 μ L y se colocó en un tubo Eppendorf con 900 μ L de solución salina al 0.9%; de este tubo se prepararon diluciones seriales hasta 1×10^{-10} .

Se utilizaron 100µL de cada dilución y se sembraron por extensiones en cada placa en medio sólido MRS. Estos pasos fueron repetidos por triplicado para la evaluación de la viabilidad de la emulsión doble, $W_1/O/W_2$.

La supervivencia del microorganismo encapsulado después del proceso de secado por aspersión se hizo mediante rompimiento de las cápsulas y liberación del probiótico. Se disolvieron 0.5 g de microcápsulas recién deshidratadas y se colocaron en contacto con 4.5 mL de solución salina. Se homogenizaron y posteriormente, fueron sometidas a mezcla en vortex durante 10 min. Después de este paso se prepararon diluciones y se realizó conteo en placa como se describió previamente. Las cajas Petri inoculadas se incubaron por 72 horas a 37°C en condiciones anaerobias. Los resultados fueron reportados como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (inóculo y emulsión o colonias por gramo (UFC/g) (microcápsulas).

La viabilidad del microorganismo encapsulado después de su almacenamiento en microclimas a 8 diferentes humedades se hicieron mediante el rompimiento de las cápsulas y liberación del probiótico. Se disolvieron 0.5 g de microcápsulas de cada uno de los ocho microclimas y se mezclaron con 4.5 mL de solución salina. Estos tratamientos fueron homogenizados en vortex. Después de este paso, se prepararon diluciones y se realizó conteo en placa como se describió previamente; las cajas Petri inoculadas se incubaron por 72 h a 37°C en condiciones anaerobias. Los resultados fueron reportados como unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g)

Análisis microscópico de emulsiones y microcápsulas

Se realizaron micrografías para verificar la presencia del probiótico en las emulsiones dobles recién elaboradas, así como en las microcápsulas obtenidas después del proceso de secado. Las muestras se examinaron utilizando el microscopio óptico con software para análisis de imágenes (MOTIC-BA310). De igual forma, se evaluó el tamaño de partícula en objetivo 40X para microcápsulas con y sin miel y así evaluar las diferencias de ambos tratamientos.

Análisis Estadístico

Los valores reportados en este trabajo son la media con su correspondiente desviación estándar. Todas las mediciones fueron realizadas al menos por duplicado. Los softwares estadísticos utilizados en este trabajo fueron Kaleida Graph 4.0 (Synergy Software, Reading PA, EU), Curve Expert 1.4 y Excel (Microsoft Co E.U.A).

Resultados y discusión

Observación de probióticos en emulsión

En la Figura 1a) y 1b) se muestra la morfología de emulsiones dobles con miel y emulsiones dobles sin miel respectivamente, a base de proteína de suero de leche conteniendo *Lactobacillus rhamnosus*; las gotas de emulsión fueron observadas con objetivo cuyo aumento fue de 40X.

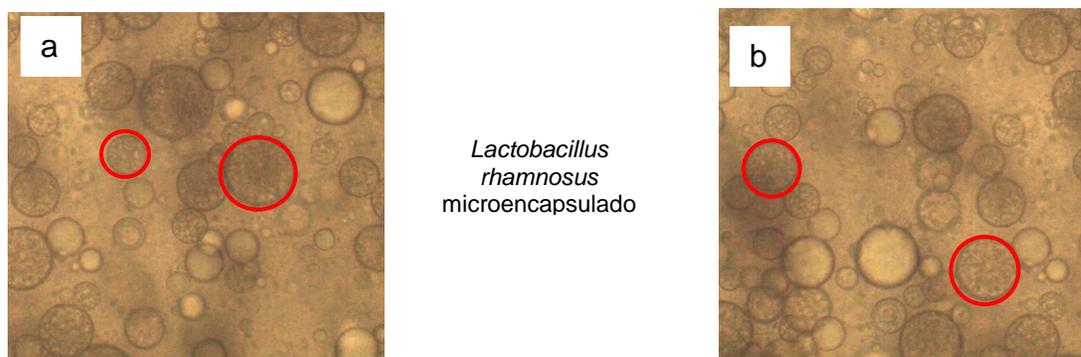


Figura 1. Microcápsulas de emulsión doble con y sin miel respectivamente conteniendo *Lactobacillus rhamnosus* observadas al microscopio en aumento de 40X

En el objetivo 40X se observa la fase acuosa y la oleosa de la emulsión doble con y sin miel. Utilizando este aumento se pudo notar que las gotas de emulsión en su mayoría eran esféricas y de borde liso, conteniendo a su vez gotas de la emulsión W_1/O . La evaluación microscópica a 40X, permitió observar la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* dentro de las gotas de emulsión simple y emulsiones dobles con y sin miel.

La morfología de las microcápsulas permite que puedan ser clasificadas como emulsión múltiple tipo C, donde *Lactobacillus rhamnosus* se encuentra disuelto en una fase acuosa (W_1) y a la vez es atrapada por una fase oleosa (W_1/O), la cual se encuentra dispersa en una segunda fase acuosa (W_2) para formar la cubierta. De igual manera se puede observar a *Lactobacillus rhamnosus* dentro de un glóbulo de agua atrapado por la fase oleosa W_1/O .

Efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular en la emulsión simple y emulsiones con miel y sin miel

En la Figura 2 se muestra la supervivencia celular de *Lactobacillus rhamnosus* en la primera etapa (W_1/O) y en la elaboración de emulsión doble ($W_1/O/W_2$) en función del tratamiento sin miel y con miel. El objetivo fue observar si la adición o falta de miel en la formulación ejerce un efecto sobre la supervivencia del probiótico.

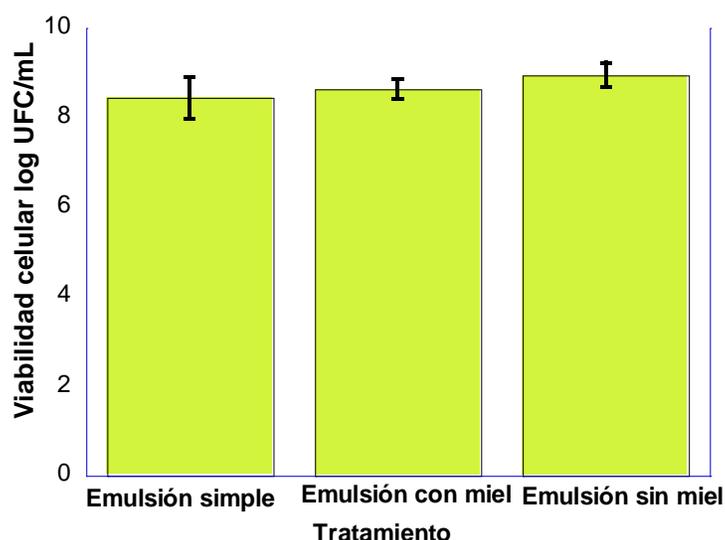


Figura 2. Efecto de diferentes tratamientos sobre la supervivencia de *L. rhamnosus* en emulsiones simple y dobles

Los resultados obtenidos en la Figura 2 muestran que estadísticamente no hay un cambio significativo en los diferentes tratamientos de emulsión simple y emulsión doble sin miel comparados con los obtenidos de la emulsión doble adicionada con miel.

Efecto de los tratamientos en la viabilidad celular después del proceso de aspersión

En la Figura 3 se muestra la supervivencia celular de *L. rhamnosus* después del proceso de aspersión. En esta segunda etapa del proceso se puede observar que el procesamiento a temperaturas altas a las que es sometido *L. rhamnosus* no afecta su viabilidad significativamente. Con respecto a los tratamientos de microcápsulas sin

miel y microcápsulas con miel, los resultados sugieren que la adición de proteína de suero de leche en la formulación ejerce una cierta protección a la supervivencia del microorganismo.

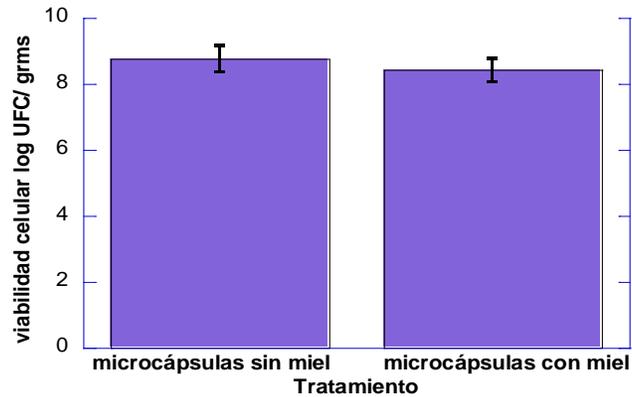


Figura 3. Efecto del secado por aspersión sobre la viabilidad de *L. rhamnosus*

Efecto de la adición de miel en la preparación de *L. rhamnosus* sobre la viabilidad celular durante el almacenamiento

En las Figuras 4 y 5 se observa que el almacenamiento a una actividad de agua de 0.444 permite obtener microcápsulas con efecto benéfico (10×10^7 UFC/g con un contenido de humedad de 28.0704 g agua/100 g ss, observándose mientras tanto que, en actividades de agua mayores, de 0.6 a 0.8 se afecta la viabilidad de *L. rhamnosus* durante un almacenamiento de 5 semanas.

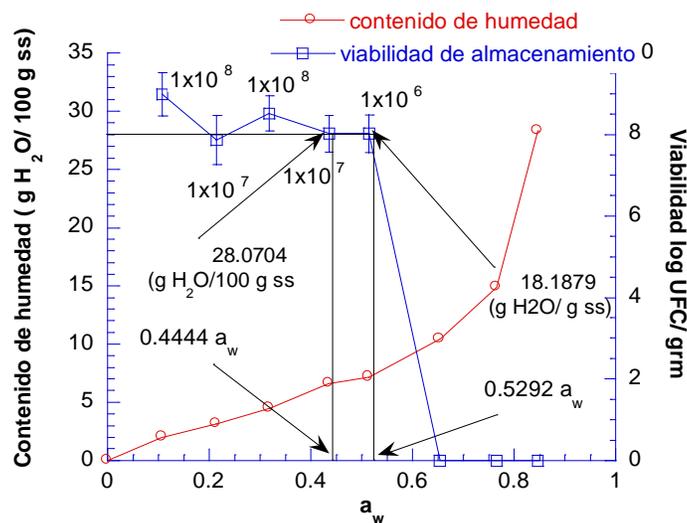


Figura 4. Efecto de la actividad de agua sobre la viabilidad celular de *L. rhamnosus* en microcápsulas sin miel durante el almacenamiento

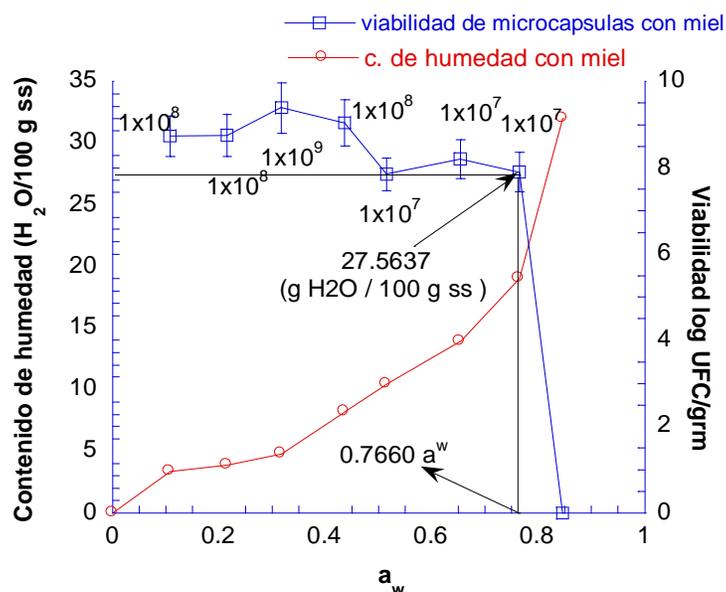


Figura 5. Efecto de la actividad de agua sobre la viabilidad celular de *L. rhamnosus* en microcápsulas sin miel durante el almacenamiento

Conclusiones

El uso de una emulsión doble y su posterior secado demostró que el procesamiento térmico no afecta la viabilidad de *L. rhamnosus* el cual garantizó la presencia del microorganismo durante el proceso de secado por aspersión que generaban valores de viabilidad de 1×10^7 UFC/g los cuales son requeridos para un efecto beneficioso en la salud humana. El uso de la microscopía permitió observar y verificar la presencia del microorganismo dentro de gotas de la emulsión doble.

La evaluación de viabilidad celular de *Lactobacillus rhamnosus* en diferentes actividades de agua permitió conocer que las microcápsulas con miel influyen positivamente en la viabilidad del microorganismo en presencia de valores con actividades de agua mayores como lo sería en este caso una a_w de 0.7 a 35°C , mientras que en microcápsulas sin miel solo se observa presencia de *Lactobacillus rhamnosus* en a_w de 0.1 a 0.5.

La alta viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* posterior al secado por aspersión así como el almacenamiento de 5 semanas en diferentes actividades de agua hacen posible que en este trabajo se recomiende utilizar el tratamiento que utiliza la adición de miel a temperatura de almacenamiento de 35°C .

Referencias

1. Anal A. K. y H. Singh. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Science and Technology* 18:240–251.
2. Al-Muthaseb, A. H., W. McMin, A. M. y Magee, T. R. A. 2002. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: A review. *Institution of Chemical Engineers*. 80:118-127.
3. Pérez-Leonard H., G. Bueno-García, M. A. Brizuela-Herrada, K. Tortoló-Cabañas y C. Gastón-Peña. 2013. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 47:14-25
4. Gómez. S., E. Nova y A. Marcos. 2007. Probióticos *In* Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación. Dirección General de Alimentación. Departamento de Metabolismo y Nutrición. Instituto del Frío. CSIC. Madrid. pp 14.

5. Rodríguez-Huezo. M. E., R. Durán-Lugo., L. A. Prado-Barragán., F. Cruz-Sosa., C. LobatoCalleros., J. Alvarez-Ramírez y E. J. Vernon-Carter. 2007. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International* 40:1299–1306
6. Puupponen-Pimia R., A. M. Aura., K. M. Oksman-Caldentey., P. Myllarinen., M. Saarela., T. Mattila-Sandholm y K. Poutanen. 2002. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science & Technology* 13: 3–11.
7. Kailasapathy K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Curr Issues Intest Microbiology*. 3: 39- 48.
8. Pimentel-González D.J., R. Campos-Montiel G., C. Lobato-Calleros, R. Pedroza-Islas. 2009. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 42:292-297