

## Microencapsulado de *Bifidobacterium longum* para el desarrollo de un alimento funcional

T.J.S. Sánchez-Pérez<sup>1</sup>, S. Gutiérrez-Vargas<sup>3</sup>, M.F. León-Galván<sup>1,2\*</sup>.

1 Departamento de Alimentos, 2 Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. 3 Departamento de energías, Universidad Politécnica de Guanajuato. [sgutierrez@upgto.edu.mx](mailto:sgutierrez@upgto.edu.mx) ; [tjs.sanchezperrez@ugto.mx](mailto:tjs.sanchezperrez@ugto.mx); [fabiola@ugto.mx](mailto:fabiola@ugto.mx)

**RESUMEN:** Los principales problemas de salud pública que afectan a la población mexicana están asociados con trastornos metabólicos del sistema digestivo siendo las de mayor incidencia las infecciones entéricas, gastrointestinales, enfermedad intestinal inflamatoria, en incluso el síndrome de intestino irritable y el cáncer de colon; esto se ha asociado a estilos de vida con una alimentación inadecuada y a la pérdida de microorganismos probióticos en la microbiota del humano. La pérdida de los probióticos puede deberse a la edad avanzada, o bien a ayunos muy prolongados por periodos sostenidos. En ese sentido, en esta investigación se ha planteado como objetivo desarrollar un alimento biofuncional que no requiera refrigeración y que mantenga viable durante la vida de anaquel la bacteria probiótica *Bifidobacterium Longum* y esta pueda llegar intacta al colon, para lo anterior se realizó la caracterización molecular y cinética de crecimiento de *Bifidobacterium Longum*, y para mantener la bioactividad se plantea el microencapsulado mediante secado por aspersión.

**Palabras clave:** Microbiota, microencapsulado, probiótico.

**ABSTRACT:** The main public health problems that affect the Mexican population are associated with metabolic disorders of the digestive system, with the highest incidence being enteric, gastrointestinal infections, inflammatory bowel disease, and even irritable bowel syndrome and colon cancer. has associated lifestyles with inadequate nutrition and the loss of probiotics in the human microbiota. The loss of probiotics may be due to advanced age, or to very long fasts for sustained periods. In this sense, this research has aimed to develop a biofunctional food that maintains viable during the shelf life of the probiotic bacterium *Bifidobacterium Longum* and this can reach the colon intact, for the above was made the molecular and kinetic characterization of growth of *Bifidobacterium Longum*, and to maintain bioactivity, microencapsulation is proposed by spray drying.

**Key words:** Microbiota, microencapsulated, probiotic.

**Área:** Alimento funcional

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad el estilo de vida ha ocasionado cambios en la nutrición asociada tanto al nivel socioeconómico como al crecimiento global acelerado ocasionando un alza en la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles como obesidad y diabetes. Estas enfermedades tienen en común que su naturaleza es gastrointestinal y de trastornos metabólicos principalmente en el tracto digestivo, como incidencia las infecciones entéricas, gastrointestinales, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome de intestino irritable e incluso cáncer de colon. Esta situación ha demandado el desarrollo de nuevos productos que cumplan con el requerimiento nutricional y que sean de fácil y rápido acceso para el consumidor. En ese sentido surgen los alimentos funcionales (AF). Un alimento funcional hace referencia a alimentos que promueven una salud óptima y ayudan a reducir el riesgo de enfermedades, y solo puede considerarse funcional si logra demostrar que posee un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo. Para que pueda clasificarse como alimento funcional debe seguir siendo de naturaleza alimentaria y consumirse como parte de una dieta diaria (1). a regulación en relación con los alimentos saludables está siendo constantemente revisada y modificada, y constituye uno de los temas de mayor dinamismo en los organismos regulatorios y en la industria alimentaria. El concepto de desarrollar alimentos no sólo para disminuir las deficiencias nutricionales, sino más bien para proteger la salud de la población fue desarrollado a principios de los años 80 en Japón, a través del Ministerio de Salud, preocupado por los elevados gastos en salud de la

población japonesa con alta expectativa de vida. Es así como creó un marco regulatorio que favorecía el desarrollo de estos alimentos, que en la actualidad se conocen como FOSHU (Foods for Specified Health Use) (1).

Los alimentos funcionales descritos a la fecha, se centran en adicionar micronutrientes, fibra dietética, metabolitos secundarios, y probióticos, siendo estos últimos dirigidos principalmente a niños y a ancianos ya que en términos generales mejoran la respuesta inmunitaria.

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando son administrados en la cantidad adecuada ejercen un efecto beneficioso a la salud del huésped (2). Para ser considerado probiótico es necesario que se hayan realizado estudios que demuestren en humanos que demuestren los beneficios concretos, los principales probióticos conocidos hasta ahora se clasifican en, *Lactobacillus*, *enterococcus*, *Bifidobacterium*, y algunos *Streptococcus*; los cuales requieren prebióticos (fuente de carbono) específicos para cada uno.

De manera particular *Bifidobacterium longum* es una bacteria probiótica gram positiva, catalasa negativa presente de forma natural en la microbiota humana, su fuente de carbono son los fructooligosacáridos; se considera que es un excelente regulador del sistema inmune y que ayuda a restaurar la microbiota intestinal (3). Existen muchos productos en el mercado que contienen alguna especie de *Bifidobacterium*, sin embargo a la fecha todos requieren refrigeración pues son derivados lácteos como yogurth, queso, entre otros, y estos productos se vuelven perecederos y de difícil acceso para el sector más vulnerable de la población. En ese sentido, objetivo de este trabajo es desarrollar un alimento biofuncional que no requiera refrigeración y que mantenga viable durante la vida de anaquel la bacteria probiótica *Bifidobacterium Longum* y esta pueda llegar intacta al colon.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Activación de *Bifidobacterium longum* y determinación de su cinética de crecimiento.

La recuperación de la cepa de *Bifidobacterium longum* se realizó en medio de cultivo Agar y líquido Mann Rogosa (MRS). La cepa fue estriada en cajas de medio de cultivo MRS e incubada en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 72 horas, posteriormente se seleccionó una colonia y se puso a crecer en medio líquido MRS, de igual forma en las mismas condiciones, todo lo anterior con base a la NOM-092-SSA1-1994. Para la cinética de crecimiento de tomo muestra cada 3 horas y se determinó a una O.D de 600.

Caracterización molecular de *Bifidobacterium longum*

Se realizó PCR colonia de la cepa aislada seleccionada para crecimiento en líquido, para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos específicos LM26 F y LM3 R, específicos para el gen ribosomal 16s de *Bifidobacterium*, con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial de 94°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos que constan de 94°C por 45 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, finalmente una extensión a 72 °C por 7 minutos. La reacción para el PCR colonia constó de buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, oligonucleótido UBF 0.1 μM, oligonucleótido 1492R 0.1μM, dNTP's 0.2mM, Taq polimerasa 1u/μla. El termociclador que se utilizó es dual C1000 Thermal Cycler de Biorad, El producto de PCR se observó en electroforesis en gel agarosa al 1% y se analizó la amplificación del fragmento de aproximadamente 1500 pb correspondiente al gen 16S en un trasluminador UV.

Secuenciación y análisis bioinformático

Se efectuó secuenciación del producto de PCR y la secuencia obtenida fueron analizadas en las plataformas bioinformáticas del NCBI y NCBI y Ribosomal Database.

Selección del agente microencapsulante

Se propuso emplear alginato de calcio, quitosano, maltodextrina.

Microencapsulado de *Bifidobacterium longum*

El método propuesto para microencapsular *Bifidobacterium longum* fue secado por aspersión, se emplea un equipo BUCHI Mini Spray Dryer B-29, siguiendo las condiciones reportadas por Alamilla et al. 2005.

#### Formulación del alimento funcional

Para alimento funcional se seleccionaron ingredientes que aporten la cantidad adecuada de proteína, carbohidratos, lípidos y micronutrientes adecuados para cubrir el 30% del requerimiento calórico de un adulto.

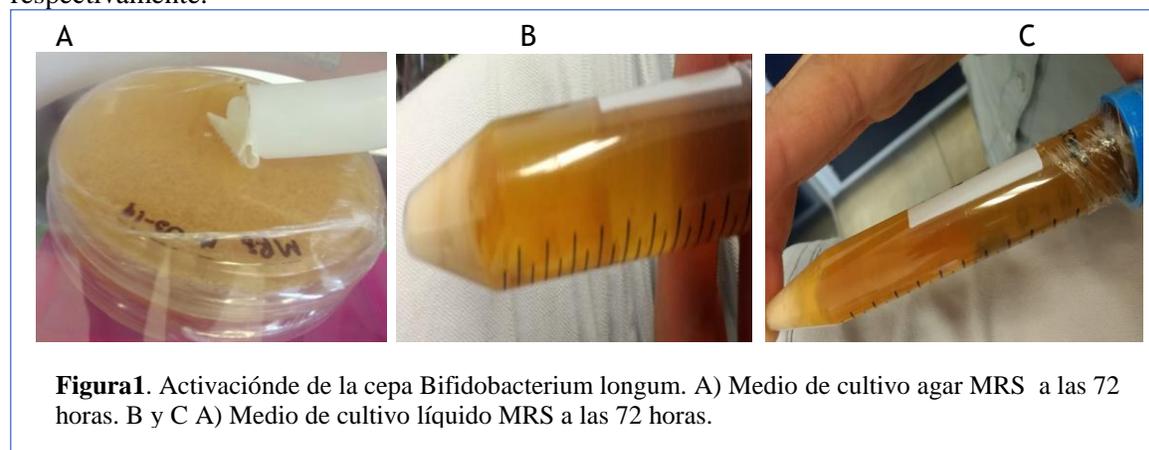
#### Determinación de la vida de anaquel

La vida de anaquel se determinó de acuerdo a 28 y 37°C, y se evaluó a los 7,14 y 28 días (prueba aún en proceso).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

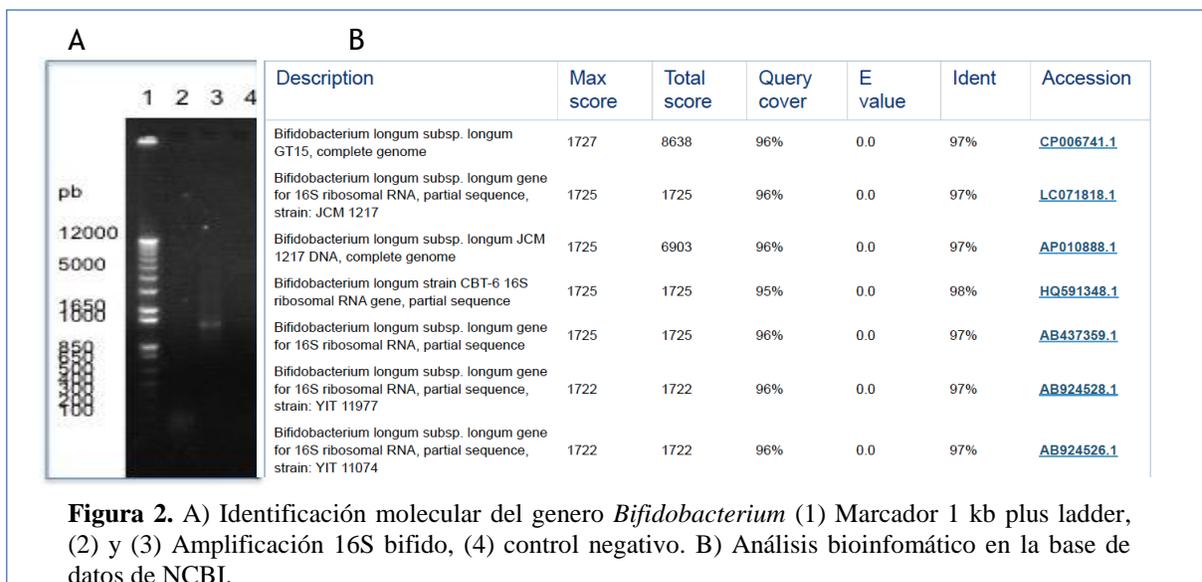
### Activación de *Bifidobacterium longum*

*Bifidobacterium longum* se recuperó a las 72 horas de crecimiento, se observó crecimiento a partir de las 48 horas, principalmente en medio líquido. Como puede observarse en la Figura 1, la temperatura de 37°C fue favorable aunque se ha reportado que puede crecer a 28°C. En la Figura 1A se presenta el crecimiento en medio sólido, y en las Figuras 1B y 1C se presenta en líquido, a las 48 y 72 horas respectivamente.



### Caracterización molecular y bioinformática de la cepa *Bifidobacterium longum*

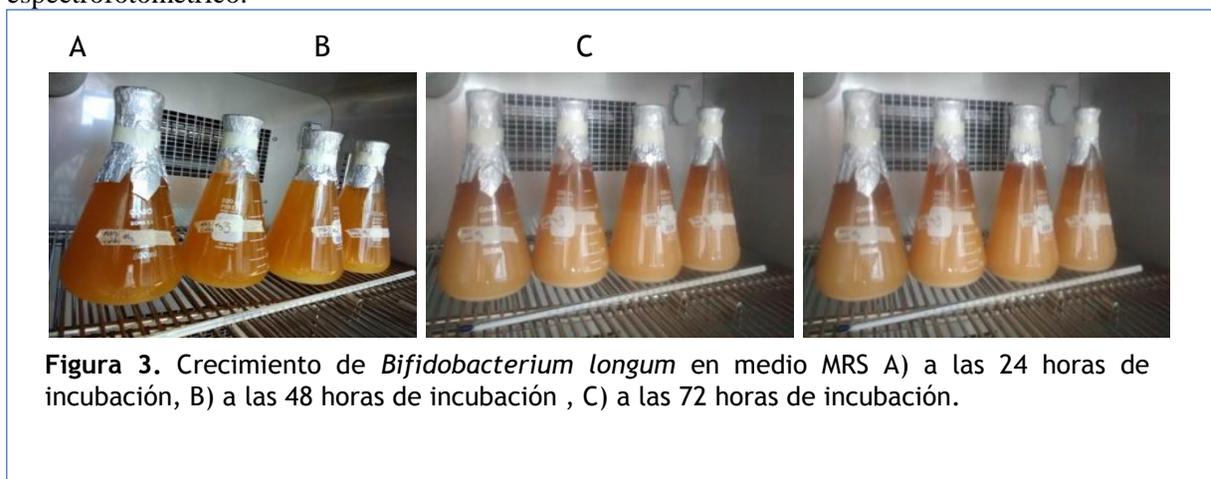
El amplicón generado fue de 1000 pares de bases (Figura 2A), y el análisis bioinformático realizado en la plataforma de NCBI indicó que la cepa con la que se está trabajando efectivamente es *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* GT15 como puede observarse en la Figura 2B.



**Figura 2.** A) Identificación molecular del genero *Bifidobacterium* (1) Marcador 1 kb plus ladder, (2) y (3) Amplificación 16S bifido, (4) control negativo. B) Análisis bioinformático en la base de datos de NCBI.

### Microencapsulado de *Bifidobacterium longum*

A partir de la cepa obtenida se volvió a inocular en 2lts de medio liquido caldo MRS de igual manera se obtuvo un crecimiento óptimo. A las 24 horas se observa que existe un cambio de color de cristalino a turbio con una presencia mínima de bacterias (Figura 3A); a las 48 horas los cambios presentados en este intervalo son: cambio de coloración de café cristalino a beige también se observa el crecimiento de la bacteria (Figura 3B). A las 72 horas, como se muestra en la Figura 3C, se puede observar la tonalidad del medio de cultivo ha prevalecido así mismo la bacteria ha tenido un creciente óptimo, de este crecimiento se está estableciendo la cinética de crecimiento por su densidad óptica por método espectrofotométrico.



**Figura 3.** Crecimiento de *Bifidobacterium longum* en medio MRS A) a las 24 horas de incubación, B) a las 48 horas de incubación, C) a las 72 horas de incubación.

Con relación a la seleccionar el agente encapsulante más adecuado determinó que el mejor para la bacteria es el alginato de calcio, esto corresponde a lo reportado por Almilla et al. En 2005 (4); quien también estableció que el agente que el encapsulador más viable es el alginato de calcio debido a que resiste mejor las temperaturas, mejor resistencia mecánica, alta porosidad y tolerancia a ciertas sales y agentes quelantes en el proceso de extrusión además de tener mayor estabilidad de las cápsulas mediante la modificación del material de pared a nivel de su microestructura.

El método para el encapsulado seleccionado fue secado por aspersión (Mini Spray Dreyer, Figura 6), y las condiciones establecidas son las siguientes: Se mezcla 2% (V/V) del concentrado de células con alginato de sodio al 4%. La mezcla se hace pasar por una aguja calibre 21 y se deja gotear sobre una

solución de cloruro de calcio al 0.2M y se deja que endurezca por 30 minutos, las capsulas se enjuagan con solución salina y se colocan en frascos. Las capsulas se someten a un secado por lecho fluidizado con una temperatura de aire de 40°C y velocidad de 3.25 m/s, las capsulas secas se almacenaron en frascos de polipropileno a temperatura ambiente y se mide su viabilidad, las capsulas húmedas se almacenan en solución de agua peptona da al 0.1% a 4°C y se realiza el conteo de células viables en capsulas.

### **Viabilidad de la bacteria**

Los cultivos de *B. Longum* fueron incubados por 108 hrs en una jarra de anaerobiosis. Se tomaron muestras cada 3 horas y se midió la densidad óptica a 600nm. En la figura 34 se presenta la curva de crecimiento de *B. longum* en medio MRS, en donde se puede observar que hasta las seis hrs se mantuvieron en una fase lag de adaptación al mediosimilar, la diferencia en el crecimiento comenzó a las nueve hrs. Además, se observó que el mayor crecimiento se presentó a las 84 hrs con una densidad OD600 de 3.643.% p/v).

### **Formulación del alimento funcional**

El alimento funcional esta formulado con harina de nopal, semilla de girasol, amanto y chia, contiene 18% de proteína, 52% de carbohidratos y 30% de lípidos.

### **Determinación de la vida de anaquel**

Hasta el momento no se tiene aún los resultados de la vida de anaquel se encuentran en proceso de evaluación, sin embargo, se pudo observar que el producto no ha perdido sus propiedades organolepticas.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Arai, S. Studies of functional foods in Japan - State of the art. *Biosci Biotech Biochem* 1996; 60: 9-15.
2. FAO. Probiotics in Food. *Food Nutr.Pap.* 2001. 85 pp. 71.
3. Parche, S.; Amon, J.; Jankovic, I.; Rezzonico, E.; Beleut, M.; Barutçu, H.; Schendel, I.; Eddy, M. P.; Burkovski, A.; Arigoni, F.; Titgemeyer, F. 2007. "Sugar Transport Systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705". *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 12 (1-2): 9-19
4. Alamilla L. Chanona J.J. Jiménez A.R. Gutiérrez G.F. (2005). Description of morphological change of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering,* 67:179-184.