

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**

**“MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus casei* CON  
PROTEÍNAS LÁCTEAS GELADAS ENZIMÁTICAMENTE Y  
EVALUACIÓN DE SU SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES  
GASTROINTESTINALES SIMULADAS”**



**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

**PRESENTA:**

**ING. IRENE MARGARITA ARENALES SIERRA**



**Chapingo, Estado de México a 18 de enero de 2013**

**“Microencapsulación de *Lactobacillus casei* con proteínas lácteas geladas enzimáticamente y evaluación de su supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas”**

Tesis realizada por Irene Margarita Arenales Sierra, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

**DIRECTORA: DRA. CONSUELO S. O. LOBATO CALLEROS**

NOMBRE

*Consuelo S. O. Lobato Calleros*  
FIRMA

**ASESOR: DR. EDUARDO JAIME VERNON CARTER**

NOMBRE

*E. J. V. C.*  
FIRMA

**ASESOR: DR. GABRIEL LEYVA RUELAS**

NOMBRE

*G. Leyva Ruelas*  
FIRMA

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial y a la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, que me brindaron los medios para tener una formación académica de excelencia.

Al CONACyT por el financiamiento para la realización de esta investigación.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros por su amistad, comprensión, confianza, apoyo y atinadas observaciones para mejorar y realizar esta investigación.

Al jurado examinador: Dr. Jaime Vernon Carter y Dr. Gabriel Leyva Ruelas, por sus atinadas observaciones al presente trabajo.

A la Dra. Ofelia Sandoval Castilla y al Dr. Cesar Ramírez Sánchez por su asesoría en la presente investigación.

A la Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada y la Sra. Esperanza por su apoyo para la realización de trámites para la conclusión de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de manera directa e indirecta contribuyeron a la realización de este trabajo.....GRACIAS.

## DEDICATORIAS

A Dios por darme la fuerza para seguirme preparando y con ello mejorar como persona y profesional.

A mi papá Tomás Arenales Arenales<sup>†</sup>, por que siempre ha sido mi razón de ser y mi más grande motivo para salir adelante y ser mejor cada día.

A mi mamá Lucina Sierra Morales, porque con su fortaleza me ha demostrado que para lograr algo, siempre hay que poner lo mejor de cada uno, y por el gran apoyo que siempre he recibido de ella, espero no defraudarte.

A mis hermanas: Norma, gracias por ayudarme siempre que lo necesite y por tu fortaleza; Sarita, gracias porque tu nobleza es enorme y siempre has estado para apoyarme

A mis hermanos: Tomás, gracias por tu alegría y nobleza; Emanuel, gracias por tu empeño y siempre cuidarnos.

A mis tíos Guillermo y Ofelia y mis primas Mariana, Elizabeth y Beatriz, por su apoyo y amor de familia incondicional.

A mis amigas y amigos: Rosa María, Pamela, Jovane, Anahí, Landy, Ofe y Cesar, gracias por sus consejos, apoyo y por todas las cosas lindas que he vivido con ustedes, sin duda los amig@s se cuentan con los dedos de la mano y son lo más bonito que nos puede suceder.

A mis compañeros de la novena generación de la MCyTA, por todos los momentos que vivimos durante esta gran experiencia.

A todas las personas que directa o indirectamente han sido parte de mi vida, y me han ayudado a lograr este sueño...

GRACIAS...

CON AFECTO IRENE...

## DATOS BIOGRÁFICOS

**Irene Margarita Arenales Sierra** nació el 21 de febrero de 1983 en el estado de Morelos. Sus estudios de educación básica los realizó en el municipio de Atlatlahucan, Morelos. Posteriormente de 1998 a 2005, cursó su formación media superior y superior en la Universidad Autónoma Chapingo, donde obtuvo el título de Ingeniero Agroindustrial. En el 2005, realizó su estancia preprofesional en Ensenada, Baja California, en la empresa Vinícola L. A. Cetto, S. A. de C. V. En el 2008 laboró en el Estado de Guerrero, en el Despacho Ingeniería y Tecnología en Agronegocios S. C., como Prestador de Servicios Profesionales y posteriormente como Directora General, de dicho despacho. En el 2009 laboró en el aeropuerto de Cabo San Lucas, Baja California Sur, como Auxiliar de Inspección Fitozoosanitario de vuelos internacionales, para el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Realizó una estancia de investigación de enero a marzo de 2012, en la Universidad de Zaragoza España. Durante su formación profesional y laboral ha recibido diversos cursos de capacitación y actualización.

# MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus casei* CON PROTEÍNAS LÁCTEAS GELADAS ENZIMÁTICAMENTE Y EVALUACIÓN DE SU SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS

## MICROENCAPSULATION OF *Lactobacillus casei* WITH ENZYMATICALLY GELLED MILK PROTEINS AND EVALUATION OF THEIR SURVIVABILITY IN SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS

Arenales Sierra Irene Margarita<sup>1</sup>, Lobato-Calleros Consuelo<sup>1</sup>

### RESUMEN

Células de *Lactobacillus casei* fueron microencapsuladas en matrices de proteína láctea sin y con recubrimiento de quitosano (Q) o alginato de sodio (A) por medio de emulsificación, gelación enzimática y subsecuente dispersión en soluciones de Q o A (0.1 o 0.5% p/p). El diámetro, rendimiento, eficiencia de atrapamiento y microestructura de las microcápsulas y la supervivencia de *Lactobacillus casei* atrapado en condiciones gastrointestinales simuladas (CGIS) fueron evaluados. Se obtuvieron microcápsulas esféricas o semiesféricas exhibiendo 104.8-142.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, y 74.8-96.36% de rendimiento. La estructura interna de las microcápsulas fue semejante a la microestructura de queso fresco y su morfología y topografía exterior fueron afectadas por la naturaleza y concentración de los polisacáridos usados como recubrimiento. En todos los casos la eficiencia de atrapamiento de células probióticas fue más alta que 95%. Las microcápsulas cubiertas con una solución de Q al 0.5% p/p proporcionaron una significativa mejor protección a *Lactobacillus casei* contra CGIS.

**Palabras clave:** *Lactobacillus casei*, microencapsulación, proteína láctea gelada, condiciones gastrointestinales simuladas, alginato de sodio, quitosano.

### ABSTRACT

*Lactobacillus casei* cells were microencapsulated in milk protein matrices without or with chitosan (Q) or sodium alginate (A) coating by means of emulsification, enzymatic gelation, and subsequent dispersion in Q or A solutions (0.1 or 0.5% w/w). The diameter, yield, entrapment efficiency, and microstructure of the microcapsules and the survivability of entrapped *Lactobacillus casei* cells in simulated gastrointestinal conditions (CGIS) were evaluated. Spherical or semispherical microcapsules exhibiting 104.8-142.2  $\mu\text{m}$  in diameter, and 74.8-96.36% of yield were obtained. The inner structure of the microcapsules was like fresh cheese microstructure and their morphology and outer topography was affected by the nature and concentration of the polysaccharides used as coating. In all cases, probiotic cells entrapment efficiency was higher than 95%. The microcapsules coated with 0.5% w/w Q solution provided a significant better protection to *Lactobacillus casei* against CGIS.

**Keywords:** *Lactobacillus casei*, microencapsulation, gelled milk protein, simulated gastrointestinal conditions, sodium alginate, chitosan.

<sup>1</sup> Programa en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230.

## CONTENIDO

|                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>      | <b>iv</b>   |
| <b>DEDICATORIAS.....</b>         | <b>v</b>    |
| <b>DATOS BIOGRÁFICOS.....</b>    | <b>vi</b>   |
| <b>RESUMEN.....</b>              | <b>vii</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>             | <b>vii</b>  |
| <b>ÍNDICE.....</b>               | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE CUADROS.....</b>     | <b>xiii</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>     | <b>xiv</b>  |
| <br>                             |             |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>      | <b>1</b>    |
| <br>                             |             |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>         | <b>6</b>    |
| 2.1. Objetivo general.....       | 6           |
| 2.2. Objetivos particulares..... | 6           |

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. ANTECEDENTES.....</b>                                                                           | <b>7</b>  |
| 3.1. Microorganismos probióticos.....                                                                 | 7         |
| 3.2. Microflora normal del intestino humano.....                                                      | 10        |
| 3.3. Beneficios a la salud atribuidos a los probióticos.....                                          | 11        |
| 3.4. <i>Lactobacillus casei</i> .....                                                                 | 14        |
| 3.5. Microencapsulación.....                                                                          | 15        |
| 3.6. Métodos de microencapsulación.....                                                               | 19        |
| 3.6.1. Secado por aspersión.....                                                                      | 19        |
| 3.6.2. Extrusión, emulsión y separación de fases.....                                                 | 21        |
| 3.6.3. Uso de proteínas lácteas para la encapsulación.....                                            | 23        |
| 3.6.4. Aplicación de microencapsulación en bacterias probióticas...                                   | 24        |
| 3.7. Técnicas de microencapsulación por capas.....                                                    | 25        |
| 3.7.1. Biopolímeros de recubrimiento secundario.....                                                  | 26        |
| 3.7.1.1. Alginato.....                                                                                | 26        |
| 3.7.1.2. Quitosano.....                                                                               | 27        |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                                   | <b>30</b> |
| 4.1. Materiales.....                                                                                  | 30        |
| 4.2. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> .....                                      | 31        |
| 4.3. Preparación del concentrado celular de <i>Lb. casei</i> a encapsular...                          | 32        |
| 4.4. Pruebas preliminares para establecer las condiciones de<br>preparación de las microcápsulas..... | 32        |
| 4.5. Preparación de las microcápsulas.....                                                            | 32        |

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6. Recubrimiento de microcápsulas.....                                                                | 34        |
| 4.7. Caracterización de las microcápsulas.....                                                          | 35        |
| 4.7.1. Rendimiento.....                                                                                 | 35        |
| 4.7.2. Tamaño.....                                                                                      | 36        |
| 4.7.3. Microestructura.....                                                                             | 36        |
| 4.8. Eficiencia de entrampamiento.....                                                                  | 37        |
| 4.9. Supervivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado bajo condiciones<br>gastrointestinales simuladas..... | 37        |
| 4.10. Análisis de datos.....                                                                            | 39        |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                                                   | <b>40</b> |
| 5.1. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> .....                                        | 40        |
| 5.2. Condiciones de formación de las microcápsulas.....                                                 | 44        |
| 5.3. Tamaño de las microcápsulas.....                                                                   | 46        |
| 5.4. Rendimiento.....                                                                                   | 50        |
| 5.5. Microestructura.....                                                                               | 52        |
| 5.5.1. Microcápsulas de caseína sin recubrimiento (MC).....                                             | 52        |
| 5.5.2. Microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato<br>(MC <sub>0.1A</sub> ).....               | 54        |
| 5.5.3. Microcápsulas recubiertas con 0.1 % de quitosano<br>(MC <sub>0.1Q</sub> ).....                   | 56        |
| 5.5.4. Microcápsulas recubiertas con 0.5 % de quitosano<br>(MC <sub>0.5Q</sub> ).....                   | 57        |

|                                                                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.6. Eficiencia de encapsulamiento.....                                                                         | 59        |
| 5.7. Supervivencia de <i>Lactobacillus casei</i> encapsulado a condiciones<br>gastrointestinales simuladas..... | 61        |
| <b>6. CONCLUSIONES.....</b>                                                                                     | <b>66</b> |
| <b>7. REFERENCIAS.....</b>                                                                                      | <b>68</b> |

## LISTA DE CUADROS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Inmovilización/encapsulación de células para alimentos/aplicación biotecnológica.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 25 |
| <b>Cuadro 2.</b> Valores medios ( $\pm$ DE) del diámetro de las microcápsulas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 49 |
| <b>Cuadro 3.</b> Valores medios ( $\pm$ DE) de rendimiento de las microcápsulas...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 51 |
| <b>Cuadro 4.</b> Valores medios ( $\pm$ DE) de eficiencia de encapsulamiento de <i>Lactobacillus casei</i> libre.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 60 |
| <b>Cuadro 5.</b> Valores medios ( $\pm$ DE) de sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei</i> libre y encapsulado sometido a condiciones gástricas simuladas (HCl, pH 2), después de 3 h a 37 °C con agitación constante y sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei</i> libre y encapsulado después de su exposición secuencial a condiciones gastrointestinales simuladas (HCl, pH 2 y 0.1 % p/v de extracto de bilis porcino) durante 6 h a 37 °C con agitación constante..... | 62 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Distribución y abundancia de bacterias en el tracto gastrointestinal humano.....                                                                                                                                          | 10 |
| <b>Figura 2.</b> Beneficios fisiológicos de los alimentos funcionales que contienen bacterias probióticas.....                                                                                                                             | 13 |
| <b>Figura 3.</b> Principio de la microencapsulación: Membrana barrera (tamaño de poro 30-70 kDa) que aísla las células del sistema inmune del huésped al tiempo que permite el transporte de metabolitos y nutrimentos extracelulares.. .. | 18 |
| <b>Figura 4.</b> (a) Estructura química de alginato; (b) esquema de la interacción de alginato con iones calcio.....                                                                                                                       | 27 |
| <b>Figura 5.</b> Estructura de quitina, quitosano y quitano.....                                                                                                                                                                           | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> por espectrofotometría.....                                                                                                                                         | 41 |
| <b>Figura 7.</b> Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> por la técnica de recuento en placa.....                                                                                                                            | 43 |
| <b>Figura 8.</b> Fotografía mostrando las microcápsulas MC inmersas en las soluciones de alginato de sodio o quitosano usadas para su recubrimiento.....                                                                                   | 47 |

|                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 9.</b> Precipitación de alginato de sodio en la forma de alginato de calcio durante la preparación de las microcápsulas MC <sub>0.5A</sub> .....                                          | 47 |
| <b>Figura 10.</b> Representación de la red que forma el alginato de sodio en presencia de calcio (modelo "egg-box").....                                                                            | 48 |
| <b>Figura 11.</b> Micrografía MEB de microcápsula del tratamiento MC, ampliación 1800 ×.....                                                                                                        | 53 |
| <b>Figura 12.</b> . Micrografía MEB de microcápsula del tratamiento MC, (a) capa externa, (b) fracción interna y (c) <i>Lactobacillus casei</i> entrampados, ampliación 5000 ×.....                 | 54 |
| <b>Figura 13.</b> Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC <sub>0.1A</sub> , ampliación 1800 ×.....                                                                                      | 55 |
| <b>Figura 14.</b> Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC <sub>0.1A</sub> , (a) capa externa, (b) fracción interna y (c) <i>Lactobacillus casei</i> entrampados, ampliación 5000 ×..... | 55 |
| <b>Figura 15.</b> Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC <sub>0.1Q</sub> , ampliación 150 ×.....                                                                                       | 56 |
| <b>Figura 16.</b> Micrografía MEB de la capa externa y fracción interna de microcápsulas del tratamiento MC <sub>0.1Q</sub> , ampliación 550 ×.....                                                 | 57 |
| <b>Figura 17.</b> Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC <sub>0.5Q</sub> . Ampliación 1800 ×.....                                                                                      | 58 |
| <b>Figura 18.</b> Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC <sub>0.5Q</sub> (a) fracción interna y (b) <i>Lactobacillus casei</i> entrampados. Ampliación 10000×                          | 58 |

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19.</b> Sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei</i> libre y encapsulado después de su exposición secuencial a condiciones gastrointestinales simuladas (HCl, pH 2 y 0.1 % p/v de extracto de bilis porcino)..... | 63 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## 1. INTRODUCCIÓN

La nutrición actual está enfocada a la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles, en las que la dieta y el estilo de vida desempeñan roles etiológicos. El desarrollo y la producción de alimentos funcionales con actividad selectiva relacionada con una o varias funciones del organismo, en particular de aquellos considerados como probióticos, han mostrado incrementos considerables (Heidebach *et al.*, 2009). Los probióticos son considerados como “microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando son administrados en cantidades adecuadas” (Araya *et al.*, 2002). Entre los numerosos beneficios a la salud ejercidos por los probióticos, establecidos científicamente y/o probados clínicamente, pueden señalarse la reducción y prevención de diarreas de diferente origen, el mejoramiento del balance microbiano intestinal, el alivio de síntomas de intolerancia a la lactosa, la prevención de alergias alimentarias, el aumento de actividad autoinmune y actividades contra la formación de tumores (McFarland, 2009; Andersson *et al.*, 2000; Salminen *et al.*, 2001).

El nivel de consumo de probióticos recomendado es de  $10^8$ - $10^9$  ufc día<sup>-1</sup>, equivalente a 100 g de un producto alimenticio conteniendo  $10^6$ - $10^7$  ufc g<sup>-1</sup> (Kailasapathy, 2006). No obstante, los niveles de probióticos de productos lácteos fermentados, se encuentran a menudo muy por debajo de los recomendados, debido a las condiciones adversas generadas durante el almacenamiento de dichos productos (Heidebach *et al.*, 2009; Champagne *et al.*, 2007; Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Adicionalmente, se ha demostrado que el medio altamente ácido del estómago y la acción de las sales biliares en el intestino delgado, pueden reducir considerablemente el número de células viables capaces de alcanzar el intestino (Anal y Singh, 2007; Muthukumarasamy *et al.*, 2006; Krasaekoopt *et al.*, 2003).

La técnica de microencapsulación es considerada como una alternativa para aumentar la supervivencia de los probióticos durante el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos, y en especial durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal, al proporcionar una barrera física entre estos microorganismos y condiciones externas adversas (Agrawal, 2005; Augustin, 2003; Krasaekoopt *et al.*, 2003). Aún cuando se han desarrollado diversas técnicas para la microencapsulación de probióticos, la gran mayoría de ellas presentan algunas desventajas que es necesario resolver; por ejemplo, el secado por aspersión de concentrados celulares de probióticos en varias dispersiones de proteínas, presenta como desventajas la obtención de microcápsulas con alto grado de solubilidad en agua, liberándose células en el producto en corto tiempo (Krasaekoopt *et al.*, 2003); así como también pérdidas

significativas en la viabilidad y la resistencia de los probióticos a las condiciones adversas del medio ambiente, como consecuencia de las altas temperaturas empleadas durante el secado (Desmond *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2005). El entrapamiento de probióticos en matrices formadas por polisacáridos, es un método que prevalece para la producción de microcápsulas insolubles en agua y su aplicación en alimentos (Doleyres y Lacroix, 2005; Krasaekoopt *et al.*, 2003). Los resultados sobre la protección que proporcionan estas matrices de polisacáridos a los probióticos durante el almacenamiento de los productos lácteos y a través de su paso por el tracto gastrointestinal, son inconsistentes (Heidebach *et al.*, 2009). Las dispersiones acuosas de los polisacáridos usados como materiales de pared (i.e. alginato, goma gelana, goma xantana,  $\kappa$ -carragenina, etc.) exhiben altas viscosidades, lo que restringe su uso a concentraciones muy bajas, de alrededor del 2 al 4 %. Lo anterior, resulta tanto en la formación de estructuras de pared de baja densidad, que proporcionan un efecto de barrera limitado (Crittenden *et al.*, 2006), como en la formación de cápsulas relativamente grandes, con diámetros entre 1 y 3 mm, que ocasionan efectos adversos en la calidad sensorial del alimento al que se incorporan (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). En adición, el uso de polisacáridos de origen no lácteo como materiales de pared para la encapsulación de probióticos con fines de su incorporación en productos lácteos, no es permitido en algunos países (Champagne *et al.*, 1994; Picot y Lacroix, 2004).

Resulta entonces un reto interesante, el desarrollo de nuevas técnicas para la fabricación de cápsulas pequeñas, insolubles en agua, con propiedades de barrera que garanticen la protección de probióticos durante el procesamiento y el almacenamiento de productos lácteos y a través de su trayecto por el tracto gastrointestinal. Una alternativa para el logro de las características señaladas, la puede constituir el uso de lactoproteínas como materiales de pared, debido a sus propiedades funcionales ampliamente reconocidas en el área de los alimentos. La incorporación de cápsulas elaboradas a partir de lactoproteínas en productos lácteos, puede también contribuir al mejoramiento de las propiedades mecánico-sensoriales de estos productos; por ejemplo, para el caso de quesos reducidos en grasa. Escasas investigaciones se han realizado sobre el uso de lactoproteínas para la preparación de microcápsulas insolubles en agua. El proceso de gelación de estas proteínas se realiza tradicionalmente mediante tratamiento térmico; proceso no aplicable a las bacterias probióticas, térmicamente sensibles. La gelificación de las lactoproteínas vía enzimática, constituye una opción para su uso como materiales de pared de microcápsulas conteniendo probióticos. Heidebach *et al.* (2009), informaron sobre la encapsulación de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 y *Bifidobacterium lactis* Bb12, en matrices de lactoproteínas, por medio de la gelación enzimática de estas últimas por quimosina. Las cápsulas elaboradas con lactoproteínas tuvieron un diámetro medio de  $68 \pm 5 \mu\text{m}$ , y protegieron a las células de *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis* durante su incubación bajo condiciones gástricas simuladas a bajo pH. Con base en lo expuesto, el objetivo

de este proyecto es proteger *Lactobacillus casei* contra condiciones gastrointestinales simuladas mediante su entrapamiento en microcápsulas de lactoproteínas geladas enzimáticamente, con y sin recubrimiento.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

- Proteger *Lactobacillus casei* contra condiciones gastrointestinales simuladas mediante su entrapamiento en microcápsulas de lactoproteínas geladas enzimáticamente, con y sin recubrimiento.

### **2.2. Objetivos particulares**

- Obtener microcápsulas a partir de lactoproteínas, mediante la técnica de emulsificación y subsecuente gelación enzimática, con y sin recubrimiento.
- Determinar la eficiencia de entrapamiento de *Lactobacillus casei* en microcápsulas de lactoproteínas geladas.
- Determinar el diámetro, el rendimiento y la microestructura de las microcápsulas.
- Determinar la capacidad de protección de la microcápsulas sobre células probióticas de *Lactobacillus casei* durante su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. Microorganismos probióticos**

Aunque el concepto de probióticos se introdujo en el siglo XX, el término no fue acuñado hasta 1960. La definición del término ha evolucionado a través de los años. Según Fooks y otros (1999), la palabra probiótico se deriva de dos palabras griegas que significan para la vida. Este término se utiliza para describir una primera sustancia microbiana que estimuló el crecimiento de otros microorganismos (Lilley y Stillwell, 1965) o extractos de tejidos que promovieron el crecimiento microbiano (Sperty, 1971), pero este concepto no recibió la aceptación general. Parker (1974) fue el primer autor en usar la palabra probiótico en el contexto de la suplementación de los animales, y los definió como organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio de la flora intestinal. Fuller (1989) define los probióticos como suplementos alimenticios que contienen microorganismos vivos que afectan al anfitrión de una forma sana, incidiendo en el equilibrio de la flora intestinal. Muchas otras definiciones del término probiótico se han publicado desde entonces, sin embargo, la definición más ampliamente aceptada es la de la FAO/OMS (2001) "los probióticos son microorganismos vivos, que administrados en ciertas cantidades aportan beneficios para la salud del huésped" (Granato *et al.*, 2010).

Aunque varias cepas de bacterias de ácido láctico han sido descritas como probióticos, relativamente pocas cumplen con las normas de las Naciones Unidas de tener documentación del ensayo clínico, y muchas son demasiado sensibles a la acidez intensa y presencia de sales biliares en el tracto gastrointestinal humano, por lo que mueren en ruta hacia el intestino. La mayoría de los productos probióticos disponibles en el mercado contienen especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son los principales géneros de bacterias gram-positivas que según la FAO/WHO son aceptados como probióticos. Las diferentes especies de microorganismos probióticos que han sido empleados en la industria alimentaria mediante su incorporación a yogures, yogures congelados tradicionales y en postres, son: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. thermophilus*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. brevis*, *B. infantis*, y *B. animalis* y *L. delbrueckii spp. thermophilus bulgaricus* (Granato et al., 2010).

Las propiedades ideales de las cepas probióticas para beneficiar la salud humana y ser utilizadas en la industria de los probióticos son: resistencia al ácido y la bilis; unión a las células epiteliales intestinales humanas; colonización en el intestino humano; producción de sustancias antimicrobianas, incluyendo bacteriocinas; buenas características de crecimiento y efectos benéficos sobre la salud humana. Una de las características más importantes de una cepa probiótica es que debe ser no patógeno y generalmente reconocida como segura (GRAS). Los probióticos también debe presentar algunas características deseables, tales como el mantenimiento de la viabilidad durante el

procesamiento y el almacenamiento, facilidad de aplicación en los productos, y resistencia al tratamiento físico-químico de los alimentos (Granato *et al.*, 2010). Los probióticos no deben ser patógenos, tóxicos, mutagénicos o carcinogénicos en el organismo del huésped; deben ser antagonistas a los agentes patógenos y ser genéticamente estables sin un mecanismo de transferencia de un plásmido, especialmente referente a resistencia a los antibióticos; deben sobrevivir durante la digestión y poseer la capacidad de adherirse y colonizar la mucosa intestinal, así como promover la inmuno-estimulación sin efectos inflamatorios. Es importante informar que estas bacterias deben estar presentes en un alimento lácteo en un nivel mínimo de  $10^6$  ufc  $g^{-1}$  y que la ingesta diaria debe ser de aproximadamente  $10^8$  ufc  $g^{-1}$ , con el objetivo de compensar la posible reducción en el número de los microorganismos probióticos durante su paso a través del intestino (Granato *et al.*, 2010).

Otros autores consideran que los alimentos funcionales deben contener al menos  $10^7$  ufc  $g^{-1}$  de bacterias probióticas y debe ser consumido en cantidades mayores a 100 g  $dia^{-1}$  para tener efectos positivos sobre la salud. La mayoría de los alimentos probióticos en el mercado son leches fermentadas y yogur, que son productos frescos y de consumo rápido (Kasimoğlu *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007; Boylston *et al.*, 2004).

Los probióticos deberían llegar a lo largo del intestino, y específicamente al colon, intactos y viables; sin embargo, cuando los probióticos son ingeridos, se

reduce su actividad y viabilidad, en parte por las condiciones ácidas del estómago y por la bilis (Lankaputhra y Shah, 1995), retardando su colonización.

### 3.2. Microflora normal del intestino humano

En los últimos 20 a 25 años, el conocimiento de la complejidad de la microbiota del tracto gastrointestinal que habita a los mamíferos ha aumentado considerablemente; una comunidad compleja de microorganismos se encuentra desde la boca al ano, pero el colon es, por mucho, el sitio principal de esta colonización microbiana. Bajzer y Seeley (2006) informan que el 75 % del total de la microbiota gastrointestinal son *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Figura 1).

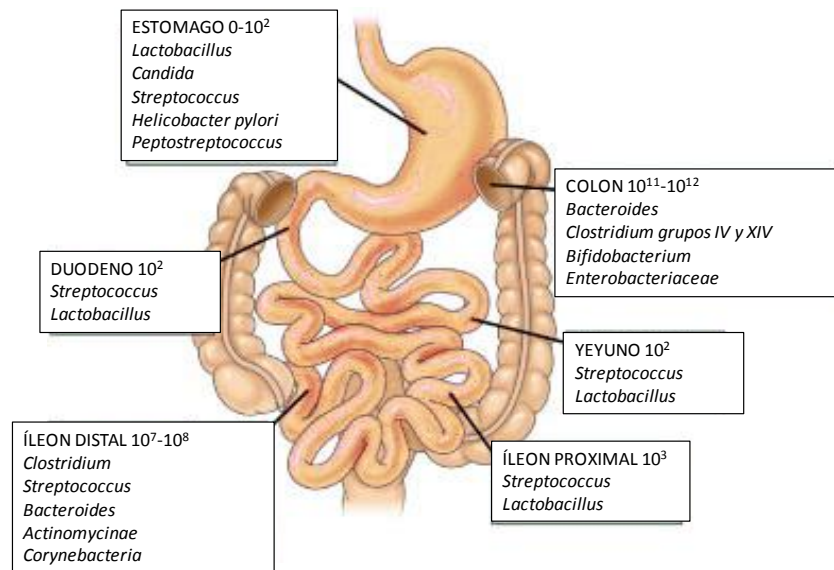


Figura 1. Distribución y abundancia de bacterias en el tracto gastrointestinal humano. Fuente: <http://www.wright.edu/~oleg.paliy/research.html>, consultada

20/09/2012.

En el adulto sano hay  $10^{11}$ - $10^{14}$  bacterias que colonizan el intestino. Esto supera en número a las células de los tejidos totales en el cuerpo por lo menos en un orden de magnitud. La composición y la actividad de este sistema microbiano complejo (llamado microflora o microbiota) tienen una influencia importante en la salud y la enfermedad. La microbiota del comensal contribuye a las funciones tróficas del intestino (la formación de productos de fermentación y vitaminas que pueden ser utilizados por las células epiteliales intestinales); estimula la función inmune del tracto gastrointestinal; transforma o excreta sustancias tóxicas; protege al huésped contra la invasión por especies patógenas y modula la motilidad digestiva (Bajzer y Seeley, 2006).

### **3.3. Beneficios a la salud atribuidos a los probióticos**

En el mundo académico se piensa que los microorganismos probióticos pueden mejorar la salud y a través de los medios de comunicación y el mercadeo, la población debe ser más consciente de esto. Para suplir la creciente demanda de probióticos, la industria alimentaria ha desarrollado nuevos productos. Algunas cepas específicas de bacterias de ácido láctico tales como *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. longum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *B. animalis* y *B. lactis* están en el mercado y proporcionan buenos beneficios para varias empresas. En este contexto, bebidas y yogures probióticos se han desarrollado, tanto en los sectores industriales y académicos, para ofrecer nuevas fuentes de productos mejorados para los consumidores. Sin embargo, este mercado todavía tiene un enorme

potencial de crecimiento, ya que la mayoría de los productos disponibles son o yogures o leches fermentadas con *B. animalis* y *L. acidophilus* (Granato *et al.*, 2010).

Varios beneficios para la salud son atribuidos a la ingestión de alimentos que contienen probióticos (Figura 2), algunos de ellos han sido probados científicamente y otros todavía requieren más estudios en humanos.

Los principales beneficios relacionados científicamente con los probióticos son: actividades antimicrobianas y anti-mutagénica; propiedades anticancerígenas; propiedades antihipertensivas; efectos benéficos sobre el metabolismo mineral, especialmente con respecto a hueso; atenuación de los síntomas de la enfermedad intestinal y el síndrome de Crohn; reducción de los síntomas de las alergias alimentarias y reducción de niveles de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad).

Algunas cepas de *Lactobacillus* también han mostrado la supresión de microorganismos patógenos tales como *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, y *Serratia marcescens* (Granato *et al.*, 2010).

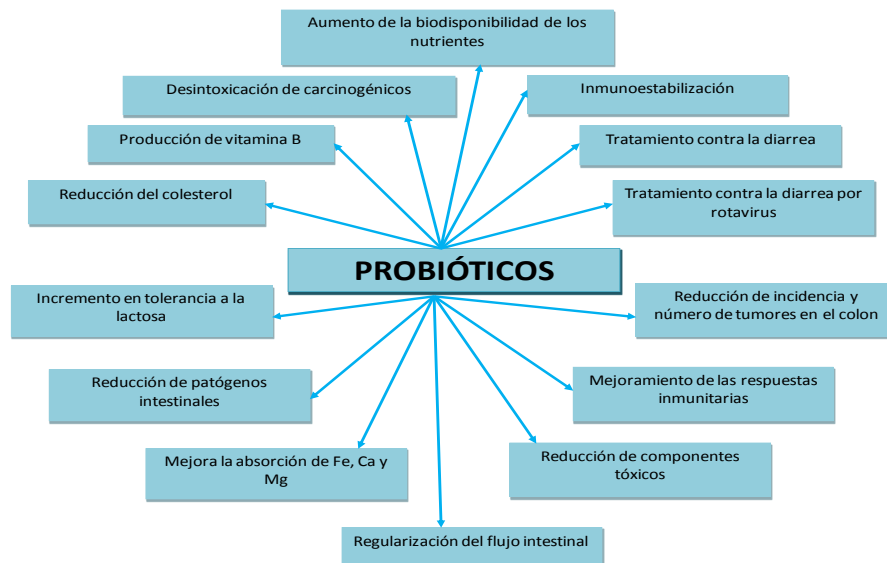


Figura 2. Beneficios fisiológicos de los alimentos funcionales que contienen bacterias probióticas. Fuente: Granato *et al.*, 2010.

Las bacterias probióticas promueven los mecanismos endógenos; además tienen efectos sobre la defensa inmunológica intestinal, que se caracteriza por la estabilización de la microflora intestinal. Las bacterias probióticas han demostrado mejorar las respuestas inmunitarias humorales y promover así la barrera inmunológica del intestino. Las bacterias probióticas han demostrado estimular la resistencia del huésped a patógenos microbianos no específicos y modular las respuestas inmunes del huésped a los antígenos potencialmente dañinos con un potencial para regular las reacciones de hipersensibilidad. Los probióticos como una parte de la flora intestinal juegan un papel importante en la inducción y desarrollo del cáncer de colon mediante la reducción de la incidencia y el número de tumores. La flora endógena y el sistema inmune participan en la modulación de la carcinogénesis (Granato *et al.*, 2010).

Algunos otros beneficios fisiológicos de cepas probióticas son: regulación del flujo intestinal; el tratamiento de la diarrea; reducción del colesterol; aumento de la tolerancia a la lactosa; mejora en la absorción de hierro y calcio; reducción de compuestos tóxicos en el organismo, aumentando el sistema inmunológico; tratamiento de la diarrea por rotavirus; mejora de la salud urogenital; prevención de cáncer y tumores supresores; desintoxicación de carcinógenos; reducción de los productos catabólicos eliminados por los riñones y el hígado; prevención de la arteriosclerosis (reducción del colesterol del suero); prevención de la osteoporosis; mejor desarrollo (crecimiento); mejora del bienestar; síntesis de nutrimentos (ácido fólico, niacina, riboflavina, vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>); aumento de la biodisponibilidad de nutrimentos; prevención de infecciones del tracto intestinal (bacterias o virus inducidos, *Candida enteritis*, *Helicobacter pylori*/neoplasia); regulación de la motilidad intestinal (estreñimiento, síndrome del intestino irritable); disminución de la diarrea inducida por quimioterapia antituberculosa y mejora o curación de la colitis (Granato *et al.*, 2010).

### **3.4. *Lactobacillus casei***

*Lactobacillus casei* es un microorganismo que se utiliza como probiótico ya que genera actividad antagónica contra patógenos causantes de desórdenes gastrointestinales, debido a su capacidad inmunomoduladora y a cambios de pH generados por la producción de ácido láctico (Escobar *et al.*, 2010).

*Lactobacillus casei* es un microorganismo gram positivo encontrado en el tracto reproductivo e intestinal de los humanos y animales (Kandler y Weiss, 1986). *Lb casei* tiene forma de bacilos cortos y coreniformes con dimensiones de 0.7-1.1×2.0-4.0 µm; con tendencia a formar cadenas, sin movimiento. Las temperaturas óptimas de crecimiento son de 30 a 37 °C. *Lb. casei* es una bacteria aerotolerante, heterofermentativa facultativa. *Lactobacillus casei*, presenta un buen crecimiento en caldo MRS y agar MRS, a una temperatura de incubación de 37 °C durante 72 h o bien a 30 °C por 5 d (Merck, 1994). *Lb casei* es frecuentemente encontrado en ecosistemas alimenticios, tales como leche, quesos, leches fermentadas, vegetales frescos y fermentados y carne (Erdoğrul y Erbilir, 2006). Su actividad metabólica genera sabores característicos y ejerce un efecto preservativo sobre los productos fermentados.

### **3.5. Microencapsulación**

La supervivencia de probióticos en alimentos es afectada por varios factores, incluyendo pH, post-acidificación durante el almacenamiento en productos fermentados, producción de peróxido de hidrógeno, toxicidad por oxígeno (permeabilidad de los empaques a oxígeno). En adición los probióticos muestran crecimiento pobre en leche (falta de proteasas para degradar las proteínas lácteas a sustancias nitrogenadas más simples) e incompatibilidad con cultivos iniciadores durante la fermentación (Dave y Shah, 1997).

Para que los microorganismos probióticos ejerzan beneficios sobre la salud de quien los ingiere, un gran número de sus células debe sobrevivir al proceso de manufactura y al periodo de almacenamiento del alimento en el que se incorporaron, así como a su paso por el tracto gastrointestinal, incluyendo el medio altamente ácido del estómago y la acción de las sales biliares en el intestino delgado (Anal y Singh, 2007; Muthukumarasamy *et al.*, 2006). Existe amplia información disponible sobre los beneficios que proporcionan los probióticos a la salud, pero el desarrollo tecnológico de sistemas de protección de estos microorganismos en los alimentos en los que son incorporados y a su paso por el tracto gastrointestinal, es todavía un reto importante (Heidebach *et al.*, 2009).

El entrapamiento de microorganismos en una matriz de gel de alginato es el sistema más popular informado. La inmovilización y encapsulación son términos que se utilizan indistintamente en la literatura reportada. Mientras que la encapsulación es el proceso de formación de un recubrimiento continuo alrededor de una matriz interior, que está totalmente contenido dentro de la pared de la cápsula como un núcleo de material encapsulado, la inmovilización se refiere a la captura de material dentro o por toda la matriz (Kailasapathy, 2002).

La encapsulación se produce naturalmente cuando las células bacterianas crecen y producen exopolisacáridos. Las células microbianas se atrapan dentro de sus propias secreciones que actúan como una estructura de protección o

como una cápsula. La reducción de la permeabilidad del material de la cápsula provoca que los microorganismos estén menos expuestos a los factores ambientales adversos. Muchas bacterias ácido-lácticas sintetizan exopolisacáridos, pero no los producen en cantidades suficientes para encapsularse completamente (Kailasapathy, 2002).

La microencapsulación ayuda a separar un material de núcleo de su entorno hasta que se libera. Esta técnica protege el núcleo inestable de su entorno, lo que mejora su estabilidad, extiende su vida y proporciona una liberación sostenida y controlada (Figura 3) (Kailasapathy, 2002).

La estructura formada por el agente de micro-encapsulación alrededor de la sustancia del núcleo se conoce como pared. Las propiedades del sistema de pared están diseñadas para proteger el núcleo y para liberarlo a velocidades controladas bajo condiciones específicas, mientras permite que las moléculas pequeñas pasen dentro y fuera de la membrana. Las cápsulas pueden variar desde sub-micrómetros a varios milímetros de tamaño y pueden ser de diferentes formas (Kailasapathy, 2002).

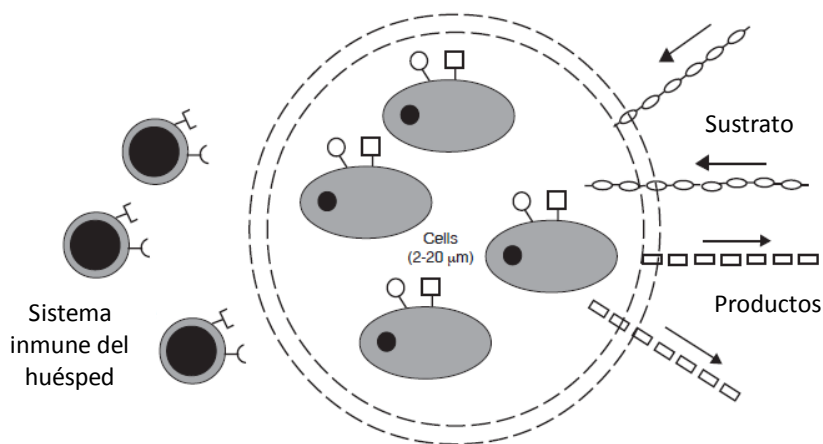


Figura 3. Principio de la microencapsulación: Membrana barrera (tamaño de poro 30-70 kDa) que aísla las células del sistema inmune del huésped al tiempo que permite el transporte de metabolitos y nutrientes extracelulares. Fuente: Kailasapathy, 2002.

La microencapsulación ha sido reconocida como una alternativa para incrementar la resistencia de los microorganismos probióticos a ambientes hostiles (Anal y Singh, 2007). La microencapsulación es definida como una tecnología de empaque de materiales bioactivos, con el objetivo de protegerlos del ambiente externo (Popplewell *et al.*, 1995), permitiendo o no que los sustratos y productos entren y salgan de la cápsula y que puedan liberar su contenido a tasas controladas bajo condiciones específicas (Anal y Stevens, 2005; Anal *et al.*, 2006; Kailasapathy y Masondole, 2005). El tamaño de las cápsulas puede variar desde 1  $\mu\text{m}$  a 1 mm, dependiendo de los materiales y métodos usados para su preparación (Anal y Singh, 2007). Se han preparado microcápsulas usando diferentes materiales de pared y diferentes métodos

(Capela *et al.*, 2006). La encapsulación de bacterias probióticas extiende la vida de anaquel de los cultivos, los protege de la incidencia de bacteriófagos e incrementa su viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento (O'Riordan *et al.*, 2001).

En comparación con otras técnicas de inmovilización/entrampamiento, la de micro-encapsulación representa muchas ventajas. La microcápsula que se compone de una pared membranosa semipermeable, esférica, fina y fuerte, mantiene dentro las células de los microorganismos; más aún, en comparación con una matriz de entrampamiento, no existe núcleo sólido o gelificado en la microcápsula y su diámetro pequeño ayuda a reducir las limitaciones de transferencia de masa. Los nutrientes y los metabolitos se pueden difundir a través de la membrana semipermeable fácilmente. La membrana sirve como una barrera para la liberación de células y minimiza la contaminación. El material de núcleo encapsulado se libera por varios mecanismos tales como ruptura mecánica de la pared celular, la disolución de la pared, de fusión de la pared y la difusión a través de la pared (Kailasapathy, 2002).

### **3.6. Métodos de microencapsulación**

#### **3.6.1. Secado por aspersion**

El secado por aspersion es el método de microencapsulación más comúnmente utilizado en la industria alimentaria; es económico, flexible y produce un

producto de buena calidad. El proceso implica la dispersión del material del núcleo en una solución de polímero, formando una emulsión o dispersión, seguido de homogeneización del líquido y la atomización de la mezcla en la cámara de secado. Esto último conduce a la evaporación del disolvente (agua) y por lo tanto la formación de la matriz de tipo micro cápsulas (Kailasapathy, 2002).

La ventaja del proceso es que puede ser operado sobre una base continua. La desventaja es que la alta temperatura utilizada en el proceso puede no ser adecuada para la encapsulación de cultivos de bacterias probióticas. Sin embargo, el ajuste y el control adecuado de las condiciones de procesamiento, tales como las temperaturas de entrada y de salida pueden proporcionar cultivos viables encapsulados de distribución de tamaño de partícula deseado (Kailasapathy, 2002).

A una temperatura de entrada de 100 °C y una temperatura de salida mínima de 45 °C, las células de *Bifidobacterium* fueron encapsuladas satisfactoriamente para producir microesferas con almidón gelatinizado modificado como un material de recubrimiento. En este estudio, el secado por aspersión se encontró que era un valioso proceso para encapsular las bifidobacterias. El proceso de secado por aspersión es económico, fácil de ampliar y utiliza equipos disponibles para la industria alimentaria. Un informe anterior indicó que la supervivencia de las bacterias probióticas durante el secado por aspersión disminuyó al aumentar la temperatura de entrada. Las

temperaturas de entrada de por encima de 60 °C dieron como resultado un secado deficiente y un producto pegajoso. Temperaturas más altas de entrada (> 120 ° C) dieron lugar a temperaturas de salida más altas (> 60 ° C) y redujeron significativamente la viabilidad de las bifidobacterias. Otras cepas de bacterias probióticas también se ha informado que pierden viabilidad a temperaturas de entrada más altas. El secado por aspersión de células encapsuladas mostró una cobertura uniforme de las mismas, con un tamaño promedio de micro esfera (> 10 micrómetros) (Kailasapathy, 2002).

### **3.6.2. Extrusión, emulsión y separación de fases**

La microencapsulación por extrusión implica la proyección de una emulsión como núcleo y del material de revestimiento a través de una boquilla a alta presión. La extrusión de soluciones de polímeros a través de boquillas para producir cápsulas se realiza principalmente a escala de laboratorio, donde se aplican dispositivos simples, tales como jeringas. Si la formación de gotitas se produce de una manera controlada la técnica se conoce como de formación de perlas. Esto se hace preferiblemente por pulsación del chorro o vibración de la boquilla. El uso de flujo coaxial o de un campo electrostático es la otra técnica común para formar gotitas (Kailasapathy, 2002).

La producción en masa de esferas puede ser alcanzada por los sistemas multi-boquilla, atomizadores de disco giratorio o mediante la técnica de corte por chorro. Sistemas centrífugos utilizando ya sea un sistema de multinozzle o un

disco giratorio también se han desarrollado para la producción en masa de las microcápsulas (Kailasapathy, 2002).

El proceso de extrusión centrífuga es un proceso de coextrusión, que utiliza una boquilla que consiste de orificios concéntricos situados en la circunferencia exterior de un cilindro giratorio. Un material líquido o núcleo se bombea a través del orificio interior y un material de envoltura líquido a través del orificio exterior que forma una varilla de co-extruida de material de núcleo rodeado por material de corteza. Conforme el sistema gira, la barra extrudida se rompe en gotitas que forman cápsulas (Kailasapathy, 2002).

La mayor parte de la literatura reportada sobre la encapsulación de bacterias probióticas se refiere a la técnica de emulsificación para producir una pequeña cantidad de cápsulas. Las cápsulas o perlas se forman mediante un procedimiento en dos etapas, implicando dispersión y endurecimiento. La dispersión se puede realizar por extrusión o por emulsificación. En este método, las células bacterianas en una suspensión de polímero se extruyen a través de una aguja o una boquilla, generándose gotas esféricas que caen en una solución de endurecimiento. La técnica de emulsificación implica la dispersión de una fase acuosa que contiene las células bacterianas y la suspensión de polímero en una fase orgánica, tal como aceite, resultando en una emulsión de agua en aceite. Las gotitas dispersadas acuosas son endurecidas por enfriamiento o por la adición de un agente gelante o un agente de reticulación en el caso de geles de poliacrilamida. Después de la gelificación las perlas se

lavan para eliminar el aceite. Mediante la técnica de emulsificación se obtienen perlas de diámetro pequeño, adecuado para ampliar sus aplicaciones. El aceite residual en las cápsulas, sin embargo, puede no ser adecuado para el desarrollo de aplicaciones en productos alimenticios de bajo contenido graso (Kailasapathy, 2002).

El método de encapsulación por emulsificación y posterior gelación, es una técnica, en la que un pequeño volumen de suspensión de células con biopolímeros (fase dispersa) se añade a un volumen mayor de aceite vegetal (fase continua), como aceite de canola o aceite de maíz. La mezcla es homogeneizada para formar una emulsión W/O. Una vez formada la emulsión, las gotas de fase dispersa deben ser insolubilizadas para formar minúsculas partículas de gel dentro de la fase oleosa y posteriormente son recuperadas por filtración. El tamaño de las partículas es controlado por la velocidad de agitación y puede variar entre 25 $\mu$  - 2mm (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

### **3.6.3. Uso de proteínas lácteas para la encapsulación**

La leche contiene entre 3.0 y 3.5 % de proteínas. Las caseínas representan el 80 % de la proteína de la leche y están organizadas en micelas de 50- 500 nm de diámetro (150 nm en promedio). La estructura de las micelas de caseína es importante desde el punto de su estabilidad en la leche y durante el procesamiento de esta última para la elaboración de productos lácteos (DeKruif y Holt, 2003).

Los caseinatos han sido utilizados como materiales de pared para la encapsulación (O'Riordan *et al.*, 2001). Las caseínas pueden formar cápsulas artificiales cuando pierden su estructura micelar original, así como a través de su comportamiento funcional natural (i.e. durante su coagulación enzimática). Se ha demostrado que el tamaño y la estabilidad de las micelas pueden ser controlados por la proporción relativa de  $\kappa$ -caseína, la cual estabiliza la superficie de las micelas de caseína, por lo que su hidrólisis puede ser una alternativa para el encapsulamiento de componentes bioactivos (Semo *et al.*, 2007).

#### **3.6.4. Aplicación de microencapsulación en bacterias probióticas**

La literatura reciente sobre tecnología de cultivos inmovilizados para aplicaciones biotecnológicas y en alimentos se resume en el Cuadro 1. Los primeros reportes sobre la inmovilización de las células bacterianas para su aplicación en la industria alimentaria y en la tecnología láctea cubren la mayor parte de las tecnologías de cultivo inmovilizado (Kailasapathy, 2002).

Cuadro 1. Inmovilización/encapsulación de células para alimentos/aplicación biotecnológica.

| Cultivo                                                       | Material de pared                         | Producto                 | Referencia                    |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i>                        | Alginato de Calcio                        | Mayonesa                 | Khalil y Mansour, 1998        |
| <i>L. paracasei</i>                                           | Grasa de leche                            | Queso Cheddar            | Stanton <i>et al.</i> , 1998  |
| <i>Enterococcus faecium</i>                                   | Grasa de leche                            | Queso Cheddar            | Gardiner <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentes</i>                    | Crema                                     | Queso blanco en salmuera | Ghoddusi y Robinson, 1998     |
| <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , and <i>B. longum</i> | Geles de alginato de calcio               | Queso Crescenza          | Gobbeti <i>et al.</i> , 1997  |
| <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>                         | $\kappa$ -carragenina y goma de algaborro | Queso fresco             | Sodini <i>et al.</i> , 1997   |
| <i>L. casei</i>                                               | cápsula de alginato de centro liquido     | Ácido láctico            | Yoo <i>et al.</i> , 1996      |
| <i>Lactobacilli</i>                                           | alginato de calcio                        | Postre helado            | Sheu y Marshall, 1993         |
| <i>Lactococci</i>                                             | Alginato de Calcio                        | Crema                    | Prevost and Divies, 1992      |
| <i>L. casei</i>                                               | $\kappa$ -Carragenina y goma de algaborro | Yogurth                  | Lacroix <i>et al.</i> , 1990  |

Fuente: Kailasapathy, 2002.

### 3.7. Técnicas de microencapsulación por capas

El método de microencapsulación capa por capa es importante. En este proceso multicapas de polielectrolitos se preparan secuencialmente a través de

sumergir un sustrato cargado positivamente o negativamente en soluciones de polielectrolitos con carga de signo contrario, en un procedimiento cíclico. La cubierta del núcleo de las partículas, con un tamaño y propiedades adaptados, se preparan usando partículas coloidales como el material del núcleo que sirve como una plantilla en la que se fabrican multicapas. Cápsulas huecas de partículas orgánicas, inorgánicas o híbridas pueden ser obtenidas disolviendo el material del núcleo. Esta técnica es versátil y simple; el espesor de las multicapas se controla con precisión variando el número total de capas depositadas (Dubey *et al.*, 2009).

### **3.7.1. Biopolímeros de recubrimiento secundario**

#### **3.7.1.1. Alginato**

El alginato es un polisacárido aniónico aislado principalmente de algas pardas. Es un copolímero lineal de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), unidades conectadas a través de enlaces glucosídicos  $\beta 1 \rightarrow 4$ . Los residuos M y G se encuentran distribuidos en bloques homopoliméricos de M o bloques de G, o bien bloques heteropoliméricos alternando residuos M y G (Figura 4a). El alginato puede formar geles en presencia de cationes divalentes tales como calcio debido a la unión entre bloques G- y calcio, dando lugar a una red tridimensional conocida como “modelo de caja de huevo” (Figura 4b). La estructura tridimensional de las cadenas ricas en ácidos gulurónicos genera

distancias entre los grupos carboxilos e hidroxilos que permiten un alto grado de coordinación de iones calcio (Chuah *et al.*, 2009).

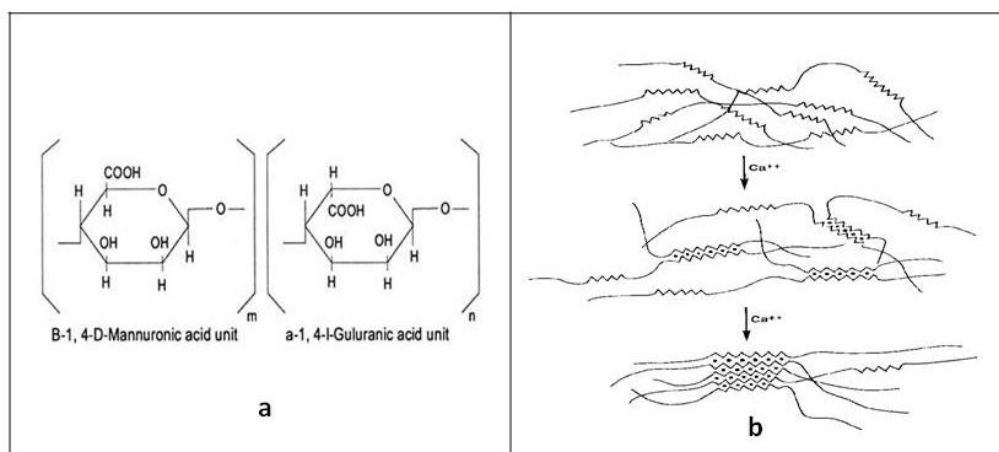


Figura 4. (a) Estructura química de alginato; (b) esquema de la interacción de alginato con iones calcio. Fuente: Braccini y Prez, 2010.

### 3.7.1.2. Quitosano

El quitosano se obtiene de fuentes naturales, como lo es el exoesqueleto de los insectos, crustáceos y hongos y se ha demostrado que son biocompatibles y biodegradables. Los polímeros del quitosano son aminopolisacáridos derivados semi-sintéticamente, que tienen estructuras únicas, propiedades multidimensionales, funcionalidad altamente sofisticada y un amplio rango de aplicaciones en áreas biomédicas, industriales y otras. Se han convertido en una materia de interés, no sólo porque están hechos de fuentes renovables abundantes, sino porque son muy compatibles y biomateriales efectivos que son utilizados en muchas aplicaciones (Dash *et al.*, 2011; Prashanth y

Tharanathan, 2007; Lee y Hong 2009). El quitosano es un copolímero lineal de  $\beta$ -(1-4) unido a 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranososa, y es obtenido mediante la desacetilación de la quitina, un polisacárido natural que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos tales como cangrejos y camarones (Figura 5). Este polisacárido catiónico ha llamado cada vez más la atención en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, debido a su abundante disponibilidad, mucoadhesividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y baja inmunogenicidad. Las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano están muy influenciadas por su peso molecular y grado de desacetilación (Patel *et al.*, 2010).

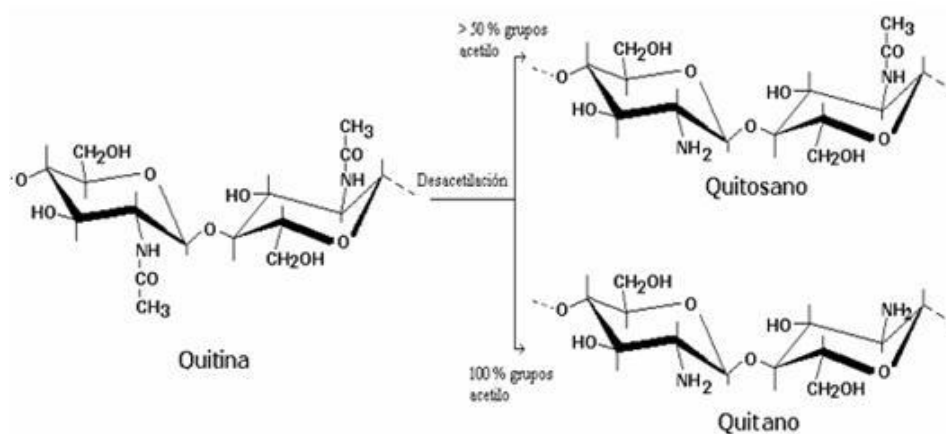


Figura 5. Estructura de quitina, quitosano y quitano. Fuente: Patel *et al.*, 2010.

Sistemas basados en quitosano han sido ampliamente estudiados para transporte y liberación de fármacos hacia el colon, ya que este sistema puede proteger a los agentes terapéuticos de las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal superior y liberar a los agentes atrapados específicamente en el

colon a través de la degradación de los enlaces glicosídicos de quitosano por la microflora del colon (Patel *et al.*, 2010).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

Cultivo liofilizado de *Lactobacillus casei* LBC81 LYO (Lb, Danisco, Dange Saint Romain, Francia). Caldo y agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) para lactobacilos y peptona de caseína (Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Francia). Leche descremada en polvo (LDP, DIBICO S. A. de C. V., México), cuajo fuerza 1:10 000 (Distribuidora Alcatraz, S. A. de C. V., D.F., México), aceite de canola (AC, Canoil, AGYDSA, México). Cloruro de calcio, ácido ascórbico, cloruro de sodio, ácido clorhídrico y etanol absoluto, todos grado analítico (Química Laitz, S. A. de C. V., México). Alginato de sodio (A, de bajo peso molecular FD-175, 60.5 % de ácido gulurónico (CP Kelco, Lille, Skensved, Dinamarca). Glutaraldehído al 2.5 % (v/v) (Electron Microscopy Sciences, Washintgton, EUA.). Quitosano (Q, de alto peso molecular, > 75 % de desacetilación), bilis de porcino B8631 y TWEEN 60 (peso molecular 1309, ácido palmítico 35-50 %, ácido esteárico 47-55 %, CMC 27 %, HLB 14.9) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA).

#### **4.2. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei***

Para determinar la cinética de crecimiento de Lb se realizaron pruebas preliminares para establecer el periodo de incubación máximo. Lo anterior se realizó usando caldo MRS estéril (121 °C, 15 min) adicionado con ácido ascórbico (0.1 g L<sup>-1</sup>) para promover un ambiente anaerobio (Song *et al.*, 2003) y una temperatura de incubación de 37 °C. Mediciones de absorbancia del medio de cultivo a 540 nm se efectuaron cada 40 min (espectrofotómetro UV, Spectronics Genesys 5 UV/Vis, Spectronic Unicam, Rochester, NY, EUA). A partir de 26 h de incubación las bacterias no mostraron crecimiento adicional, como fue indicado por incrementos poco significativos en los valores de absorbancia.

La cinética de crecimiento de Lb se determinó por el método de vaciado en placa usando agar MRS estéril (121 °C, 15 min) adicionado con ácido ascórbico (0.1 g L<sup>-1</sup>), una temperatura de incubación de 37 °C y un periodo de incubación de 26 h. Las unidades formadoras de colonias (ufc) se determinaron en el periodo comprendido de 0 a 26 h, realizando las diluciones decimales necesarias en solución de NaCl estéril (0.9 % p/v). Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 72 h y se determinó el número de ufc mL<sup>-1</sup> (Sheu y Marshall, 1993). La determinación de la cinética de crecimiento de Lb se efectuó por triplicado.

#### **4.3. Preparación del concentrado celular de *Lb casei* a encapsular**

Células de *Lb casei* se cosecharon por centrifugación aplicando  $2336.45 \times g$  durante 5 min en una centrífuga (Damon/Iec División IEC PR-J, Internacional Equipment Co., Nashville, Tennessee, EUA) a partir de un cultivo en caldo MRS de 19 h de incubación, periodo correspondiente a la fase logarítmica tardía de crecimiento de *Lb*. El sobrenadante fue decantado y el concentrado celular se lavó dos veces con solución de NaCl (0.9 % p/v) estéril; en ambas ocasiones se centrifugó bajo las condiciones mencionadas y finalmente se resuspendió en agua peptonada estéril ( $0.1 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), para obtener el concentrado celular a encapsular (CC,  $11.56 \pm 0.1 \text{ log ufc mL}^{-1}$ ).

#### **4.4. Pruebas preliminares para establecer las condiciones de preparación de las microcápsulas**

Para establecer las condiciones adecuadas para la preparación de microcápsulas con diámetros en el rango de 100-200  $\mu\text{m}$ , se realizaron pruebas preliminares en las que se tuvieron las siguientes variables de proceso: fracción volumétrica de la emulsión ( $\Phi = 0.1, 0.2, 0.3$ ) y velocidad de homogenización (900, 1500, 1680 y 4000 rpm).

#### **4.5. Preparación de las microcápsulas**

Se preparó una dispersión de LDP ( $35 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ p/p}$ ) en agua destilada estéril aplicando agitación moderada con un equipo caframo (modelo RZR1, Cole-

Parmer, Vernon Hills, IL, EUA). Las dispersiones se refrigeraron a 4 °C durante 24 h para completa rehidratación de la LDP. Posteriormente, la dispersión se mezcló con el CC en una relación 9:1 para mantener una carga celular de  $10.56 \pm 0.1 \log \text{ufc ml}^{-1}$  y una concentración de proteína de  $10.27 \pm 0.2 \%$  (DLDL).

Se prepararon emulsiones agua-en-aceite (W/O) con una fracción volumétrica ( $\Phi$ ) de 0.3, mediante el procedimiento sugerido por Heidebach *et al.* (2009), con ligeras modificaciones: (a) 60 g de DLDL se adicionaron con 800  $\mu\text{L}$  de cuajo (diluido al 25 %, v/v) (DL DLC) e incubó durante 60 min a 5 °C; (b) por separado se pesaron 140 g de AC y se mantuvieron en refrigeración, para que tanto el aceite como la DL DLC se encontraran a la misma temperatura al momento de preparar la emulsión; (c) La DL DLC se incorporó gota a gota al AC mediante el equipo caframo, operado a 1680 rpm y (d) la emulsión W/O formada fue adicionada con 480  $\mu\text{L}$  de cloruro de calcio diluido al 10 % p/v y se continuó la agitación durante 10 min. Para prevenir la prematura gelación de las lactoproteínas durante el proceso de emulsificación, la temperatura se mantuvo a  $5 \pm 1$  °C mediante un baño de hielo.

Con la finalidad de inducir la gelación de las lactoproteínas y así obtener las microcápsulas de caseína (MC), la emulsión W/O obtenida se sometió a calentamiento ( $40 \pm 1$  °C) durante 5 min, aplicando agitación continua. La mezcla microcápsulas-sobrenadante se dejó reposar 15 min a  $5 \pm 1$  °C,

después de lo cual el sobrenadante se removió y las microcápsulas se lavaron dos veces con TWEEN 60 diluido al 1 % p/p, para eliminar el residuo oleoso.

#### **4.6. Recubrimiento de microcápsulas**

Se prepararon cuatro variaciones de microcápsulas con recubrimiento, con el objeto de brindar mayor protección a los microorganismos atrapados, a partir de las MC usando las siguientes dispersiones: 0.1 % de A (MC<sub>0.1A</sub>), 0.5 % de A (MC<sub>0.5A</sub>), 0.1 % de Q (MC<sub>0.1Q</sub>) y 0.5 % de Q (MC<sub>0.5Q</sub>). Como control se consideraron las MC sin recubrimiento. En algunos estudios se informan las siguientes concentraciones para las dispersiones de recubrimiento: 0.4 % de Q y 0.17 % de A para atrapar *Lactobacillus plantarum* (Brinques y Záchia, 2011), 0.4 % de Q y 0.2 % de A para atrapar *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* (Chavarri et al., 2009), 1 % de Q, 1.5 % de A y 0.5, 1.0 y 2.0 % de carboximetilquitosano (CMCS) para atrapar *Lactobacillus casei* ATCC 393 (Yan et al., 2010). Con base en la información expuesta y tomando en cuenta que tanto Q como A forman disoluciones de alta viscosidad, lo cual en turno podría afectar el tamaño de las microcápsulas, se determinó evaluar las concentraciones de 0.1 y 0.5 % de ambos biopolímeros en las disoluciones de recubrimiento de las microcápsulas MC.

Las dispersiones de A se prepararon hidratando 0.05 g (MC<sub>0.1A</sub>) y 0.25 g (MC<sub>0.5A</sub>) en 49.95 g y 49.75 g de agua estéril, respectivamente, durante 24 h con agitación magnética. Por su parte, las dispersiones de Q se prepararon

hidratando 0.05 g (MC<sub>0.1Q</sub>) y 0.25 g (MC<sub>0.5Q</sub>) en 49.95 g y 49.75 g de ácido acético al 3 % p/p, respectivamente, durante 24 h con agitación magnética.

Las dispersiones se agregaron, de acuerdo al tratamiento, gota a gota a MC, aplicando agitación magnética durante 15 min, seguido de un reposo de 10 min a 5 °C. Posteriormente las microcápsulas se decantaron y lavaron con agua peptonada (0.1 g 100 mL<sup>-1</sup>). Las microcápsulas obtenidas fueron vaciadas en tubos de plástico estériles de 50 mL y centrifugadas durante 5 min a 1350 rpm, para eliminar el líquido restante; el sobrenadante fue removido y se agregaron 5 mL de agua peptonada (0.1 g 100 mL<sup>-1</sup>) estéril, para evitar la deshidratación. Las microcápsulas se almacenaron a 5°C hasta su caracterización. Todas las microcápsulas se elaboraron por triplicado.

#### **4.7. Caracterización de las microcápsulas**

##### **4.7.1. Rendimiento**

Se evaluó el rendimiento de microcápsulas como función de la cantidad de proteína gelificable en la DLDL, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento}[\%] = \frac{\text{g de proteína en las microcápsulas resultantes}}{5.7568 \text{ g de proteína gelificable en DLDL}} \cdot 100$$

Para aplicar la ecuación anterior, se cuantificó la proteína presente en LDL y en las microcápsulas después de 1 d de su elaboración por el método de

microkjeldahl (AOAC, 1999). Para el primer caso se consideró que el 80 % de la proteína era atribuible a caseínas (Fox *et al.*, 2000); mientras que para la microcápsulas el contenido de proteína determinado se consideró como igual al de caseína.

#### **4.7.2. Tamaño**

El diámetro mayor medio de veinte microcápsulas se determinó después de 1 d de su elaboración, utilizando el analizador de imágenes Motic Images Advanced 3.2 (Motic Co, Hong Kong, China) , a partir de las micrografías obtenidas con una cámara digital Motic 350 (Motic Co, Hong Kong, China) a 40× (Rasband, 2007).

#### **4.7.3. Microestructura**

Las microcápsulas fueron fijadas en una disolución de glutaraldehído al 2 % v/v en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) durante 6 h; posteriormente, se deshidrataron en disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (50, 60, 70, 80, 90 y 100 % v/v), permaneciendo 30 min en cada una. Las microcápsulas fijadas se secaron a punto crítico en un CPA II Technics Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, EUA). Cada microcápsula se fracturó con el objetivo de exponer la estructura interior; luego se montaron en soportes de aluminio y finalmente se cubrieron con una capa fina de oro en un Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). Las microcápsulas fracturadas se observaron en un microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (JEOL Scanning

Electron Microscope JMS-035, Jeol Ltd., Akishima, Japón), operado a 20 kV a una magnificación de 150× a 5 000× (Lobato Calleros *et al.*, 2002).

#### **4.8. Eficiencia de entrapamiento**

Se evaluó la eficiencia de entrapamiento de las células de Lb y se expresó como el porcentaje de células viables entrampadas relativo a la carga inicial presente en la DLDL. Para el recuento de células viables entrampadas, fue necesario destruir mecánicamente las cápsulas y así liberar las células de Lb (Heidebach *et al.*, 2009); se realizaron las diluciones decimales necesarias para hacer la siembra en agar MRS, se incubó a 37°C durante 72 h y se realizó el recuento en placa. La eficiencia de entrapamiento se calculó de acuerdo a lo propuesto por Reid *et al.* (2005).

$$\text{Eficiencia de encapsulamiento (\%)} = \frac{\text{ufc g}^{-1} \text{ de microcápsulas}}{\text{ufc g}^{-1} \text{ de DLDL}} \times 100$$

Donde:

ufc g<sup>-1</sup> de microcápsulas: ufc de Lb g<sup>-1</sup> de microcápsulas; ufc g<sup>-1</sup> de DLDL: ufc de Lb g<sup>-1</sup> de la dispersión celular en leche descremada.

#### **4.9. Supervivencia de *Lactobacillus casei* encapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas**

Se determinó la supervivencia de Lb en jugo gástrico simulado y sales biliares de manera secuencial, para lo cual se colocó 1 g de microcápsulas preparadas

recientemente, por triplicado, en tubos conteniendo 9 mL de solución gástrica simulada estéril (pH 2.0, ácido clorhídrico 0.1 N). Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 3 h en un baño de agua con agitación (Precision 360 Scientific Orbital, West Cortland St., Chicago, IL., EUA) (Hughes y Hoover, 1995) Posteriormente, las microcápsulas se filtraron, enjuagaron con disolución salina y se colocaron en tubos conteniendo 9 mL de extracto de bilis de porcino al 1 % p/v (la concentración máxima de sales biliares en el intestino humano es de 2 %) y pH 6.4. Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h con agitación suave (Carteris *et al.*, 1998; Sun y Griffiths, 2000; Madureira *et al.*, 2005). Al finalizar el periodo de incubación se determinó la viabilidad de Lb por el procedimiento descrito. Células de Lb sin encapsular en la misma concentración, se sometieron de manera directa a las mismas condiciones gastrointestinales simuladas que las microcápsulas y sirvieron como control (Mosilhey, 2003). La tasa de supervivencia de Lb libres y encapsulados después de ser sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas, se determinó de acuerdo con lo propuesto por Heidebach *et al.* (2009).

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = \frac{\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1}(\text{t} = \text{t}_i)}{\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1}(\text{t} = 0)} \cdot 100$$

Donde:

ufc g<sup>-1</sup>(t=t<sub>i</sub>): ufc de Lb g<sup>-1</sup> de microcápsulas después de haber sido sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas a diferentes tiempos de incubación (3 h para condiciones gástricas y 3 h para condiciones biliares en análisis secuencial).

ufc  $g^{-1}(t=0)$ : ufc de  $Lb\ g^{-1}$  de microcápsulas antes de ser sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas.

#### **4.10. Análisis de datos**

Los experimentos de esta investigación se realizaron por triplicado, usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos correspondientes a las características de las microcápsulas se sometieron a Análisis de Varianza de Clasificación Simple y en los casos pertinentes a pruebas de comparación de medias de Tukey. La significancia se estableció en  $p \leq 0.05$ . Para el análisis de datos se usó el software Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*

En la Figura 6, se muestran los valores de absorbancia versus tiempo correspondientes a la determinación de la cinética de crecimiento de Lb mediante espectrofotometría.

La variación de los valores de absorbancia con el tiempo mostraron un comportamiento sigmoideal, pudiendo observarse cuatro etapas de crecimiento: (i) latencia o lag (0-3 h), en la que los valores de absorbancia permanecieron prácticamente sin variación; (ii) logarítmica (4-19 h), caracterizada por incrementos significativos en los valores de absorbancia; (iii) estacionaria (19-21 h), en la cual en forma similar a la etapa de latencia, los valores de absorbancia permanecieron sin cambio significativo y (iv) de muerte (22-25 h) en la que los valores de absorbancia presentaron incrementos despreciables. Escobar *et al.* (2010) informaron que en la etapa de muerte de los microorganismos se observan pequeños incrementos en la absorbancia debidos a la presencia de fragmentos celulares originados por ruptura. A partir de los resultados expuestos se estableció como periodo máximo de incubación de Lb el de 19 h, correspondiendo este tiempo a la fase de crecimiento logarítmica tardía.

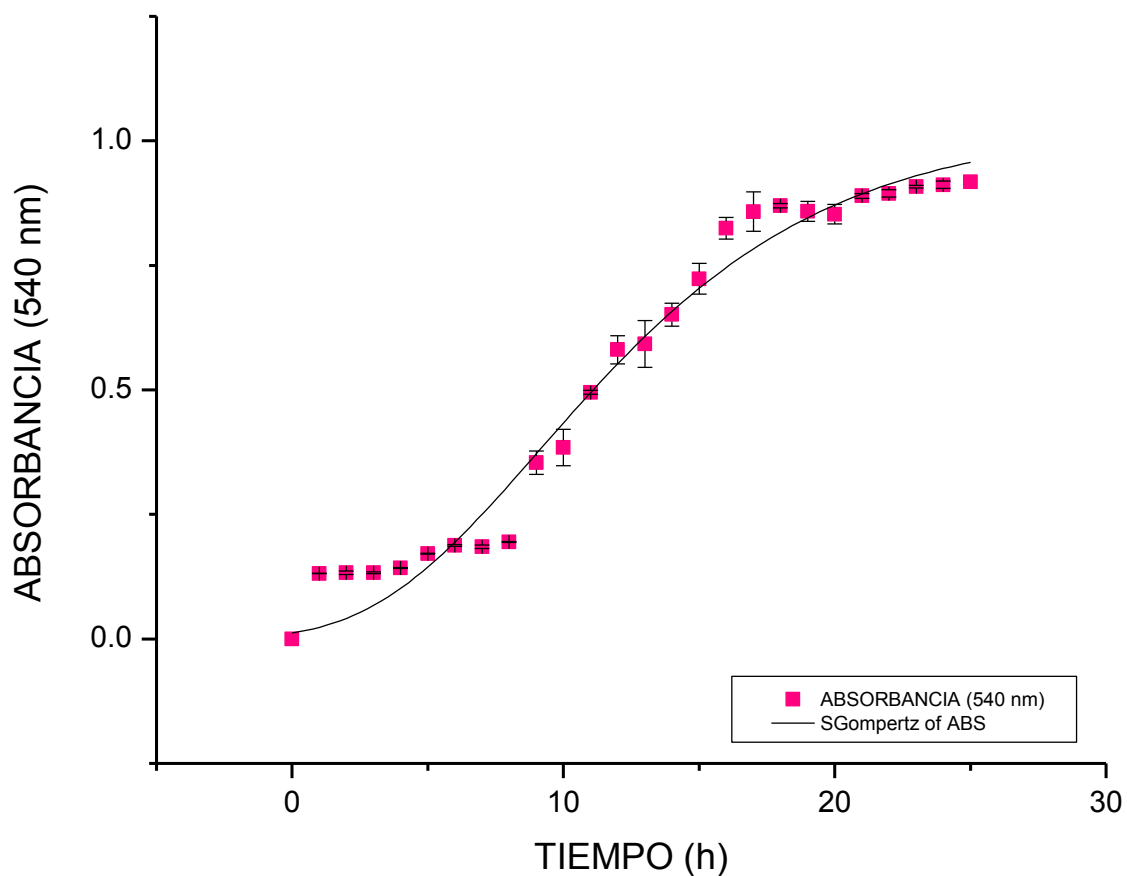


Figura 6. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* por espectrofotometría.

Los datos de las mediciones espectrofotométricas mostraron un ajuste adecuado ( $R^2 = 97.31$ ) al modelo de Gompertz: Este modelo fue el primero descrito en la ciencia y se considera que es la ecuación primaria más ampliamente utilizada para describir el crecimiento microbiano en alimentos bajo condiciones ambientales controladas y definidas. El modelo de Gompertz está basado en una relación exponencial entre la velocidad de crecimiento específico y la densidad de población (Castro *et al.*, 2008):

$$y = a * \exp(-\exp(-k * (x - x_c)))$$

Donde:  $y$ : absorbancia en un tiempo dado;  $k$ : coeficiente de valor constante=1;  $a$ : amplitud en tiempo de la fase estacionaria;  $x_c$ : representa la pendiente de la curva y describe la tasa de crecimiento y  $x$ : variable independiente tiempo (Origin Pro 8, 2007).

Los valores obtenidos para los parámetros del modelo de Gompertz para *Lb* fueron:  $a = 1.03$  que representa el tiempo que dura la fase estacionaria y  $x_c = 0.91$ ; indicando este último valor que la pendiente máxima en la fase logarítmica, cercana a 1, fue muy elevada.

La determinación de la cinética de crecimiento mediante el recuento de ufc de *Lb* en placa con el tiempo de incubación dio como resultado la gráfica mostrada en la Figura 7, en la cual pueden apreciarse las diferentes fases de crecimiento de *Lb* relacionadas con el número de ufc  $\text{mL}^{-1}$  presentes. Las fases del crecimiento microbiano identificadas fueron: (a) fase de adaptación o latencia, con una duración de 0-3 h, donde las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento; es el período en el que las bacterias individuales están madurando y no tienen aún la posibilidad de dividirse, durante esta fase del ciclo las bacterias sintetizan ARN, enzimas y otras moléculas (Castro *et al.*, 2008); (b) fase de crecimiento logarítmica o exponencial, que comprendió de 3-20 h, la cual es un período caracterizado por la duplicación celular, el número de nuevas bacterias que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población actual (Castro *et al.*, 2008); (c) fase estacionaria, en ésta la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la

acumulación de productos tóxicos, esta fase se caracteriza por un valor constante del número de bacterias a medida que la tasa de crecimiento de las bacterias se iguala con la tasa de muerte bacteriana (Castro *et al.*, 2008); en este experimento fue muy corta para *Lb*, con una duración de 1 h (21-22 h) y (d) la fase de muerte, donde las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren (Castro *et al.*, 2008); en este estudio inició después de las 22 h y se documentó hasta las 26 h de cultivo.

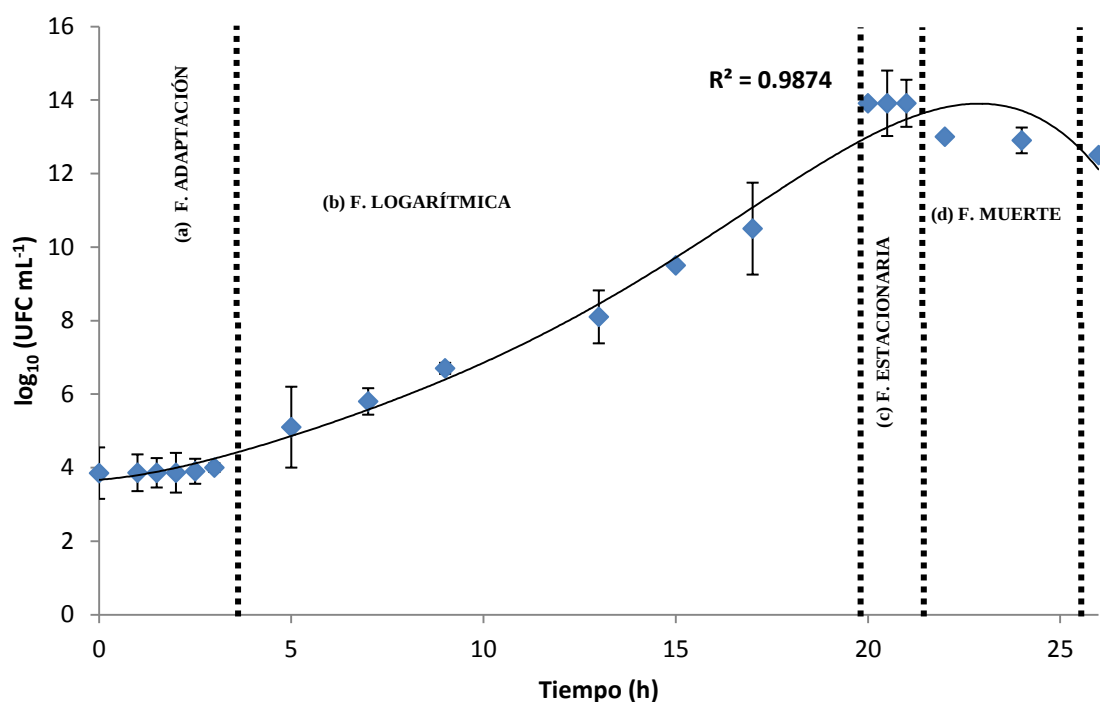


Figura 7. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* por la técnica de recuento en placa.

Los resultados de esta prueba fueron la base para las siguientes fases de esta investigación, debido a que a partir de estos se definió el periodo de incubación

tras el cual se cosechó *Lb* para ser entrampado en las microcápsulas. La mayor densidad de microorganismos se encontró a las 20 h de cultivo, con  $13.91 \log_{10} \text{ ufc mL}^{-1}$  ( $8.11 \times 10^{13} \text{ UFC mL}^{-1}$ ), por lo cual se determinó la hora de cosecha a las 19 h; tiempo que corresponde a la fase logarítmica tardía. Lo anterior con el fin de evitar la muerte de los microorganismos durante el proceso de microencapsulación (Sheu y Marshall, 1993).

Al comparar las fases de crecimiento obtenidas a partir de las mediciones espectrofotométricas con aquellas resultantes del conteo de ufc en placa, se pudo observar que los tiempos en los que se desarrolló cada una de ellas fueron similares en ambas pruebas.

## **5.2. Condiciones de formación de las microcápsulas**

Se ha informado que el tamaño de las microcápsulas influye de manera importante sobre la supervivencia de los microorganismos probióticos. Sheu *et al.* (1993), encontraron que la supervivencia de *Lb. Bulgaricus* entrampado en cápsulas de alginato adicionadas a postres congelados, fue significativamente mayor en aquellas cápsulas con 30-102  $\mu\text{m}$  de diámetro, en comparación con la observada en cápsulas con un diámetro de 15  $\mu\text{m}$ . Por su parte, Hansen *et al.* (2002), establecieron que cápsulas de alginato deberían tener un diámetro de al menos 100  $\mu\text{m}$ , para prevenir la reducción en la viabilidad de *Bifidobacterium* bajo la acción de jugos gástricos simulados; pues la viabilidad de las células en las cápsulas de alginato incrementa con un incremento en el tamaño de la

cápsula y la concentración de los geles (Chandramouli *et al.*, 2004). Hansen *et al.* (2002), sugieren un tamaño menor a 100  $\mu\text{m}$  de microcápsulas para evitar un impacto sensorial negativo en alimentos.

Basado en las referencias y en las pruebas preliminares se determinó la obtención de microcápsulas con un rendimiento mayor al 90 % y un rango de tamaño entre 100-200  $\mu\text{m}$  para no modificar las características sensoriales del alimento al que pudieran agregarse. Las condiciones óptimas para la obtención de dichas microcápsulas fueron las siguientes:

- Fracción volumétrica ( $\Phi$ ) de 0.3
- Velocidad de homogeneización 1680 rpm
- 10 min en agitación para la emulsión a 4 °C
- 40 °C de temperatura durante el proceso de gelación
- 5 min de agitación durante la gelación

La variación de tamaño fue debida a la velocidad de homogenización, la fracción másica y la composición de las cápsulas. Heidebach *et al* (2009), mencionan que la obtención de partículas < 100  $\mu\text{m}$  es debido a las propiedades emulsionantes de las proteínas de la leche. El tamaño óptimo de las microcápsulas está comprometido con la efectividad de encapsulación y propiedades sensoriales. La granulosidad es una propiedad sensorial cuya sensación percibida en la boca es granulosa y está relacionada con el tamaño de partícula y en algunos alimentos es una característica indeseable. McMaster, *et al.* (2005) sugieren un rango óptimo de 100 a 200  $\mu\text{m}$ .

### 5.3. Tamaño de las microcápsulas

Las soluciones de biopolímeros usadas para el recubrimiento de las MC<sub>0.1A</sub>, MC<sub>0.1Q</sub> y MC<sub>0.5Q</sub>, rindieron microcápsulas individuales, exentas de la formación de aglomerados de biopolímero, pudiendo así lavarse después del recubrimiento sin observarse pérdidas significativas (Figura 8). En contraste, moléculas de A presentes en la solución al 0.5 % p/p, usada para la preparación de las MC<sub>0.5A</sub>, precipitaron inmediatamente al entrar en contacto con los iones Ca<sup>+2</sup> contenidos en la solución de CaCl<sub>2</sub> utilizada como agente gelante, formando una masa amorfa de alginato de calcio (Figura 9), la cual dificultó la separación de las microcápsulas MC<sub>0.5A</sub> a partir de la solución de recubrimiento. Lo anterior, generó pérdida importante de microcápsulas, razón por la que el tratamiento MC<sub>0.5A</sub> se desechó. Se ha informado que a nivel molecular la precipitación de A en presencia de iones Ca<sup>+2</sup> se debe a la formación de una unidad dimérica en forma de bucles originada por la interacción entre los iones Ca<sup>+2</sup> y las cadenas de A, el modelo llamado "egg-box", donde los iones Ca<sup>+2</sup> se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido galurónico, formándose alginato cálcico con una estructura de gel (Figura 10) (Braccini y Prez, 2001).

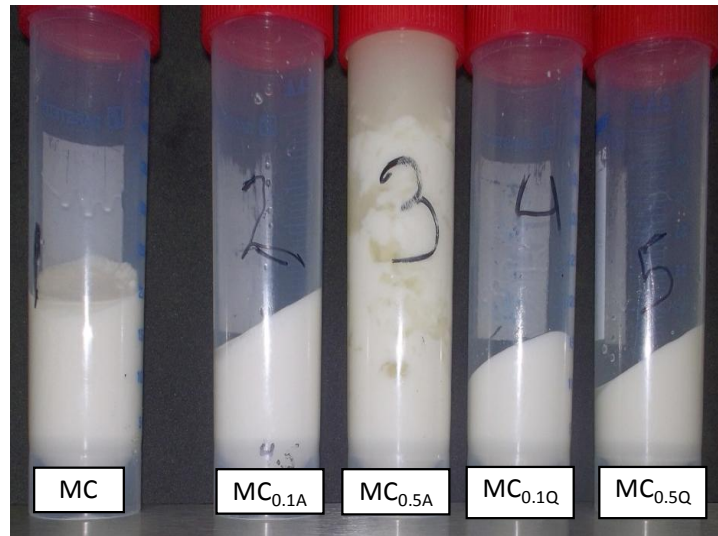


Figura 8. Fotografía mostrando las microcápsulas MC inmersas en las soluciones de alginato de sodio o quitosano usadas para su recubrimiento.



Figura 9. Precipitación de alginato de sodio en la forma de alginato de calcio durante la preparación de las microcápsulas MC<sub>0.5A</sub>.

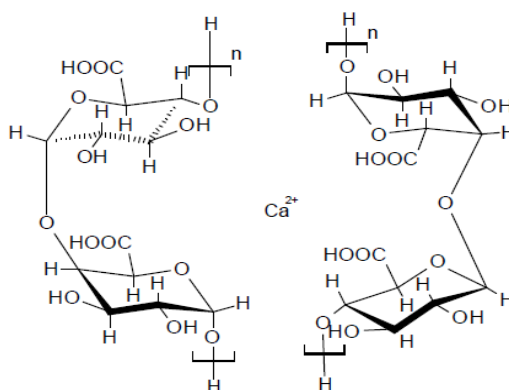


Figura 10. Representación de la red que forma el alginato de sodio en presencia de calcio (modelo "egg-box"). Fuente: Braccini y Prez, 2001.

Los diámetros de las microcápsulas correspondientes a los distintos tratamientos variaron en el rango de 104.83 a 142.20  $\mu\text{m}$  (Cuadro 2). Los diámetros de las MC<sub>0.1A</sub> y MC<sub>0.1Q</sub> no difirieron ( $p > 0.05$ ) del valor correspondiente a las MC. En contraste, el diámetro de las MC<sub>0.5Q</sub> fue menor significativamente a aquel de las MC, esto se debió a que el recubrimiento de MC<sub>0.5Q</sub> provocó que las microcápsulas se aglomerasen en menor grado que en el tratamiento MC, lo cual se observó tanto en el microscopio al determinar diámetro mayor, como después del lavado de las microcápsulas, pues en el tratamiento MC<sub>0.5Q</sub> se observó una consistencia granulosa uniforme y en el MC se observaron aglomerados.

El tamaño de las microcápsulas obtenidas es semejante a aquel de 93  $\mu\text{m}$  informado por Heidebach *et al.* (2009) para microcápsulas de caseína preparadas mediante un procedimiento muy similar al realizado en este trabajo. Estos mismos autores mencionaron que el diámetro de microcápsulas es una

característica muy variante, pudiendo encontrarse valores desde 20 hasta 2200  $\mu\text{m}$ .

**Cuadro 2. Valores medios ( $\pm$  DE) del diámetro de las microcápsulas.**

| Tratamiento        | Diámetro ( $\mu\text{m}$ )      |
|--------------------|---------------------------------|
| MC                 | 142.20 $\pm$ 35.5 <sup>b</sup>  |
| MC <sub>0.1A</sub> | 125.84 $\pm$ 33.8 <sup>ab</sup> |
| MC <sub>0.1Q</sub> | 121.26 $\pm$ 17.5 <sup>ab</sup> |
| MC <sub>0.5Q</sub> | 104.84 $\pm$ 20.7 <sup>a</sup>  |

MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC<sub>0.1A</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC<sub>0.1Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC<sub>0.5Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano. Diferentes superíndices en una columna indican que las medias son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

El tamaño de las microcápsulas, medido mediante su diámetro, constituye un factor determinante para la selección del tipo de producto alimenticio idóneo al que pueden incorporarse. Es importante que las microcápsulas presentes en un alimento no demeriten su calidad sensorial. Esto es, es conveniente que microcápsulas con diámetros menores a 100  $\mu\text{m}$  sean incorporadas a alimentos con tamaño de partícula pequeño con la finalidad de que no provoquen sensación de granulosidad (Hansen *et al.*, 2002); mientras que microcápsulas con diámetros superiores a 100  $\mu\text{m}$  pudieran ser adicionados a alimentos como el queso, con tamaño de partícula relativamente grande.

El tamaño de las microcápsulas puede disminuirse aplicando procesos de homogenización con equipo especializado; sin embargo, las altas tasas de corte pueden ocasionar pérdidas en el número de células entrampadas (Capela *et al.*, 2007). En adición, aumentos en la velocidad de agitación generalmente son acompañados de incrementos en la incorporación de oxígeno; agente dañino para el desarrollo de Lb, microorganismo anaerobio; en efecto se ha comprobado que los probióticos se encuentran aglomerados en el centro de las microcápsulas creando regiones anaeróbicas (Beunik *et al.*, 1989).

#### **5.4. Rendimiento**

El contenido de proteína de la DLDLC fue de  $10.28 \pm 0.22$  %; considerando que el 80 % de la proteína total de la leche es caseína y el resto son proteínas del lactosuero (Fox *et al.*, 2000) y que se partió de unidades experimentales de 70 mL de DCL, la cantidad máxima de proteína gelificable es de 5.7568 g. Por lo cual el rendimiento se calculó tomando como 100 % de proteína gelificable 5.7568 g y se obtuvieron los rendimientos medios mostrados en la Cuadro 3.

**Cuadro 3. Valores medios ( $\pm$  DE) de rendimiento de las microcápsulas.**

| Tratamiento        | % Rendimiento                |
|--------------------|------------------------------|
| MC                 | 96.20 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup> |
| MC <sub>0.1A</sub> | 96.36 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> |
| MC <sub>0.1Q</sub> | 74.87 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup> |
| MC <sub>0.5Q</sub> | 95.56 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup> |

MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC<sub>0.1A</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC<sub>0.1Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC<sub>0.5Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano. Diferentes superíndices en una columna indican que las medias son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

La comparación de medias de los tratamientos mostró que no existen diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre los tratamientos MC, MC<sub>0.1A</sub> y MC<sub>0.5Q</sub>, lo cual es un resultado satisfactorio pues se traduce en que más del 90 % de la proteína gelificable (caseína) se conserva en las microcápsulas y el resto de la proteína (4-5 %) se perdió en los lavados por ser microcápsulas de tamaño muy pequeño.

El tratamiento MC<sub>0.1Q</sub> fue el que menor rendimiento mostró y estadísticamente fue diferente al resto de los tratamientos. A partir de estos resultados puede inferirse que la disolución de Q al 0.1 % no brindó recubrimiento a las MC, sino al contrario, las dañó, haciéndolas quebradizas. En efecto, una gran parte de MC<sub>0.1Q</sub> se encontraron fracturadas y pequeñas fracciones de ellas se perdieron durante los lavados, reflejándose esto en un menor rendimiento en base a

proteína gelificable. El fenómeno descrito se atribuye al cambio brusco de pH que sufrieron las MC al adicionarles la solución de Q al 0.1 %, variando el pH de un valor casi neutro de 6.8 a uno altamente ácido de 1.3, correspondiente a la disolución de Q, lo cual provocó la insolubilización del calcio, la disminución de interacciones caseína-caseína y por lo tanto daño en las MC<sub>0.1Q</sub>.

## **5.5. Microestructura**

Cuando las micelas de caseína son sometidas a la acción de la enzima quimosina, a bajas temperaturas, ocurre la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína, pero no así la floculación de las cadenas de caseína y subsecuente formación de una estructura proteínica de gel. La posterior elevación de la temperatura a valores mayores a 18 °C, induce rápidamente la formación de la estructura de gel de las caseínas (Bansal *et al.*, 2007). Es por ello que una característica semejante en todos los tratamientos fue que las microcápsulas se asemejan a la cuajada de queso fresco.

### **5.5.1. Microcápsulas de caseína sin recubrimiento (MC)**

La microestructura de las microcápsulas del tratamiento MC se puede observar en las figuras 11 y 12. La Figura 11 muestra la micrografía de una MC, pudiendo observarse que exhibió superficie lisa y compacta, distintiva de las microcápsulas constituidas por proteínas (Friberg y Larsson, 2007). La superficie de la microcápsula está libre de Lb y su apariencia compacta se debe

a que el proceso de gelación ocurre del exterior hacia el interior de la microcápsula.

Al interior (Figura 12), las MC presentaron una estructura relajada y porosa, pudiendo además observarse la presencia de células de Lb, logrando así la protección de estos microorganismos. La estructura interior es muy semejante a la de queso fresco puesto que el principio de elaboración es el mismo, dicha característica se puede comprobar en estudios previos acerca de la microestructura del queso (Lobato-Calleros *et al.*, 2008).

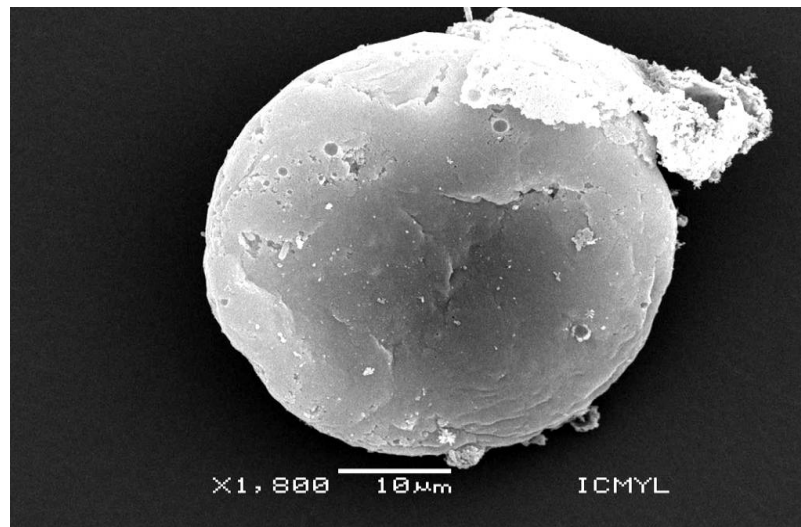


Figura 11. Micrografía MEB de microcápsula del tratamiento MC, ampliación 1800 ×.

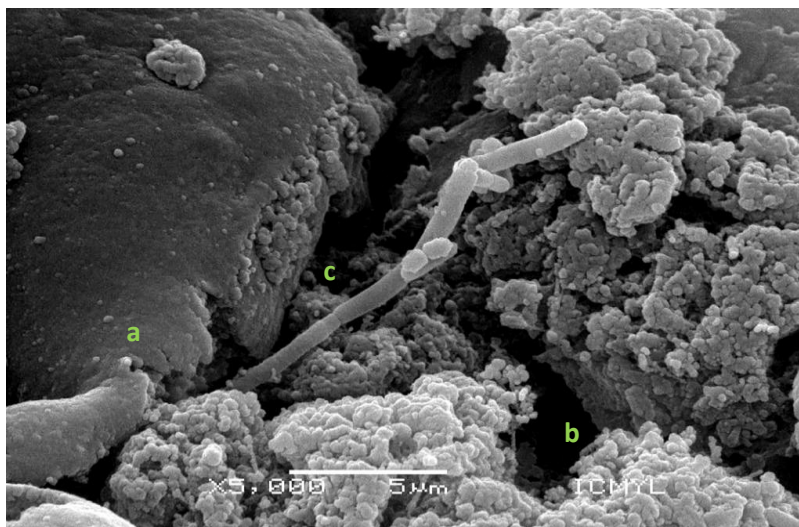


Figura 12. . Micrografía MEB de microcápsula del tratamiento MC, (a) capa externa, (b) fracción interna y (c) *Lactobacillus casei* entrampados, ampliación 5000 ×.

### 5.5.2. Microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato (MC<sub>0.1A</sub>)

Las microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.1A</sub> mostraron una superficie compacta y más lisa que aquella de las MC (Figura 11), con nula presencia de células de Lb (Figura 13). La fracción interna de las MC<sub>0.1A</sub> fue porosa y relajada al igual que la correspondiente a las MC, pudiendo observarse la presencia de células de Lb (Figura 14). Al igual que en el tratamiento MC la estructura interna es semejante a la de queso fresco.

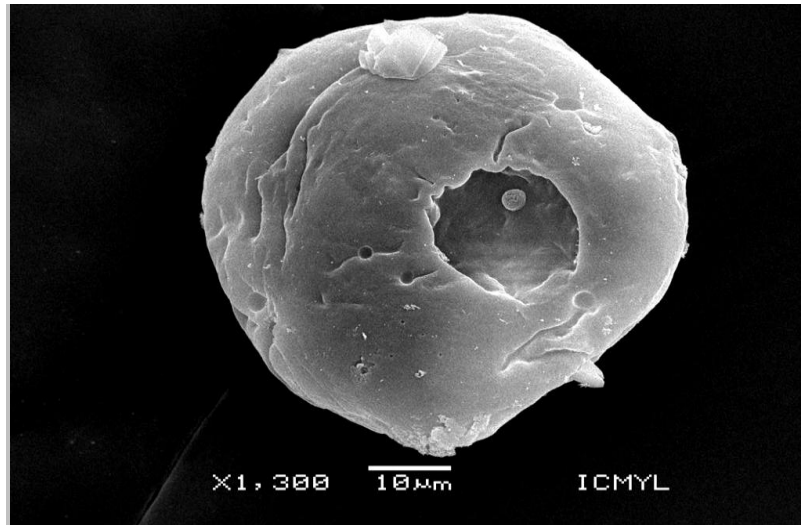


Figura 13. Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.1A</sub>, ampliación 1800 ×.

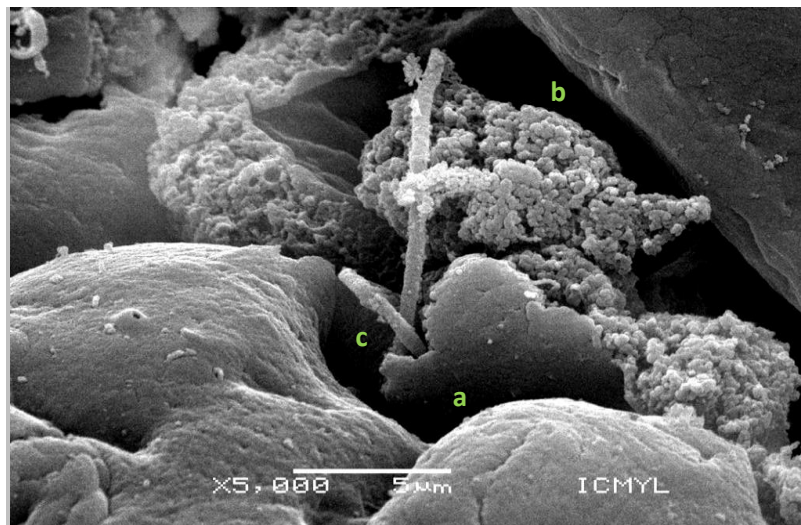


Figura 14. Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.1A</sub> , (a) capa externa, (b) fracción interna y (c) *Lactobacillus casei* atrapados, ampliación 5000 ×.

### 5.5.3. Microcápsulas recubiertas con 0.1 % de quitosano (MC<sub>0.1Q</sub>)

En las figuras 15 y 16 puede apreciarse que las MC<sub>0.1Q</sub> consistieron de agregados de caseína de distintos tamaños y estructuras amorfas, con superficie en general lisa, pero con algunas fisuras superficiales. Las diferencias apreciadas en la morfología de las MC<sub>0.1Q</sub>, en comparación con la morfología de las MC (Figura 11) y MC<sub>0.1A</sub> (Figura 13), son congruentes con la suposición de que la elevada acidez de la solución de Q usada para su preparación dañó la estructura de estas microcápsulas, a través de la insolubilización del calcio, la disminución de interacciones caseína-caseína y por tanto, la pérdida de la estructura esférica inicial de las MC. Lo anterior, se reflejó en la disminución del tamaño de las MC<sub>0.1Q</sub> ( $121.26 \pm 17.49 \mu\text{m}$ ). La estructura débil de las MC<sub>0.1Q</sub> se manifestó en dificultad para su manejo por su consistencia quebradiza. La estructura interna de las MC<sub>0.1Q</sub> fue similar a aquella de las MC, puesto que estas últimas fueron usadas para su recubrimiento con Q (Figura 16).



Figura 15. Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.1Q</sub>, ampliación 150 ×.

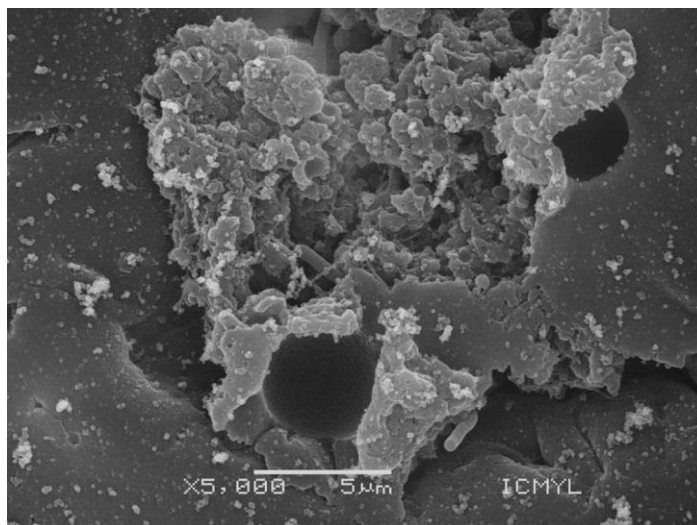


Figura 16. Micrografía MEB de la capa externa y fracción interna de microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.1Q</sub>, ampliación 5000 ×.

#### 5.5.4. Microcápsulas recubiertas con 0.5 % de quitosano (MC<sub>0.5Q</sub>)

Las MC<sub>0.5Q</sub> (Figura 17) presentaron morfología esférica al igual que las MC (Fig. 11) y MC<sub>0.5A</sub> (Figura 13), con superficie lisa, compacta y sin presencia externa de Lb. Estos resultados indican que en contraste con el efecto de la solución de Q al 0.1 % sobre la estructura de las MC<sub>0.1Q</sub>, la disolución de Q al 0.5 % sí cumplió la función de recubrimiento. Lo anterior probablemente debido a la mayor viscosidad de la solución de Q al 0.5 % en comparación aquella de la solución de Q al 0.1 % y a su mayor valor de pH (1.7). El aumento en la concentración de Q y su mayor viscosidad consecuente pudo favorecer la formación del recubrimiento e impedir la migración del ácido al interior de la microcápsula.

La fracción interna de las MC<sub>0.5Q</sub> (Figura 18) presentó una estructura porosa, relajada, con una gran semejanza a la estructura de un queso fresco y en este tratamiento fue donde se observó la mayor cantidad de células de Lb entrampadas.

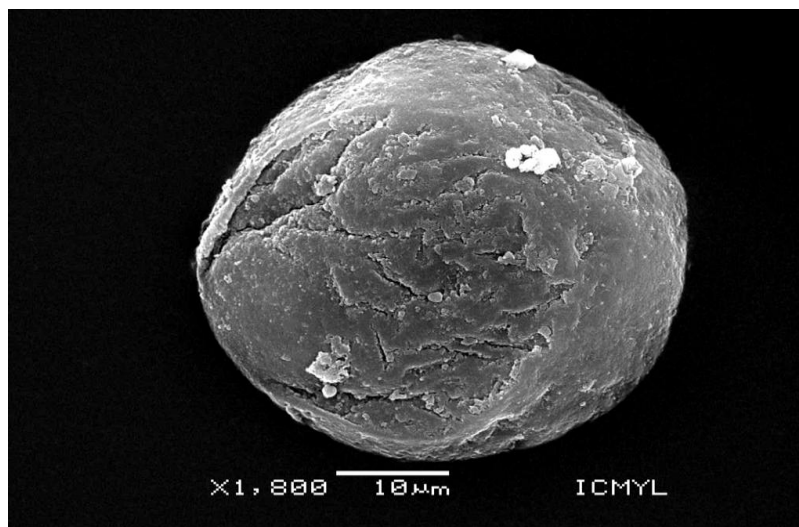


Figura 17. Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.5Q</sub>. Ampliación 1800 ×.

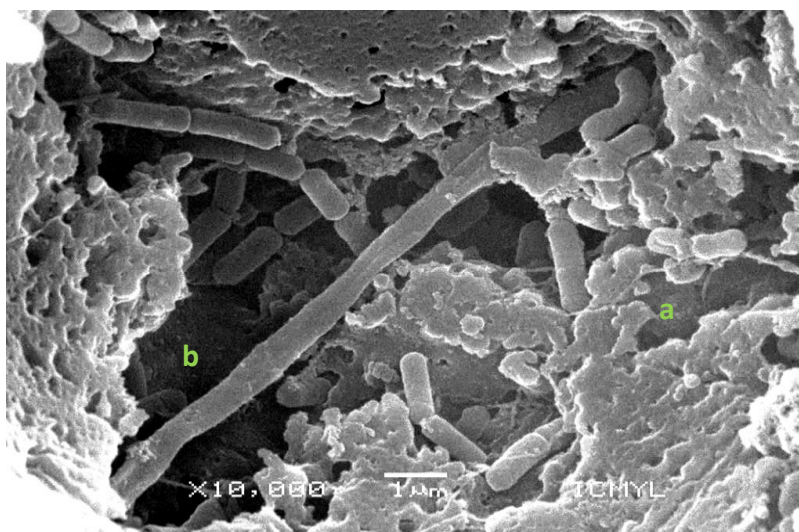


Figura 18. Micrografía MEB de microcápsulas del tratamiento MC<sub>0.5Q</sub> (a) fracción interna y (b) *Lactobacillus casei* entrampados. Ampliación 10000 ×.

## 5.6. Eficiencia de encapsulamiento

La eficiencia de entrapamiento de las microcápsulas en todos los tratamientos se determinó después de 1 d de su elaboración. Los resultados del análisis de varianza con  $\alpha = 0.05$  dieron como resultado un  $R^2 = 98.78$  y un CV de 0.50, lo cual refleja que los datos se ajustaron correctamente al modelo y los factores de error fueron controlados adecuadamente.

Las MC<sub>0.1A</sub> exhibieron la eficiencia de encapsulamiento de Lb más elevada ( $p \leq 0.05$ ) (104.05 %,  $2.82 \times 10^{13}$  ufc mL<sup>-1</sup>) partiendo de una carga celular del CC de  $8.41 \times 10^{12}$  ufc mL<sup>-1</sup> (Cuadro 4). El valor de eficiencia de encapsulamiento mayor al 100 % pudo deberse a dos factores principalmente, siendo el primero el hecho de que las bacterias se cosecharon en fase logarítmica tardía, por lo cual su crecimiento continúa. El segundo factor puede atribuirse al efecto prebiótico reconocido para A. La suma de estos dos factores pudo provocar que la carga celular de las microcápsulas aumentara y por lo tanto el rendimiento fuese mayor al 100 %. Resultados similares han sido informados por Heidebach *et al.* (2009) al encapsular *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* F19 y *Bifidobacterium lactis* Bb12 en microcápsulas de proteína de leche gelada, estos autores encontraron eficiencias de encapsulamiento que variaron de 85-125 % y 102-128 % y concluyeron que estos porcentajes no se refieren a pérdida ni ganancia de ufc, sólo son valores estables cercanos al 100%.

Cuadro 4. Valores medios ( $\pm$  DE) de eficiencia de encapsulamiento de *Lactobacillus casei* libre.

| Código de microcápsula | Eficiencia de entrapamiento (%) | Carga celular (ufc mL <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| MC                     | 99.03 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>    | 6.31 x 10 <sup>12</sup>               |
| MC <sub>0.1A</sub>     | 104.05 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>   | 2.82 x 10 <sup>13</sup>               |
| MC <sub>0.1Q</sub>     | 96.71 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>    | 3.23 x 10 <sup>12</sup>               |
| MC <sub>0.5Q</sub>     | 96.08 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>    | 2.62 x 10 <sup>12</sup>               |

MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC<sub>0.1A</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC<sub>0.1Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC<sub>0.5Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano. Diferentes superíndices en una columna indican que las medias son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Las eficiencias de entrapamiento de Lb de las MC<sub>0.1Q</sub> y MC<sub>0.5Q</sub> no fueron diferentes estadísticamente ( $p > 0.05$ ), pero fueron menores ( $p \leq 0.05$ ) a aquellas observadas en MC y MC<sub>0.1A</sub> (Cuadro 4). La menor eficiencia de entrapamiento por MC<sub>0.1Q</sub> y MC<sub>0.5Q</sub> pudo estar relacionada con la acción del ácido acético usado para la disolución del Q, sobre los microorganismos que se encontraban en la periferia de las microcápsulas.

Las MC presentaron una eficiencia de entrapamiento intermedia a aquellas de las MC<sub>0.1A</sub> y las MC<sub>0.1Q</sub> y MC<sub>0.5Q</sub>, lo que significa que las microcápsulas sin recubrimiento por sí solas tienen un alto grado de entrapamiento de Lb y que efectivamente la menor eficiencia de entrapamiento de las MC recubiertas con

Q se debió a la acción dañina por parte del ácido acético usado para la disolución de Q sobre las microcápsulas.

### **5.7. Supervivencia de *Lactobacillus casei* encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas**

La protección conferida a Lb ante condiciones gastrointestinales simuladas a través de su entrapamiento fue diferente de acuerdo a la naturaleza y a la concentración de los biopolímeros usados como recubrimiento. El análisis de varianza de los datos de supervivencia de Lb sometido a condiciones gástricas simuladas (HCl, pH 2), dio como resultado una  $R^2 = 99.37$  y un CV de 8.68, lo que significa que los datos se ajustaron adecuadamente al modelo y que los factores de error se controlaron adecuadamente. Los resultados de la supervivencia de Lb al ser sometido a condiciones gástricas simuladas (HCl, pH 2) se muestran en el Cuadro 5, pudiendo observarse que dicha supervivencia varió de 6.50 % (microorganismos libres) a 73.43 % (MC<sub>0.5A</sub>).

La supervivencia de células de Lb libres fue menor significativamente a aquellas de células de Lb entrapadas (Cuadro 5), resultado esperado debido al contacto directo de las células de Lb con el HCl. Por su parte la protección que brindaron MC, MC<sub>0.1A</sub> y MC<sub>0.1Q</sub> a Lb contra la acción del HCl fue similar ( $p > 0.05$ ), pero menor significativamente a aquella proporcionada por las MC<sub>0.5Q</sub>. Así, la mayor supervivencia de Lb bajo condiciones gástricas se presentó cuando sus células fueron entrapadas en MC<sub>0.5Q</sub>, con un valor 73.43 % (1.92

$\times 10^{12}$  ufc mL<sup>-1</sup>), lo cual significa apenas una disminución de 0.135 log. Este resultado comparado con otros estudios como Heidebach *et al.* (2009) que al encapsular *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* F19 y *Bifidobacterium lactis* Bb12 en microcápsulas de proteína de leche gelada enzimática, presento una disminución de 0.8 log y 2.8 log (después de condiciones gástricas), respectivamente, y Chavarri *et al.* (2010) que al encapsular *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* en microcápsulas de alginato-quitosano, presento una disminución de 0.8 log y 0.23, respectivamente; por lo cual se concluye que los resultados obtenidos son adecuados para usar las microcápsulas MC<sub>0.5Q</sub> como un vehículo de microorganismos probióticos.

Cuadro 5. Valores medios ( $\pm$  DE) de supervivencia de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado sometido a condiciones gástricas simuladas.

| Código de microcápsula | Supervivencia <sup>1</sup><br>(%) | Supervivencia <sup>2</sup><br>(%) |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Lb libres              | 6.50 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>       | 0.12 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>       |
| MC                     | 22.28 $\pm$ 3.1 <sup>bc</sup>     | 18.03 $\pm$ 2 <sup>c</sup>        |
| MC <sub>0.1A</sub>     | 31.27 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>      | 19.90 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>      |
| MC <sub>0.1Q</sub>     | 16.57 $\pm$ 4.9 <sup>bc</sup>     | 12.33 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>      |
| MC <sub>0.5Q</sub>     | 73.43 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>      | 65.72 $\pm$ 1.8 <sup>d</sup>      |

<sup>1</sup>: Supervivencia de *Lactobacillus casei* sometido a condiciones gástricas simuladas (HCl, pH 2);

<sup>2</sup>: Supervivencia de *Lactobacillus casei* después de su exposición secuencial a condiciones gastrointestinales simuladas (HCl, pH 2 y 0.1 % p/v de extracto de bilis porcino).

MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC<sub>0.1A</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC<sub>0.1Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC<sub>0.5Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano. Diferentes superíndices en una columna indican que las medias son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Los resultados obtenidos muestran que la protección brindada por la matriz de caseína a las células de *Lb* contra la acción del HCl, fue incrementada sensiblemente mediante el recubrimiento de las MC usando una solución de Q al 0.5 %. Lo anterior, debido probablemente a que el Q es un biopolímero catiónico que contiene numerosos grupos amino en su estructura, los cuales le confieren estabilidad a este biopolímero en medios ácidos y permite que su degradación se desarrolle hasta el colon, por acción de la microflora presente en este sitio (Chavarri *et al.*, 2010).

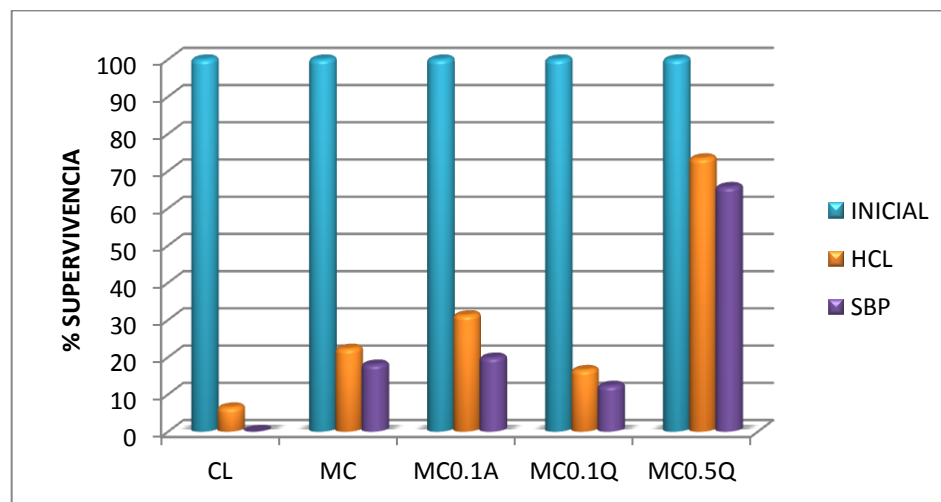


Figura 19. Supervivencia de *Lactobacillus casei* libre (CL) y entrampado después de su exposición secuencial a condiciones gastrointestinales simuladas (HCl, pH 2 y 0.1 % p/v de extracto de bilis porcino). MC: microcápsulas sin recubrimiento; MC<sub>0.1A</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de alginato; MC<sub>0.1Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.1 % de quitosano; MC<sub>0.5Q</sub>: microcápsulas con recubrimiento de 0.5 % de quitosano.

Los resultados de supervivencia de Lb después de haber sido expuesto secuencialmente a condiciones gastrointestinales simuladas (HCl, pH 2 y 0.1 % p/v de extracto de bilis porcino) pueden observarse en la Figura 19, pudiendo apreciarse diferencias entre los tratamientos.

El análisis de varianza arrojó como resultado una  $R^2 = 99.81$  y un  $CV=5.94$  %, lo que significa que los datos se ajustaron adecuadamente al modelo y que los factores de error se controlaron adecuadamente.

Los valores de los porcentajes de supervivencia de Lb después de su exposición secuencial a condiciones gastrointestinales simuladas, así como aquellos correspondientes a las pruebas de comparación de medias se presentan en el cuadro 5. Como se esperaba, las células libres de Lb fueron las que presentaron el menor porcentaje de supervivencia bajo condiciones gastrointestinales simuladas, alcanzando apenas un valor de 0.12 % (Cuadro 5). Adicionalmente se observó que células de Lb entrampadas en MC y MC<sub>0.1A</sub> presentaron una supervivencia estadísticamente igual ( $p > 0.05$ ), por lo cual se puede concluir que el recubrimiento con A no confirió mayor protección a Lb ante condiciones gastrointestinales simuladas, en comparación con la proporcionada por MC sin recubrir. Por su parte la protección proporcionada a Lb por parte de las MC<sub>0.1Q</sub> fue menor que aquella brindada por el resto de las microcápsulas, posiblemente debido a las deficiencias en su estructura ya señaladas. En contraste, las MC<sub>0.5Q</sub> confirieron la mayor protección a Lb ante condiciones gastrointestinales simuladas, de manera similar a lo observado bajo

condiciones gástricas simuladas, con una supervivencia de 65.72 % ( $1.72 \times 10^{12}$  ufc mL<sup>-1</sup>), lo que equivale a una disminución de apenas 0.18 log. Al comparar estos resultados con lo informado por Heidebach *et al.* (2009) para *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis* entrampados en caseína gelada, con disminuciones de 0.8 y 2.8 log de carga celular, respectivamente, después de ser sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas, puede concluirse que el recubrimiento de las MC usando una solución de Q al 0.5 % mejoró las características de protección de las microcápsulas. Así, la carga celular de Lb en las MC presentó una disminución de 0.75 log, muy semejante a lo antes mencionado para *Lactobacillus paracasei*, mientras que al adicionar el recubrimiento la disminución fue de 0.18 log.

Pimentel *et al.* (2009) informaron una supervivencia de 89 % en *Lactobacillus rhamnosus* entrampado en emulsiones dobles, después de ser sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas (pH 2.3 y sales biliares 0.3 % durante 2 y 24 h, respectivamente). Chavarri *et al.* (2010), observaron una supervivencia de *L. gasseri* y *B. bifidum* entrampados en microcápsulas de alginato-quitosano, mayores al 90 % después de ser sometidos a condiciones gastrointestinales simuladas (pH 2.0, 2 h y 3%, 2 h de sales biliares). Las diferencias en la supervivencia se atribuyen al microorganismo y los métodos de protección.

## 6. CONCLUSIONES

Se entrampó *Lactobacillus casei* en microcápsulas de caseína gelada enzimáticamente (MC) con y sin recubrimiento a base de quitosano (Q) o alginato de sodio (A), obteniéndose eficiencias de entrampamiento que variaron de 96.08 a 104.05 %.

El diámetro y el porcentaje de rendimiento de las microcápsulas fueron afectados por el tipo y la concentración de biopolímero en la solución usada para su recubrimiento. Así el diámetro varió de 104.8  $\mu\text{m}$  (MC<sub>0.5Q</sub>, recubierta con una solución de Q al 0.5 %) a 142.20  $\mu\text{m}$  (MC, microcápsulas de caseína sin recubrimiento), y el porcentaje de rendimiento estuvo en el rango de 74.8 % (MC<sub>0.1Q</sub>) a 96.36 % (MC<sub>0.1A</sub>).

La morfología de la microcápsulas fue esférica con superficie lisa y homogénea, a excepción de las MC<sub>0.1Q</sub>, las cuales presentaron la forma de agregados amorfos de partículas de caseína gelada enzimáticamente, con fisuras en su superficie. La microestructura interna de todas las microcápsulas fue semejante a la de la cuajada de un queso fresco, pudiendo observarse la presencia de células de *Lactobacillus casei*.

La protección brindada por las microcápsulas a *Lactobacillus casei* contra condiciones gastrointestinales simuladas varió de acuerdo al tipo y concentración del biopolímero usado para su recubrimiento. Las microcápsulas recubiertas con una solución de Q al 0.5 % (MC<sub>0.5Q</sub>) confirieron la mayor protección, obteniéndose porcentajes de supervivencia de 73.43 % después de su exposición a condiciones gástricas simuladas y de 65.72 % después de su exposición secuencial a condiciones gástricas simuladas y a la acción de sales biliares.

## 7. REFERENCIAS

- Agrawal, R. (2005). Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*. Volume 19, Issue 3: 227-246.
- Anal, A. K., Stevens, W. F. (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1/2), 45-54.
- Anal, A. K., Stevens, W. F., Remuñán-López, C. (2006). Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 312(1-2), 166-173.
- Anal, A., Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5): 240-251.
- Anderson DB, McCracken VJ, Aminov RJ, Simpson JM, Mackie RJ, Vestegem MWA. Gaskins HR (2000). Gut microbiology and growth promoting antibiotics in swine. *Pig News and Information*; 20:115N-122N
- AOAC International. (1999). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, USA.

- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., Ben-Embarek, P. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London (Ontario, Canada) April 30 and May 1. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Consultada 03-05-10.
- Augustin, M. A. (2003). The role of microencapsulation in the development of functional dairy foods. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58 (2), 156-160.
- Bajzer, M. and Seeley, R.J. (2006). Physiology: obesity and gut flora. *Nature* 444, 1009–1010.
- Bansal, N.; Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (2007). Aggregation of rennet-altered casein micelles at low temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 8, p. 3120-3126.
- Beunick J & Rehm HJ (1988) Synchronous anaerobic and aerobic degradation of DDT by an immobilized mixed culture system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:72-80.
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B. and Reinheimer, J. A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal* 14 (2004) 375–387.
- Braccini, I. y Prez, S. (2001). Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4):1089-1096.
- Brinques, G. B. and Záchia A. M. A. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal

- conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering* 103 (2011) 123–128.
- Capela, P., Hay, T. K. C., Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2), 203-211.
- Carteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotics *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 759–768.
- Castro, G., Valvuela, E., Sanchez, E., Briñez, W., Vera, H. y Leal M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Revista científica*, septiembre-octubre, año/vol. XVII, numero 005, Maracaibo, Venezuela, pp. 582-588.
- Champagne, C.P., Lacroix, C., and Sodini-Gallot, I. 1994. Immobilised cell technologies for the dairy industry. *Crit. Rev. Biochem.* 14: 109-134.
- Champagne, C. P. and Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 184-190.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P. y Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1): 27-35).

- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F. and Villarán, M. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology* 142 (2010) 185–189.
- Chuah, A. M., Kuroiwa, T., Kobayashi, I., Zhang, X. y Nakajima M. (2009). Preparation of uniformly sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 351 (2009) 9–17.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L. and Augustin, M. (2006). Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Appl Environ Microbiology* 72, 2280–2282.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R., Chiellini, E. (2011). Chitosan: A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*: 36, 981–1014.
- Dave, R. I. and Shah, N. P. (1997). Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, Volume 7, Issues 6–7, June–July 1997, Pages 435-443.
- De Kruif C G and Holt C (2003), 'Casein micelle structure, functions and interactions', in Fox P F and McSweeney P L H, *Advanced Dairy*

Chemistry Volume 1: Proteins, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 233-276.

Desmond, C., Ross, R.P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G. and Stanton, C. (2002) Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J Appl Microbiology* 93, 1003 – 1011.

Doleyres, Y. and Lacroix, C. (2005) Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int Dairy J* 15, 973–988.

Dubey, R., Shami, T. C. and Bhasker, R. K.U. (2009). Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Science Journal*, Vol. 59, No. 1, January 2009, pp. 82-95.

Erdoğan, Ö., Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turk Journal of Biology*, 30, 39-44.

Escobar, L. F., Rojas, C. A., Giraldo G. G. A. y Padilla S. L. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. *Rev. Invest. Univ. Quindío* (20): 42 - 49. Armenia – Colombia.

Fox, P. F., T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. H. McSweeney. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.

Friberg, S.E.(1997). *Food Emulsions: Third edition, revised and expanded*. Friberg, S.E y Larsson, K. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Granato, D., Branco, D. F., Gomez, C. A., Foseca, F. J. and Shah, N. P. (2010). Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.9 (5), 455-470.
- Hansen, L. T., Ian-Wotjas, P. M., Jin, Y. L. and Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. In milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19 (1), 35-45.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23, 1670–1677.
- Hughes, D. B., Hoover, D. G. (1995). Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 78(2), 268-276.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* (2002) 3: 39-48.
- Kailasapathy, K., Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60(3): 252-258.
- Kandler, O. y Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*, En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. Eds.), vol. 2, 9<sup>a</sup> ed. pp: 1063-1065. Williams and Wilkins, Baltimore, MA.
- Kasimoğlu A., Göncüoğlu, M., and Akgün S. (2004). Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal* 14 (2004) 1067–1073.

- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1): 3–13.
- Lankaputhra, W. E. V., Shah, N. P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal*, 30(3), 2–7.
- Lee, A. y Hong, Y. (2009). Coacervate formation of  $\alpha$ -lactalbumin–chitosan and  $\beta$ -lactoglobulin chitosan complexes. *Food Research International* 42:733–738.
- Li, X. Y., X. G. Chenb, Z. W. Suna, H. J. Parkc, and D. S. Chac (2011) Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers* 83 (2011) 1479–1485.
- Lobato-Calleros, C., Ramirez-Santiago, C., Osorio-Santiago, V. J., Vernon-Carter, E. J. (2002). Microstructure and texture of Manchego cheese-light products Made with canola oil, lipophilic, and hydrophilic emulsifiers. *Journal of Texture Studies*, 33, 165–182.
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 41, 1847–1856.
- Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* , 11(1-2): 1-17.

- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2005). Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 921–927.
- Merck, E. (1994). Manual de medios de cultivo. Darmstadt, Alemania. Pp 124.
- McFarland, L. V. (2009). Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 15 (2009) 274–280.
- McMaster, L. D., Kokott, S. A., y Slatter, P. (2005). Micro-encapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21,723-728.
- Mosilhey, S. H. (2003). Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Tesis. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat. Bonn, Alemania.
- Muthukumarasamy, P., Allan, P. W., Holley, A. R. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1), 20–24.
- O’Riordan, A. D., Buckle, K., Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology* 91(6), 1059-1066.
- OriginPro 8 SR0 (2007). One Roundhouse Plaza Northhampton, MA 01060, USA.

- Patel, M. P., Patel, R. R. y Patel, J. K. (2010). Chitosan Mediated Targeted Drug Delivery System: A Review. J Pharm Pharmaceut Sci ([www.cspcsCanada.org](http://www.cspcsCanada.org)) 13(3) 536 - 557, 2010.
- Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal, 14, 505–515.
- Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E.J. (2009) Encapsulation of Lactobacillus rhamnosus in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. Food Research International 42 (2009) 292–297.
- Popplewell, I. M., Black, J. M., Norris, I. M., Porzio, M. (1995). Encapsulation system for flavors and colors. Food Technology, 49(5), 76-82.
- Prashanth, H. y Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential – An overview. Trends in Food Science and Technology 18: 117–131.
- Rasband, W.S. (2007). ImageJ, Image Processing and Analysis in Java U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007. Consultada 26-06-2001.
- Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., Champagne, C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>2+</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. Journal of Microencapsulation, 22(6), 603-619.

- Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1410–1417.
- Salminen MK, Järvinen A, Saxelin M, Tynkkynen S, Rautelin H, Valtonen V (2001): Increasing consumption of *Lactobacillus* GG as a probiotic and the incidence of lactobacilli bacteraemia in Finland. *Clin Microbiol Infect*, 7: (Suppl 1) 802.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Álvarez-Ramírez, J. y Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International* 43 (2010) 111-117.
- Semo et al., 2007. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*. Volumen 21. 936-942.
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T. (1993). Microencapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557-561.
- Song, S. H., Cho, Y. H. and Park, J. (2003). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using a microporous glass membrane emulsification system, *Journal of Food Science*, 68(1): 195-200.
- Souza, C. H. B., Buriti, F. C. A., Behrens, J. H. and Saad, S. M. I. (2007). Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 43 (5), 871-877.

Sun, W., Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. International Journal of Food Microbiology, 61(1), 17-25.