



XXI CONGRESO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE
DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

XVII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



CyTAL[®]-ALACCTA 2019



20 al 22 de Noviembre de 2019
Universidad Católica Argentina
Sede Puerto Madero
Buenos Aires - Argentina

- D15 MICROCÁPSULAS DE FITOQUÍMICOS DE AJO Y SU EMPLEO COMO CONSERVANTE EN UN ALIMENTO MODELO.
- D16 Obtención y caracterización de encapsulados de polifenoles de yerba mate
- D17 Utilización de hidrolizados casearios como acelerador de la maduración de quesos duros tipo sardo
- D18 Desarrollo de una estrategia de bajo costo de producción y purificación de la enzima alfa-amilasa fúngica apta para la industria alimenticia
- D20 Evaluación del potencial del molino planetario para encapsular β -caroteno en matrices de almidón de arroz
- D21 DESARROLLO DE RELLENO Y GALLETAS LIBRES DE GLUTEN CON ORUJO DE UVA LIOFILIZADO.
- D22 EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE HARINA DE TOPINAMBUR SOBRE LA CALIDAD DE GALLETAS DULCES APTAS PARA CELIACOS
- D23 Actividad biológica de hidrolizados lácteos obtenidos por una serin-proteasa fúngica
- D24 Recuperación de proteínas y compuestos fenólicos de raíces de *Pachyrhizus ahipa* para enriquecer almidones libres de gluten
- D25 Efecto de la temperatura y la encapsulación sobre las características físico-químicas del colorante de Sangorache (*Amaranthus quitensis* L.)
- D26 Influencia del procesamiento en la textura de papas rehidratadas luego de cocción y deshidratación
- D27 Caracterización fisicoquímica y funcional de mezclas de harina de trigo con bagazo de pera, un subproducto de la industria de jugos de fruta
- D28 Desarrollo de un jugo blend naranja-mandarina con procesamiento a escala piloto de luz UV-C asistida y agregado de yerba mate (*Ilex paraguariensis*; St Hill)
- D29 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN EXTRACTO DE YACÓN DESHIDRATADO POR SECADO SPRAY
- D30 Desenvolvimento de tecnologia de produção de bebida fermentada de laranja (*Citrus sinensis*)
- D31 Physicochemical, rheological and structural properties effects of essential fatty acid sources incorporation on cheeses matrix: a review
- D32 SUPERVIVENCIA DE L. CASEI INMOVILIZADO EN UN INGREDIENTE FORMULADO A BASE DE EXPELLER DE SOJA
- D34 Caracterización fisicoquímica parcial de los péptidos responsables de la actividad antioxidante y antihipertensiva presente en hidrolizados enzimáticos de proteínas de suero lácteo
- D35 INFLUENCIA DEL GRADO DE HIDRÓLISIS EN LAS PROPIEDADES BIOACTIVAS DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO
- D36 Desarrollo de un extracto de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) de interés industrial. Optimización y estudios in vitro.



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

SUPERVIVENCIA DE *Lactobacillus casei* INMOVILIZADO EN UN INGREDIENTE FORMULADO A BASE DE EXPELLER DE SOJA

A. Castellanos Fuentes^{1,2}, C. Genevois³, S. Flores^{1,2}, A. Bengoa⁴,
N. Gagliarini⁴, A. Abraham⁴, M. de Escalada Pla^{1,2}.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Departamento de Industrias. Buenos Aires. Argentina.

²CONICET-Universidad de Buenos Aires. Instituto de Tecnología de Alimentos y
Procesos Químicos (ITAPROQ). Buenos Aires, Argentina

³ CONICET. Centro de Investigaciones y Transferencia de Entre Ríos (CITER).
Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER).

⁴Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA),
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CONICET, La Plata,
Buenos Aires, Argentina

e-mail: a.castell@hotmail.com

El expeller de soja que se obtiene luego de la extracción del aceite, es un concentrado con un importante contenido proteico (40-47%) sobre materia seca. Los expeller se utilizan en la formulación de piensos de alto valor nutricional ya que representan la principal fuente de aminoácidos esenciales. En estudios previos, se formuló un ingrediente funcional conteniendo *L. casei*, utilizando expeller de soja como sustrato. De acuerdo con la reglamentación vigente, se debe garantizar una carga de células probióticas viables entre 10^6 y 10^9 UFC g^{-1} de alimento. El objetivo de este trabajo fue estudiar y determinar la supervivencia de *L. casei* soportado en el ingrediente a base de expeller, durante el almacenamiento a 25°C evaluando, además, la funcionalidad.

Partiendo de resultados previos, se preparó el ingrediente con expeller fermentado con una suspensión de *L. casei* de $\approx 10^3$ UFC. cm^{-3} de caldo MRS. El expeller fermentado fue lavado y deshidratado al vacío, envasado y almacenado en bolsas de tipo ZiplocTM. A lo largo del almacenamiento se tomaron muestras que fueron digeridas *in vitro* en condiciones gastrointestinales simuladas. Se realizaron recuentos en agar MRS, microscopia electrónica de barrido (SEM). La funcionalidad de la cepa inmovilizada en expeller, se verificó mediante el ensayo de adhesión utilizando la línea celular Caco-2/TC7 como modelo *in vitro* para el epitelio intestinal. Como control, se llevó a cabo un ensayo con células libres de *L. casei* crecidas en caldo MRS. Todas las determinaciones se llevaron a cabo al menos por duplicado.

La viabilidad del *L. casei* mostró un recuento inicial de $8,3 \pm 0,7$ log (UFC. g^{-1}), en el ingrediente obtenido a base de expeller de soja. Se registró una disminución de 2 ciclos logarítmicos después de 42 días, presentando un recuento final de $6,1 \pm 0,6$ log (UFC. g^{-1}). Sin embargo, la resistencia del probiótico a las condiciones gastrointestinales simuladas se mantuvo entre el 62 y el 94 % a lo largo de los 42 días de almacenamiento; mientras que las células libres de *L. casei* provenientes de un inóculo fresco con un recuento inicial de $8,3 \pm 0,6$ log (UFC. g^{-1}) lograron sobrevivir solo en un 40%. También pudo registrarse la presencia de *L. casei* por medio de las imágenes obtenidas por SEM. Alrededor del $38 \pm 2\%$ del log UFC. g^{-1} de *L. casei* presentes en el ingrediente se

adhirieron a las células Caco-2/TC7, mientras que las células libres de la misma cepa de un inoculo fresco, lograron adherirse en un $\approx 78 \pm 6\%$.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la cepa probiótica *L. casei* se encontró viable durante los 42 días de almacenamiento a 25°C, mostrando recuentos dentro del rango exigido por la regulación vigente. La resistencia de la cepa de *L. casei* a las condiciones gastrointestinales *in vitro* mejoró notablemente cuando estuvo soportada en la matriz vegetal y se mantuvo a lo largo del almacenamiento. A pesar de la inmovilización, cerca del 40% del log UFC.g⁻¹ de la cepa probiótica pudo adherirse a las células Caco- 2/TC7.

Palabras claves: Expeller de soja, *Lactobacillus casei*, digestión gastro intestinal.

1. Introducción

La soja (*Glycinemax*) es la semilla oleaginosa más comúnmente cultivada en el mundo debido a su alto contenido de proteínas, que es importante para las dietas de humanos y animales criados para el consumo humano (Carvalho, 2012). Los subproductos oleaginosos son los residuos sólidos resultantes de la extracción de aceite de granos por presión o solventes. Estos residuos son denominados expellers cuando provienen de la extracción de aceite por presión (prensa y/o extrudado y prensa). El expeller es un concentrado con un importante contenido proteico (por lo general entre 40 y 47% sobre sustancia seca). Desde el punto de vista de la nutrición animal los expellers y las harinas de soja en sus diferentes formas, son alimentos de alto valor alimenticio porque representan la principal fuente de proteína (y de aminoácidos esenciales) para muchas especies de interés comercial: aves, cerdos y ganado de leche y carne (Gallardo, 2005).

El desarrollo de nuevos alimentos que contienen probióticos ha despertado un interés creciente en los últimos años. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud definieron los probióticos como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped". *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, , son los géneros con mayor representación de cepas probióticas. Los probióticos deben ingerirse en una cantidad suficiente de bacterias vivas (al menos 10⁶-10⁷ UFC / g) para brindar beneficios para la salud (Boylston y Vinderola et al., 2004).

La exposición a condiciones gástricas e intestinales a lo largo de la digestión es el principal estrés que afecta la viabilidad de los microorganismos probióticos ingeridos (Liong y Shah, 2005). Los experimentos de adhesión *in vivo* son difíciles de realizar, por lo tanto, se han desarrollado varios modelos *in vitro* para evaluar esta propiedad. Estos métodos se basan en el uso de matrices como las proteínas de la membrana mucosa (colágeno, laminina, fibronectina, etc.) y diferentes modelos de epitelio intestinal como línea celular Caco-2. (Bengoa, A.A., 2018).

El objetivo de este trabajo fue estudiar y determinar la supervivencia de *L. casei* soportado en el ingrediente a base de expeller, durante el almacenamiento a 25°C evaluando, además, la resistencia gastrointestinal y la capacidad de adhesión *in vitro*.

2. Materiales y métodos

Los recortes de expeller fueron donados por R-Mix SRL proteico. Urdinarrain (Entre Ríos), los cuales se molieron (D-56 Moulinex, Buenos Aires, BA, Argentina) y tamizaron en un juego de tamices (Zonytest, Rey Ronzoni S.R.L., Bs As. Argentina). Obteniendo las siguientes fracciones en cuanto al tamaño de partícula promedio: 630,00; 393,75 y 175,50 µm. Las distintas fracciones, con un contenido de humedad final de 5,5% fueron almacenadas en bolsas al vacío a -18 °C y descongeladas antes de su uso, (sistema EN). Otros materiales utilizados fueron: suero de queso en polvo (Mastellone, Buenos Aires, BA, Argentina), agar y caldo (MRS) (BiokarDiagnostics, Beauvais. OI, Francia) y los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico (Research AG. S.A. Argentina).

2.1 Preparación del inóculo y Recuento de Células Viabiles

El inóculo se preparó mediante la transferencia de 1 ml del cultivo madre crio-conservado conteniendo *L. casei*, en un matraz de 250 ml que contenía 30 ml de caldo MRS estéril. El cultivo de células se incubó a 37°C durante 20 h en una cámara (Inquilab I-290, Argentina) con agitación constante de 120 rpm (Vicking, Argentina). El inóculo se consideró adecuado para los ensayos, cuando presentó al menos 9,00 log UFC/ml de *Lactobacillus casei*.

El recuento de bacterias lácticas, en los distintos ensayos y diferentes sistemas, se llevó a cabo en agar MRS, incubando las placas a 37°C por 48 horas.

2.2 Preparación del sistema

Tomando como base estudios previos (Castellanos y col, 2016), se optimizaron las condiciones para la preparación de un medio a base de expeller de soja. Brevemente, se preparó un sistema con ($\approx 1,0000$ g) de expeller seco tamaño de partícula promedio ($\approx 393,75$ μm), $4,74$ cm^3 de agua destilada y $0,32$ g de suero de queso. Posteriormente, los tubos se esterilizaron 120°C durante 15 minutos y se enfriaron. Seguidamente, se inoculó con una suspensión de *L. casei* de $\approx 10^3$ UFC/ cm^3 de caldo MRS (Biokar, Francia). Luego de 20 h se centrifugó, lavó y deshidrató obteniendo la fracción Expeller de soja Inoculado (sistema EI). Un sistema control, Expeller Control (sistema EC), fue llevado a cabo del mismo modo sin inocular.

2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La estructura de los sistemas se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron montadas en el portamuestras del equipo con la ayuda de cinta adhesiva doble faz y metalizadas por bombardeo iónico con una capa de oro (Cressington Scientific Instruments 108 Sputter, UKA). Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido (Zeiss Supra 40, Alemania) operado a un voltaje de aceleración de 3 kV.

2.4 Condiciones gastrointestinales simuladas.

La resistencia de *L. casei* a las condiciones gastrointestinales simuladas se evaluó en el sistema EI reconstituido en agua bidestilada estéril. El ensayo se realizó de acuerdo con Genevois, 2016; con algunas modificaciones.

En el procedimiento gastrointestinal simulado se incluyó tres pasos: digestión bucal, gástrica e intestinal. Brevemente, se reconstituyeron $0,5$ g de EI que contenía $9,0 \pm 0,1$ log (CFU g^{-1}) de *L. casei* con $9,0$ ml de agua bidestilada estéril, y por 2 minutos se agitó en vortex (MSI minishaker IKA®, Campinas, SP, Brasil). Inmediatamente, se lleva a 37°C con agitación orbital a $0,32$ x g durante 30 min. Luego, fue mezclado con $2,5$ ml de saliva artificial [NaCl ($6,2$ g L^{-1}), KCl ($2,2$ g L^{-1}), CaCl_2 ($0,22$ g L^{-1}), NaHCO_3 ($1,2$ g L^{-1})], seguido de agitación durante 2 min con vortex. Inmediatamente, la digestión gástrica se realizó mediante la adición de 15 mL de una solución de HCl-pepsina [pepsina al $0,3\%$ (p/v) (Merck, $0,7$ FIP-U/mg) en HCl $0,01$ N] seguido de incubación a 37°C (I-290, INGELAB, AR) con agitación orbital a 120 rpm durante $1:45$ h. Posteriormente, se ajustó el pH a las condiciones intestinales, $7,5$ - $8,0$ con una solución estéril de NaOH 2 M, y finalmente, se adicionó 15 mL de solución intestinal (KH_2PO_4

0,05 M) conteniendo sales biliares (0,6% p/v). Luego, se llevó a 37°C con agitación orbital a 120 rpm durante 1:45 h. El proceso gastrointestinal simulado se realizó al menos por duplicado y la viabilidad de *L. casei* se determinó mediante conteo de placas en agar MRS al final de la digestión gástrica e intestinal.

2.5 Cultivo celular Caco-2 / TC-7 y ensayo de adhesión

Las condiciones de crecimiento del cultivo celular y los ensayos de adhesión se llevaron a cabo de acuerdo con Golowczyc et al. (2007) Brevemente, se incubó una monocapa de células Caco-2 / TC-7 con 0,5 ml de suspensión de lactobacilos rehidratados (2×10^8 UFC / ml de PBS) y 0,5 ml de medio de adhesión DulbeccomodifiedEagle'sminimalessential médium (DMEM), sin antibióticos ni suplementos, durante 1 hora a 37 ° C en atmósferas de 5% CO₂-95% de aire. Luego, la monocapa se lavó y se lisó (40-50 min) agregando agua destilada estéril. Para determinar la cantidad de lactobacilos viables adheridos a las células Caco-2 / TC-7, diluciones apropiadas en triptona al 0.1% (p / v) (BiokarDiagnostics) se sembraron en agar MRS y se realizaron recuentos de colonias después de 48 h de incubación. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia (p) menor a 0,05 seguido por un método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para discriminar entre las medias. Para el análisis estadístico se utilizó el programa StatgraphicsCenturion XV (V 2, 15,06, 2007, USA).

3. Resultados y discusión

En la **Figura 1** se observa, la viabilidad de *L. casei*, así como el porcentaje de supervivencia después de las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal, soportado en expeller (sistema EI), durante un almacenamiento durante 42 días a una temperatura de 25°C. La viabilidad de *L. casei* mostró un recuento inicial de $8,3 \pm 0,7$ log (UFC.g⁻¹), manteniéndose sin modificaciones ($p < 0,05$) hasta los 14 días, después de este tiempo el probiótico registró una disminución leve pero significativa ($p < 0,05$). El recuento al final de los 42 días fue de $6,1 \pm 0,6$ log (UFC.g⁻¹). De acuerdo con las normas internacionales y locales, un alimento debe contener un recuento viable de microorganismos probióticos $> 10^6$ log (UFC.g⁻¹). (FDA, EFSA y ANMAT).

La resistencia del probiótico a las condiciones gastrointestinales simuladas se mantuvo entre el 62 y el 94 % a lo largo de los 42 días de almacenamiento; mientras que las células libres de *L. casei* provenientes de un inóculo fresco con un recuento inicial de $8,3 \pm 0,6 \log$ (UFC. g^{-1}) lograron sobrevivir solo en un 40%.

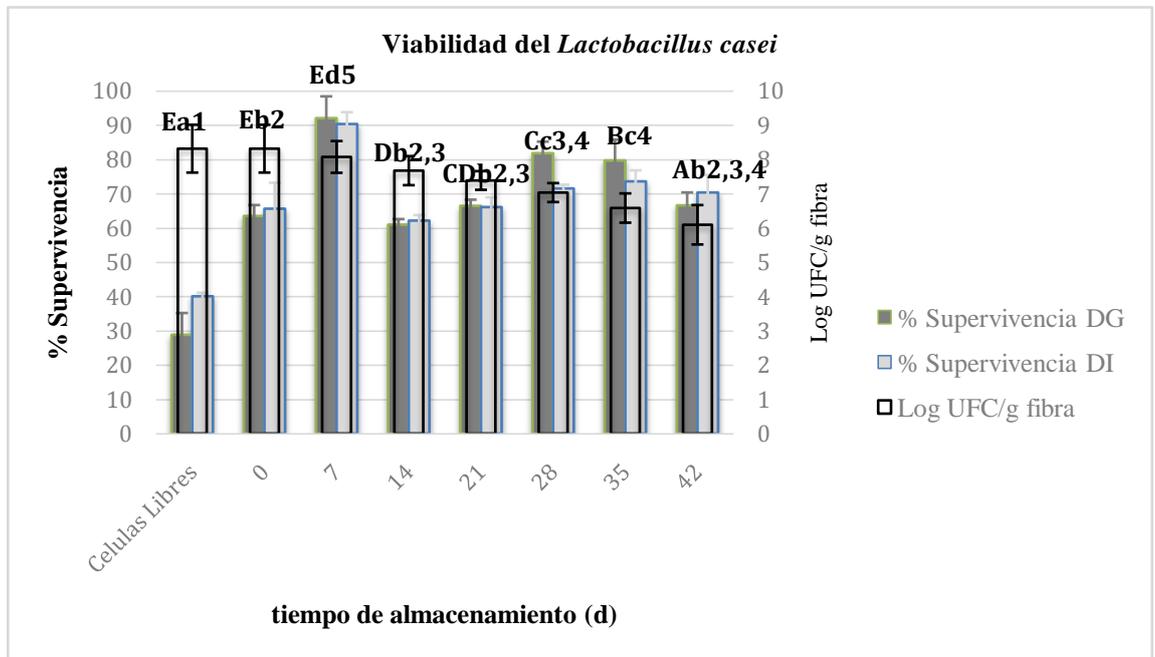


Figura 1. Porcentaje de supervivencia del *Lactobacillus casei* después de las condiciones simuladas de digestión gástrica (■DG) e intestinal (■DI) en expeller de soja inoculado (EI) y las UFC/g de fibra del recuento antes de la digestión; a lo largo del almacenamiento a 25°C. Células libres corresponden a un cultivo de *L. casei* en caldo MRS de 24 horas, antes de la digestión (□).

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$): mayúsculas entre los recuentos antes de la digestión; minúsculas entre los porcentajes de resistencia a la DG; y números entre los porcentajes de resistencia a la DI.

En la **Figura 2 a y b** se muestran las imágenes microscópicas de (EI) luego de la deshidratación al vacío. Se puede observar la adherencia del probiótico a la matriz vegetal, aun cuando se realizaron lavados con agua destilada estéril, lo que indica una buena inmovilización (**Figura 2b**). La inmovilización celular se produjo por el atrapamiento de las células en las estructuras porosas y vacías que se encuentran en la matriz vegetal (Xiudong 2016) (**Figura 2a**).

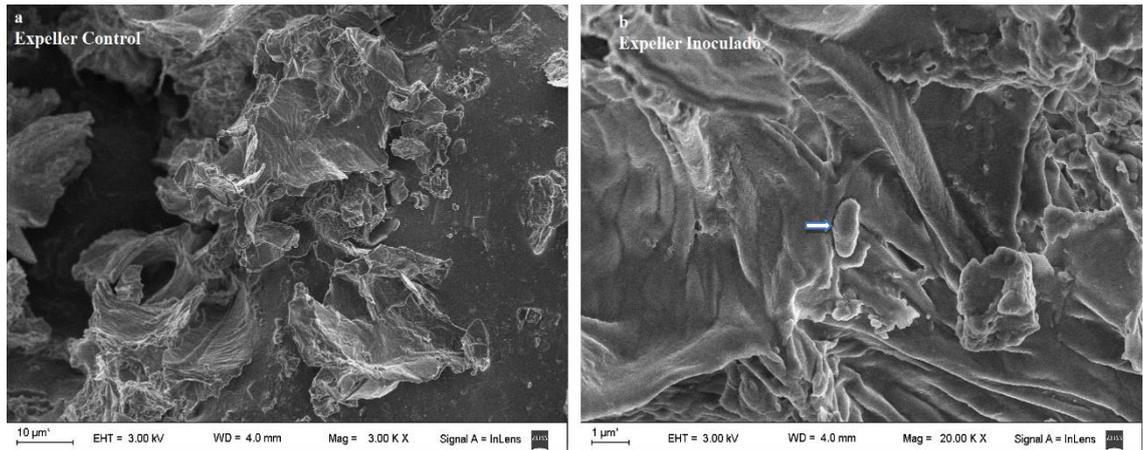


Figura 2. Microscopía electrónica de expeller control (EC) (a) y de células de *L. casei* adheridas a la matriz vegetal de expeller inoculado (EI) (b) deshidratado al vacío.

La **Figura 3** muestra el recuento de *L. casei* antes y después del ensayo de adhesión. Cabe destacar que la muestra de EI utilizada en el ensayo tenía 20 días de almacenamiento mostrando un recuento celular de $6,6 \pm 0,4 \log (\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1})$. A fines comparativos, se preparó caldo MRS fresco (24 hs de incubación) conteniendo la misma cantidad ($p > 0,05$) del probiótico $7,5 \pm 1,1 \log (\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1})$, sistema CL. En ambos casos, EI y CL, pudo verificarse la adhesión del *L. casei* a las células Caco-2/Tc7; siendo del $38 \pm 2\%$ en el primer caso, EI y del $78 \pm 6\%$ en el segundo caso, CL. Ello representa que parte de las células presentes en EI, serían capaces de adherirse al epitelio intestinal, a pesar de encontrarse inmobilizadas en el tejido vegetal.

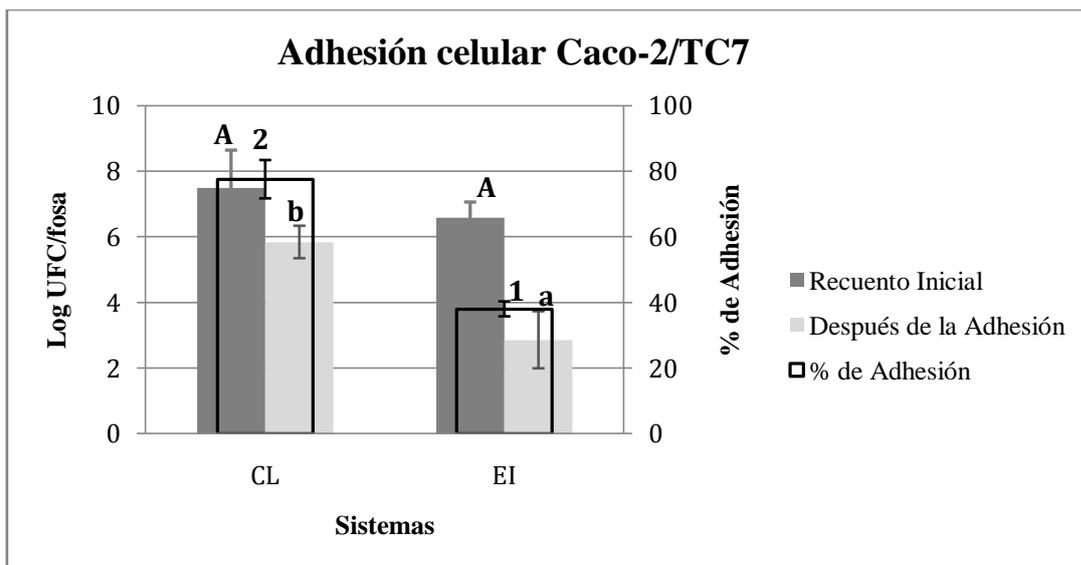


Figura 3. Adhesión de *Lactobacillus casei* en células Caco-2 / TC-7 en Expeller Inoculado (EI) deshidratado al vacío y células libres (CL) como control.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$): mayúsculas entre los recuentos antes de la adhesión celular; minúsculas entre los recuentos después de la adhesión; y números entre los porcentajes de adhesión a las células Caco- 2/TC7.

4. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la cepa probiótica *L. casei* se encontró viable durante los 42 días de almacenamiento a 25°C, mostrando recuentos dentro del rango exigido por la regulación vigente. La resistencia de la cepa de *L. casei* a las condiciones gastrointestinales *in vitro* mejoró notablemente cuando estuvo soportada en la matriz vegetal y se mantuvo a lo largo del almacenamiento. A pesar de la inmovilización, cerca del 40% del log UFC.g⁻¹ de la cepa probiótica pudo adherirse a las células Caco- 2/TC7.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT-GEF 2018-2020 20020170100092), y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica ANPCyT (PICT 2016-3552) y a la empresa R-Mix SRL proteico (Urdinarrain, Entre Ríos) quien suministro el expeller utilizado en este trabajo.

Referencias

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011, Pub. L. No. 261/2011; 22/2011 (2011). Argentina.

Bengoia, A.A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S.A., Bronsoms, S., Serradell, M. de los Á., Garrote, G.L., Abraham, A.G.(2018). Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International* 103. 462-467.

Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B., Reinheimer, J.A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*. 375-387.

Carvalho, P.T. 2012. Balanço de emissões de gases de efeito estufa de biodiesel produzido a partir de soja e dendê no Brasil [Balance of emissions of greenhouse gases from biodiesel produced from soybean oil and palm oil in Brazil]. 2012. 166f. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Planejamento Energético, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Castellanos Fuentes, A., Torres V., Flores S., y de Escalada Pla M. (2016). Utilización de Okara para la obtención de un ingrediente funcional conteniendo *Lactobacillus casei*. Actas del VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICyTAC 2016). Córdoba.

Gallardo, M. (2005). Soja: harinas de extracción para la alimentación del ganado. Un análisis de las cualidades nutricionales de los distintos tipos de acuerdo con el método de extracción utilizado. EEA INTA Rafaela.

Genevois, C., Flores, S., de Escalada Pla M. (2016). By-product from pumpkin (*Cucurbitamoschata Duchesne ex Poiret*) as a substrate and vegetable matrix to contain *Lactobacillus casei*. Journal of Functional Foods, 23: 210-219.

Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. (2007). Protective action of Lactobacillus kefir carrying S-layer against Salmonella enterica serovar Enteritidis. International Journal of Food Microbiology 118, 264–273.

Golowczyc, M.A., Silva, J., Teixeira, P., De Antoni, G.L., Abraham, A.G. (2011). Cellular injuries of spray-dried Lactobacillus spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. International Journal of Food Microbiology, 144, 556–560.

Liong, M.T., Shah, N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. Journal of Dairy Science, 88(1), 55–66.

Minnaard, J., Delfederico, L., Vasseur, V., Hollmann, A., Rolny, I., Semorile, L., & Pérez, P. F. (2007). Virulence of Bacillus cereus: a multivariate analysis. International Journal of Food Microbiology, 116(2), 197–206.