

Evaluación del rendimiento de encapsulación de microcápsulas de alginato utilizando extracto de betabel como matriz prebiótica

F. Pérez-Liceaga¹, S. López Uriarte, E. Sánchez García², K. García- Alanís¹, M. Bautista-Villarreal¹, S. Castillo^{1*}

¹ Departamento de Ciencia de Alimentos, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. ² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. *sandra.castilloh@uanl.mx

RESUMEN: En el presente trabajo se evaluó el rendimiento de encapsulación (R.E.) para *Lactobacillus plantarum* en microcápsulas de alginato utilizando betabel como matriz prebiótica. Se diseñaron varias formulaciones con distintas combinaciones de Betabel en diferentes fases con el alginato. Una vez estandarizadas las mejores combinaciones para la obtención de la microcápsula, se incorporó el cultivo en tres formulaciones diferentes: alginato 1% (A), alginato 1% + betabel 1% (A+B1), y alginato 1% + betabel 2% (A+B2). Posteriormente, se determinó el rendimiento de encapsulación (R.E.) para *L. plantarum* en cada una de las formulaciones con betabel mediante cuenta de células viables en placa antes y después del encapsulado. Los resultados mostraron que, aunque las tres formulaciones con betabel mantuvieron un rango de $10^7 - 10^9$ UFC/g células viables después de la encapsulación, el rendimiento varió para cada formulación, siendo la formulación A+B1 aquella que obtuvo el mejor R.E. (95%) mientras que en las otras dos formulaciones fue más bajo (83%). Por lo que, el diseño de la formulación influye en el rendimiento de encapsulación de *Lactobacillus plantarum*.

Palabras clave: Betabel, microencapsulación, probióticos.

ABSTRACT: In the present work the encapsulation yield (R.E.) for *Lactobacillus plantarum* in alginate microcapsules using beetroot was evaluated as a prebiotic matrix. Several formulations with different combinations of beetroot in different phases were designed with alginate. Once the best combinations for obtaining the microcapsule were standardized, the culture was incorporated in three different formulations: alginate 1% (A), alginate 1% + beet 1% (A + B1), and alginate 1% + beet 2% (A + B2). Subsequently, the encapsulation yield (R.E.) for *L. plantarum* was determined in each of the formulations with beetroot by viable cells count technique before and after the encapsulation. The results showed that, although the three beet formulations maintained a range of 10^7-10^9 CFU/g of viable cells after encapsulation, the yield varied for each formulation, being the formulation A + B1 the one that obtained the best R.E. (95%) while in the other two formulations it was lower (83%). Therefore, the design of the formulation influences the encapsulation performance of *Lactobacillus plantarum*.

Keywords: Beetroot, microencapsulation, probiotics.

Área: Alimentos funcionales

Introducción

El desarrollo de alimentos funcionales con incorporación de probióticos se ha propuesto como una alternativa a la problemática de nutrición, obesidad y morbilidad de enfermedades gastrointestinales, teniendo en cuenta que el consumo de productos de origen vegetal puede coadyuvar de manera importante en estos casos. Actualmente la obesidad, es uno de los problemas de gran importancia a nivel mundial, principalmente en los países desarrollados, y ha sido provocada mayormente por factores como la urbanización, modernización de las prácticas laborales y mejora de las condiciones sociales donde éstos tienen un mayor efecto en el individuo al presentar un estilo de vida sedentaria y un elevado consumo de alimentos procesados sin valor nutricional, esto último provoca la disminución del interés en alimentos saludables como frutas y vegetales. La falta de una buena alimentación rica en frutas y vegetales junto con un estilo de vida saludable resulta en un gran impacto al disminuir una gran variedad de enfermedades (Gupta & Abu, 2012).

En México, se ha observado que la obesidad afecta a por lo menos el 70% de la población adulta. Esta condición, está asociada al desarrollo de diversas complicaciones como la diabetes, enfermedades cardiovasculares (hipertensión), hiperlipidemia, arteriosclerosis, hígado graso y cáncer; donde la diabetes es la primera causa de muerte en México, por lo que ocupa una demanda de atención médica en consulta externa, siendo una de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de instituciones públicas (entre 15% y 20%)(Baboota *et al.*, 2013 ; Soto, Moreno & Pahua, 2016).

El desarrollo de alimentos funcionales busca proveer beneficios a la salud más allá de la nutrición básica; éstos cubren una amplia gama de productos comerciales entre los cuales se encuentran los probióticos, esteroides vegetales y ácidos grasos omega 3 (Hunter & Hegele, 2017).

Los probióticos han sido populares entre los consumidores debido a sus potenciales beneficios sobre la salud como la prevención de infecciones intestinales, actividad anticancerígena, control de niveles de colesterol sérico y estimulación del sistema inmune. Debido a que los probióticos llegan a perder su viabilidad, ya sea durante su procesamiento, almacenamiento o durante la digestión gastrointestinal, se han desarrollado varias técnicas para que éstos y otras sustancias sensibles puedan ser protegidas de su degradación causada por condiciones ambientales con el objetivo de ser consumidas ó aprovechadas. Una de estas técnicas es la microencapsulación, la cual se basa en proteger a la sustancia del medio exterior mediante una barrera física donde los probióticos constituyen parte como una matriz continua, de manera que un hidrogel es formado (Heidebach, Först & Kulozik, 2012).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el R.E. de diferentes formulaciones para la obtención de microcápsulas conteniendo *L. plantarum* utilizando betabel como matriz prebiótica, mediante la técnica de cuenta viable en placa. Esto dará la pauta, para el desarrollo de microcápsulas estables y su futura incorporación en un alimento funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Cepas microbianas y condiciones de cultivo.

La cepa que se utilizó fue *Lactobacillus plantarum* y fue activado en medio MRS BD ® estéril (121°C/15 min) e incubado a 37°C/ 18 horas en atmósfera microaerofílica. El cultivo activado, se centrifugó a 2500 rpm/ 20 min, se descartó el sobrenadante y se suspendió en 1 ml de solución salina estéril al 0.85% para posteriores experimentos.

b) Preparación del material vegetal.

El material vegetal utilizado, fue betabel (*Beta vulgaris*). El betabel se desinfectó muy bien, y posteriormente se cortó en cuadros pequeños y se secó en un túnel de secado a una temperatura de 45°C. Una vez seco, se molió y se almacenó en recipientes estériles, en obscuridad.

c) Microencapsulación

Se prepararon tres soluciones de alginato sódico (Deima ®) al 1% estéril. Posteriormente se agregó una solución de betabel al 1% para obtener la formulación A+B1 y otra al 2% para obtener la formulación A+B2. La tercera formulación no contenía betabel, y se utilizó como control.

Después de la dispersión de las soluciones, se agregó la cepa microbiana. Se depositaron 5 ml de la mezcla en una jeringa estéril con una aguja de 22G x 32 mm, se dejó caer gota por gota en un vaso de precipitado con 100 ml de CaCl₂ 0.1 M en agitación a 600 rpm. Después se dejó reposar las microcápsulas durante 15 minutos, y finalmente fueron recuperadas. Las microcápsulas se almacenaron bajo refrigeración (4°C) en una solución de 0.1 M CaCl₂ durante 24h.

Se determinó el rendimiento de encapsulación (R.E) de *L. plantarum*, por la metodología descrita en Khosravi et al. (2014). Se transfirió un gramo de cápsulas a 9ml de buffer de fosfato (pH 6.8) para la liberación de las bacterias probióticas. La solución se sometió a agitación en un homogeneizador a 2000 rpm /15 minutos. Se determinaron las cuentas (UFC/g) inoculando la solución en placas Petri con agar nutritivo e incubando por 24 horas a 37°C.

d) Determinación de rendimiento de encapsulación (R.E.)

Se determinó el rendimiento de encapsulación empleando el método mencionado por Khosravi et al. (2014), esto se calculó con la siguiente ecuación:

$$R.E. = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100$$

Donde N_0 es el número de bacterias viable en CFU/ml de cultivo y N es el número de bacterias viables en UFC/g de microcápsulas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se muestran los resultados del R.E. en donde se puede observar que *L. plantarum* se mantuvo dentro del rango mínimo de $10^6 - 10^7$ UFC/g viables antes de la ingesta (Shaikh, Deshpande & Kulkarni, 2018) en las tres formulaciones; sin embargo, se observa una diferencia significativa en la formulación A+B1 con respecto a las demás, siendo esta última la que mostró el mejor rendimiento de encapsulación.

Tabla I. Rendimiento de encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en diferentes formulaciones de microcápsulas. La formulación A, se utilizó como control.

Formulación de la microcápsula	Carga inicial (N ₀) UFC/g	Carga final (N) UFC/g	R.E. (%)
Alginato 1% (A)	1.41x10 ⁹	3.70x10 ⁷	82.73 ^a
Alginato 1% + Betabel 1% (A+B1)	3.47x10 ⁹	1.14x10 ⁹	94.92 ^b
Alginato 1% + Betabel 2% (A+B2)	3.39x10 ⁹	7.35x10 ⁷	82.53 ^a

Estudio realizado por duplicado con al menos tres repeticiones. Letras diferentes en la columna señalan diferencia significativa. Análisis estadístico ANOVA con post hook Tukey HSD.

En el trabajo de Sathyabama et al. (2014) se realizó una microencapsulación de *Staphylococcus succinus* y *Enterococcus faecium* con alginato adicionado con prebióticos en polvo (betabel y achicoria), donde ambas mostraron niveles de 9 Log UFC /mL después de su encapsulación mediante un protocolo de emulsión. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo en la formulación A+B1, la cual presentó un R.E. de 94.9% con un nivel de 9 Log UFC /g de *L. plantarum* (Figura 1) mostrando una diferencia significativa contra el control (formulación A). Por otra parte, la formulación de betabel A+B2 aunque se mantuvo en el nivel deseado de encapsulación (10^6-10^7) no presentó diferencia significativa comparado con la formulación A. Esto puede estar influenciado por diversos factores, entre los que se menciona que la acidez generada por el betabel en el interior d la cápsula, puede afectar el rendimiento de encapsulación debido a efectos negativos en la bacteria encapsulada (Gupta & Abu, 2012).

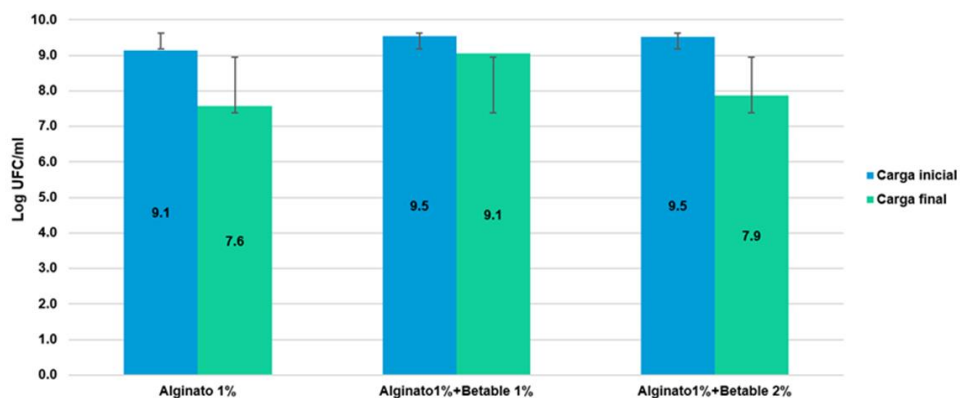


Figura 1. Log UFC/mL de *L. plantarum* antes y después de la microencapsulación.

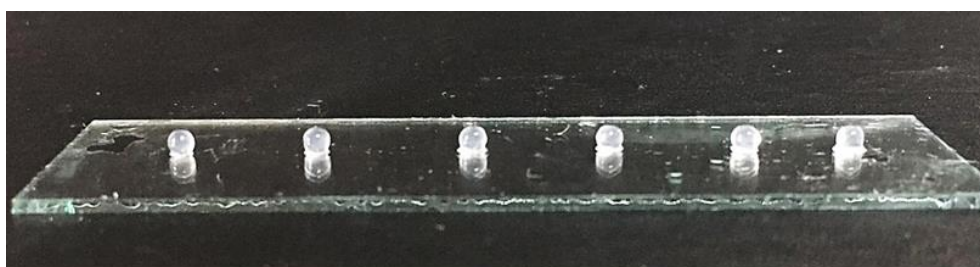


Figura 2. Microcápsulas de Alginate 1% (A) y *L. plantarum* con un rango de diámetro de 2 - 2.5 mm.

Por otra parte, una cantidad mayor de betabel en el interior de la cápsula, podría desplazar a la bacteria y con ello obtenerse un menor rendimiento de encapsulación (Sathyabama et al, 2014). De acuerdo con Alaniz et al. (2018) y Gupta & Abu (2012), los compuestos que pueden estar presentes en el betabel son: oligosacáridos generados a partir de los polisacáridos de la pared celular, en este caso arabino-oligosacáridos, ácido málico, betalaína, compuestos fenólicos y compuestos antioxidantes; Estos compuestos pueden tener un efecto prebiótico potencial sobre la bacteria encapsulada manteniendo las células viables por más tiempo. En el caso de los compuestos fenólicos y antioxidantes, ayudan a limitar los efectos negativos de la exposición al oxígeno en la bacteria, manteniéndola protegida. Es importante la formulación de la microcápsula para la obtención de un rendimiento óptimo. Estudios posteriores, deben dirigirse hacia la caracterización fisicoquímica y nutricia de la microcápsula, además de la supervivencia de la bacteria a través del tiempo para poder determinar una vida de anaquel para su incorporación a un alimento funcional.

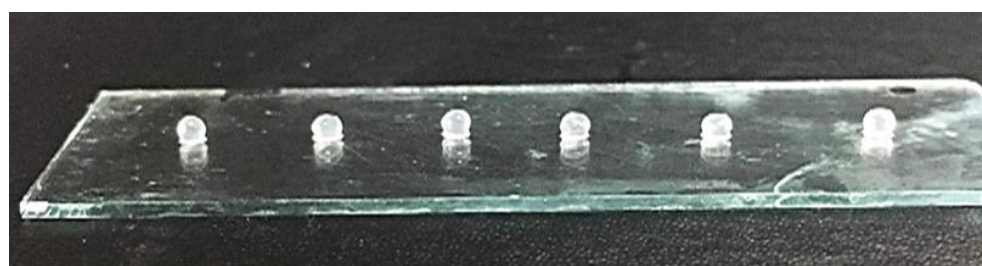


Figura 3. Microcápsulas de Alginate 1% + Betabel 1% (A+B1) y *L. plantarum* con un rango de diámetro de 2 - 2.5 mm.

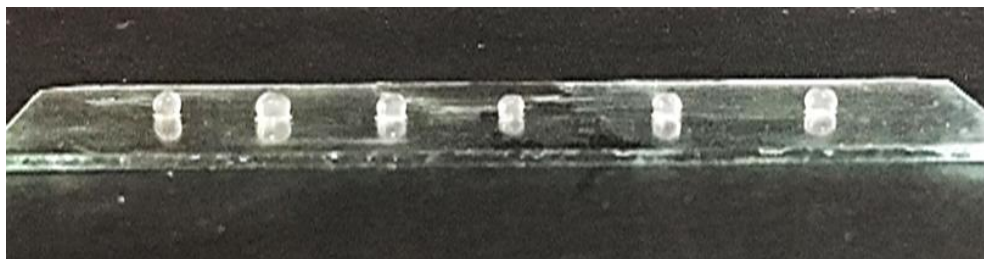


Figura 4. Microcápsulas de Alginato 1% + Betabel 2% (A+B2) y *L. plantarum* con un rango de diámetro de 2 - 2.5 mm.

BIBLIOGRAFÍA

- Alaniz Porto, M.R., Sayuri Okina, S., Colombo Pimentel, T., Garcia, S., & Prudencio, S.H. 2018. Beet and orange mixed juices added with *Lactobacillus acidophilus*. *Nutrition & Food Science*, 48 (1): 76-87.
- Baboota, R. K., Bishnoi, M., Ambalam, P., Kondepudi, K. K., Sarma, S. M., Boparai, R. K., & Podili, K. (2013). Functional food ingredients for the management of obesity and associated comorbidities – A review. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 997–1012.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. 2012. Probiotic Fermentation of Plant Based Products: Possibilities and Opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52: 183 – 199.
- Heidebach, T., Först, P. & Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (4): 291-311.
- Hunter, P. M., & Hegele, R. A. (2017). Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidaemia. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(5) : 278–288.
- Khosravi Zanjani, M. A., Ghiassi Tarzi, B., Sharifan, A., & Mohammadi, N. 2014. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3): 843–852.
- Sathyabama, S., Ranjith kumar, M., Bruntha devi, P., Vijayabharathi, R., & Brindha priyadharisina, V. 2014. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT – Food Science & Technology*, 57: 419 – 425.
- Shaikh, U.A., Deshpande, H.W., & Kulkarni, D.B. 2018. A review on probiotic beverages prepared using vegetables. *International Journal of Chemical Studies*, 6 (5): 61 – 65.
- Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., & Pahuja-Díaz, D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(6) : 8-22.