

Liofilización de la bacteria probiótica lactobacillus acidophilus y evaluación de su supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas

B. Valtierra, A. López y M. Jiménez

B. Valtierra, A. López y M. Jiménez

Universidad Tecnológica de Tecamachalco. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Ave. Universidad Tecnológica No.1 Tecamachalco, Puebla 75483, ^bUniversidad de las Américas Puebla, Ex-hacienda Sta. Catarina Mártir, Cholula, Puebla. 72810. blanca.valtierraea@udlap.mx

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) .Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2013.

Abstract

The probiotic bacteria *L. acidophilus* was lyophilized using mixtures of whey, inulin and arabic gum with maltodextrins protective agents which provides the best probiotic resistance to gastrointestinal conditions. After the lyophilization, the organism was exposed to simulated gastric fluid for 2 h it was also exposed to simulated intestinal fluid for 3 h, evaluating their survival every hour.

The results show that the lyophilized bacteria showed a decrease of 1.0 log cycles, after 2 h in simulated gastric fluid, on the other hand, it also showed an increase of 0.8 log cycles after 3h in simulated intestinal fluid, obtaining final probiotic population of 9 log cycles. In conclusion, this study shows that the lyophilization of *L. acidophilus* with mixtures of whey, inulin and arabic gum with maltodextrin increase the survival of probiotic cells when exposed to similar conditions to the ones of the gastric system.

17 Introducción

El término probiótico es relativamente nuevo, significa “por la vida” y es usado para denominar las bacterias asociadas con efectos benéficos para humanos y animales (Metchnikoff, 1907). La importancia de los probióticos es significativa, tienen aplicación tanto a nivel industrial en la elaboración de productos (leches fermentadas) y desde el punto de vista digestivo en el ser humano, al modificar su microflora intestinal.

Por sus potenciales beneficios para la salud, algunas bacterias ácido lácticas, miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, han ganado un amplio reconocimiento como bacterias probióticas debido a sus beneficios en la salud; son capaces de poblar el intestino humano, suprimir patógenos y proteger al tracto intestinal de diversas enfermedades. Entre sus aplicaciones clínicas se encuentra el tratamiento de diarrea por rotavirus, estreñimiento, desórdenes del colon, modulación de la inmunidad y prevención de algunos cánceres, en algunos casos la ingestión de estas bacterias es efectiva en la prevención de alergias alimentarias (Salminen *et al.*, 1998).

En recientes años se ha dado un renovado interés en la bacteria *Lactobacillus acidophilus* y su papel en la microflora del intestino delgado, proponiéndose diferentes tipos de productos como vehículos de este microorganismo probiótico. Existen varios factores benéficos asociados con su consumo Tejada-Simonet *et al.* (1999) demostraron que el consumo de yogur complementado con *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*, podría mejorar la mucosa intestinal y la respuesta inmunológica a la toxina del cólera. Por otro lado, en un estudio hecho por Apostolidis *et al.* (2007), se muestran los potenciales beneficios del manejo de la hiperglucemia e hipertensión asociada con *diabetes mellitus*, mediante el consumo de leche fermentada con esta bacteria. Igualmente, el consumo de productos lácteos con probióticos ha sido propuesto como una forma de reducir el colesterol. Liong y Shah (2005) demostraron mediante estudios *in vitro* que *L. acidophilus* y *L. casei* poseen la capacidad de eliminar dicho compuesto.

Sin embargo, a fin de ejercer sus efectos benéficos en el hospedador, los microorganismos prebióticos deben permanecer viables al momento de su consumo en grandes cantidades, y ser capaces de sobrevivir al paso del estómago, donde el pH alcanza valores menores de 2 (Ding y Shah, 2007).

En un estudio realizado por Liong y Shah (2005) *L. acidophilus* muestra una apreciable disminución en su viabilidad cuando es expuesto a condiciones de pH bajo, al igual que en presencia de sales biliares, de igual forma Favaro y Grosso (2002), concluyeron que el conteo de *L. acidophilus* disminuye, cuando es sometido a pH de 1 y 2. En consecuencia, diversas técnicas han sido sugeridas para proteger a las bacterias probióticas, de forma tal que un adecuado número de ellas pueda sobrevivir al paso del estómago e intestino delgado, y lleguen vivas al colon donde realizan su función benéfica.

La liofilización se presenta como una técnica promisoría en la preservación de células probióticas, debido a sus numerosas ventajas, entre la que resalta su tiempo de supervivencia prolongado y el que su conservación en forma de polvos es potencialmente superior al estado congelado o líquido en cuanto a su esterilidad y estabilidad (Menget *et al.*, 2008).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la técnica de liofilización sobre la viabilidad de *L. acidophilus* y su supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas usando como agentes protectores mezclas de suero de leche, goma arábica e inulina con maltodextrina.

17.1 Materiales y métodos

El microorganismo *L. acidophilus* fue obtenido de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental de la UDLAP, México.

Como agentes protectores se utilizaron: suero de leche (SL) (Fleischmann, S. A. de C. V., México), maltodextrina (MA) ED 10 (Globe CP Ingredientes, S. A. de C. V., México), inulina (IN) (Fructagave SP750 Monterrey, México) y goma arábica (GA) (Quetzal Negro Alimentos S. A. de C. V., México).

17.2 Curva de crecimiento de *L. acidophilus*

Se realizó la curva de crecimiento de *L. acidophilus* inoculando mediante asada de cuña a 100 mL de caldo MRS (BD Difco™, Francia), incubando por 48 h a 37°C en una incubadora (Mod. Imperial III, Lab-Line Instruments, EE.UU.) en condiciones anaerobias mediante un desecador al vacío. La toma de muestra se llevó a cabo cada 4 h.

17.3 Preparación del inóculo de *L. acidophilus*

Se prepararon 3 caldos MRS de 100 mL e inocularon con *L. acidophilus*, incubando durante 28 h a 37°C en condiciones anaerobias para obtener la población óptima con base a lo observado en la curva de crecimiento, después del tiempo de incubación los caldos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 15 min, a una temperatura de 3°C en una centrífuga (Mod. Marathon 21 K/R, Fisher Scientific, EE.UU), posteriormente se retiró el sobrenadante de cada uno de los tubos de centrífuga, recuperándose la biomasa de *L. acidophilus* la cual fue agregada a las mezclas de los agentes protectores.

17.4 Preparación de las mezclas protectoras

Las mezclas utilizadas como agentes protectores, SL, IN y GA con MA fueron preparada en una proporción 1:2 con un contenido de sólidos de 30% (p/p) e inoculadas con una 10^{10} ufc/g de *L. acidophilus*.

17.5 Liofilización de *L. acidophilus*

Las mezclas se colocaron en recipientes de plástico, se congelaron a -40°C por 18 h en un congelador (modelo 40-9.4 ScienTemp. EE.UU.) y se secaron en un liofilizador (LYPH-LOCK 6, Labconco, EE.UU.) a una presión de vacío de 5 mmHg y una temperatura de 20°C durante 72 h.

17.6 Estabilidad de *L. acidophilus* liofilizado en condiciones gastrointestinales simuladas

Para evaluar la supervivencia *L. acidophilus* en condiciones gastrointestinales simuladas el microorganismo probiótico fue expuesto a fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). Se tomó 1 g de cada liofilizado y se inoculó en 9 mL de FGS incubando a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 h, en condiciones anaeróbicas, de acuerdo al tiempo de tránsito gástrico sugerido por Ding y Shan (2007) posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se inoculó en 9 mL de FIS incubando por 3 h también en condiciones anaerobias (Zhou, *et al.*, 2009). Alícuotas de 1 mL fueron tomadas a los tiempos 0, 1, 2 y 5 h para el conteo de células viables. Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado.

El FGS se preparó de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos (1988), disolviendo 2.0 g de cloruro de sodio y 3.2 g de pepsina purificada de mucosa gástrica de porcino (Sigma-Aldrich, EE.UU) en 7.0 mL de ácido clorhídrico concentrado, aforando a un volumen de 1000 mL y ajustando el pH a 1.5 ± 0.1 .

El FIS se preparó de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos (1988), disolviendo 6.8 g de fosfato monobásico de potasio en 250 mL de agua, adicionando 190 mL de hidróxido de sodio 0.2N y 400 mL de agua, a esta disolución se agregaron 10.0 g de pancreatina de origen porcino (HYCEL de México) ajustando el pH a 7.0 ± 0.1 y aforando a un volumen de 1000 mL.

Los recuentos de células se corrigieron teniendo en cuenta las diluciones resultantes de los ajustes de volumen, en el final de la fase gástrica y antes de iniciar la fase intestinal. Se preparó una prueba testigo con 1 mL del *L. acidophilus* cultivado en caldo MRS

17.7 Recuento microbiano

El conteo de células viables fue realizado por el método de siembra en placa, la siembra se realizó por duplicado mediante el sembrador en espiral Autoplate 4000 (SpiralBiotech, Exotech, EE.UU), la incubación se llevó a cabo en una incubadora (Imperial III, Lab Line Instruments, EE. UU.) a 37°C durante 24 h en condiciones anaerobias y el recuento microbiano se realizó en el escáner Qcount (SpiralBiotech, Exotech, EE.UU).

17.8 Pruebas estadísticas

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente con ANOVA y pruebas de comparación de Tuckey con un nivel de significancia del 0.05, haciendo uso del paquete estadístico MINITAB (v.15 1997, LEAD Technologies Inc., EE.UU).

17.9 Resultados

A fin de ejercer sus efectos benéficos en el huésped, las bacterias probióticas deben ser capaces de alcanzar el intestino grueso en grandes cantidades, facilitando su colonización y proliferación (Shah, 2000). Cambios en el conteo de células viables de *L. acidophilus* liofilizados fueron monitoreados durante su exposición secuencial a FGS y FIS y comparados con la bacteria sin encapsular (Tabla 17).

Para todos los sistemas en estudio, la inoculación en FGS a 37°C resultó en una disminución de la población microbiana después de 2 h a pH de 1.5, incrementando significativamente después de 3 h en FIS a pH de 7.0, existiendo una diferencia significativa en el aumento de la población microbiana para las mezclas ($p < 0.05$), en estudio y la bacteria sin encapsular que se redujo en 1.92 ciclos log (ufc/g), este incremento indica que las bacterias de *L. acidophilus* liofilizadas sufrieron un daño menor debido al cambio de pH.

Tabla 17 Efecto del fluido gastrointestinal simulado en la supervivencia de *L. acidophilus* liofilizado

Agente encapsulante	Log (N)				incrementos logarítmicos Log N_t - Log N_0
	FGS	FGS	FGS	FIS	
	0 h	1 h	2 h	5 h	
IN-MA	8.53 ± 0.10	7.77 ± 0.14	7.76 ± 0.06	10.34 ± 0.09	0.81 ± 0.01 ^a
SL-MA	8.45 ± 0.08	7.32 ± 0.01	7.96 ± 0.01	9.04 ± 0.17	0.59 ± 0.02 ^a
GA-MA	8.34 ± 0.05	7.78 ± 0.03	7.77 ± 0.01	9.03 ± 0.01	0.70 ± 0.04 ^a
<i>L. acidophilus</i> en caldo MRS	8.40 ± 0.35	6.04 ± 0.02	6.69 ± 0.30	7.50 ± 0.70	- 1.40 ± 1.04 ^b

FGS: fluido gástrico simulado. FIS: fluido intestinal simulado. N_0 : número inicial de *L. acidophilus* a las 0 h. N_t : número *L. acidophilus* a las 5 h. IN: inulina, SL: suero de leche, GA: goma arábica, MA: maltodextrina. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey a un nivel de confianza de 95%.

17.10 Discusión

La mezcla SL-MA presentó un incremento en la población microbiana, de 0.59 ciclos log (ufc/g), este comportamiento puede ser explicado por la función prebiótica que el SL ejerce sobre las bacterias probióticas, como fue demostrado por Rodríguez *et al.* (2011), quienes estudiaron la acción protectora del SL sobre las bacterias *L. acidophilus* y *L. casei*, de igual forma, Juárez *et al.* (2009), en su trabajo sobre la estabilidad de *L. acidophilus* liofilizado con diferentes protectores, reportaron que el SL mantiene la función productora de ácido láctico de ésta bacteria, por otro lado, Antunes, *et al.* (2005) reportaron una mejora en el crecimiento y supervivencia de *L. acidophilus* y *B. longum* al agregar SL a yogur.

Para las dos mezclas de IN-MA estas aumentaron en aproximadamente un ciclo log (ufc/g) la población de *L. acidophilus*, lo cual se atribuye a la probada acción prebiótica de la inulina (Roberfroid, 2007; Altieri *et al.*, 2011; Barclay *et al.*, 2010). No existen estudios reportados para las mezclas estudiadas en este trabajo.

17.11 Conclusión

Los resultados obtenidos muestran que la liofilización de *L. acidophilus* protegido con las mezclas en estudio preservó su viabilidad en el FGS, actuando como una barrera contra el medio ácido y la acción de la pepsina, permitiendo la liberación de células vivas en el FIS y su posterior multiplicación, siendo los liofilizados obtenidos una alternativa para su utilización en diversos productos alimenticios.

17.12 Referencias

Altieri, C., Bevilacqua, A. & Sinigaglia, M. (2011). Prolonging the viability of *Lactobacillus plantarum* through the addition of prebiotics into the medium. *Journal of Food Science*, 76(6), M336-45.

Antunes, A., Cazetto, T. & Bolini, H. (2005). Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *Journal Society of Dairy Technology*, 58(3), 169-173.

Barclay, T., Markovic, M., Cooper, P. & Petrovsky, N. (2010). Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1(3), 27-50.

Apostolidis, E., Kwon, Y., Ghaedian, R. & Shetty, K. (2007). Fermentation of milk and soymilk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* enhances functionality for potential dietary management of hyperglycemia and hypertension. *Food Biotechnology*, 21(3), 217-236.

Ding, W. & Shah N. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9), M446-M450.

Favaro T. y Grosso, C. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, 19(4), 485-94.

Juárez, M., Bru, E., Martos, G. & Nader, M. (2009). Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(5), 544-52.

Liong, M. & Shah, N. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55-66.

Meng, X., Stanton, C., Fitzgerald, G., Daly, C., & Ross, R. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemical*, 106, 1406-16.

Metchnikoff, E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, London: 161-183. Citado en: FAO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. p. 5.

Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha, T., Silva, J., Sousa, J., Costa, P., Amaral, M., Pintado M., Gomes, A., Malcata, F. & Freitas, A. (2011). Influence of l-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*. 21 (11), 869-876

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited, *Journal of Nutrition*, 137(3), 830S-837S.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Devos, W., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S., & Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics-a review. *International Journal Food Microbiology*, 44(2), 93-106.

Shah, N. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods, *Journal Dairy Science*, 83, 894-907

Tejada-Simon, M., Lee, J., Ustunol, Z. y Pestka, J. (1999). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin a response to cholera toxin in mice, *Journal of Dairy Science*, 82(4), 649-60.

Zzhou, T. Li, B., Peng, C., Ji, BP., Chen, G y Ren, YL. (2009). Assessment of the sequential simulated gastrointestinal tolerance of lactic acid bacteria from kefir grains by response surface methodology, *Journal of Food Science*, 74, M328-34.