

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“EFECTO DEL ALMIDÓN EN LA
VIABILIDAD GASTROINTESTINAL DE
Lactobacillus acidophilus EN
BIOSOPORTES DE
ALGINATO/ALMIDÓN”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

DEREK AMORÓS LÓPEZ

JULIO, 2013





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESORES TUTORES:

Dr. D. Sergio Collado Alonso (Universidad de Oviedo) y Dra. Dña.
Adriana Laca Pérez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICAN:

Que Dña. **Derek Amorós López** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7ª promoción curso 2012-2013.

Oviedo, 17 de Julio de 2013

D. Sergio Collado Alonso

Dña. Adriana Laca Pérez

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Adriana Laca, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de este proyecto y permitirme lograr realizar una meta más.

Al Dr Sergio Collado, por su importante aporte y participación en el desarrollo de mi trabajo. Y, sobre todo, por su disponibilidad, paciencia, apoyo y confianza.

A toda mi familia, por saber estar cerca, aún en la distancia. A mis padres, por hacer de mi lo que soy y por permitirme disfrutar de esta experiencia, ayudándome en mi enriquecimiento tanto personal como profesional. A Sergio, por apoyarme en todas mis decisiones, creer en mi por encima de todo y darme fuerzas para que no me rindiera. A todos vosotros, gracias por entender mis ausencias y mis malos momentos. En especial a mi abuelo Ramón, por todo el amor, cariño y motivación que me ha dado mientras vivía.

A mis amigos, por animarme a seguir adelante y no permitir que me viniera abajo.

A mis compañeros de viaje Miriam, Eva, Laura, Mercedes, Iván y María, quienes me han dado algo más importante que su ayuda: la amistad, quienes han hecho de este año, un año especial, que recordaré toda mi vida.

A todas las personas del departamento que de alguna manera u otra me han dado su ayuda desinteresada y se han preocupado por mi día a día, y por “mis bacterias”, gracias por vuestra compañía y por hacerme sentir una más. A Isma, Dani y Ana, por hacer que los duros e intensos días de laboratorio se hicieran más amenos, gracias por darme ánimos y sacarme sonrisas.

Me gustaría agradecer de manera especial y sincera a Rosana y Saúl, por dedicarme su tiempo y ayudarme a no perder la calma. Gracias por vuestros consejos y dedicación a mis experimentos. Gracias por dejar que aprenda de vosotros. Gracias por vuestro apoyo moral y preocupación continua. Sobre todo, gracias por estar ahí siempre, habéis conseguido que nunca me sienta sola. Sois parte de este proyecto.

Gracias a todos de corazón.

RESUMEN

Los efectos beneficiosos de las bacterias ácido lácticas sobre la salud humana han sido ampliamente reconocidos y demostrados mediante numerosos estudios. Sin embargo, su baja supervivencia a las condiciones gastrointestinales ha impulsado el desarrollo de técnicas de microencapsulación. Los materiales y métodos utilizados deben aumentar su viabilidad durante el paso por el tracto gastrointestinal, permitiendo al mismo tiempo que se liberen una vez lleguen al intestino para ejercer su mecanismo de acción.

En este estudio se llevó a cabo la microencapsulación de *L. acidophilus* con alginato sódico (1%) y distintas proporciones de almidón (entre 1,25% y 4,5%) mediante la técnica de extrusión. Fueron obtenidas microcápsulas de unos 2mm a partir de las mezcla bacteria- alginato- almidón en contacto con una solución de CaCl_2 .

Se determinaron la eficacia de encapsulación, las características físico-químicas de las microcápsulas obtenidas y la viabilidad de las células encapsuladas en jugos gástricos simulados. Los resultados mostraron que el aumento de la proporción de almidón en la mezcla polimérica hasta 1,75% tiene un efecto positivo sobre la viabilidad de *L. acidophilus* (desde 3log hasta 2log), empeorando para porcentajes superiores, hasta alcanzar un valor de reducción logarítmica en torno a 3log.

Finalmente, se evaluó la capacidad de las bacterias encapsuladas para colonizar la mucosa intestinal, ejerciendo así su efecto probiótico. Para ello se determinó la cantidad de células viables en jugos intestinales simulados. En este sentido, los resultados mostraron que existe una gran pérdida de la viabilidad de *L. acidophilus* en el tratamiento intestinal debido principalmente al efecto de los jugos gástricos sobre la resistencia de las microcápsulas y la presencia de sales biliares en los jugos intestinales.

ABSTRACT

The beneficial effects of the lactic acid bacteria over human health have been longer recognized and demonstrated through a great amount of surveys. However, its low survival to the gastrointestinal conditions has increased the development of microencapsulation techniques. The materials and methods used must increase their viability during the passage through the gastrointestinal tract, while allowing the release of the probiotic when the bowel is reached to exert their action mechanism.

In this work, the microencapsulation of the bacterium *L. acidophilus* was carried out with sodium alginate (1%) and different concentration of starch (between 1,25 and 4,5%) through extrusion techniques. Microcapsules with a diameter of around 2 mm were obtained beginning from the mixture of bacteria-alginate-starch in contact with a solution of CaCl₂.

The efficiency of encapsulation, the physicochemical characteristics of the capsules and the viability of the cells encapsulated in simulated gastric juices were determined. The results showed that the increment of the starch concentration in the polymeric mixture up to 1,75% has a positive effect over the viability of *L. acidophilus* (from 3log to 2log), getting worse to higher percentages, reaching a log reduction value above 3log.

Finally, it was evaluated the capacity of the encapsulated bacteria to colonize the intestinal mucosa, so exercising its probiotic effect. For this, the amount of viable cells in simulated intestinal juices was determined. In this way, the results showed a great loss of viability for *L. acidophilus* in the intestinal treatment mainly due to the gastric juices effects on the resistance of the microcapsules and the presence of bile salts in the intestinal juices.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema conceptual de trabajo	7
FIGURA 2: Mecanismos de acción de los probióticos	13
FIGURA 3: Enfermedades sobre las que actúan los probióticos	16
FIGURA 4: Factores influyentes en la viabilidad de los probióticos.....	18
FIGURA 5: Distintos tipos de microcápsulas: (a) Esférica monopared (b) Irregular monopared (c) Monopared con varios núcleos (d) Multipared con un núcleo (e) Multipared con núcleo matricial altamente disperso en la matriz polimérica.....	24
FIGURA 6: Representación esquemática de una microcápsula.....	25
FIGURA 7: (a) Generador electrostático (b) cortador de flujo o ‘jet cutter’ (c) vibración (d) coextrusión o flujo axial.....	28
FIGURA 8: Presentación esquemática del proceso de emulsión	30
FIGURA 9: Presentación esquemática del secado por atomización	32
FIGURA 10: Microscopia electrónica de barrido: microcápsulas que contienen <i>L. acidophilus</i>	34
FIGURA 11: Formación de unidad dimérica entre los iones de calcio y las cadenas de polímero en forma de bucle (regiones de bloques GG).....	37
FIGURA 12: Cápsulas de alginato con células probióticas de <i>L. acidophilus</i>	37
FIGURA 13: Unidades estructurales básicas de amilosa (a) y amilopectina (b)	39
FIGURA 14: Obtención del concentrado celular	50
FIGURA 15 : Centrífuga Kubota (a) e incubador orbital (b)	51
FIGURA 16: Esquema para la determinación de la concentración de microorganismos, pH y D.O.....	52
FIGURA 17: Equipos a) Centrífuga de meseta b) pH metro c) Espectrofotómetro.....	53

FIGURA 18: Equipos para el trabajo en condiciones estériles: autoclave (a) y campana de flujo laminar (b).....	54
FIGURA 19: Procedimiento de encapsulación	55
FIGURA 20: Estereomicroscopio Leica M205	56
FIGURA 21: Analizador TA.XTplus (Stable Micro Systems)	57
FIGURA 22: Geles con 1% de alginato y 1,25% de almidón	58
FIGURA 23: Procedimiento para determinar la eficacia de encapsulación.....	59
FIGURA 24: Tratamiento gástrico simulado	61
FIGURA 25: Limpieza de las cápsulas tras someterse a los jugos gástricos	62
FIGURA 26: Tratamiento intestinal simulado	62
FIGURA 27: Crecimiento de <i>L. acidophilus</i> en MRS (D.O. y viabilidad celular) y evolución del pH con el tiempo	65
FIGURA 28: Cápsulas de alginato (1%) con distintas proporciones de almidón: a)1,25% b) 1,75% c) 2 % d) 2,25% y e) 4,5%.....	68
FIGURA 29: Estereomicroscopía fotónica (Luz de reflexión) de una microcápsula de alginato (1%) y almidón (2%) realizada por el mecanismo de extrusión.....	70
FIGURA 30: Determinación de la firmeza (F1) y la pegajosidad (F2) de un gel de alginato y almidón (1 %: 1,25%).....	71
FIGURA 31: Eficacia de encapsulación de <i>L. acidophilus</i> en mezclas alginato (1%) con distintos porcentajes de almidón.....	74
FIGURA 32: Cantidad de células retenidas en las microcápsulas (1:1,25) en función del volumen de inóculo en la solución de encapsulación	76
FIGURA 33: ufc/g de cápsulas con 1,25 % de almidón, a distintos tiempos del procedimiento de encapsulación.....	77
FIGURA 34: Eficacia de encapsulación a distintos tiempos de la curva de crecimiento microbiana	78

FIGURA 35: Concentración de células viables retenidas en microcápsulas con 1% de alginato y 1,25 % de almidón durante el tratamiento gástrico simulado.....	80
FIGURA 36: Evolución de la concentración celular en el interior de las microcápsulas con distintas proporciones de almidón durante el tratamiento gástrico.....	81
FIGURA 37: Muerte celular a los 45 y 90 minutos en función de la proporción de almidón	82
FIGURA 38: Efecto de la fase de crecimiento del microorganismo sobre su viabilidad en las microcápsulas (1: 1,25) expuestas al JGS	84
FIGURA 39: Tamaño de las microcápsulas con 1% de alginato y 2,25% de almidón a) antes y b) tras 90 minutos de exposición al JGS	85
FIGURA 40: Microfotografías de microcápsulas con una proporción de a) 1:2 b) 1:4,5, a distintos tiempos de exposición al JGS. Estereomicroscopía fotónica. Luz de transmisión.....	86
FIGURA 41: a) Diámetro y b) longitud de microcápsulas con distintas proporciones de almidón sometidas al JGS.....	87
FIGURA 42: Concentración inicial de células microbianas en las microcápsulas tras el JGS y evolución de su liberación en el JIS.....	88
FIGURA 43: Viabilidad de <i>L. acidophilus</i> en microcápsulas (1:1,75) durante el JIS con o sin paso previo de las mismas por el JGS.....	90
FIGURA 44: Cápsulas en contacto con el JIS tras su exposición a los JGS (a) y sin previa exposición a los mismos (b)	91
FIGURA 45: Viabilidad de <i>L. acidophilus</i> en a) el interior de cápsulas b) liberados de las cápsulas durante su exposición a distintos tipos de jugos intestinales; u(JIS 1:con bilis)n(JIS 2:sin bilis).....	92
FIGURA 46: Células libres sometidas a distintos tipos de jugos intestinales.....	94
FIGURA 47: Células de <i>L.acidophilus</i> sin cápsula inoculadas directamente y encapsuladas sometidas al JIS 1	95

FIGURA 48: Estado de microcápsulas con distinta proporción de almidón durante la simulación intestinal.....96

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: Microorganismos empleados comúnmente como probióticos	11
TABLA 2: Microorganismos del tracto gastrointestinal	20
TABLA 3: Estudios sobre encapsulación de <i>L. acidophilus</i> mediante extrusión.....	29
TABLA 4: Probióticos encapsulados por la técnica de emulsión.....	31
TABLA 5: Encapsulación de <i>L. acidophilus</i> en yogures.....	44
TABLA 6: Mezclas poliméricas con alginato y almidón en distintas proporciones	53
TABLA 7: Condiciones de realización del ensayo con el texturómetro	58
TABLA 8: Composición de los jugos gástrico e intestinal.....	60
TABLA 9: Firmeza y pegajosidad en geles con distintas proporciones de alginato y almidón	72
TABLA 10: Eficacia de encapsulación para mezclas alginato(1%)/almidón con distintas proporciones	73
TABLA 11: Composición de los JIS ensayados.....	92

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. OBJETIVOS	6
1.2. MAPA CONCEPTUAL	7
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS	8
2. 1. Importancia de los probióticos y su influencia en la salud	9
2.1.1. Concepto de probiótico.....	9
2.1.2. Microorganismos empleados comúnmente como probióticos. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	10
2.1.3. Mecanismos de acción de los probióticos	12
2.1.4. Efectos de los probióticos en la salud humana	15
2.2. Factores influyentes en la viabilidad de los probióticos	17
2.2.1 Características y flora microbiana del tracto gastrointestinal.....	18
2.2.2. Estabilidad de los probióticos en el tracto gastrointestinal y capacidad de adhesión	21
2.2.3. Características de la matriz.....	21
2.2.4. Condiciones de procesado y almacenamiento	22
2. 3. Microencapsulación	23
2. 3.1. Concepto de microencapsulación	23
2. 3.2. Caracterización de las microcápsulas	24
2.3.3. Técnicas empleadas en la microencapsulación de <i>L. acidophilus</i>	26
2.3.3.1. Extrusión.....	27
2.3.3.2. Emulsión.....	29
2.3.3.3. Secado por atomización (Spray- drying)	31
2.3.3.4. Atomización en frío (Spray- cooling o spray-chilling)	33
2.3.4. Materiales empleados en la microencapsulación de <i>L.acidophilus</i>	34
2.3.4.1. Alginato	36
2.3.4. 2. Almidón	38
2.3.4.3. Goma gellan y goma xantana	39
2.3.4.4. Quitosano.....	40
2.3.4.5. Proteínas de la leche (caseínas, proteínas del lactosuero)	40
2.4. Productos con probióticos encapsulados	41

2.4.1. En desarrollo.....	41
2.4.2. En comercialización	45
2.5. Marco legislativo.....	47
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	48
3.1. Microorganismo y condiciones de cultivo	49
3.1.1. Microorganismo y medio de cultivo.....	49
3.1.2. Preparación de cultivos stock	49
3.1.3. Obtención del concentrado celular	50
3.1.4. Curva de crecimiento de <i>L.acidophilus</i>	51
3.2. Microencapsulación.....	53
3.2.1. Materiales	53
3.2.2. Procedimiento de encapsulación: método de extrusión.....	54
3.2.3. Caracterización de las microcápsulas	56
3.2.4. Determinación de la dureza y pegajosidad de las microcápsulas.....	56
3.2.5. Eficacia de encapsulación.....	59
3.2.5. Resistencia de las células encapsuladas a los jugos gástricos	60
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
4.1. Curva de crecimiento	65
4.2. Microencapsulación.....	67
4.2.2. Caracterización de las microcápsulas	67
4.2.2.1. Examen macroscópico	67
4.2.2.2. Examen microscópico.....	69
4.2.2.3. Firmeza y pegajosidad de las microcápsulas.....	71
4.2.3. Eficacia de la encapsulación.....	73
4.2.3.1. Efecto del contenido en almidón	73
4.2.3.2. Efecto de otros parámetros	75
4.3. Tratamiento gastrointestinal.....	78
4.3.2. Comportamiento de las microcápsulas en el jugo gástrico simulado (JGS). 78	
4.3.2.1. Efecto del contenido en almidón	79
4.3.2.3. Efecto de la fase de crecimiento del microorganismo	84
4.3.2.2. Caracterización de las microcápsulas tras la exposición al JGS	85
4.3.3. Comportamiento de las microcápsulas en el jugo intestinal simulado (JIS) 88	
4.3.3.1. Viabilidad en las microcápsulas	89

4.3.3.2. Efecto del tratamiento gástrico previo sobre la viabilidad de los microorganismos en condiciones intestinales.....	89
4.3.3.3. Influencia de la bilis sobre la supervivencia en células encapsuladas y libres	91
4.3.3.4. Estado de las microcápsulas durante su paso por el jugo intestinal	96
4.4. Propuestas de continuación de trabajo.....	97
5. CONCLUSIONES	98
6. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	101
7. BIBLIOGRAFÍA	104

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés de los responsables de la salud pública y de los consumidores por conocer la relación que existe entre la alimentación y la salud. Los expertos recomiendan seguir una dieta sana, variada y equilibrada como la mejor manera de prevenir ciertas enfermedades pero los nuevos estilos de vida han provocado que se abandonen determinados hábitos de alimentación saludables que durante años han formado parte de nuestra historia y tradición. Sin embargo, cada vez más consumidores son conscientes de su autocuidado y buscan en el mercado productos que contribuyan a su salud y bienestar. Ello estimula a la industria a desarrollar constantemente nuevos productos fortificados, enriquecidos, o con agregados de ciertas sustancias, así como alimentos libres de algún componente considerado nocivo (alérgenos, grasa, etc.).

En este contexto, surgen los alimentos funcionales, aquellos que han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar. Estos alimentos, además, ejercen un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades. Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos.

Los probióticos son alimentos a los que se les han adicionado cultivos vivos de microorganismos que ejercen una acción beneficiosa sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas (FAO/WHO, 2002). Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas. Las tres especies más utilizadas y estudiadas son *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium spp*, las cuales suelen utilizarse para la elaboración de productos fermentados.

Los efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud humana han sido ampliamente reconocidos y demostrados mediante numerosos estudios desde principios del siglo XX (Metchnikoff, 1907) y en la mayoría de los casos estos efectos son dependientes de la viabilidad del microorganismos en el lugar de acción. Para ello, los probióticos deben mantenerse metabólicamente estables y activos en el producto al que se incorporan,

sobrevivir a su paso por el tracto digestivo y mostrar habilidades para adherirse y colonizar el intestino, lo cual les permitirá desempeñar sus mecanismos de acción (Champagne y col., 2005; Mattila- Sandholm y col., 2002; Stanton y col., 2005).

Numerosas investigaciones afirman la pérdida de viabilidad microbiana en los productos que los contienen en las condiciones de procesado y almacenamiento (Sharp y col., 2008; Mirzaei y col., 2012; Nualkekul y col., 2012; Ranadheera y col., 2012) . Sobre todo, una gran pérdida asociada con su paso por el estómago e intestino, lo cual se debe principalmente a la elevada acidez de los jugos gástricos y la presencia de sales biliares en los jugos intestinales (Begley, Gahan y Hill., 2004; Kimoto y col., 2000; Vinderola y Reinheimer, 2003).

La microencapsulación está siendo estudiada como una alternativa para proteger a los probióticos de aquellos factores que puedan afectar a su estabilidad y viabilidad de manera que permanezcan viables y con la capacidad de ejercer sus beneficios en la salud. Para ello, las microcápsulas conteniendo el microorganismo no deben fracturarse hasta que pasen a través del estómago y lleguen al intestino, permitiendo así la liberación microbiana (Charalampopoulos y col., 2009).

Existen diferentes técnicas y materiales de microencapsulación que se han estudiado en los últimos años para intentar aumentar la protección, pretendiendo causar el mínimo daño a la integridad microbiana. La selección juiciosa del método y los materiales es importante y debe realizarse buscando el máximo equilibrio entre la supervivencia microbiana y la eficacia de encapsulación, teniendo en cuenta la especie que vaya a ser microencapsulada porque de ella depende en gran medida la mayor o menor supervivencia (Sohail y col., 2011).

1.1. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es evaluar el comportamiento de microcápsulas compuestas por diferentes concentraciones de alginato y almidón cuando son sometidas a las condiciones gástricas e intestinales, y su efecto en la protección de *L. acidophilus* para su liberación efectiva en el intestino. Más específicamente, los objetivos son:

- Evaluar la eficacia de la encapsulación de *Lactobacillus acidophilus* mediante mezclas poliméricas alginato/almidón.

- Determinar las características físicas-químicas de las microcápsulas obtenidas.
- Comparar el comportamiento de las distintas microcápsulas durante el tratamiento gástrico e intestinal, en cuanto a integridad física, viabilidad celular y liberación de las células probióticas, prestando especial atención al efecto de la bilis de los jugos intestinales.

1.2. MAPA CONCEPTUAL

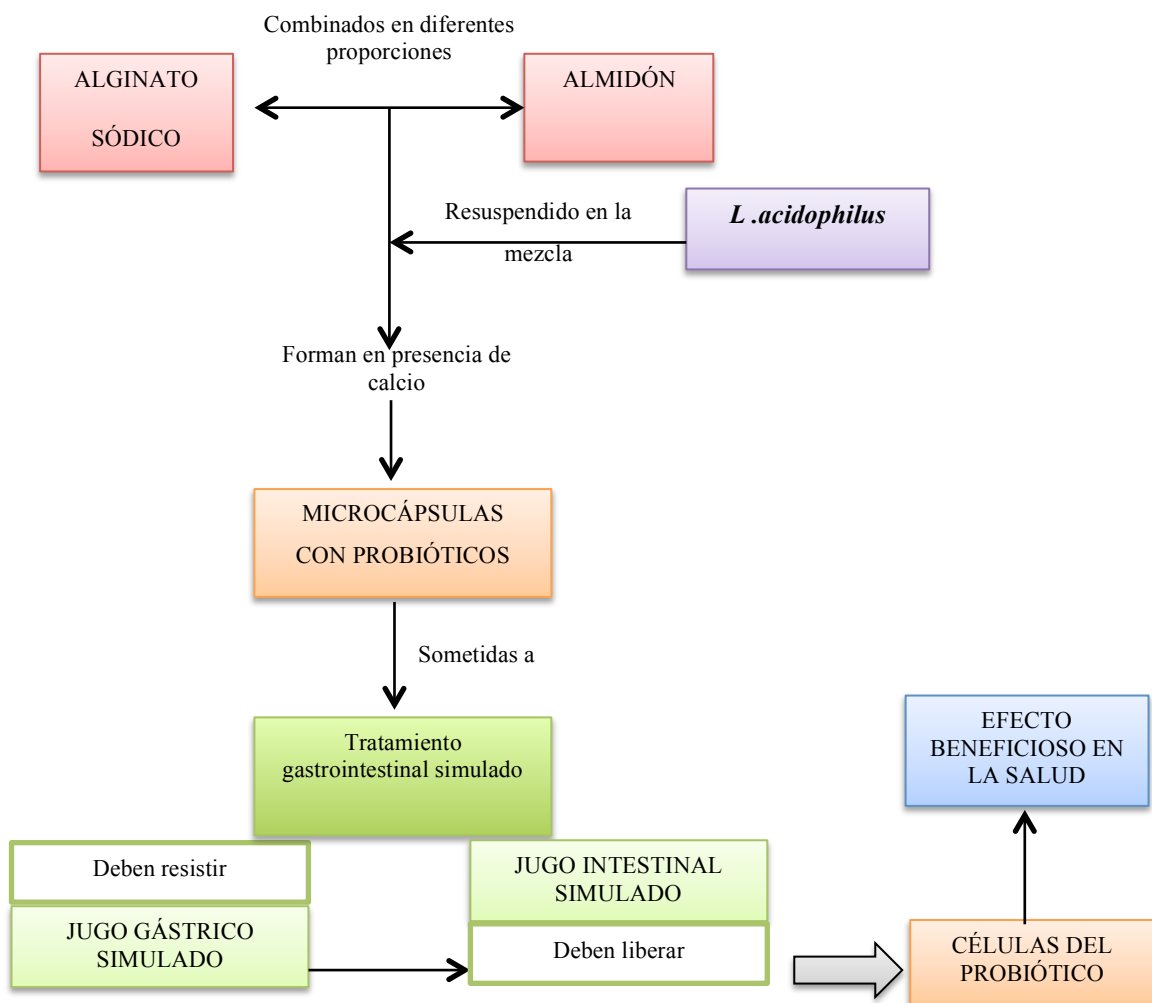


FIGURA 1: Esquema conceptual de trabajo.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2. 1. Importancia de los probióticos y su influencia en la salud

2.1.1. Concepto de probiótico

La palabra probiótico se deriva de dos palabras griegas: pro (a favor de) y biótico (vida). Lilly y Stillwell en el año de 1965 intentaron utilizar por primera vez este término, en el sentido de que una sustancia microbiana estimulara el crecimiento de otro microorganismo (Fooks y col., 1999). Sperti (1971) sustituyó esta definición por: extracto de tejido que mejora el crecimiento bacteriano, sin lograr la aceptación general para ésta. El concepto ha evolucionado a lo largo de los años a partir de su significado original “para la vida”. En 1989, Fuller definió a los microorganismos probióticos como: “un suplemento alimenticio con microorganismos vivos que afecta benéficamente al huésped mejorando el equilibrio microbiano intestinal”, logrando una mayor aceptación. La definición más reciente, y la más ampliamente aceptada al día de hoy es la publicada por la FAO/ WHO (2002) (Food and Agriculture Organization/ World Health Organization) la cual menciona lo siguiente: “los microorganismos probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped”.

Algunos requisitos de los probióticos indican que estos microorganismos deben (Ramos-Cormenzana y col., 2005; Saulnier y col., 2009):

- Estar correctamente identificados a nivel de género, especie y cepa
- Ser de origen humano por poseer mayor facilidad para colonizar el intestino humano
- Carecer de patogenicidad, de factores de virulencia y de la capacidad de producir metabolitos indeseables.
- Estar reconocidos como seguros (término “GRAS” o “Generally Recognized as Safe”).
- Mostrar tolerancia a las condiciones del entorno donde ejercen el beneficio
- Ser viables en el momento de su consumo, y que se verifique su funcionalidad probiótica en ensayos de intervención en humanos

En la actualidad se han desarrollado un sin número de productos sobre la base de la incorporación de estos microorganismos, que van desde alimentos como lácteos (yogurt, leches fermentadas, quesos y helados), frutas, jugos o postres, hasta

suplementos dietéticos diversos. La incorporación puede ser bajo la modalidad de cepas simples hasta múltiples y algunas veces combinadas con elementos o sustancias con carácter prebiótico, obteniéndose en este caso un efecto sinérgico entre ambos componentes, que afecta beneficiosamente al hospedador. Ello puede realizarse bajo técnicas muy diversas: simple agregado al producto, o buscando un medio que permita la protección a los microorganismos.

Los productos lácteos siguen siendo los productos probióticos más comunes y tradicionales en el mercado. Estos tipos de productos son altamente susceptibles al deterioro a causa de su alta actividad de agua y el contenido de nutrientes con lo que mantener una cantidad suficiente de microorganismos probióticos viables en el tiempo es un desafío.

Las estrategias tales como la microencapsulación de probióticos, la utilización de agentes protectores y las técnicas de deshidratación se proponen cada vez más para reducir al mínimo la pérdida de las bacterias beneficiosas en estos productos y su deterioro.

2.1.2. Microorganismos empleados comúnmente como probióticos.

Lactobacillus acidophilus

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de laboratorios o industrias alimenticias a nivel internacional así como en colecciones de cultivos.

Algunos ejemplos de estos microorganismos aparecen en la tabla 1 que se muestra a continuación, la mayoría pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas. Se las conoce como BAL por su capacidad de convertir los hidratos de carbono en ácido láctico, y pueden ser homofermentativas o heterofermentativas.

Las tres especies más utilizadas y estudiadas son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium spp*, las cuales suelen utilizarse para la elaboración de productos fermentados.

TABLA 1: *Microorganismos empleados comúnmente como probióticos (Saad y col., 2013)*

Especies de <i>Lactobacillus</i>	Especies de <i>Bifidobacterium</i>	Otras bacterias ácido lácticas	Otras
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

En este trabajo se tratarán las características del género *Lactobacillus* y, en concreto, de *L. acidophilus*, al tratarse del microorganismo utilizado como probiótico en la parte experimental.

Los *Lactobacillus* son un género perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*. Son microorganismos Gram-positivos que se caracterizan por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos corineformes. Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Crecen bien en medios ligeramente ácidos, pH de 6,4 hasta 4,5, y con un óptimo desarrollo entre 5,5 y 6,2 (Forrest, 1979). Su crecimiento cesa con valores de pH de

entre 3,6 y 4,0 (dependiendo de la especie y la cepa), disminuyendo de manera notable en medios neutros o ligeramente alcalinos. Mediante la formación de ácido láctico, reducen el crecimiento de otros microorganismos, con la excepción de otras BAL y levaduras (Samaniego y Sosa, 2000). Presentan resistencia a la bilis, característica importante a tener en cuenta para la colonización del intestino.

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son aerotolerantes; Su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento en la concentración de CO₂ (entre el 5 y 10%) puede estimular su crecimiento, sobre todo en el caso del desarrollo superficial sobre medios sólidos (Samaniego y Sosa, 2000). La mayor parte de los *Lactobacillus* son mesófilos, con un límite superior de 40°C. Los homofermentativos transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares en ácido láctico, y los heterofermentativos pueden generar otros productos finales, adicionales al ácido láctico como: peróxido de hidrógeno, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico (Chandramouli y col., 2004).

L. acidophilus es un bacilo Gram positivo, no flagelado, que no forma esporas ni presenta motilidad. Presenta un tamaño de 0,6-0,9 µm de longitud (Gomes y Malcata, 1999; Shan, 2000). Su crecimiento óptimo se da en un pH comprendido entre 5,5 y 6,0 y una temperatura entre 35-40 °C. Crece de manera natural en una gran variedad de alimentos (leche, carne, pescado, cereales, entre otros) y existe en los alimentos fermentados y en los suplementos nutricionales. Está presente en el intestino delgado, donde se produce la mayor parte de la digestión. Absorbe la lactosa, formando ácido láctico y también ayuda en la producción de niacina, ácido fólico y vitamina B6 (piridoxina). Se encuentra además en la boca y en la vagina de los mamíferos.

2.1.3. Mecanismos de acción de los probióticos

Los probióticos pueden actuar en el huésped a distintos niveles (Correia y col., 2012) (Figura 2):

- 1.- Actuación sobre el lumen intestinal, mediante interacción con la microbiota intestinal o ejerciendo un efecto metabólico directo.
- 2.- Actuación sobre la mucosa y epitelio intestinales, incluyendo los efectos de barrera, los procesos digestivos y el sistema inmunológico asociado a la mucosa.
- 3.- Actuación sobre otros órganos como el sistema inmune sistémico.

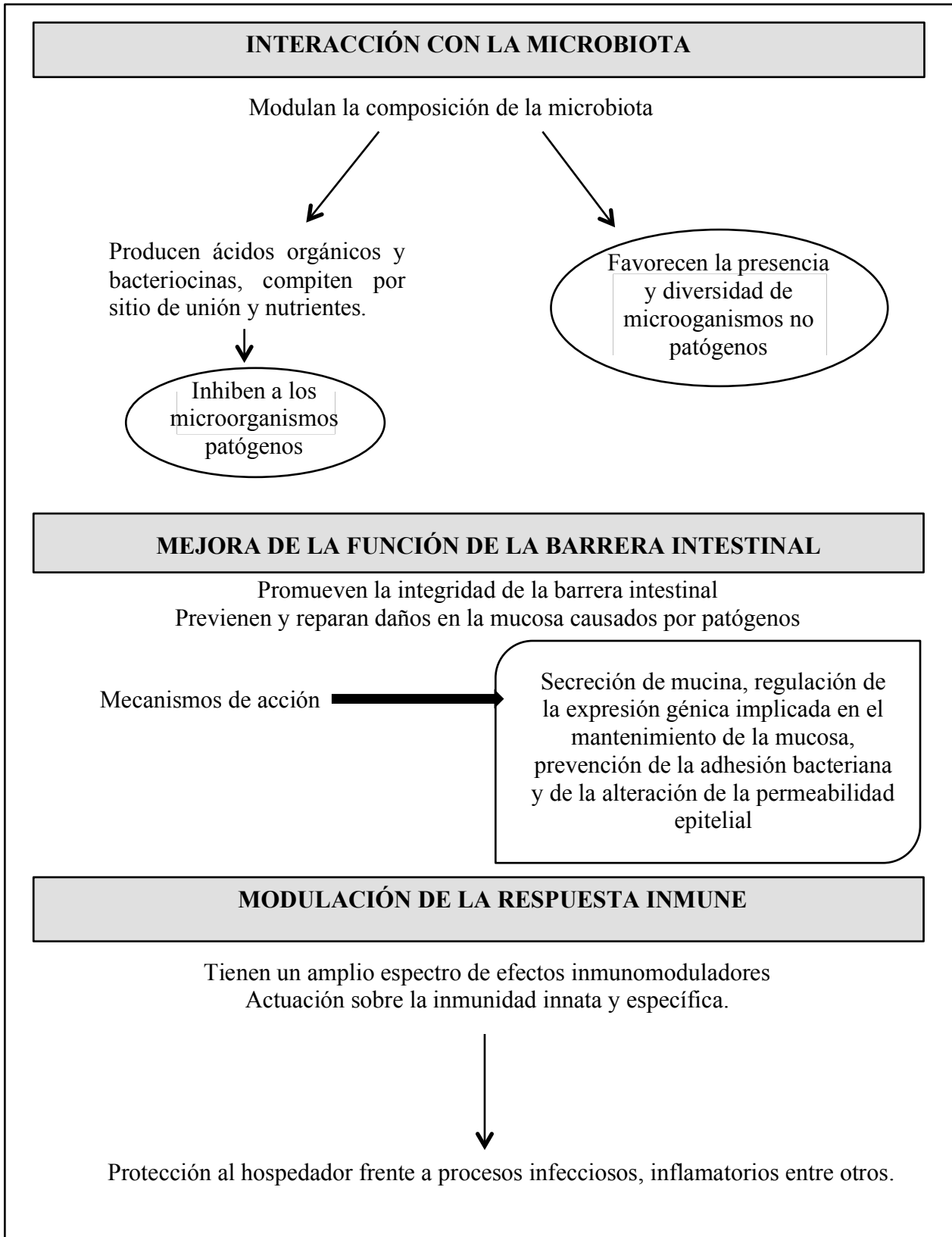


FIGURA 2: Mecanismos de acción de los probióticos.

Interacción de los probióticos con la microbiota intestinal

La microbiota del intestino humano es un ecosistema complejo en cuanto a la cantidad y variedad de microorganismos, y tiene una gran capacidad para influir en el estado de salud del individuo. Entre las funciones de la microbiota intestinal cabe destacar: (1) capacidades metabólicas, que incluyen degradación de material no digerible de la dieta y regulación del almacenamiento de energía, biotransformación de xenobióticos, síntesis de vitaminas esenciales y aumento de absorción de minerales, (2) protección frente a agentes infecciosos y a la proliferación de especies microbianas con potencial patógeno y (3) diferenciación del epitelio intestinal y modulación del sistema inmune.

Los probióticos pueden ejercer efectos beneficiosos en la salud modulando la composición de la microbiota intestinal (Dobson y col., 2012), mediante inhibición de patógenos (producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas, competición por sitios de unión epiteliales y por nutrientes) o favoreciendo la presencia y diversidad de los grupos microbianos considerados como beneficiosos dentro del ecosistema intestinal.

Mejora de la función de barrera intestinal

La función de barrera intestinal es un mecanismo de defensa que permite mantener la integridad del epitelio intestinal, protegiendo así al organismo frente a la acción de agresiones externas. La pérdida de la integridad de la barrera epitelial puede desencadenar desórdenes como la enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones entéricas, enfermedad celiaca y algunas enfermedades autoinmunes. Los probióticos han demostrado ser capaces de promover la integridad de la barrera intestinal, prevenir y reparar daños en la mucosa causados por distintos agentes como alérgenos presentes en los alimentos, microorganismos patógenos y citoquinas proinflamatorias.

Los mecanismos de acción incluyen la secreción de mucina, la regulación de la expresión génica implicada en el mantenimiento de la mucosa, prevención de la adhesión bacteriana a la mucosa epitelial por exclusión competitiva, inhibición de las alteraciones inducidas por patógenos sobre la permeabilidad epitelial, entre otros.

Modulación de la respuesta inmune

Los probióticos poseen un amplio espectro de efectos inmunomoduladores ya que son capaces de actuar sobre la inmunidad innata y la adquirida o específica, pudiendo

proteger al hospedador frente a infecciones y procesos de inflamación intestinal crónica (enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, etc.). Las células epiteliales y las células del sistema inmune innato poseen receptores celulares capaces de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena, induciendo la síntesis de distintos mediadores de la respuesta inmune innata (citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, etc.) y de adecuadas respuestas adaptativas destinadas a combatir a los patógenos (Werner y Haller, 2007).

Los probióticos pueden actuar estimulando la respuesta inmunitaria antígeno-específica en situaciones de sensibilización a antígenos (alergias) o bien ejercer efectos intestinales claramente antiinflamatorios. Se ha documentado que ciertas cepas probióticas pueden actuar sobre receptores opioides y canabinoides de las células epiteliales, mediando así en funciones analgésicas, lo que daría lugar a nuevos enfoques en el tratamiento del dolor abdominal y la enfermedad del colon irritable (Rousseaux y col., 2007). Estudios recientes han informado que los probióticos pueden inducir la síntesis de inmunoglobulina A (Generoso y col., 2011).

2.1.4. Efectos de los probióticos en la salud humana

Se relaciona a los microorganismos probióticos con la mejora en un gran número de enfermedades. Cada vez son más los estudios relacionados con este tema, los cuales tienen como objetivo determinar realmente cuál es el efecto saludable de los mismos y en que grado intervienen en la prevención o tratamiento de distintas enfermedades (Figura 3). En este sentido, existen resultados que ofrecen evidencias científicas lo suficientemente comprometedoras.

Algunos de los efectos demostrados se basan en estudios clínicos, otros en cambio han sido adquiridos sobre la base de pruebas *in vitro*. Es importante tener en cuenta que los mecanismos y la eficacia de estos efectos está muy relacionada con la microbiota específica del hospedador y con las células inmunológicas de la mucosa intestinal.

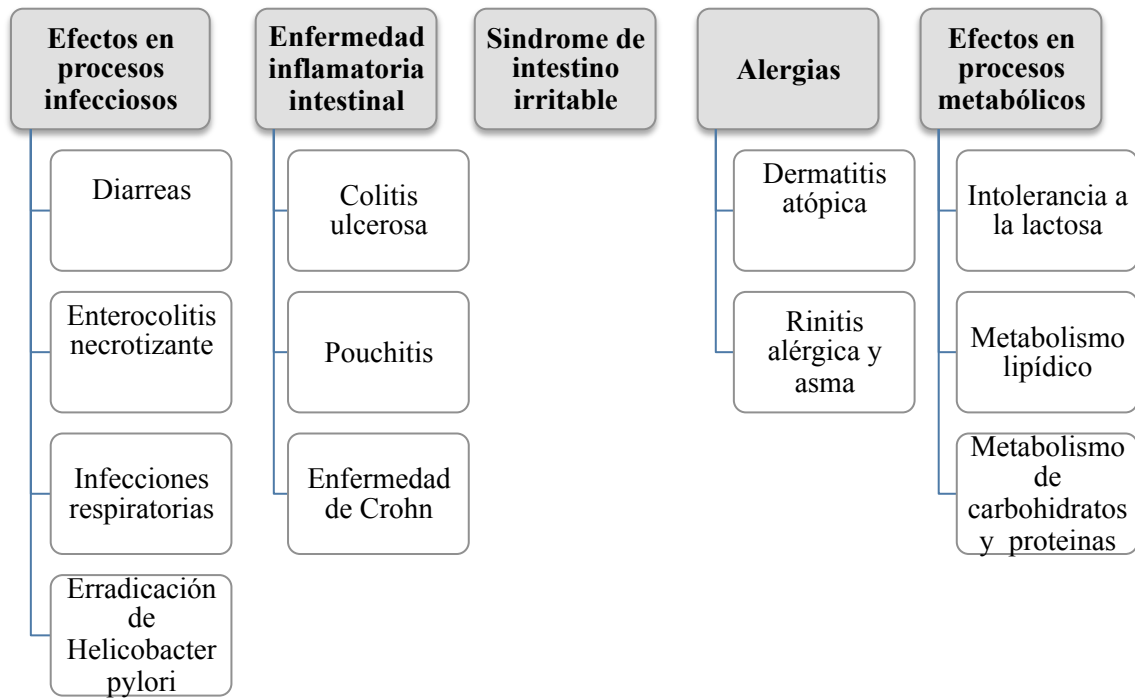


FIGURA 3: Enfermedades sobre las que actúan los probióticos (Adaptado de Martínez-Cuesta, 2012)

Se ha demostrado la eficacia de los probióticos en la mejora de la salud intestinal y en la modulación del sistema inmune. Algunos son eficaces en la reducción de la incidencia y la duración de la diarrea por rotavirus en niños y de la diarrea asociada al tratamiento con antibióticos en adultos. Además, también se ha observado que ciertos probióticos causan mejoras sintomáticas en el síndrome del intestino irritable y alivio del malestar digestivo, así como la reducción de la frecuencia y la severidad de la enterocolitis necrotizante en nacidos prematuros. Sin embargo, hay resultados que carecen de evidencia científica, como los resultados sobre los beneficios de probióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal, dermatitis atópica, infecciones respiratorias o genitourinarias y tratamiento complementario frente a *Helicobacter pylori*.

La mayoría de estos beneficios se asocia a una cepa probiótica determinada o a una combinación de ellas. Diferentes estudios sobre *L.acidophilus* a lo largo de los años han mostrado su importancia en la salud (Pereira y Gibson, 2002; Parkes y col., 2010; Zhu y col., 2011; Konieczna y col., 2012; Saad y col., 2013).

Se ha visto que puede:

- Reducir la gravedad de la diarrea causada por rotavirus y la diarrea asociada al uso de antibióticos.
- Favorecer la activación del sistema inmune en pacientes con el síndrome del intestino irritable.
- Reducir el colesterol en sangre.
- Tener actividad anticancerígena.

Además de estos efectos se está estudiando la posible relación de *L.acidophilus* con la prevención de la enterocolitis necrotizante en niños, el tratamiento de la intolerancia a la lactosa, las alergias, entre otros, pero se requiere de más investigaciones.

2.2. Factores influyentes en la viabilidad de los probióticos

La viabilidad de las células probióticas en los productos a los que se incorporan es un aspecto de gran importancia (Figura 4). Las cepas deben mostrar un buen crecimiento hasta elevadas concentraciones durante la obtención de biomasa y, posteriormente, resistencia a las condiciones de procesado y almacenamiento. El requisito de viabilidad implica además que cuando estas células son ingeridas, deben sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal y, en cierto modo, mantener activa su capacidad para interactuar con el epitelio o microbiota intestinal, según su mecanismo de acción.

Hay que tener en cuenta que para ejercer algún efecto beneficioso, no solamente deben permanecer viables, sino que deben encontrarse en cantidad suficiente (de Vos y col., 2010). El nivel mínimo de probióticos que indica la IDF (*International Dairy Federation*) es de 10^7 ufc/ g en el producto antes de su consumo. Los estudios relativos a las dosis efectivas son muy limitados y pueden variar según el grupo de población pero algunos autores citan que para un efecto probiótico se considera necesaria una ingesta diaria entre 10^7 y 10^{10} organismos viables (Sanz y Dalmau, 2008).

Existen numerosas investigaciones que afirman la pérdida de viabilidad de las células probióticas en condiciones de procesado y almacenamiento y, sobre todo, una gran pérdida asociada con su paso a través del estómago e intestino, lo cual se atribuye a la elevada acidez y concentración de sales biliares en los mismos. Por este motivo, los estudios se centran en proteger en cierto modo a las células ante los factores expuestos,

para reducir la muerte celular durante el paso por el estómago y controlar su liberación en el tracto intestinal, con el objetivo de que se mantengan metabólicamente estables, activas y funcionales, es decir, con la capacidad de desarrollar respuestas favorables que les permitan sobrevivir. Al respecto juegan un papel importante las características propias de la matriz a la que se incorpora el microorganismo probiótico y surge el concepto de microencapsulación.

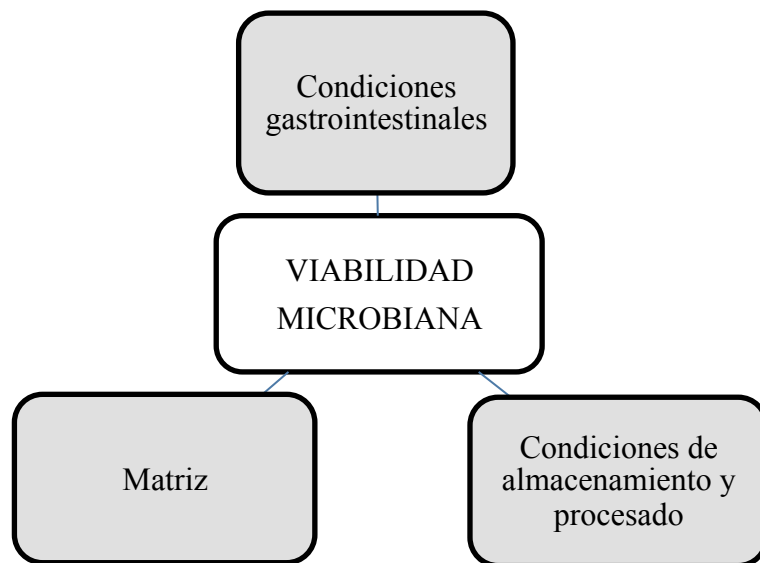


FIGURA 4: Factores influyentes en la viabilidad de los probióticos.

2.2.1 Características y flora microbiana del tracto gastrointestinal

Dada la relación del entorno gastrointestinal con la posible pérdida de viabilidad de los microorganismo probióticos, a continuación se explican brevemente sus características con el objetivo de entender realmente cuáles son los factores influyentes.

El tracto gastrointestinal (TGI) es un tubo muscular que se extiende desde la boca, a través del estómago y los intestinos, hasta el ano, y tiene aproximadamente 9 metros de largo. Está formado por:

- El tracto gastrointestinal superior: boca, faringe, esófago y estómago, cuya función principal es la digestión de los alimentos.

- El tracto gastrointestinal inferior: intestino delgado y grueso cuya función principal es la absorción de los nutrientes.

El estómago es una dilatación del tubo digestivo, se sitúa entre el esófago y el duodeno, sirve como sitio de mezclado y retención. Una vez son ingeridos los alimentos, el estómago tiene la capacidad de almacenarlos, posteriormente los mezcla y los desintegra gracias a las secreciones gástricas, formándose el quimo, el cual está compuesto por las sustancias desintegradas procedentes del alimento original. El quimo se vacía lentamente hacia el intestino delgado. Las secreciones gástricas contienen agua, HCl y enzimas como pepsina, renina, lipasa, entre otras. La acidez de las secreciones gástricas puede ser dañino, ya que hay que tener en cuenta que, en condiciones de ayuno, el estómago de un individuo sano presenta un pH que se encuentra entre 1,3 y 2,5; en cambio durante las comidas puede aumentar hasta 7. A esto hay que añadir que el hígado secreta bilis al tracto gastrointestinal, la cual es importante en la emulsificación y la solubilización de los lípidos tras su digestión. La presencia de bilis es otro factor crítico en la viabilidad de los microorganismos (Begley y col., 2005).

Una vez el quimo abandona el estómago, se vacía lentamente al intestino delgado, concretamente en el duodeno. El intestino delgado se divide en tres partes, duodeno, yeyuno e íleon. El quimo que llega al intestino delgado contiene carbohidratos, proteínas y lípidos digeridos parcialmente; la digestión de éstos finaliza gracias a la intervención de la bilis y los jugos intestinal y pancreático. Otros nutrientes como las vitaminas o los minerales inician su digestión en este punto.

Desde el duodeno al íleon el pH se hace progresivamente menos ácido y aumenta el número de bacterias tal y como se muestra en la tabla. La microbiota aumenta en cantidad y complejidad a medida que avanzamos por el TGI (Tabla 2). La cantidad de bacterias en el íleon se encuentra habitualmente entre 10^5 y 10^7 ufc/g de contenido intestinal. El mayor número de bacterias en el TGI humano reside en el intestino grueso, constituyendo entre el 35 y el 50% del volumen del contenido intestinal. Las bacterias en el intestino grueso utilizan como nutrientes algunos productos de la digestión de los alimentos. El recuento total de aerobios facultativos (*Escherichia coli*) es por lo general inferior a 10^7 ufc/g del contenido intestinal. Debido a la actividad de los aerobios facultativos disminuye la concentración de O_2 en el medio, convirtiendo el ambiente del

intestino grueso en favorable para el crecimiento de anaerobios obligados como especies de *Clostridium* y *Bacteroides*, los recuentos en este caso se encuentran entre 10^{10} - 10^{11} ufc/g del contenido intestinal. En cualquier caso, la microbiota intestinal se verá influenciada por la dieta del individuo (Madigan y col., 2004) y sus características individuales.

El intestino está colonizado por grandes cantidades bacterias, que incluyen de entre 300 y 500 especies distintas, del orden de 10^{14} . A la comunidad de bacterias se le denomina microbiota entérica normal. Estas bacterias desempeñan un papel fundamental en las características y la salud del ser humano gracias a su función de protección, al prevenir la invasión de microorganismos patógenos, al desempeño de funciones tróficas sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal, etc. Esto ha sido demostrado a partir de numerosas evidencias científicas, lo cual ha llevado a fomentar su utilización para combatir la enfermedad y mejorar la salud humana, de ahí el concepto de probiótico. La presencia constante de estas bacterias abundantes inocuas en el intestino, dificulta el establecimiento de los microorganismos “recién llegados”, sean patógenos o no, ya que éstos tienen que competir por el espacio físico, los nutrientes y resistir a los catabolitos con efecto antibacteriano de las bacterias residentes.

Además, no hay que olvidar que ciertos elementos de la microbiota intestinal pueden ser fuente de infección e inducir distintas patologías, sobre todo cuando hay una alteración física o funcional de la barrera mucosa intestinal.

TABLA 2: *Microorganismos del tracto gastrointestinal (Tomado de Madigan y col., 2004)*

Lugar anatómico	Microorganismos
Boca	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Fusobacterium, Veillonella, Corynebacterium, Neisseria, Actinomyces.</i>
Tracto gastrointestinal	<i>Lactobacillus, Streptococcus, Bifidobacterium, Eubacterium, Peptococcus, Ruminococcus, Clostridium, Escherichia, Klebsiella, Enterococcus, Staphylococcus.</i>

2.2.2. Estabilidad de los probióticos en el tracto gastrointestinal y capacidad de adhesión

Teniendo en cuenta cómo se produce el proceso de digestión y absorción de los alimentos a través del tracto gastrointestinal, se puede afirmar que en la ingesta de probióticos, el pH del estómago y las sales biliares se consideran factores determinantes en la viabilidad de los mismos (Mainville y col., 2005). El pH ácido del estómago es una importante barrera para su supervivencia. Según Berrada y col. (1991), el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago son 90 minutos, y durante este tiempo el pH se encuentra próximo a 2.

Por otro lado, las sales biliares que son secretadas al intestino delgado durante la digestión son detergentes biológicos muy tóxicos para las bacterias, capaces de desorganizar la estructura de la bicapa lipídica de la membrana celular, además de producir daños oxidativos en los cromosomas y plegamientos anómalos en las proteínas.

La acidez y la bilis hepática son los principales responsables de la disminución de la viabilidad microbiana pero también es un criterio importante considerar la capacidad de adhesión de los microorganismos a las células epiteliales del intestino. Sólo las cepas que se puedan adherir al epitelio intestinal podrán llevar a cabo una colonización efectiva y ejercer los efectos beneficiosos que proveen los probióticos en su interacción con el huésped. El desarrollo de una microbiota favorable dependerá de la especificidad de las bacterias por los receptores del intestino y de la concentración de la competencia de las bacterias presentes en el mismo.

2.2.3. Características de la matriz

Los probióticos además de mantenerse estables ante el entorno gastrointestinal, tener la capacidad de adherirse al intestino y competir con la flora existente, deben ser capaces de soportar las condiciones de la producción industrial y mantener gran parte de su viabilidad durante el almacenamiento, en muchas ocasiones en refrigeración o congelación. De no ser así, de nada servirá que un alimento contenga microorganismos promotores de la salud del consumidor ya que no podrá ejercer sus efectos beneficiosos.

En este sentido, existen varios factores que pueden afectar al crecimiento de las células probióticas y a su supervivencia, tales como el pH, la presencia de O₂, la concentración en proteínas, grasa, y azúcar del producto (Ranadheera y col., 2010). También influye el tipo de bacteria. Algunos alimentos poseen propiedades que les permiten, de algún modo, proteger a los microorganismos que le son incorporados. Pueden amortiguar el efecto negativo de la elevada acidez y las sales biliares, incluso regular su colonización en el epitelio intestinal. Determinados ingredientes de los alimentos pueden interactuar con los probióticos, aumentando su funcionalidad y eficacia, por ejemplo, sustancias prebióticas.

Se ha demostrado que la viabilidad varía en función de la matriz alimentaria, esto se ha podido evidenciar a través de diferentes estudios con distintos alimentos, por ejemplo, se han observado diferencias en el queso Cheddar, yogur, helados, y otros alimentos no lácteos, lo cual se explica detalladamente más adelante.

El vehículo alimenticio óptimo para la incorporación de probióticos debe contar con un alto contenido en grasa, por ejemplo y, debe ser almacenado, preferentemente, bajo condiciones de refrigeración. Por otro lado, el bajo pH y la presencia de diversos ácidos orgánicos en el alimento (zumo de frutas y preparados de frutas) pueden hacer que disminuya la estabilidad de los probióticos (Saarela y col., 2011; Santo y col., 2011).

Por lo tanto, la selección de la matriz para la incorporación de los probióticos es un factor fundamental que se debe considerar ya que el objetivo es lograr su mayor protección.

2.2.4. Condiciones de procesado y almacenamiento

Las condiciones de proceso y almacenamiento pueden incidir sobre la estabilidad de los probióticos, pero la estabilidad es también una propiedad que puede variar entre cepas probióticas, las cuales pueden ser más o menos resistentes ante diversos factores.

La mayoría de los alimentos que contienen probióticos son productos refrigerados, y como ya se ha comentado, la refrigeración tiene un efecto positivo en la viabilidad de los mismos. En este sentido, los productos dominantes son los lácteos, especialmente el yogur, pero con el paso de los años, se está llevando a cabo la incorporación de

probióticos en otros alimentos, cuyas propiedades pueden en ocasiones no ser tan favorables en su supervivencia.

Está demostrado que la estabilidad de productos lácteos refrigerados que contienen probióticos se mantiene durante el almacenamiento. Se trata de productos que retienen hasta 10^6 - 10^7 células viables/g después de 4-6 semanas (Holzapfel y Schillinger, 2002; Champagne y col, 2005; Roy, 2005). El problema es que esto no es siempre así y que no todos los alimentos están refrigerados (Scharl y col., 2011).

Por otra parte, algunas células probióticas se deshidratan para incorporarse en los alimentos, por tanto, se buscan las estrategias para lograr su supervivencia durante esta etapa ya que podría ser crítica, por ejemplo, mediante secado por congelación, aspersión, vacío o secado por lecho fluidizado (Santivarangkna y col., 2007; Peighambardoust y col., 2011). En este contexto, aparece el término de agente de encapsulación, como una posible alternativa (Champagne y col., 1991; Anal y Singh, 2007; Menshutina y col., 2010).

2. 3. Microencapsulación

2. 3.1. Concepto de microencapsulación

La microencapsulación implica el recubrimiento o el atrapamiento de un material como núcleo en un polímero para generar microcápsulas en el intervalo de tamaño de 1-1000 μ m. Esta tecnología se ha usado para encapsular una amplia gama de productos tales como productos farmacéuticos, aromas, aceites volátiles, extractos de plantas, enzimas y otros. En las últimas décadas, esta tecnología también se ha aplicado a la inmovilización de células microbianas, encontrándose aplicación en diversos procesos biotecnológicos, como la encapsulación de probióticos en las industrias alimentarias. El confinamiento de las células microbianas dentro de una matriz polimérica permite el aislamiento físico de las células del medio ambiente externo mientras se mantiene un microambiente hospitalario interno.

En cuanto a la inmovilización de células microbianas, debe citarse la posible utilización de la macroencapsulación (John y col., 2011) como técnica alternativa a la microencapsulación, en la se forman macrocápsulas de un tamaño que oscila entre los

milímetros y los centímetros (superior a 5000 μm). Sin embargo, numerosos estudios reconocen las ventajas de la utilización de cápsulas de tamaño inferior, del orden de micras, formadas durante la microencapsulación, entre las que destaca la mejora en la viabilidad celular, lo cual se relaciona con su elevada permeabilidad (Christenson y col, 1993; Dalili y Chau, 1987; Guiseley, 1989; Ogbonna y col, 1991). Cuando el tamaño es inferior a 1 μm se le denomina nanocápsula, pero el tamaño de las bacterias no permite su utilización por ser superior.

2. 3.2. Caracterización de las microcápsulas

Las microcápsulas son esféricas y semipermeables. Están formadas por una membrana fuerte y delgada que envuelve a un núcleo sólido o líquido, en este caso, una o varias células probióticas (1-5 μm). Suelen ser esféricas, sobre todo para el caso de encapsulación de células probióticas, pero pueden tener una gran variedad de estructuras y geometrías. En función de las características fisicoquímicas de la célula del material activo, de la composición del material de la pared y de la técnica de microencapsulación empleada, se podrán obtener diversas estructuras tal y como se muestra en la figura 5.

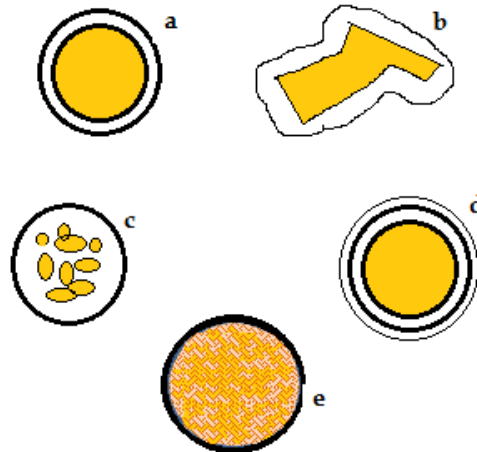


FIGURA 5: Distintos tipos de microcápsulas: (a) Esférica monopared (b) Irregular monopared (c) Monopared con varios núcleos (d) Multipared con un núcleo (e) Multipared con núcleo matricial altamente disperso en la matriz polimérica. (Reyes-Nava, 2010).

La microencapsulación de las células probióticas permitirá a éstas lo siguiente:

- ✓ Resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal.
- ✓ Viabilidad y eventual proliferación en el intestino.
- ✓ Capacidad de adherirse y colonizar fácilmente el tracto gastrointestinal compitiendo con patógenos.
- ✓ Presentar actividad antagonica frente a patógenos in vitro e in vivo.
- ✓ Sinergismos con cepas probióticas.
- ✓ Capacidad comprobable de otorgar beneficios al huésped.
- ✓ Viabilidad en el producto.
- ✓ Si forman parte de un alimento, estabilidad de propiedades probióticas durante la vida útil del mismo.

En este sentido, las funciones de la microcápsula deberán ser proteger a las células probióticas durante su paso por el tracto gastrointestinal, mejorar su estabilidad y vida media en los alimentos a los que se incorpore y permitir la liberación controlada de las células probióticas de su interior. Esta liberación puede producirse a través de varios mecanismos: rotura mecánica, disolución, fusión de la pared o difusión del contenido a través de la pared.

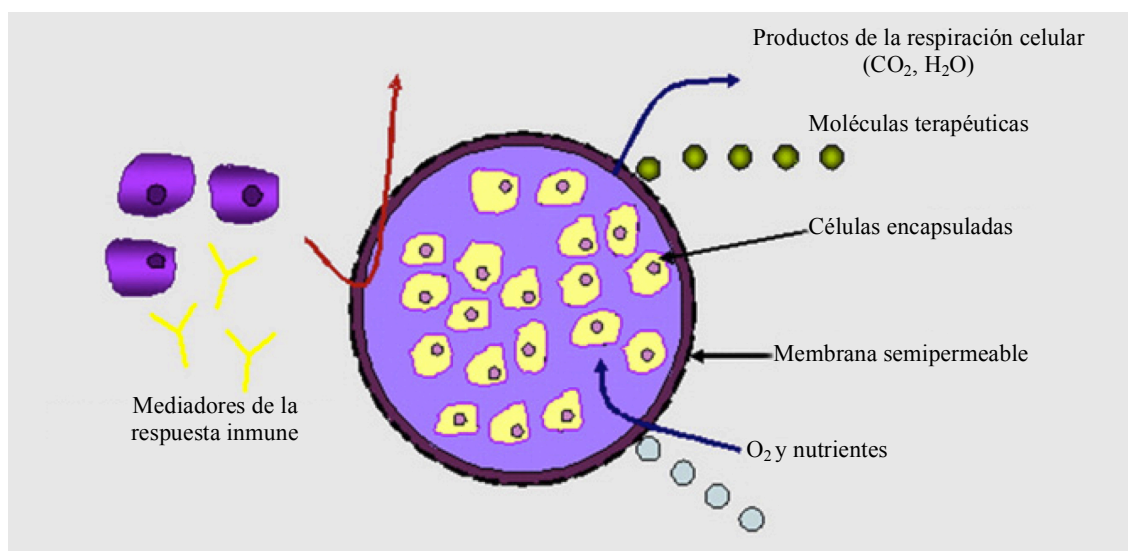


FIGURA 6: Representación esquemática de una microcápsula (Adaptado de Hernández y col., 2010).

Es importante destacar que la permeabilidad de las microcápsulas permite el intercambio de nutrientes y metabolitos con el exterior, lo cual favorece el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de las células encapsuladas (Figura 6)

2.3.3. Técnicas empleadas en la microencapsulación de *L. acidophilus*

Es esencial que el proceso de microencapsulación se realice bajo condiciones relativamente suaves para asegurar una alta viabilidad de las células encapsuladas. Es también necesario que las microcápsulas formadas posean una buena estabilidad mecánica con la finalidad de favorecer el crecimiento a largo plazo de los microorganismos, o como mínimo permitir su mantenimiento. Para proceder a la microencapsulación, previamente se obtiene un cultivo de microorganismos probióticos, crecidos en condiciones óptimas.

Existen numerosas técnicas de microencapsulación que se han ido estudiando en los últimos años para intentar aumentar la protección de las células probióticas ante los distintos factores que pueden afectar a su viabilidad, pretendiendo causar el mínimo daño a la integridad microbiana.

La selección del método de encapsulación es función de: el tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado, del mecanismo de liberación deseado y del coste, ya que interesa que su utilización a nivel industrial sea económicamente rentable (Nedovic y col., 2011). Es importante identificar el equilibrio adecuado entre la supervivencia de la cepa probiótica y la eficacia de encapsulación.

Algunas de las técnicas más comunes de encapsulación son: extrusión, emulsión, spray-drying o desecación por atomización, spray-cooling o spray-chilling, liofilización, spray coating o pulverización, entre otras. Cada una de las técnicas tiene sus propias características y la utilización de una u otra dependerá de los factores expuestos. Por ejemplo, las microcápsulas con microorganismos fermentativos que vayan a someterse a un biorreactor para llevar a cabo la fermentación, deberán ser altamente resistentes para soportar las condiciones mecánicas y físicas, la exposición a los gases de fermentación, los ambientes ácidos, etc.

A continuación, se explican más detalladamente las técnicas destinadas a la encapsulación de *Lactobacillus*. Estas técnicas son: extrusión, emulsión, spray-drying y spray-chilling.

2.3.3.1. Extrusión

La extrusión se emplea comúnmente para la microencapsulación de células microbianas (Green y col., 1996; Koyama y Seki., 2004; Ozer y col., 2008). Una solución polimérica se mezcla con las células microbianas y posteriormente se extruye a través de un orificio, formándose gotitas gracias al sistema generador de goteo, que se endurecen por el contacto con una solución de endurecimiento, normalmente CaCl_2 .

Entre los factores que afectan al tamaño de las microcápsulas destacan el diámetro del orificio, la viscosidad y velocidad de flujo de la solución polimérica, la altura de caída y la concentración y temperatura de la solución de polímero (Graeppi y col., 2011). El tamaño de las cápsulas obtenidas suele rondar los 2-4 mm.

Las ventajas de la técnica son la simplicidad de su operación, el bajo coste, y las condiciones suaves de operación que garantizan una elevada viabilidad celular (de Vos y col., 2010). Además, no emplea disolventes perjudiciales para los microorganismos. Por ello se trata de una técnica ampliamente utilizada en probióticos.

Sin embargo, es una técnica ineficiente para la producción de pequeñas microcápsulas de 500 μm de diámetro, por lo que se limita a la producción de microcápsulas con tamaños superiores a las 1000 μm . Además, el rápido endurecimiento de la superficie de la microcápsula, retrasa el movimiento de los iones de reticulación en el núcleo interior, lo que resulta en microcápsulas menos estables. Aunque las microcápsulas se producen convenientemente a escala de laboratorio, la intensificación del proceso es generalmente difícil debido a la lenta producción de las mismas (Burgain y col., 2011).

El dispositivo de goteo en esta técnica es muy variable; en el sistema simple se utiliza como orificio una punta de pipeta o una jeringa o boquilla, sin embargo, para su aplicación a nivel industrial, y para superar las limitaciones de la técnica de extrusión simple y directa podrían utilizarse otros sistemas. Por ello, paralelamente se han desarrollado numerosos métodos como la utilización de boquilla múltiples, la generación

de gotas aplicando energía electrostática o vibración, ‘jet cutter’ o técnica de corte, el atomizador de disco rotatorio y la co-extrusión o método de flujo axial. A continuación se muestran los más utilizados (Figura 7).

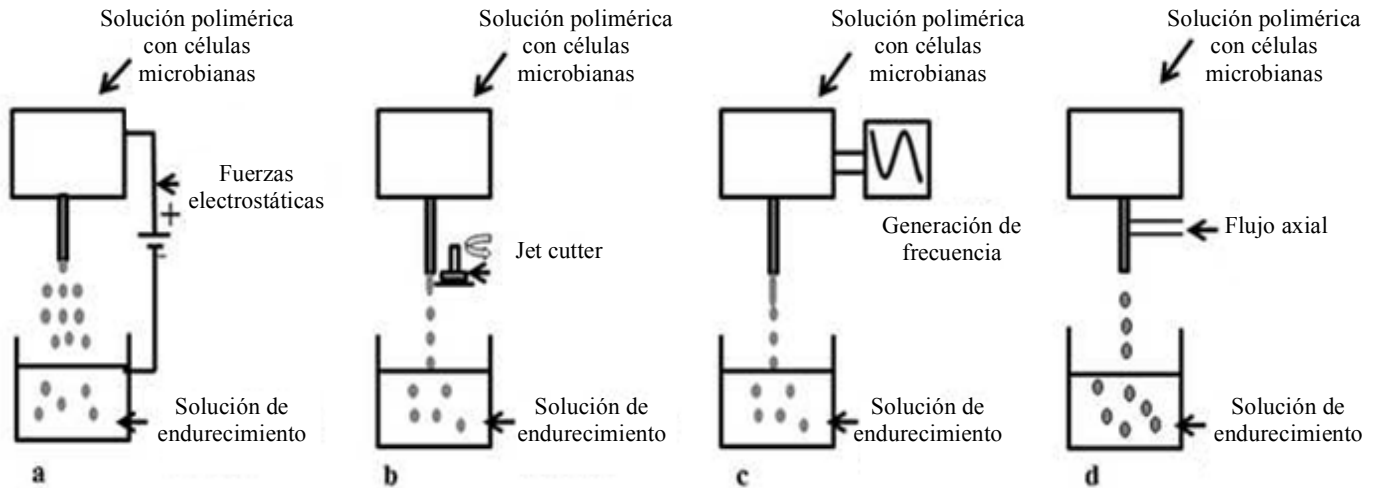


FIGURA 7: (a) *Generador electrostático* (b) *cortador de flujo o ‘jet cutter’* (c) *vibración* (d) *coextrusión o flujo axial* (Adaptado de Rathore y col., 2012).

Por ejemplo, el generador electrostático utiliza un potencial electrostático entre la aguja y la solución de endurecimiento con el objetivo de disminuir el tamaño de las cápsulas gracias a la reducción de la tensión superficial en la superficie de la gota. O, en el ‘jet cutter’, el flujo es extruido continuamente a través de un cortador de chorro giratorio, como consecuencia éste se rompe en segmentos, formándose cápsulas esféricas a medida que caen. En comparación con el resto de técnicas de extrusión, ‘jet cutter’ se considera la más adecuada para su aplicación a nivel industrial; la extrusión electrostática es especialmente efectiva para producir cápsulas inferiores a 50 μm .

Aunque las técnicas mencionadas anteriormente son ventajosas frente la extrusión convencional, muchas de ellas no han demostrado ser viables para la producción a gran escala, debido a dificultades técnicas como la necesidad de utilización de un gran número de boquillas para que sea efectivo, problemas operativos tales como el bloqueo de las mismas que implica la necesidad de su limpieza regular, la dificultad en el mantenimiento de la esterilidad, etc.

Diferentes investigadores han llevado a cabo la aplicación de técnicas de extrusión, con distintos materiales de encapsulación y microorganismos (Rathore y col., 2012). La tabla 3 muestra algunos de estos ejemplos en los que se ha empleado *Lactobacillus* como célula para la microencapsulación.

TABLA 3: Estudios sobre encapsulación de *L.acidophilus* mediante extrusión.

Microorganismo	Materiales utilizados	Referencia
<i>L. reuteri</i> DPC16	Alginato	Zhao y col., 2012
<i>L. acidophilus</i> y <i>B. bifidum</i>	Alginato	Özer y col., 2008
Distintas especies de <i>Lactobacillus</i>	Gomas xantana y gellan	Jiménez-Pranteda y col., 2012
<i>L.acidophilus</i>	Alginato y almidón	Mirzaei y col., 2012

2.3.3.2. Emulsión

Es una técnica ampliamente utilizada para la encapsulación de células probióticas. Se trata de la dispersión célula/polímero de suspensión (fase dispersa) en una fase de aceite/orgánica (fase continua), que suele ser aceite de soja, girasol o maíz. La mezcla se homogeneiza para formar una emulsión de agua en aceite (W/O) con la ayuda de tensioactivos y agitación (Adhikari y col., 2000; Özer y col., 2008; de Vos y col, 2010). Para que se produzca la formación de las cápsulas, el polímero hidrosoluble debe enlazarse con la fase continua para que se produzca la formación de las cápsulas, esto se conoce como ‘cross-linking o entrecruzamiento’. Para ello se adiciona CaCl_2 que produce la rotura de la emulsión y la formación y endurecimiento de las cápsulas (Figura 8).

Como tensioactivo o agente surfactante suele utilizarse el Tween 80, el cual permite mantener la emusión por adsorción entre las dos fases, reduciendo la tensión superficial y evitando fenómenos de coalescencia durante la fase de agitación, previa a la formación de cápsulas.

La emulsión puede ser utilizada para producir microcápsulas de tamaño inferior a 300 μm lo cual es difícil de conseguir con el método simple de extrusión (Burgain y col., 2011). Aun así, se considera un tamaño de partícula grande, pudiendo llegar a mm. El tamaño de las microcápsulas puede verse afectado por la velocidad de agitación y de adición de la adición de CaCl_2 . La adición del agente tensioactivo también influye sobre el tamaño, permitiendo un tamaño inferior de las mismas.

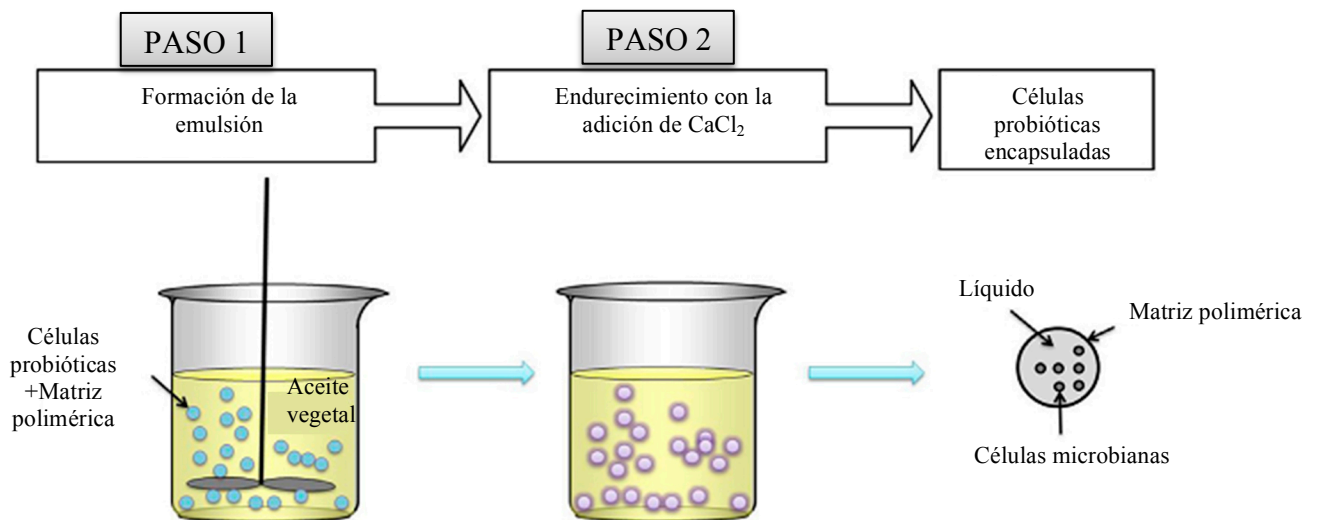


FIGURA 8: Presentación esquemática del proceso de emulsión (Adaptado de Burgain y col., 2011)

Una de las ventajas de la encapsulación mediante emulsión es la posibilidad de aplicación a nivel industrial, además de ofrecer una elevada supervivencia de las células microbianas (Chen y Chen, 2007).

El principal inconveniente de la técnica es la toxicidad de los disolventes orgánicos para las células encapsuladas. Aunque los aceites son menos tóxicos que los disolventes orgánicos, su eliminación puede ser mucho más difícil. La presencia de aceite residual en las cápsulas podría perjudicar a la textura y las características organolépticas del alimento, además de poder resultar tóxico para determinadas células, así como los agentes tensioactivos.

La preparación de una emulsión (W/O/W) fue estudiada por Sugiura y col. (2004) el cual llegó a la conclusión que podría aplicarse a la encapsulación de células probióticas, encontrándose algunas limitaciones que llevaron a que se estudiara en más profundidad,

con el objetivo de lograr una elevada tasa de producción y su aplicación a gran escala. (Van der Zwan y col., 2006; Maan y col, 2011)

Algunos ejemplos de probióticos encapsulados por esta técnica se reflejan en la siguiente tabla 4, pero existen numerosas investigaciones al respecto.

TABLA 4: *Probióticos encapsulados por la técnica de emulsión.*

Materiales utilizados	Materiales utilizados	Referencia
<i>L. acidophilus</i> y <i>B.infantis</i>	Alginato/almidón	Godward y Kailasapathy, 2003
<i>L. acidophilus</i> y <i>B. bifidum</i>	Alginato	Özer y col., 2008

2.3.3.3. Secado por atomización (Spray- drying)

Esta técnica implica la atomización conjunta de una suspensión o emulsión de células probióticas y el material encapsulante mediante aire caliente, de modo que se produce una rápida evaporación del agua, lo que permite la inmovilización de las células en forma de partículas de polvo (Nazzaro y col., 2012) (Figura 9). Es muy importante controlar la temperatura del aire porque puede afectar a la viscosidad de la suspensión o emulsión inicial y, por tanto, a la capacidad para que la atomización se produzca de manera homogénea (Brun-Graeppi y col., 2011). La temperatura de entrada del aire es directamente proporcional a la velocidad de secado de las partículas, por ejemplo, la aplicación de una temperatura insuficiente puede dar lugar a microcápsulas con elevado contenido en agua, sin embargo, la temperatura excesiva podría inducir la formación de grietas en las mismas, lo que se traduce en una pérdida de viabilidad microbiana. También es importante controlar el flujo de aire, la alimentación del producto y la temperatura de salida del aire. La optimización de estos parámetros ayuda a controlar la formación de las microcápsulas (O'Riordan y col., 2001; Vega y Roos., 2006).

Esta técnica es una de las más antiguas y, probablemente, una de las más utilizadas en el sector industrial de alimentos. Se trata de una técnica económica, aunque en su aplicación a gran escala, los costes de las instalaciones, de funcionamiento, etc pueden resultar elevados (John y col., 2011).

Da lugar a la formación de microcápsulas de un tamaño inferior a 40 μm , lo cual es deseable desde el punto de vista de las características sensoriales y, en especial, de la textura de los alimentos. El material utilizado como agente encapsulante, así como las condiciones de funcionamiento del sistema, la concentración de la solución de alimentación y la solubilidad se relacionan directamente con el tamaño de las microcápsulas. Se puede llegar hasta tamaños de 2-3 mm, pero normalmente se obtiene el tamaño deseable si se trabaja correctamente y se realiza una buena selección de los materiales. La formación de microcápsulas de mayor tamaño se ve favorecida por una concentración de sólidos elevada y una solubilidad baja (Gharsallaoui y col., 2007).

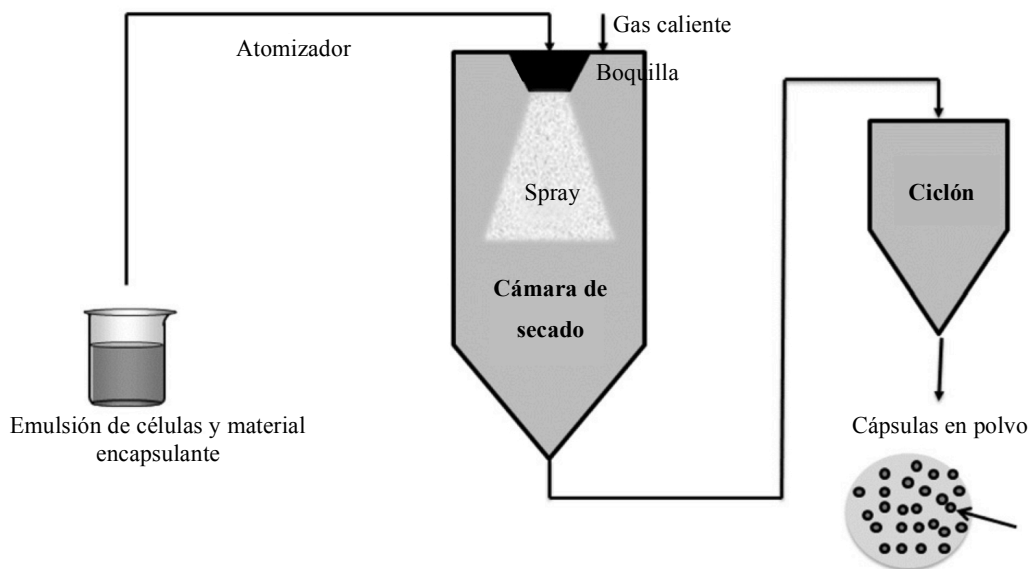


FIGURA 9: Presentación esquemática del secado por atomización.

Aún siendo una técnica extendida a nivel industrial, presenta una serie de inconvenientes, como la complejidad de los equipos necesarios o la falta de uniformidad en la cámara de secado, que dificulta controlar el tamaño de las microcápsulas. Las elevadas temperaturas necesarias pueden afectar a la viabilidad de los microorganismos, reduciendo su actividad en el producto final, como consecuencia de la deshidratación de las células y la inactivación de enzimas esenciales para el equilibrio celular (Doherty y col., 2010). Además, existe una limitación referente a los materiales encapsulantes que pueden utilizarse (John y col., 2011).

Se ha llevado a cabo la microencapsulación de *B. lactis Bb-12*, utilizándose como agente encapsulante proteína del lactosuero. Según este estudio, la técnica mejora la

viabilidad de la bacteria ante la presencia de bilis y la estabilidad durante un periodo de almacenamiento de 12 semanas (De Castro-Cislaghi y col., 2012).

2.3.3.4. Atomización en frío (Spray-cooling o spray-chilling)

Es una técnica que fue ideada para superar el problema de daño celular de las células microbianas debido a las elevadas temperaturas que se emplean en el método anterior. Ya que de acuerdo con algunos estudios, la supervivencia de éstas es inversamente proporcional a la temperatura del aire utilizado (Ananta y col., 2005; Fávaro-Trindade y Grosso, 2002. Oliveira y col., 2007b., M.I.T.D y col., 2012). Esta técnica se basa en la inyección de aire frío (10°C) que posibilita la solidificación de la partícula. Una matriz lipídica fundida que se encuentra a 48 °C la cual contiene las células a encapsular y lecitina como surfactante (emulsión), es atomizada de manera que se forman gotas sólidas rápidamente cuando éstas entran en contacto con el aire frío (Champagne y Fustier, 2007).

Esta técnica es muy económica y puede utilizarse a escala industrial (Gouin y col., 2004). Resulta eficiente para la protección de las células microbianas a través del tracto gastrointestinal, además, tiene la ventaja de emplear temperaturas inferiores a la atomización, lo cual la convierte en una técnica muy interesante.

La morfología y el tamaño de las microcápsulas formadas son adecuados y no causan efectos negativos sobre la textura, cuando se incorporan en los alimentos, por presentar un pequeño tamaño.

Se pretende mejorar la viabilidad de las células a la refrigeración y a las condiciones de almacenamiento. Al respecto, se cree que la utilización de soluciones protectoras, como los carbohidratos o glicerol, o el ajuste del pH en el medio podrían producir un efecto positivo.

Algunos inconvenientes hacen referencia a la posible aparición de células microbianas en la superficie o sobresaliendo de las microcápsulas lipídicas formadas. Las microcápsulas formadas presentan bajas capacidades de encapsulación y expulsión del material encapsulado durante el almacenamiento o, incluso, durante el proceso de solidificación (Sato y Ueno., 2005; Westesen y col., 1997).

Pedroso y col. (2012) han demostrado que esta técnica puede ser útil en la encapsulación de *L. acidophilus* (Figura 10), el cual se mezcla con un aceite vegetal (nuez de palma) que actúa de agente encapsulante. Se llegó a la conclusión que la microencapsulación favorecía la viabilidad de las células de *L. acidophilus*, en comparación con las células libres. Los resultados sugieren que las microcápsulas lipídicas cuando llegan al intestino son digeridas por las lipasas y las sales biliares y como consecuencia se liberan las células probióticas que se encuentran en su interior, pudiendo desempeñar sus mecanismos de acción. Ambas bacterias encapsuladas, sin embargo, perdieron viabilidad durante su almacenamiento a 37°C.

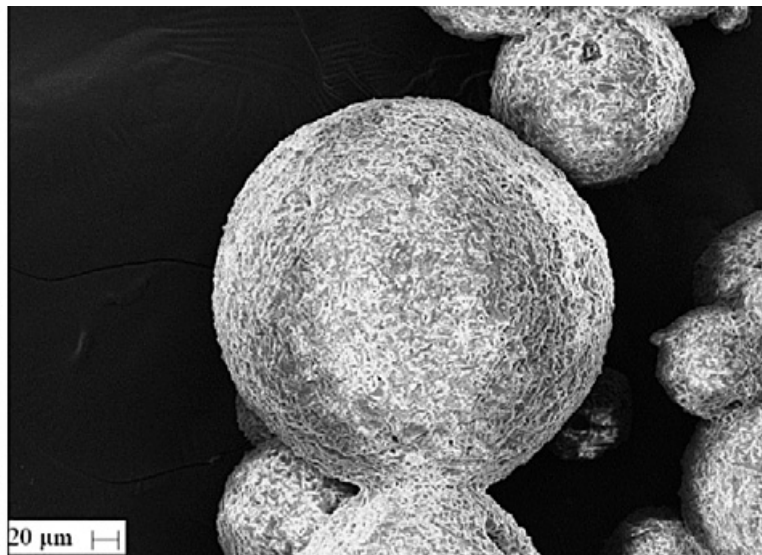


FIGURA 10: Microscopia electrónica de barrido: microcápsulas que contienen *L. acidophilus* (Pedroso y col., 2012).

2.3.4. Materiales empleados en la microencapsulación de *L. acidophilus*

La producción de microcápsulas estables para la inmovilización de células microbianas se inicia con la selección de un material de encapsulación apropiado.

Los materiales deben ser de calidad alimentaria, biodegradables, y permitir formar una barrera entre la fase interna y los alrededores. La mayoría de materiales utilizados para la encapsulación en el sector alimentario son biomoléculas, con capacidad gelificante. Además, tienen que garantizar la máxima protección del material activo, han de proporcionar una protección máxima frente a diversas condiciones, durante el procesamiento o el almacenamiento, o durante su paso por el tracto gastrointestinal,

como se ha venido comentado hasta ahora, no reaccionar con el material de encapsulado y deben ser biocompatibles con éste para no interferir en la homeostasis celular. Al respecto es importante su naturaleza físico-química. Además deben de ser estables. Serán importantes sus propiedades reológicas, por ejemplo, soluciones muy viscosas pueden dañar físicamente las membranas celulares, disminuyendo significativamente la viabilidad celular. También deben ser relativamente económicos y de fácil utilización, sobre todo, pensando en su posible aplicación a nivel industrial (Nedovic y col., 2011).

Otro parámetro importante son las propiedades de difusión de partículas ya que la tasa de entrada de moléculas en la cápsula es esencial para la supervivencia celular y también lo es la tasa de flujo de salida de productos finales metabólicos.

Se requiere que el material sea resistente para mantener su integridad y la disposición de las células, pero a la vez que sea flexible para permitir la expansión celular y aumento en el tamaño de las mismas. Aunque los polímeros sintéticos ofrecen mayor resistencia mecánica y mejor estabilidad química, se prefieren polímeros naturales por considerarse menos perjudiciales para la integridad celular y viabilidad (John y col., 2011).

Diferentes materiales no están permitidos para su utilización en la industria alimentaria, por no considerarse seguros, “GRAS” (generally recognized as safe). El criterio más importante para seleccionar un material de encapsulación es la funcionalidad que proporciona al producto final.

Aquellos materiales más ampliamente utilizados en el sector alimentario son los polisacáridos.

- El almidón y sus derivados – amilosa, amilopectina, dextrinas, maltodextrinas, polidextrosa, celulosa y sus derivados.
- Exudados de plantas y extractos- goma arábica, goma tragacanto, goma karaya, goma de mezquite, galactomananos, pectinas, polisacáridos solubles de soja.
- Extractos marinos: carrageninas, alginato.
- Dextrano, quitosano, xantano o goma xantana, gelano o goma gellan.

Además de los polisacáridos, naturales o artificiales, las proteínas y los lípidos también son apropiados para la encapsulación.

La selección juiciosa de los materiales y métodos para la producción de microesferas es crítica para asegurar el mínimo daño a la viabilidad de las células microbianas encapsuladas. Una elección de un sistema de encapsulación siempre es crucial, ya que tiene que ser eficiente y fácilmente incorporado en el alimento sin interferir con la textura y el sabor final del producto.

A continuación se citan los materiales más comúnmente utilizados y se realiza una breve descripción de los más investigados en los últimos años (Rathore y col., 2012): agar, K-carragenina, almidón, quitosano, alginato, goma gellan, goma xantana, gelatina, poliacrilamida, acetato de polivinilo o PVA, caseína y proteína del lactosuero.

2.3.4.1. Alginato

El alginato es un polisacárido de origen natural extraído de diversas especies de algas. Está constituido por dos tipos de unidades monoméricas; el ácido β -D-manúrico (M) y el α -L-gulurónico (G), los cuales forman bloques poliméricos (bloques GG, MM, MG y GM) mediante enlaces glucosídicos. El contenido relativo y la distribución de cada uno de éstos varía de acuerdo con la fuente de alginato y esto influye sobre las propiedades funcionales de alginato como agente encapsulante.

Las propiedades encapsulantes del alginato de sodio se basan en su interacción con cationes de calcio para formar un gel que permita modificar o generar propiedades reológicas deseadas. El modelo que explica la formación de los geles de alginato con sales cálcicas se denomina 'egg box' o caja de huevos (Morris et al., 1978) (Figura 11).

Además del calcio, pueden utilizarse otros cationes para la formación del gel, como el bario o el aluminio, entre otros. El calcio carece de toxicidad, es económico y de fácil disponibilidad.

Los geles de alginato se prefieren para la encapsulación de probióticos debido a su sencillez, bajo coste, biocompatibilidad y a que no presentan toxicidad (Krasaekoopt y col., 2003).

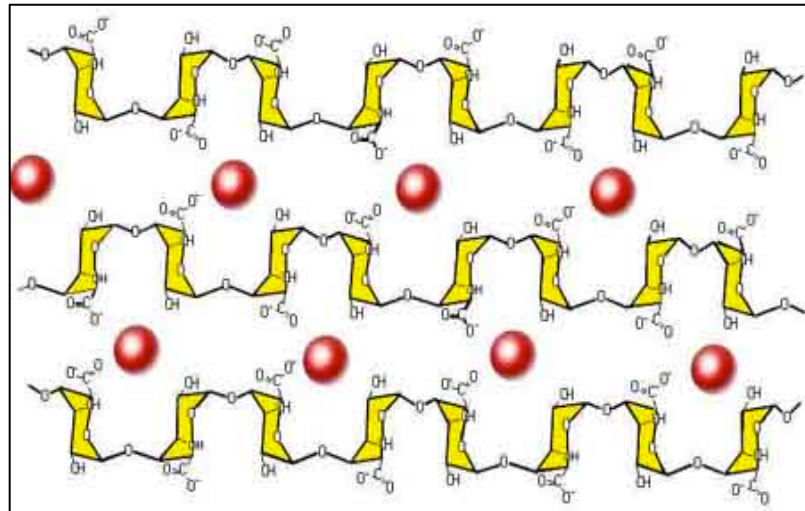


FIGURA 11: Formación de unidad dimérica entre los iones de calcio y las cadenas de polímero en forma de bucle (regiones de bloques GG)

Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes. Por ejemplo, las microcápsulas resultantes son sensibles al ambiente ácido (Mortazavian y col., 2008), lo cual no es compatible para su resistencia al paso por el estómago, además son porosas, suponiendo esto un defecto ya que lo que se pretende es proteger a las células microbianas de su entorno (Gouin, 2004) (Figura 12).

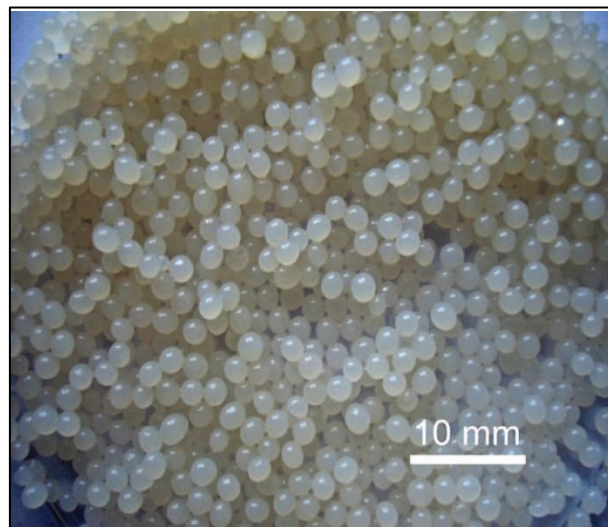


FIGURA 12: Cápsulas de alginato con células probióticas de *L. acidophilus* (Ortakci y Sert, 2012)

Estos defectos podrían ser compensados mediante la mezcla de alginato con otros compuestos, o la modificación estructural del mismo mediante el uso de aditivos.

Un estudio ha demostrado que la microencapsulación de *L. acidophilus La5* con alginato y almidón resistente resulta exitoso para mantener una cantidad suficiente de células viables en el queso en salmuera, pudiendo resistir las microcápsulas a las condiciones gástricas y liberándose adecuadamente en el intestino humano. Además, es importante destacar que no se observaron diferencias importantes en las propiedades sensoriales (color, textura y aroma) cuando se compararon el producto con células libres y encapsuladas y que el grado de aceptabilidad fue prácticamente el mismo (Mirzaei y col., 2012).

Varias publicaciones describen el efecto protector del recubrimiento o incorporación de quitosano en las cápsulas de alginato. Muestran el aumento de la supervivencia de los microorganismos en varios ordenes de magnitud en comparación con el alginato solo. La combinación de ambos polímeros ofrece protección a nivel gastrointestinal y permite una adecuada liberación microbiana en el colon. Además, se ha observado que el efecto protector no se pierde tras realizar el secado de las cápsulas para su posterior incorporación en productos (Nualkaekul y col., 2012; Cook y col., 2012).

2.3.4. 2. Almidón

El almidón es un polisacárido que consiste en un gran número de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos. Se compone principalmente de amilosa, polímero lineal formado por moléculas de D-glucopiranosas unidas mediante enlace α -1-4 y, amilopectina, un polímero ramificado de glucosa en el cual las moléculas se unen mediante enlaces glucosídicos 1-4 en su porción recta y enlaces 1-6 en sus ramificaciones (Sajilata y col., 2006) (Figura 13). La proporción de amilosa y amilopectina determina la absorción y retención de agua y en consecuencia, la capacidad de formación de geles, lo cual influirá en las propiedades funcionales del almidón.

El almidón resistente es aquél que no es digerido por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado. Por lo que puede llegar al colon donde es fermentado (Sajilata y col., 2006; Anal y Singh., 2007). Además, al tratarse de un prebiótico, puede ser utilizado por los microorganismos probióticos en el intestino grueso (Mortazavian y col., 2008). Los gránulos de almidón se consideran una superficie ideal para la adhesión de los microorganismos (Anal y Singh., 2007), lo cual mejora la viabilidad de los

mismos hasta su llegada al intestino y los mantiene metabólicamente activos (Crittenden y col., 2001).

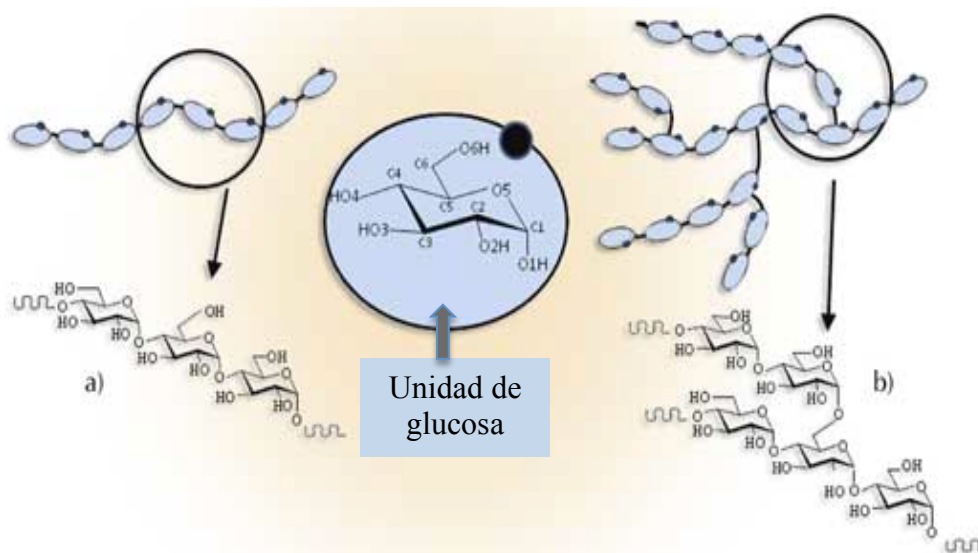


FIGURA 13: Unidades estructurales básicas de amilosa (a) y amilopectina (b).

2.3.4.3. Goma gellan y goma xantana

La goma gellan es polisacárido microbiano derivado de *Pseudomonas elodea*. Está compuesto por la repetición de un tetrasacárido de glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa. Se suele emplear como hidrocoloide, al tener la capacidad de producir espesamiento o gelificación cuando se disuelve o dispersa en agua, al igual que la goma xantana, el alginato, etc.

La goma xantana es un polisacárido extracelular obtenido del patógeno de plantas *Xanthomonas campestris*. Está formado por un esqueleto consistente en una cadena lineal de (1-4) β - D- glucano celulosa, y cadenas laterales formadas por dos manosas y un ácido glucurónico.

Presenta solubilidad tanto en agua fría como en agua caliente, elevada viscosidad a pequeñas concentraciones y estabilidad en sistemas ácidos. Su aplicación en la industria se debe a sus propiedades espesantes, estabilizantes y emulsionantes.

Se han utilizado mezclas de goma gellan y goma xantana para encapsular células probióticas, en este caso, la mezcla resultante presenta una elevada resistencia a las condiciones ácidas, a diferencia del alginato. Un estudio ha demostrado que la

utilización de goma gellan al 1% y goma xantana al 0.75 % es la más efectiva para la protección de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*, siendo otros polímeros microbianos, como la goma pululana mucho menos efectivos (Jimenez-Pranteda y col., 2011).

2.3.4.4. Quitosano

El quitosano es una molécula policatiónica obtenida mediante desacetilación alcalina de la quitina presente en el exoesqueleto de los crustáceos. Su estructura química es la de un copolímero de D-glucosamina y N-acetil- D-glucosamina. Se trata de un componente que muestra una buena eficacia para incrementar la viabilidad de las células microbianas y por lo tanto se utiliza combinado con otros materiales, por ejemplo con el alginato, como se ha comentado previamente.

Se ha estudiado la posibilidad de utilizar solamente una cubierta de quitosano sobre las microcápsulas de alginato o una doble cubierta (alginato-quitosano- alginato-quitosano). Nualkaekul y col., (2012) fueron los primeros que estudiaron el efecto de la doble cubierta de quitosano sobre la viabilidad de las células microbianas, en concreto, sobre *L. plantarum*, resultando en una importante mejora.

2.3.4.5. Proteínas de la leche (caseínas, proteínas del lactosuero)

Las proteínas de la leche son vehículos naturales para células probióticas y debido a sus propiedades estructurales y físico-químicas, son un adecuado sistema de protección y liberación (Livney, 2010). Tienen la capacidad de formar geles que constituyen una estructura tridimensional en la que quedan atrapadas las células microbianas.

Las proteínas de caseína ya se utilizaron para llevar a cabo la encapsulación de polifenoles. Las proteínas del lactosuero son un subproducto de la fabricación del queso y son ampliamente utilizadas en productos alimentarios dada su amplia funcionalidad, incluyendo la gelificación ya comentada, la capacidad emulsionante, de formación de espumas y de retención de agua. Actualmente, las investigaciones se centran en la utilización de ambas para la encapsulación de probióticos (de Vos y col., 2009).

Sus excelentes propiedades de gelificación han sido explotadas por varios investigadores (Heidebach y col., 2009(a, b); Doherty y col., 2011) para llevar a la

formación de microcápsulas. Además, su biocompatibilidad las hace especialmente interesantes (Livney, 2010). Los resultados de estos estudios son prometedores.

Las proteínas presentan un elevado valor nutritivo y propiedades funcionales excelentes. Tienen la capacidad de interactuar con una amplia gama de compuestos activos a través de sus grupos funcionales, presentes en su estructura primaria, lo cual puede suponer una oportunidad para la protección de las células microbianas en primera instancia y, posteriormente, revertir la unión de moléculas para permitir su liberación en el intestino del huésped (Chen y col., 2006; Chen y Subirade, 2008). Además, la hidrólisis de las matrices proteicas por las enzimas digestivas puede liberar péptidos bioactivos que ejerzan efectos fisiológicos beneficiosos (Korhonen y Pihlanto, 2003).

2.4. Productos con probióticos encapsulados

2.4.1. En desarrollo

La encapsulación es una técnica que está siendo muy explorada por muchas empresas con el objetivo de prolongar la vida útil de los microorganismos en los productos alimenticios y mejorar la resistencia de las células probióticas durante su paso por el tracto gastrointestinal, dada la importancia de las mismas en la salud. Los resultados son prometedores a escala de laboratorio, pero el problema es que las tecnologías utilizadas presentan dificultades para la ampliación a nivel industrial. A esto hay que añadir, que no todos los materiales que podrían utilizarse como óptimos para encapsular, son aptos para el consumo o están permitidos en algunos países. Por ejemplo, la adición de algunos polisacáridos no está permitido en productos lácteos en algunos países europeos (Picot y Lacroix., 2004).

Por tanto, la microencapsulación tiene que enfrentar muchos desafíos para su aplicación a escala industrial. Por un lado, desafíos tecnológicos para obtener microcápsulas con las mejores propiedades, que no tengan impactos negativos sensoriales. Por otro lado, la actitud del consumidor hacia nuevos alimentos. Esto no resulta sencillo y dependerá en gran medida del material y técnica de encapsulación empleados (Truelstrup- Hansen y col., 2002).

La mayor parte de los alimentos que contienen microorganismos probióticos se encuentran en la sección refrigerada de supermercados debido al hecho de que las bacterias son sensibles y pueden ser destruidos por el calor. Por lo tanto, el sector lácteo tiene una gran ventaja en los alimentos probióticos. Sin embargo, las investigaciones se centran en la ampliación de las categorías de alimentos disponibles en la actualidad.

QUESO

El queso Cheddar presenta la característica de ser un buen portador de microorganismos, debido a su relativo elevado pH (5,5). Además, su elevado contenido graso y buena capacidad tampón pueden ofrecer una protección a las bacterias probióticas contra la degradación enzimática y el entorno ácido del tracto gastrointestinal (Gardiner y col., 1998; Stanton y col., 1998; Dinakar y Mistry, 1994).

Algunas tecnologías utilizadas para encapsular probióticos antes de su incorporación en este producto fueron la emulsión y el secado por pulverización. Como materiales encapsulantes se emplearon alginato/almidón y leche desnatada, respectivamente. Según varios estudios, parece que la microencapsulación no es necesaria para aumentar la viabilidad de los probióticos en el queso Cheddar, pero sí en el caso del queso fresco, donde puede mejorarse la viabilidad de los probióticos debido al bajo valor de pH del producto (Kailasapathy, 2002). El queso Cheddar se considera un vehículo ideal para los probióticos, pero la microencapsulación no aumenta la supervivencia de los mismos, aunque tampoco supone impactos negativos sobre el aroma, sabor y textura del producto (Stanton y col., 1998).

La microencapsulación puede ser una buena manera de mejorar la viabilidad de los probióticos en el queso casar y en el queso blanco en salmuera. Cepas probióticas, entre las que interesa *L. acidophilus*, se han incorporado a estos productos, utilizándose la técnica de extrusión o emulsión para la encapsulación, y el alginato como material encapsulante. Ambas técnicas mostraron adecuadas propiedades organolépticas en el producto final con cápsulas y una mejora en la viabilidad (Otzer y col., 2008; 2009).

YOGUR

En este caso, los estudios demuestran que la utilización de células encapsuladas mejora la supervivencia de las mismas, teniendo en cuenta el bajo nivel de pH del producto,

entre 4,2 y 4,6. Además, es importante tener en cuenta la posibilidad de su incorporación de manera sencilla, sin necesidad de llevar a cabo modificaciones del proceso tradicional de elaboración (Kailasapathy, 2009). Por ejemplo, la utilización de la mezcla polimérica goma de gellan y xantana con la aplicación de la extrusión es una manera de aumentar la tolerancia de los probióticos al ambiente ácido, aumentando su supervivencia. El problema es que afecta al producto a nivel sensorial, dando un sabor amargo, lo cual se traduce en un defecto porque puede llevar al rechazo por parte del consumidor. Otra de las afecciones sensoriales se encuentra a nivel de la textura, observándose gránulos de tamaño suficientemente grande como para ser detectados por el consumidor (22-55 μm). Por lo tanto, a pesar de que la microencapsulación da protección a los microorganismos en el yogur, se ve afectada la calidad sensorial del mismo, siendo esto un problema importante para su aceptación en el mercado (Sun y Griffiths, 2000; Adhikari y col., 2003).

Varios investigadores se centran en la incorporación de prebióticos (por ejemplo, almidón resistente, raftilosa) o crioprotectores (por ejemplo, glicerol) con el objetivo de aumentar la viabilidad de las células, creando además valor añadido en el producto, gracias a la sinergia entre los probióticos y los prebióticos (Sultana y col., 2000; Capela y col., 2006). De esta manera, se mejora la técnica de supervivencia de las células en el producto, pero no bajo condiciones gastrointestinales simuladas, lo cual no significa que que sobrevivan y permanezcan viables en un mayor número hasta llegar al intestino (Sultana y col., 2000).

Se demostró que el recubrimiento de las cápsulas de alginato con quitosano ofrece una mayor protección, consiguiéndose una mayor supervivencia de las células en el yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas (Anjani y col., 2004; Iyer y Kailasapathy, 2005).

Las proteínas del lactosuero han sido utilizadas para encapsular mediante la técnica spray-drying o desecación por atomización, y se ha demostrado que podrían ser útiles con respecto a la viabilidad de las células durante su paso por el tracto gastrointestinal cuando se incorporan en los productos lácteos fermentados. En este caso, es importante tener en cuenta la necesidad de elevadas temperaturas en la técnica, que pueden afectar a la supervivencia de algunas cepas probióticas (Picot y Lacroix, 2004).

Kailasapathy (2006) explicó que la incorporación de cápsulas de probióticos que contienen células no altera significativamente las propiedades del yogur como el aspecto, color, aroma, sabor y acidez. Sin embargo, sí que se observa alteración de las propiedades texturales, en particular, la suavidad y la aspereza, cambios que podrían ser detectados por los consumidores.

En cuanto a la acidez, se demostró que la adición de cultivos probióticos ralentiza la post acidificación durante el almacenamiento de yogur. En otro estudio, Kailasapathy y col. (2008) demostraron una correlación entre el pH después de almacenamiento y la supervivencia de las bacterias probióticas, la cual se ve afectada negativamente por la presencia de pulpa de fruta. Sin embargo, todos los yogures obtenidos contenían los niveles recomendados de bacterias probióticas, incluso después de la vida útil de 35 días. Por lo tanto, el yogur puede ser un portador probiótico bueno si las células están encapsuladas (Tabla 5). Pero, la adición de las células encapsuladas en yogures probióticos se detecta organolépticamente por el consumidor. Sin embargo, de acuerdo con Champagne y Fustier (2007b), los efectos sobre las propiedades sensoriales pueden llegar a ser deseables si el consumidor está prevenido y alertado ante la presencia de las partículas.

TABLA 5: Encapsulación de *L.acidophilus* en yogures.

Técnica	Materiales	Referencias
Emulsión	Alginato	Capela y col., 2006
Emulsión	Alginato/almidon	Kailasapathy, 2006
Extrusión	Alginato/quitosano	Krasaekoop y col., 2006
Extrusión	Alginato/quitosano	Urbanska y col., 2007
Spray- drying	Maltodextrina/goma arábica	Su y col., 2007

HELADOS

No es fácil la incorporación de microorganismos probióticos en postres congelados debido a la alta acidez y presión osmótica en el producto, el daño por congelación y la

exposición al aire incorporado durante la congelación (Chen y Chen, 2007). La introducción de probióticos encapsulados en postres congelados podría superar estas dificultades (Chen y Chen, 2007). Se ha estudiado que células de *L. acidophilus* en alginato, proporcionan una tasa de supervivencia más alta (40%) que las células libres cuando son incorporadas en el helado (Sheu y Marshall, 1993; Sheu y col., 1993). Otro estudio demostró que no había diferencia significativa entre la supervivencia de las bacterias probióticas encapsuladas y las células libres. La protección de las células libres en el helado puede ser debido a los sólidos totales en el mismo (Kailasapathy y Sultana, 2003). Según Homayouni y col (2008), la encapsulación de células probióticas mejora su viabilidad en el helado y no tiene ningún efecto sobre las propiedades sensoriales del producto. El número de células probióticas fue entre 10^8 y 10^9 ufc/g después de tres meses de almacenamiento.

Por ejemplo, se ha llevado a cabo la aplicación de la técnica de emulsión, para encapsular a *L.acidophilus* y adicionarlo en el helado, utilizando como agentes encapsulantes alginato/almidón (Godward y Kailasapathy, 2003b).

CHOCOLATE

La incorporación de las células probióticas encapsulados (*L. helveticus*, *B.longum*) por la técnica spray- coating o pulverización, se ha llevado a cabo en el chocolate (Maillard y Landuyt, 2008). De acuerdo con estos autores, la viabilidad de los probióticos en el intestino delgado fue tres veces mayor cuando se incorporan en el chocolate que en el producto lácteo. Possemiers (2010), también llevó a cabo la encapsulación de células probióticas y su incorporación en el chocolate. Los resultados han demostrado que la introducción de éstas puede ser una excelente solución para protegerlos de condiciones de estrés ambiental. Además, hay que añadir, que en el chocolate, la fracción lipídica de la manteca de cacao ha demostrado ser protectora para las bifidobacterias (Lahtinen y col., 2007).

2.4.2. En comercialización

A continuación se describen una serie de productos con células probióticas encapsuladas que se pueden encontrar comercializados.

- Chocolate probiótico y Probio'Stick. Probio'Stick es un polvo bucodispersable que contiene *Bifidobacterium* y cepas de *Lactobacillus*. El producto permite una reducción de los síntomas físicos relacionados con el estrés (Diop y col., 2008), particularmente el dolor abdominal, náuseas y vómitos. Según Barry Calle-baut (2007), la adición de las células probióticas encapsuladas no tiene ninguna influencia sobre el sabor del chocolate, textura y sensación en la boca. Un consumo de 13,5 g por día de chocolate parece ser suficiente para el equilibrio de la microbiota intestinal.
- Cápsulas que contienen una combinación de probióticos y arándanos y presentan efectos reconocidos en trastornos urinarios como cistitis. En este producto, la cepa elegida tiene efectos positivos sobre la flora del aparato urinario. La combinación de estos dos ingredientes hace que este producto particularmente útil en la prevención de la cistitis.
- Probióticos encapsulados en pasas cubiertas de yogur, barras nutritivas, barras de chocolate y tabletas (Siuta-Cruce y Goulet, 2001).
- Jugos de naranja probióticos ("Dawn" para el mercado irlandés). Según estas empresas, las células probióticas permanecen viables durante toda la vida útil del producto. El uso de las células de probióticos encapsulados puede ser más adecuado para resistir las duras condiciones en los zumos.
- Helados probióticos (América Latina; Unilever en 1999).
- Yogures que contiene bacterias ácido lácticas encapsuladas, por ejemplo, bifidobacterias (Doctor-capsule, Corea) (Lee y Heo, 2000).
- Producto farmacéutico disponible en forma de cápsula que contiene bifidobacterias encapsuladas (Bifin-constipation).
- Células probióticas encapsuladas en forma de tableta/cápsula (Forever Active probiótico, Probiotic 7, Multi-probiótico) o en forma de polvo (PureBaby Probiótico, ThreeLac™).
- Simbióticos que contienen *L. sporogenes* encapsulados como un probiótico y fructo-oligosacáridos como prebiótico.

Hoy en día, las células probióticas encapsuladas se introducen, mayoritariamente, en productos nutracéuticos (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), pero cada vez más se

realizan esfuerzos para desarrollar nuevos alimentos como portadores ideales de las mismas.

2.5. Marco legislativo

En relación a los agentes encapsulantes utilizados en este trabajo, la legislación vigente señala que:

- ✓ El alginato sódico está clasificado como aditivo alimentario de uso general con la numeración E-401 según el RD (CE) 142/2002.
- ✓ El almidón está también clasificado como aditivo alimentario con la numeración E- 1404 según el RD (CE) 142/2002. Sin embargo, a efectos del citado Real Decreto, no se considera aditivo alimentario el almidón modificado por medios físicos y el almidón tratado por enzimas amilolíticas.

En la Unión Europea (UE) existen dos reglamentos bajo los cuales se ubicarían los Alimentos Funcionales: el Reglamento sobre Nuevos Alimentos y Nuevos Ingredientes Alimentarios (1997) y el Reglamento sobre Declaraciones Nutricionales y Propiedades Saludables de los Alimentos, de diciembre de 2006. Luego, a través de Reglamentos específicos se publican los listados de declaraciones de propiedades saludables denegadas y/o autorizadas, especificando el nutriente, sustancia, alimento o categoría de alimento, el tipo de declaración, las condiciones y/o restricciones de uso del alimento, o bien una declaración o advertencia complementaria.

La nueva regulación sobre alimentos funcionales establece la necesidad de establecer relaciones porción-efecto y definir las cantidades mínimas efectivas y máximas recomendadas a consumir, teniendo en cuenta el consumo habitual de los alimentos en la dieta. Con el fin de aclarar la identidad del probiótico presente en el alimento, se declarará en la etiqueta la especie microbiana. Si se ha realizado un proceso de selección en lo que respecta a la cepa, debería incluirse también la identidad de ésta, dado que el efecto probiótico parece ser específico de cada cepa. Es necesario enumerar con precisión las bacterias probióticas presentes en los productos alimenticios con el fin de incluirlas en la etiqueta. En ésta debería declararse la concentración viable de cada probiótico presente al final de su período de conservación (Reid y col., 2001c).

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Microorganismo y condiciones de cultivo

3.1.1. Microorganismo y medio de cultivo

El microorganismo probiótico utilizado para llevar a cabo la microencapsulación fue *Lactobacillus acidophilus* 903 T, suministrado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento y caracterización de *L.acidophilus* fue MRS Broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia), medio líquido de cultivo desarrollado por Man, Rogosa & Sharpe (1960) que favorece el aislamiento y cultivo de bacterias del ácido láctico, como es el caso del género *Lactobacillus* (Sharpe, 1966). Se trata de un medio comercial a base de poli peptona (10g/L), extracto de carne (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), glucosa (20 g/L), Tween 80 (1,08 g/L), fosfato cálcico de potasio (82 g/L), acetato de sodio (5 g/L), sulfato de magnesio (0,2 g /L) y sulfato de manganeso (0,05 g/L). La peptona y la glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano y el resto de componentes aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos contaminantes. Este medio se utilizó en forma líquida para la obtención de masa bacteriana y en forma sólida (MRSA), correspondiente a la misma composición que el MRS Broth con un 15 % de agar bacteriológico, para el recuento de microorganismos en placas.

Para comenzar con la experimentación, se partió de un congelado de células microbianas resuspendidas (cultivo stock) en 500 µL de caldo MRS y glicerol al 40% (v/v) (Sigma- Aldrich Química S. A., Madrid, España). A partir del congelado, se realizó un aislamiento por estrías en placas de MRSA, incubándose las mismas a 37 °C durante 48 horas. De esta manera, se obtuvieron colonias aisladas y pudo confirmarse la pureza del cultivo mediante la apariencia de las colonias sobre el medio sólido, en el que crecieron como colonias blanquecinas de pequeño tamaño.

3.1.2. Preparación de cultivos stock

A partir de colonias aisladas en placas de MRSA se preparó una suspensión bacteriana en caldo MRS, la cual fue cultivada a 37 °C durante 24 horas en condiciones estáticas y de microaerobiosis (Incubador orbital, New Brunswick Scientific Co., modelo G25).

Para la obtención de cultivos stock de estas suspensiones celulares se procedió de la siguiente manera: 1 mL de cultivo en caldo MRS se concentró por centrifugación a 13200 xg durante 5 minutos, desechándose el sobrenadante y repitiendo este paso dos veces más, con el objetivo de obtener la suficiente biomasa para asegurar la máxima viabilidad microbiana durante la congelación posterior. El pellet resultante fue resuspendido en 500 μ L de caldo MRS y suplementado con glicerol al 40% (v/v). Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.1.3. Obtención del concentrado celular

1 mL de cultivo stock se reactivó en un tubo con 9 mL de caldo MRS e incubó a 37 °C durante 48 horas, sin agitación y en condiciones de microaerobiosis. Transcurrido este tiempo, se procedió a la agitación del tubo para su homogeneización y se añadió su contenido en una botella de 250 mL con un contenido de 200 mL de caldo MRS. La botella se mantuvo a 37 °C durante 11,30 o 14 horas según el experimento, sin agitación y en condiciones de microaerobiosis. Al cabo de este tiempo, se tomaron 100 mL de este caldo y se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos (centrífuga Kubota, modelo 6500). El pellet obtenido constituyó la biomasa destinada a la microencapsulación (Figura 14).

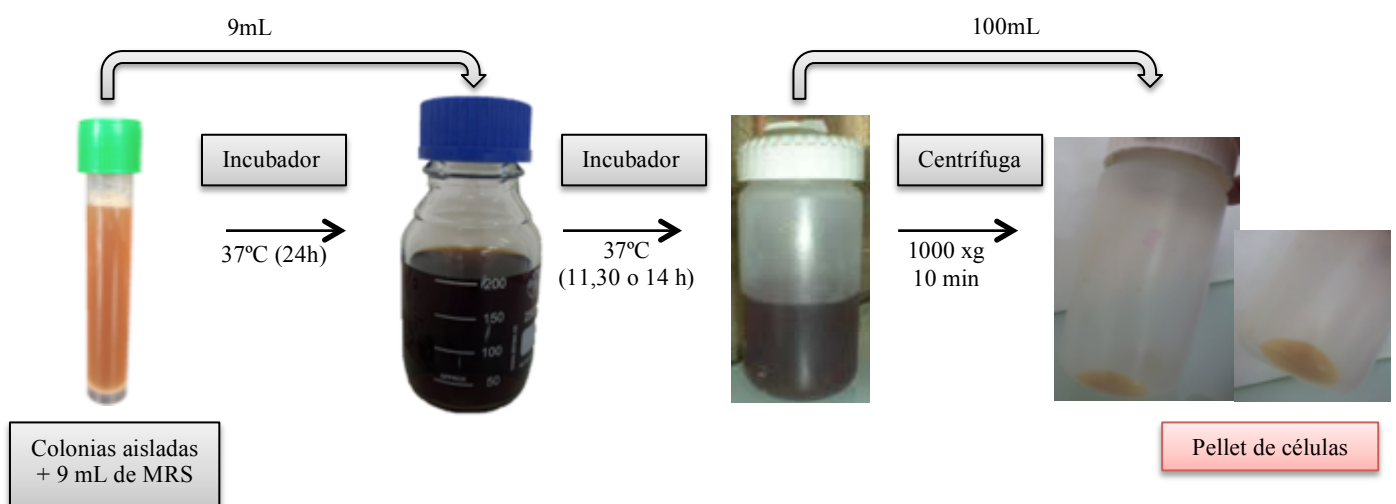


FIGURA 14: Obtención del concentrado celular.

3.1.4. Curva de crecimiento de *L.acidophilus*

Se realizó la curva de crecimiento de *L. acidophilus* con el objetivo de conocer el tiempo en el que el microorganismo alcanza la fase de crecimiento exponencial, es decir, el tiempo en el que se obtiene una suspensión celular compuesta por el mayor número de células viables. Esto fue importante para proceder a la microencapsulación, en donde interesa que el microorganismo se mantenga estable y, sobre todo, metabólicamente activo.

Para ello, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.3, una vez vertido el contenido del tubo en la botella con 200 mL de MRS, se procedió a la toma de muestras en intervalos de 2 horas, durante las primeras 10 horas de crecimiento, posteriormente, en intervalos de 1 hora, tomándose la última medida a las 17 horas. Se realizaron en cada toma de muestra recuento en placa y mediciones de densidad óptica para controlar el crecimiento bacteriano, así como medidas del pH, para determinar la evolución de cada parámetro a través del tiempo.

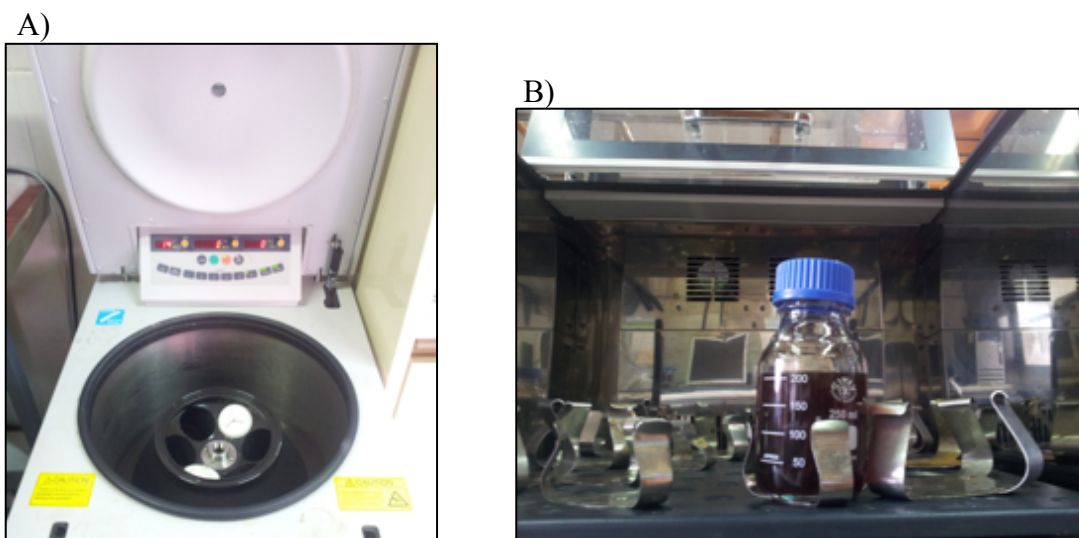


FIGURA 15 : Centrifuga Kubota (a) e incubador orbital (b).

Para la determinación de la concentración de microorganismos de la muestra a analizar, se midieron las unidades formadoras de colonias (ufc)/mL siguiendo el siguiente procedimiento: 1 mL de la botella con 200 mL de MRS, se centrifugó 13200 xg durante 5 minutos en una centrífuga de meseta (Eppendorf, modelo 5415 D). Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas utilizando cloruro de sodio 7 (g/L) como diluyente en

proporción 1:10. Se cogieron alícuotas de 100 μL de las diluciones y se sembraron en medio sólido. Las placas fueron incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Tras el recuento en placa pudieron cuantificarse las unidades formadoras de colonias (ufc) por mL, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = n \times (1/v) \times (1/d)$$

Donde:

n: número de colonias en placa.

v: volumen plaqueado (0,1 mL)

d: dilución en la que aparecen las colonias.

Paralelamente, se determinó el pH del sobrenadante de la muestra (pH- metro Crison modelo 2000) tras eliminar las células mediante centrifugación en la centrífuga de meseta y se tomaron medidas de la densidad óptica (D.O), a partir de la resuspensión del pellet obtenido en la centrifugación en 1 mL de NaCl, a longitud de onda de 600 nm (Espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV 1203) (Figura 16).

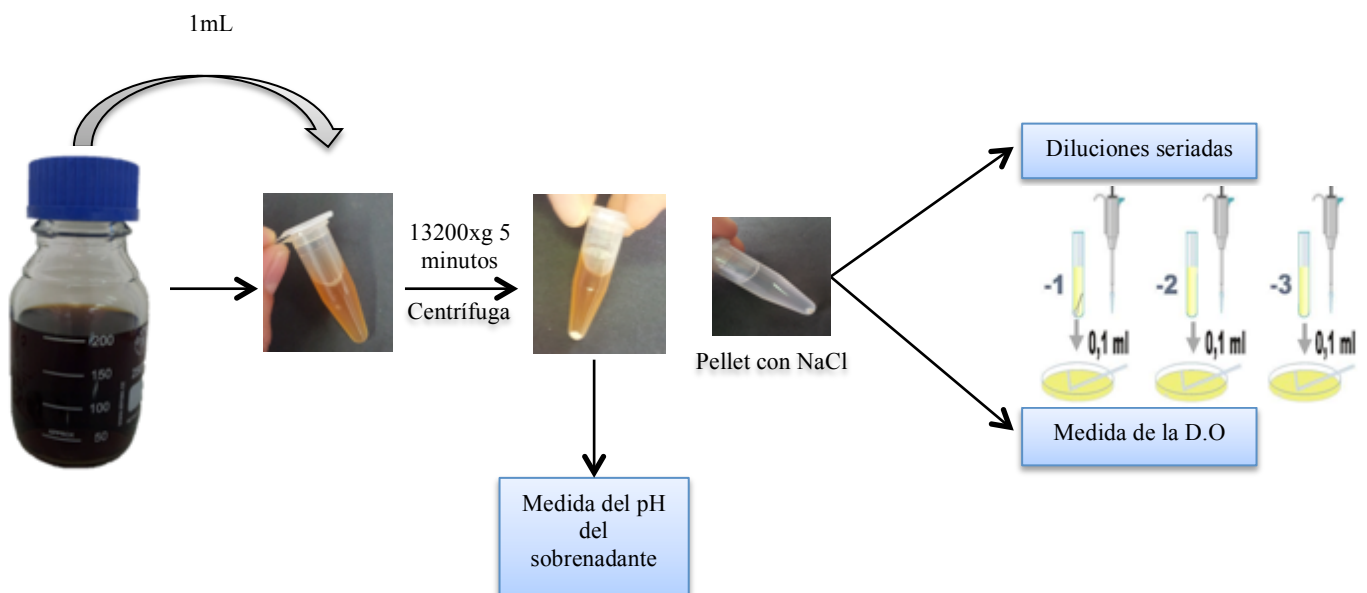


FIGURA 16: Esquema para la determinación de la concentración de microorganismos, pH y D.O.

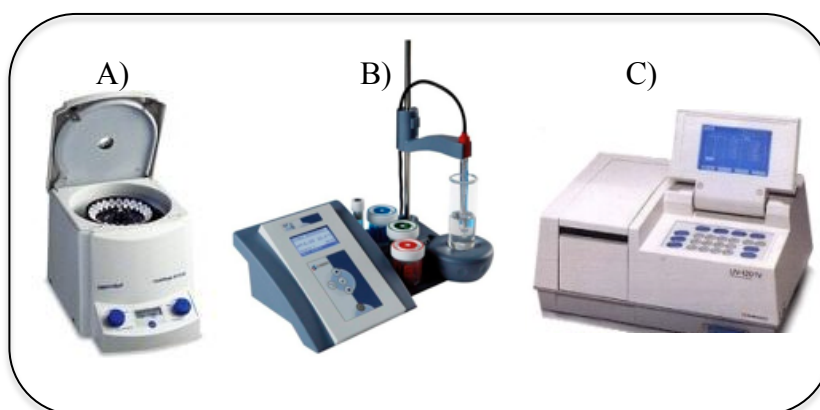


FIGURA 17: Equipos a) Centrifuga de meseta b) pH metro c) Espectrofotómetro.

3.2. Microencapsulación

3.2.1. Materiales

En el proceso de encapsulación, el alginato de sodio (Acros Organics, Bélgica) y almidón (Panreac Química) fueron utilizados como agentes encapsulantes en distintas proporciones, obteniéndose las mezclas poliméricas que se muestran en la tabla 6.

TABLA 6: Mezclas poliméricas con alginato y almidón en distintas proporciones.

Mezcla polimérica	Alginato (%)	1	1	1	1	1
	Almidón (%)	1,25	1,75	2	2,25	4,5

Otros reactivos utilizados fueron: cloruro de calcio (Panreac Química) 0,1 M como agente endurecedor de las cápsulas, citrato de sodio (Sigma Aldrich) al 1% (p/v) como disgregante de las mismas y cloruro de sodio (Sigma Aldrich) 7 g/L como diluyente.

El material utilizado para llevar a cabo la microencapsulación fue esterilizado a 121 °C durante 20 minutos en un autoclave para destruir todos aquellos microorganismos que pudieran encontrarse. Durante el proceso se trabajó en campana de flujo laminar con el

objetivo de mantener un ambiente estéril para la manipulación de un cultivo puro y evitar contaminaciones.

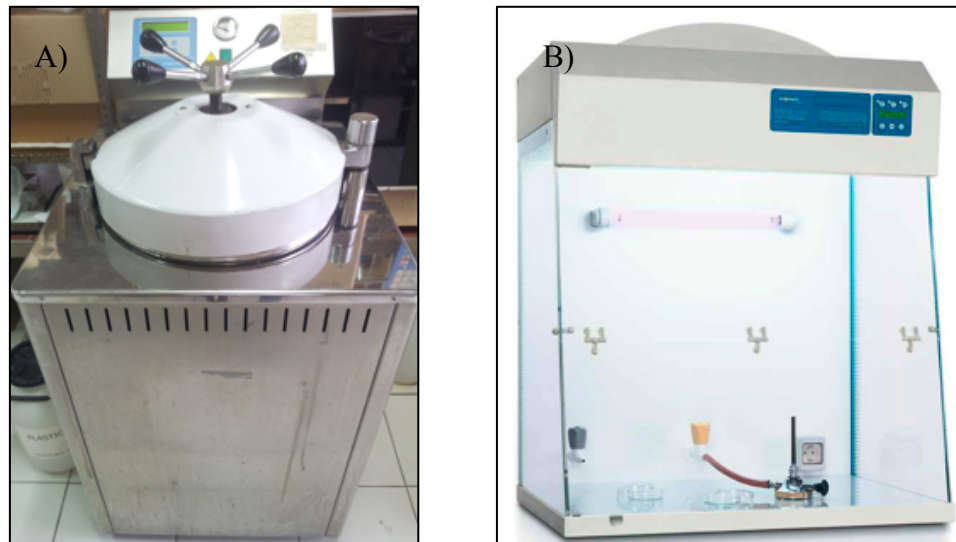


FIGURA 18: Equipos para el trabajo en condiciones estériles: autoclave (a) y campana de flujo laminar (b).

3.2.2. Procedimiento de encapsulación: método de extrusión

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.1 se obtuvo el pellet de células a partir del cual pudo iniciarse la encapsulación. Éste se resuspendió en 20 mL de la solución alginato-almidón en las proporciones mostradas en la tabla 6, resultando una concentración inicial promedio de $(3,85 \pm 1,82) \times 10^8$ ufc/mL determinada por recuento en medio sólido MRSA.

La suspensión celular se adicionó por goteo sobre una solución endurecedora de CaCl_2 en agitación, gracias a un sistema constituido por un tubo de vidrio acoplado a una punta de micropipeta mediante una goma que permitió regular la velocidad de goteo mediante una pinza Hoffman. La punta de micropipeta se situó a unos 10 cm de la solución de cloruro de calcio 0,1 M (250 mL), siendo la velocidad de goteo de 8-10 gotas por minuto, con el objetivo de obtener una óptima formación de las cápsulas. La solución de cloruro de calcio se mantuvo en agitación (100 rpm) durante todo el proceso de encapsulación para evitar que interaccionaran unas cápsulas con otras formando aglomeraciones. Las cápsulas resultantes se mantuvieron en agitación durante 30 minutos para conseguir su endurecimiento sobre la solución de CaCl_2 . Transcurridos los 30 minutos, se separó la solución de CaCl_2 de las cápsulas mediante filtración (filtro

Whatman 1001150) y posteriormente se lavaron con una solución de cloruro de calcio 0,1 M para eliminar posibles restos de la solución de CaCl_2 y de microorganismos no encapsulados en la superficie de las cápsulas. Finalmente se almacenaron en la misma solución a 4°C, hasta su uso (máximo un día) (Figura 19).

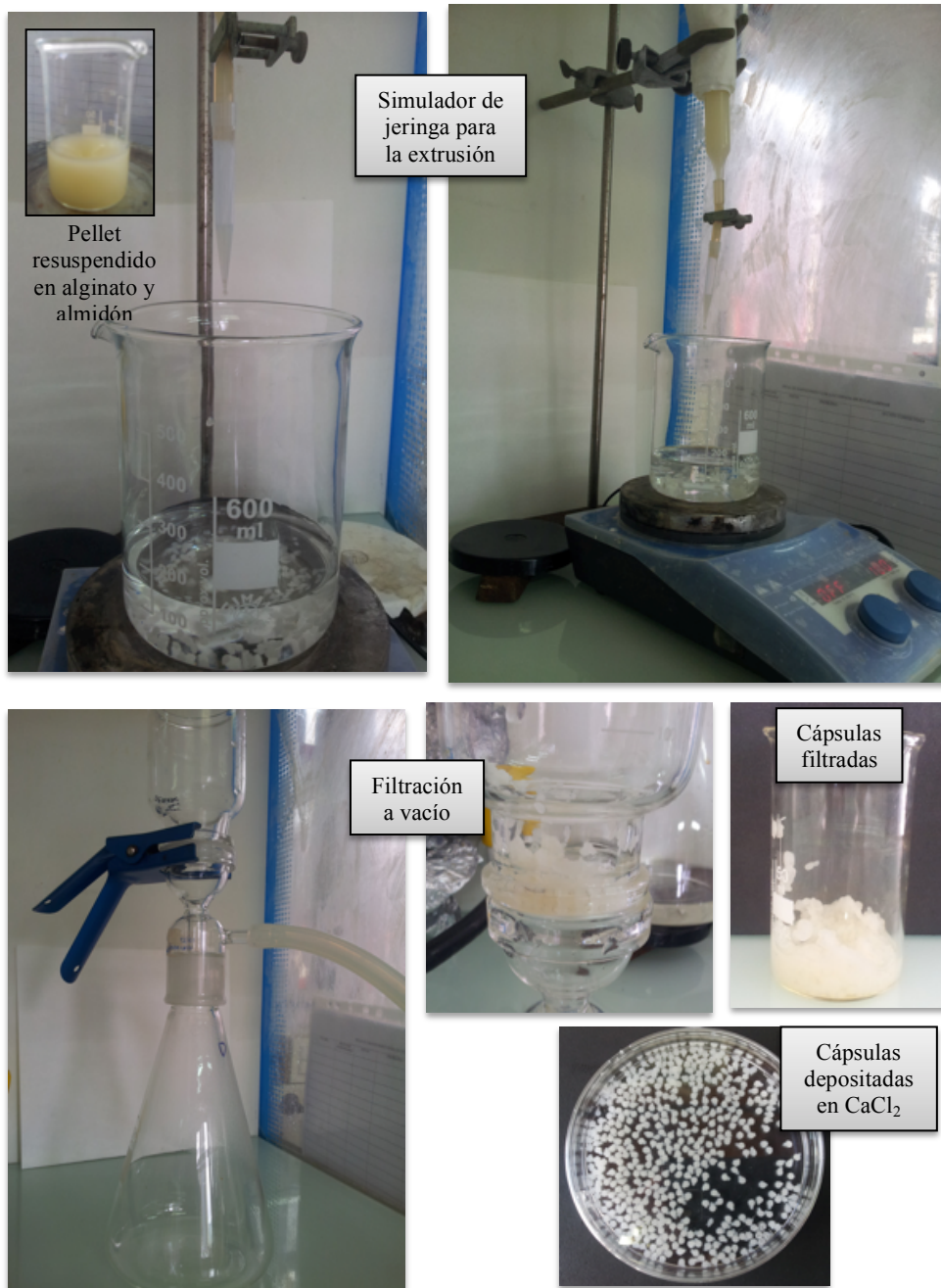


FIGURA 19: Procedimiento de encapsulación

3.2.3. Caracterización de las microcápsulas

Para la caracterización visual de las microcápsulas se utilizó el estereomicroscopio Leica M205 (Figura 20). Se trata de un microscopio fotónico simple, donde la parte óptica es una lente biconvexa que permite ver detalles del objeto y formar una imagen virtual ampliada, con apariencia sólida, relieve y profundidad gracias a la acción doble del prisma que posee.

Las microcápsulas no fueron sometidas a ningún tratamiento especial antes de su análisis, fueron colocadas directamente en un porta para su visualización con objetivo 1x y zoom óptico de 26x, obteniéndose fotografías de microcápsulas con características distintas, a partir de las cuales se realizaron comparaciones.

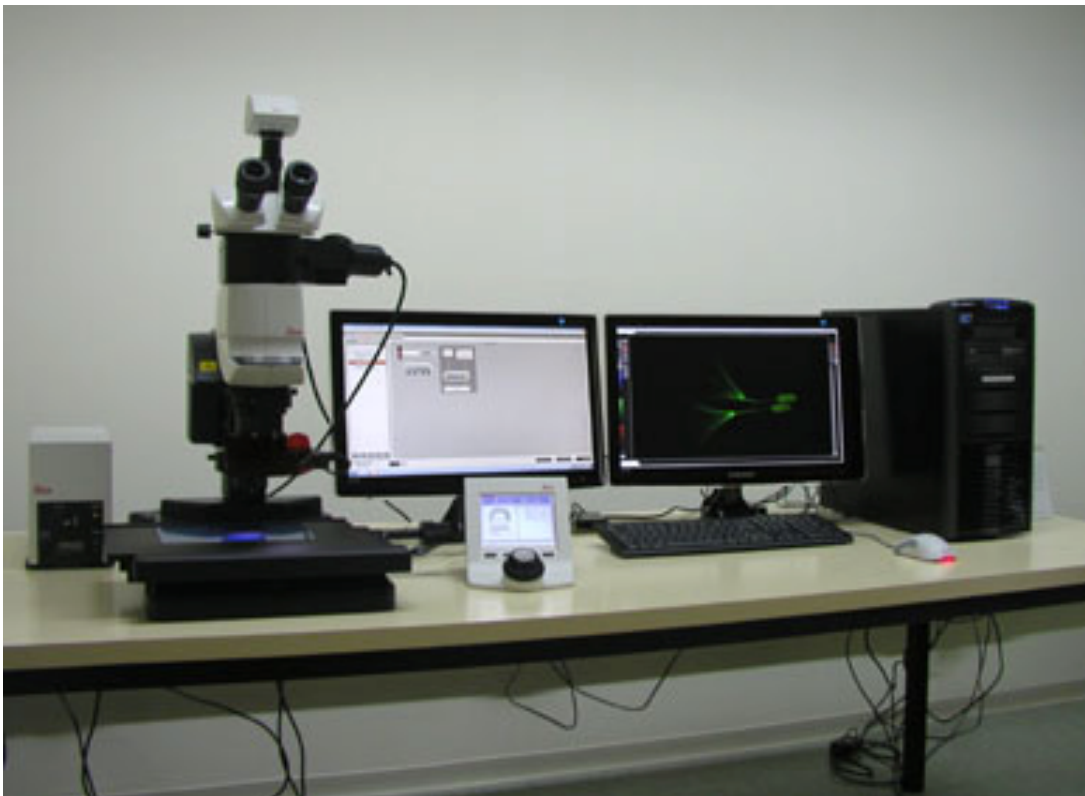


FIGURA 20: Estereomicroscopio Leica M205.

3.2.4. Determinación de la dureza y pegajosidad de las microcápsulas

Se utilizó un Analizador de Textura TA.XTplus de Stable Micro Systems para determinar la firmeza y pegajosidad de las microcápsulas (Figura 21). Este analizador mide tres parámetros: tiempo, fuerza y distancia, pudiendo evaluarse las distintas

propiedades texturales (firmeza, cohesividad, adhesión, untabilidad, etc.) de un determinado producto en función de la medida de dichos parámetros.



FIGURA 21: *Analizador TA.XTplus (Stable Micro Systems).*

En concreto, el ensayo se realizó sobre geles formados a partir de las distintas proporciones de agentes encapsulantes. El tamaño y la forma de las microcápsulas no presentaban compatibilidad con el equipo, por lo que podían dar lugar a errores de medida si se realizaban los ensayos directamente sobre las mismas.

Con el fin de solventar este inconveniente, se procedió de la siguiente manera: se obtuvo el concentrado celular tal y como se indica en el apartado 3.1.3 y se resuspendió en 20 mL de soluciones de alginato y almidón en distintas proporciones. A continuación, cada solución se dividió en alícuotas de 2 mL, sobre las cuales se adicionaron 500 μ L de la solución endurecedora de CaCl_2 , que se mantuvieron en contacto durante 30 minutos, produciéndose la gelificación y obteniéndose un bloque de

1.5x1 cm aproximadamente (Figura 22). Transcurridos los 30 minutos, se desechó la solución de CaCl_2 y los geles resultantes fueron analizados.



FIGURA 22: Geles con 1% de alginato y 1,25% de almidón.

Para el análisis de los geles, se realizó un ensayo de penetración a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) empleando para ello la sonda esférica P/0.25S y la célula de carga de 5 Kg. Los ensayos fueron realizados al menos por triplicado.

El ensayo de penetración permite determinar varios parámetros: *firmeza* (resistencia a la deformación) y *pegajosidad* (resistencia a la modificación de la estructura). Las condiciones de realización del ensayo se resumen en la tabla que se muestra a continuación:

TABLA 7: Condiciones de realización del ensayo.

Modo de ensayo	Compresión
Velocidad de ensayo	1 mm/s
Aplicar distancia	5 mm
Opciones Avanzadas	OFF
Altura de inicio	30 mm

3.2.5. Eficacia de encapsulación

En primer lugar se determinó la eficacia de la encapsulación obtenida durante el procedimiento descrito, para ello se tomaron 1 g de cápsulas recién formadas y se resuspendieron en 9 mL de citrato de sodio al 1% mediante agitación suave a temperatura ambiente para favorecer la desintegración de las mismas (Figura 23). Una vez disueltas completamente, se procedió a la determinación del contenido en ufc/g de cápsula, correspondientes al número de microorganismos viables encapsulados.

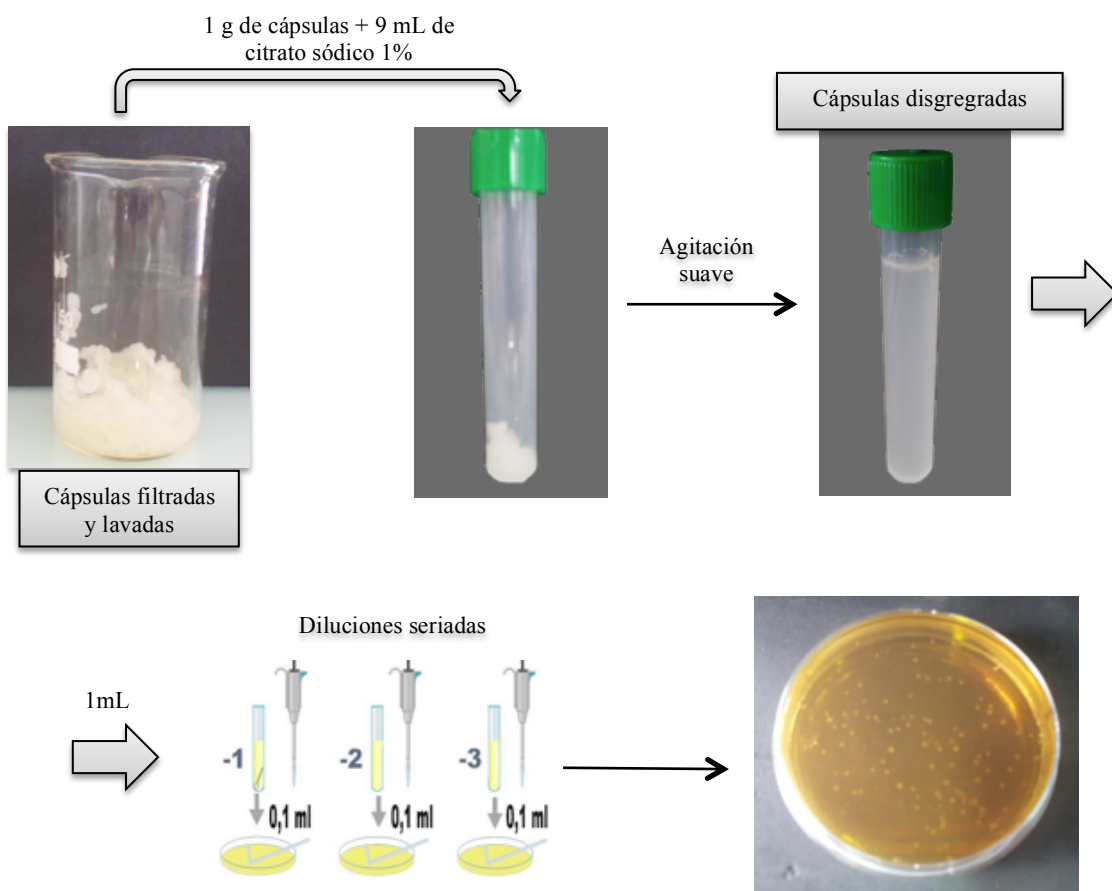


FIGURA 23: Procedimiento para determinar la eficacia de encapsulación

La eficacia de la encapsulación se calculó utilizando la siguiente ecuación (Reid y col., 2005; Sandoval- Castilla y col., 2009):

$$\text{Eficacia} = (A/B) \times 100$$

Donde:

A: UFC/g de cápsula \times g de cápsula totales/mL de suspensión polimérica después de la encapsulación.

B: UFC/mL en la suspensión polimérica antes de la encapsulación.

3.2.5. Resistencia de las células encapsuladas a los jugos gástricos

Uno de los objetivos de la encapsulación consiste en proteger al microorganismo de su paso por el estómago y permitir su liberación en el intestino para poder ejercer los correspondientes mecanismos de acción. Por ello, se procedió a la determinación de la resistencia de *L.acidophilus* a las condiciones gástricas simuladas y el grado de liberación posterior en los jugos intestinales, pudiendo comprobar así el efecto protector de los materiales y método de encapsulación aplicados.

Para estudiar la resistencia de los microorganismos encapsulados a las condiciones del tracto gastrointestinal se utilizó un modelo in vitro para simular químicamente las condiciones fisiológicas de este entorno. La composición de los jugos gástrico e intestinal simulados se ajustó al protocolo descrito por Salazar y col (2009) (Tabla 7).

TABLA 8: Composición de los jugos gástrico e intestinal.

COMPOSICIÓN	
Jugo Gástrico Simulado (JGS)	Jugo Intestinal Simulado (JIS)
Cloruro de sodio (125mM) KCl (7mM) (Panreac) NaHCO ₃ (45mM) (Sigma-Aldrich) Pepsina (3g/L) (Sigma-Aldrich)	Bilis Bovina (0,3% p/v) (Sigma-Aldrich) Pancreatina (0,1% p/v) (Sigma-Aldrich)
Ajuste de pH a 2 con HCl 1 M	Ajuste de pH a 8 con NaOH 0,1 N
Filtración a vacío con filtro estéril de 0,45 μ m (filtro Whatman 1001150)	

Paralelamente, se realizaron ensayos variando la composición del jugo intestinal para estudiar la influencia de sus componentes sobre la viabilidad microbiana, siguiendo el método descrito por Huang y Adams (2004). Concretamente, se evaluó la influencia de la bilis bovina.

Las cápsulas obtenidas con las diferentes combinaciones de alginato y almidón fueron sometidas al tratamiento gastrointestinal. Para llevar a cabo la simulación gastrointestinal se procedió de la siguiente manera: 1 g de cápsulas, se depositó en 9 mL de la solución de JGS. Las muestras fueron incubadas a 37 °C y 40 rpm durante 90 minutos en un agitador rotatorio donde los recipientes fijos giran sobre sí mismos perpendiculares al eje de modo que su contenido se desplaza de un extremo al otro del tubo, simulando así los movimientos peristálticos a lo largo del tracto gastrointestinal, tal y como se muestra en la figura 24.

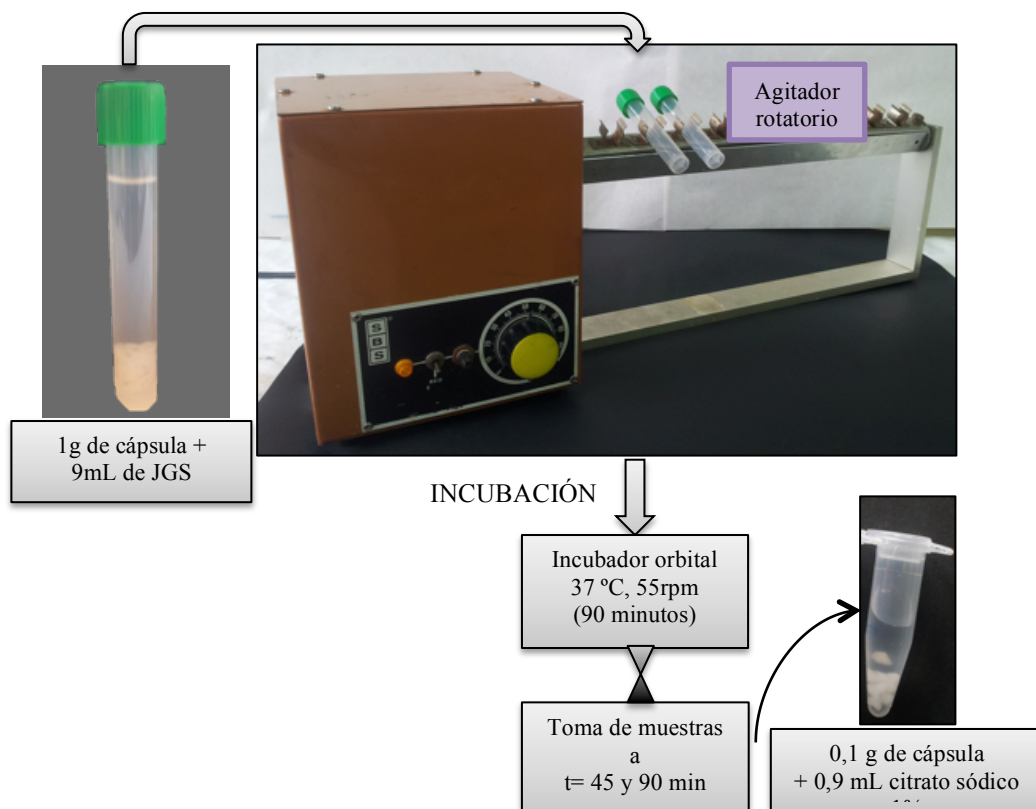


FIGURA 24: Tratamiento gástrico simulado

Tras 90 minutos de exposición al JGS las cápsulas se filtraron (Filtro Whatman 1001150), se lavaron con una solución salina de cloruro sódico al 0,7% (p/v) en la que permanecieron durante 10 minutos aproximadamente para eliminar los restos de jugos gástricos y, a continuación, se añadieron a tubos con 9mL de JIS, tal y como se muestra en la figura 25. Con el fin de comparar resultados, cápsulas y células libres fueron adicionadas directamente al JIS con y sin bilis bovina sin pasar por JGS.

Las muestras se incubaron del mismo modo que en el tratamiento gástrico y en las mismas condiciones de temperatura y agitación (37°C y 40 rpm) durante 120 minutos (Figura 26).

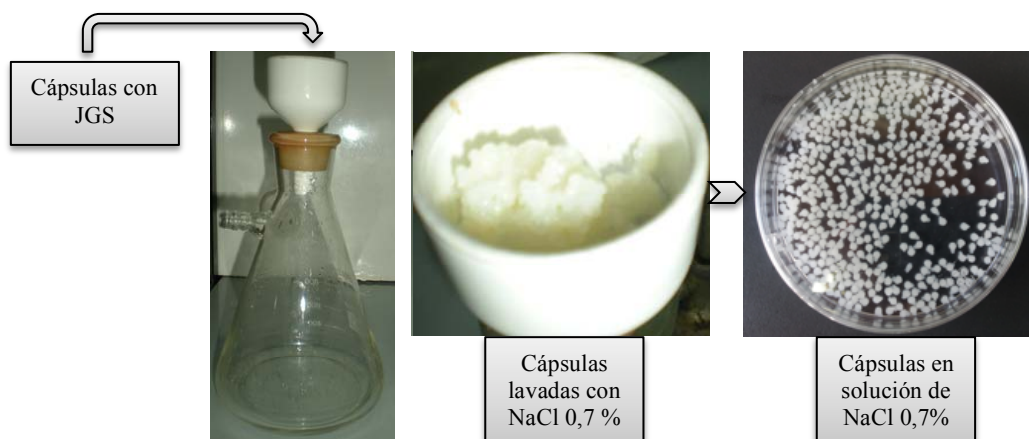


FIGURA 25: Limpieza de las cápsulas tras someterse a los jugos gástricos.

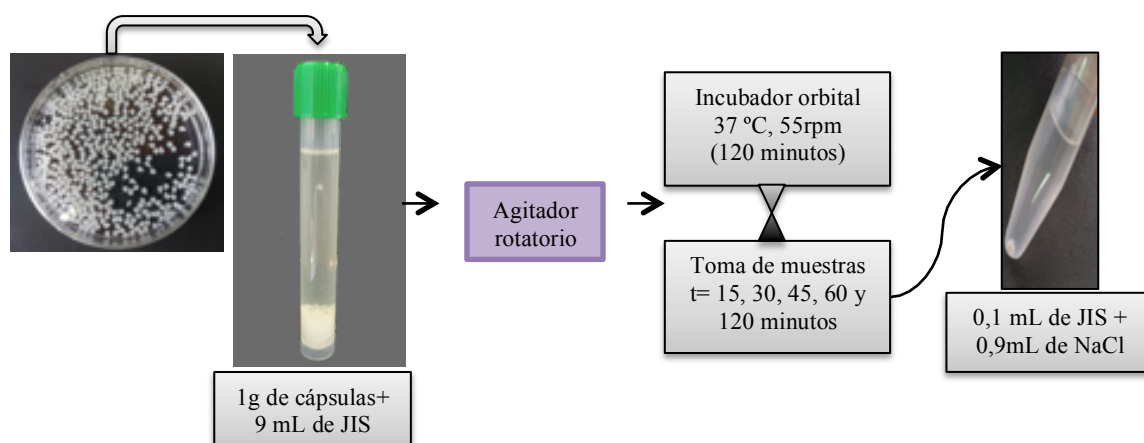


FIGURA 26: Tratamiento intestinal simulado.

El procedimiento que se llevó a cabo para determinar las ufc contenidas en las cápsulas durante los tratamientos gástrico e intestinal fue el siguiente: Por una lado, se tomaron 0,1 g de las mismas a diferentes tiempos del tratamiento gástrico simulado (a los 45 y 90 minutos) o del intestinal simulado (a los 15, 30, 45, 60 y 120), disgregándose posteriormente mediante agitación suave en 0,9 mL de citrato sódico al 1% (p/v). Por otro lado, para la determinación de las células liberadas en el jugo intestinal, se tomó 1 mL directamente del medio líquido a los 15, 30, 45, 60 y 120 minutos, el cual se centrifugó y se resuspendió en 1 mL de NaCl al 0,7 % (p/v).

Finalmente se determinó el número de células viables mediante siembra en placa, obteniéndose de ese modo las ufc/g de cápsula tras el tratamiento gástrico y las ufc/mL de JIS y las ufc/g de cápsula tras tratamiento intestinal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Curva de crecimiento

Para proceder a la microencapsulación, fue necesario estudiar la curva de crecimiento de *L. acidophilus*, con el objetivo de localizar el momento de mayor crecimiento y viabilidad.

El crecimiento de las poblaciones bacterianas, en un sistema de cultivo cerrado, está limitado por el agotamiento de los nutrientes o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Cuando las bacterias se siembran en el laboratorio, en medios de cultivo sólidos o líquidos, las condiciones se asemejan a las de un sistema cerrado, sin un aporte continuo de nutrientes. Si luego de sembrado el medio líquido se toman muestras a intervalos regulares, la representación gráfica de los datos (recuento de células viables/ tiempo) dará la curva de crecimiento característica.

En la figura 27 se muestra la curva de crecimiento de *L. acidophilus* en caldo MRS a 37°C, sin agitación y en condiciones de microaerobiosis (D.O y viabilidad celular) y la evolución del pH con el tiempo.

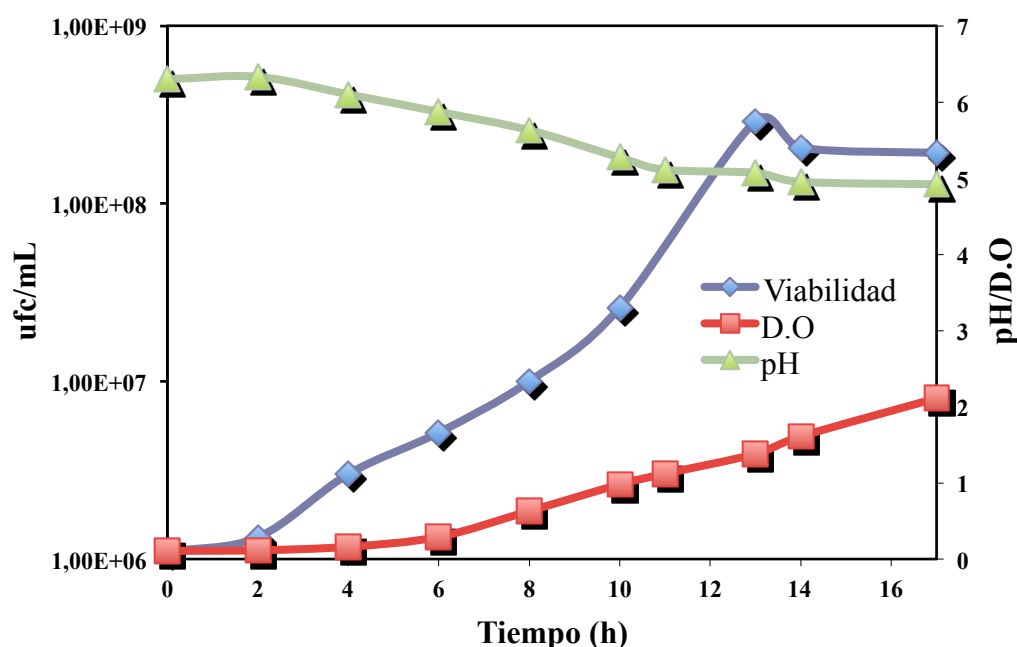


FIGURA 27: Crecimiento de *L. acidophilus* en MRS (D.O. y viabilidad celular) y evolución del pH con el tiempo.

Durante el cultivo de *L. acidophilus* se observó un descenso del pH de 6,3 a 4,8 aproximadamente. Esto pudo deberse al metabolismo bacteriano en el que se producen un conjunto de reacciones químicas y enzimáticas que le permiten al microorganismo mantenerse viable. Los *Lactobacillus* son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de diferentes ácidos (ácido láctico, ácido acético, etc). En el caso de *L. acidophilus*, al tratarse de un microorganismo homofermentador estricto, tiene la capacidad de actuar sobre la glucosa presente en el medio de cultivo dando lugar a ácido láctico. Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, presentando un óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Según la grafica, *L.acidophilus* alcanza su máximo desarrollo en un pH comprendido entre 5,1 y 6,1.

La D.O nos indicó el número total de células presentes en el medio, la cual fue aumentando progresivamente a medida que pasaba el tiempo. Durante el crecimiento bacteriano, se produce en primer lugar un aumento en el número de células viables, que coincide con la fase exponencial y, posteriormente, se produce una pérdida de células por muerte en la fase estacionaria que es balanceada por la formación de nuevas células. Cuando esto ocurre, el recuento total de células se incrementa levemente, aunque el recuento de bacterias viables permanece constante. Esto pudo observarse a través de la gráfica, que mostró un aumento en la D.O, cuando se inicia la fase estacionaria.

A partir de la gráfica se pudo deducir que la fase de adaptación del microorganismo a las condiciones de crecimiento tiene una duración de 2 horas, iniciándose la fase exponencial y de duplicación celular, a las 4 horas aproximadamente, hasta las 13 horas. A partir de las 13 horas se inicia la fase estacionaria y la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa y el número de bacterias viables disminuye rápidamente, por lo que la curva decae notablemente. Esta última fase no aparece reflejada en la gráfica porque la última toma de muestra se realizó a las 17 horas.

Teniendo en cuenta esto, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.1, se realizaron encapsulaciones con el pellet de células resultante de dos puntos de la curva de crecimiento de *L.acidophilus* :

- A las 11 horas y media de incubación (Fase tardía de la fase exponencial).
- A las 14 horas de incubación (Fase temprana de la fase estacionaria).

La concentración celular aproximada en ambos puntos fue de 10^8 ufc/ mL, a partir de la cual se llevó a cabo la microencapsulación en los diferentes ensayos. Aun obteniéndose en ambos puntos una concentración celular similar, el objetivo consistió en evaluar la influencia de la fase de crecimiento en la que se encuentra el microorganismo sobre la eficacia de encapsulación y la viabilidad de las microcápsulas formadas durante el tratamiento gastrointestinal.

4.2. Microencapsulación

La microencapsulación se realizó por el mecanismo de extrusión, utilizándose como materiales el alginato y el almidón en diferentes proporciones, tal y como se describe en el apartado 3. Se mantuvo la proporción de alginato y se variaron las proporciones de almidón, obteniéndose diferencias en cuanto a las propiedades físicas de las microcápsulas formadas y la eficacia de encapsulación.

4.2.2. Caracterización de las microcápsulas

4.2.2.1. Examen macroscópico

Las microcápsulas obtenidas a partir de las diferentes combinaciones de alginato de sodio y almidón fueron caracterizadas de acuerdo a sus propiedades físicas.

En cuanto a la *morfología*, se obtuvieron microcápsulas tanto esféricas como ligeramente ovaladas o en forma de “granos de arroz” de color blanquecino. Se observó que a medida que aumentaba la proporción de almidón, las microcápsulas adquirirían una forma más regular y esférica. Las microcápsulas con una concentración de almidón de 1,25% fueron las más irregulares y ovaladas. Independientemente de la concentración de almidón, se observó la presencia de una especie de “cola”, pudiéndose deber esto al tamaño/forma de la punta de micropipeta utilizada para la encapsulación.

En lo que se refiere al *tamaño*, las microcápsulas presentaron un tamaño de 2mm aproximadamente, observándose un tamaño ligeramente inferior en aquellas con mayor concentración de almidón. Según Shin y col. (2000), el alginato de sodio interacciona

con el almidón, inhibiendo su expansión, lo cual podría producir una reducción en el tamaño de las microcápsulas.

A partir de la figura 28 pueden observarse las propiedades descritas. Las fotografías muestran las cápsulas resultantes de las distintas mezclas poliméricas. Todas contienen la misma proporción de alginato, diferenciándose en la proporción de almidón.

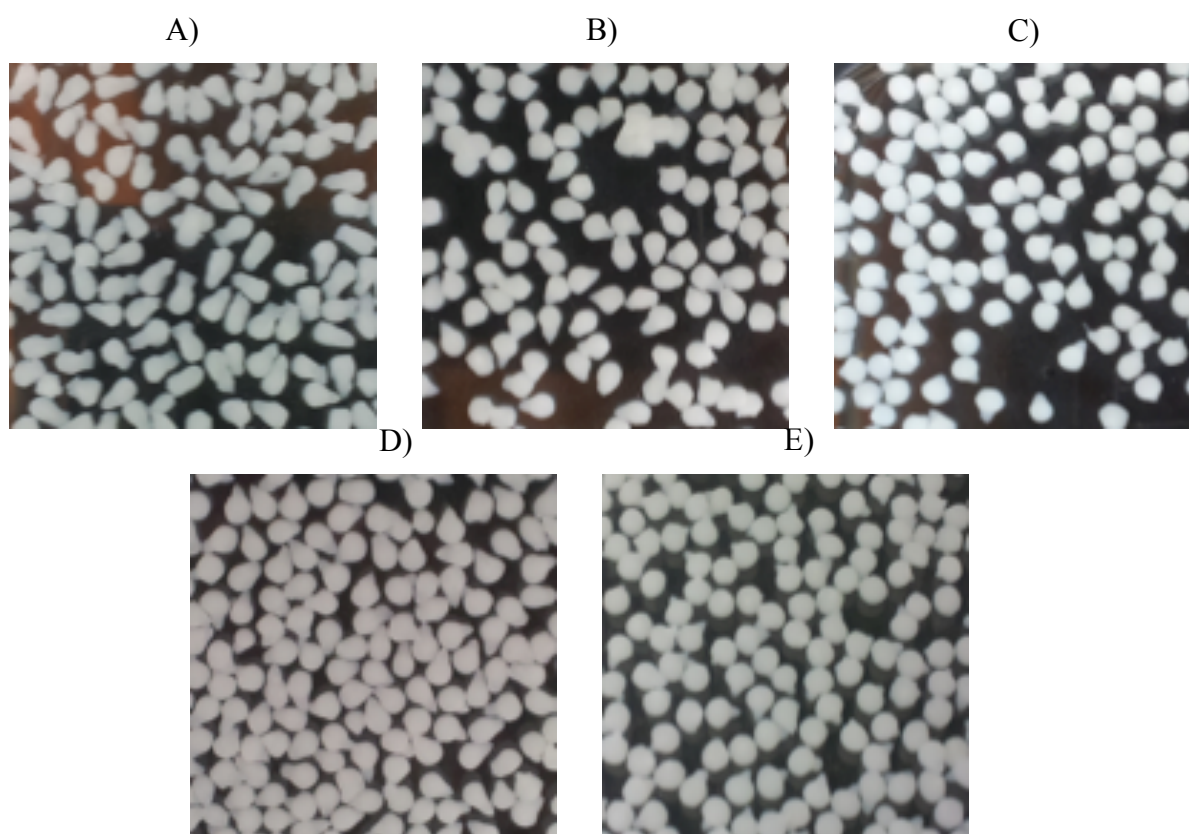


FIGURA 28: Cápsulas de alginato (1%) con distintas proporciones de almidón: a) 1,25% b) 1,75% c) 2 % d) 2,25% y e) 4,5%.

Además, a partir de las fotografías puede observarse que las cápsulas resultantes de una misma proporción de alginato y almidón, no presentan homogeneidad, principalmente se diferencian en su tamaño y en la presencia de mayor o menor “cola”. Esto puede deberse a la influencia de parámetros tales como la temperatura ambiente, la velocidad de goteo, la distancia entre la jeringa y la solución endurecedora de CaCl_2 . Se trata de parámetros que se relacionan directamente con la formación de las cápsulas que deben

controlarse durante la realización de los ensayos. Aunque se intentó trabajar en todo momento manteniendo las mismas condiciones experimentales, parámetros como la temperatura ambiente fueron diferentes para cada ensayo. Estas variaciones dentro del mismo tipo de microcápsula, dificultaron las comparaciones.

En cuanto al *peso*, Sultana y col. (2000), observaron que el peso de las microcápsulas con un 2% de alginato aumentaba conforme aumentaba la proporción de almidón hasta un 2%. En cambio, observaron que microcápsulas formadas por un 4% de almidón presentaban un peso menor. En el presente trabajo se determinó el peso total de las microcápsulas formadas en cada ensayo y no se realizaron medidas individuales de cada microcápsula. De esta manera, pudo observarse que el peso total de las microcápsulas formadas por almidón al 4%, resultó ser ligeramente superior al de las microcápsulas con 1,25% de almidón. En el primer caso, un peso total que osciló entre 12 ± 1 g y, en el segundo caso, entre $9,5 \pm 0,5$.

En cuanto a la *resistencia*, se observó que el aumento en la concentración de almidón daba lugar a microcápsulas más robustas, más resistentes a la fragmentación. Esto pudo apreciarse claramente cuando se llevó a cabo la disgregación de las mismas para determinar la eficacia de encapsulación.

4.2.2.2. Examen microscópico

A partir del examen realizado por estereomicroscopia fotónica, se compararon tamaño y forma de las microcápsulas con un 2 % y 4,5 % de almidón. También, se compararon éstos parámetros tras someter las cápsulas al tratamiento gastrointestinal, lo cual se explicará más adelante.

Se realizó un análisis microscópico utilizando dos tipos de luces: luz de reflexión y luz de transmisión. Las fotografías tomadas permitieron realizar medidas del diámetro y la longitud de las microcápsulas inmediatamente después de ser obtenidas por extrusión. La figura 29 muestra un ejemplo de una de las fotografías tomadas, en la que aparece reflejado la forma en que se determinaron la longitud (L) y el diámetro (D). Se trata de una microcápsula formada por 1% de alginato y 2% de almidón, con dimensiones de 2,1 mm de diámetro y 2,4 mm de longitud. Se observaron diferencias entre las microcápsulas formadas por un 2% de almidón y las que contenían un 4,5% de almidón.

Las formadas por un 4,5 % de almidón presentaron un diámetro ligeramente inferior, de 2,02 mm. Sin embargo, una longitud superior, de 2,07 mm que puede atribuirse a la tensión superficial generada cuando las pequeñas gotas salen a través de la punta de micropipeta. Cuanto mayor es la concentración de almidón, las gotas tienden a retenerse más en la punta de micropipeta, siendo el resultado la formación de una “cola superior”, cuando finalmente se separan de la misma para caer sobre la solución de CaCl_2 .

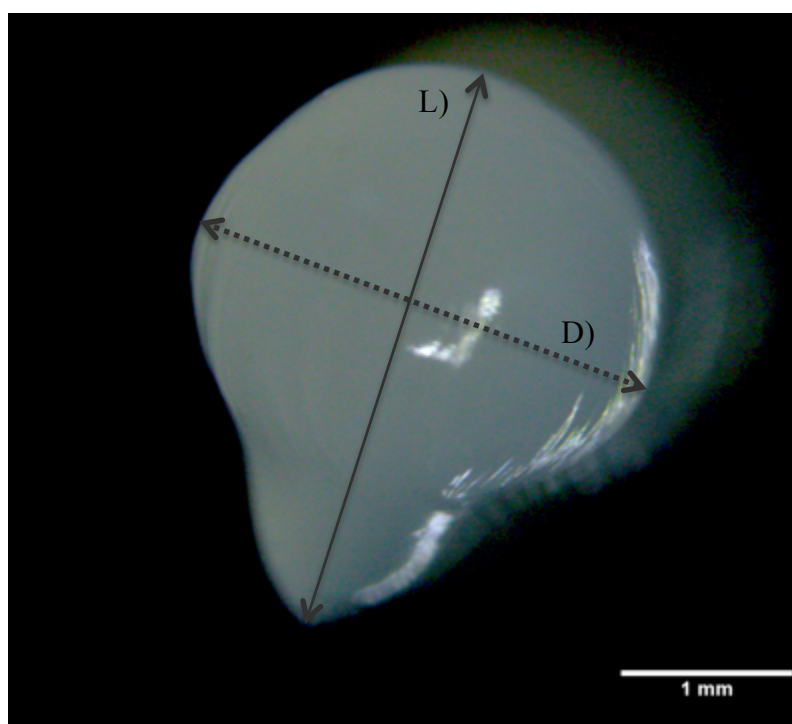


FIGURA 29: Estereomicroscopía fotónica (Luz de reflexión) de una microcápsula de alginato (1%) y almidón (2%) realizada por el mecanismo de extrusión.

Además de permitir comparar microcápsulas con distintas proporciones de almidón, el análisis a través del microscopio demostró que independientemente de esto, todas las microcápsulas tienen forma de bombilla, presentan una superficie prácticamente lisa, sin pliegues, grietas o irregularidades y que no se distinguen en ellas zonas con distinto color.

4.2.2.3. Firmeza y pegajosidad de las microcápsulas

A partir de geles formados según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.4 se realizó un análisis de la textura, con el objetivo de evaluar la influencia del almidón en las características texturales de las microcápsulas. En concreto, se compararon la firmeza y la pegajosidad de los distintos geles. Tanto la firmeza como la pegajosidad se miden en gramos, teniendo en cuenta que el equipo analiza estas propiedades texturales en función del tiempo, la fuerza y la distancia.

A continuación, la figura 30 muestra la gráfica en la que aparecen representadas la firmeza y la pegajosidad de uno de los geles analizados. Se observan dos picos, el valor positivo representa la firmeza y el valor negativo la adhesividad.

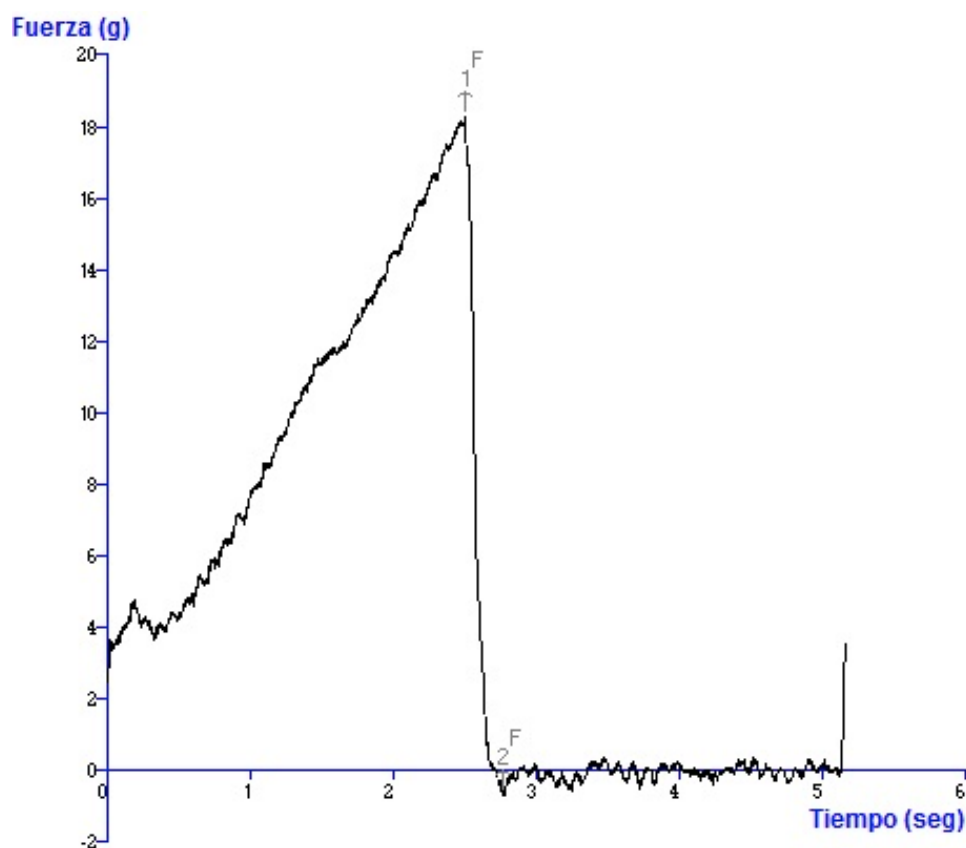


FIGURA 30: Determinación de la firmeza (F1) y la pegajosidad (F2) de un gel de alginato y almidón (1 %: 1,25%).

En la tabla 8 pueden observarse las diferencias de firmeza y pegajosidad de los diferentes geles ensayados, con los valores promedio y la desviación estándar.

TABLA 9: Firmeza y pegajosidad en geles con distintas proporciones de alginato y almidón

Gel (alginato: almidón) (%)	Firmeza (g)	Pegajosidad (g)
1: 1,25	18,7 ± 4,5	-0,56 ± 0,11
1: 1,75	17,1 ± 1,3	-0,69 ± 0,20
1: 2,00	19,1 ± 1,1	-0,61 ± 0,18
1: 2,25	23,6 ± 4,2	-0,10 ± 0,92
1: 4,5	23,3 ± 1,6	-1,30 ± 0,95

Se observa que a medida que aumenta la proporción de almidón, aumentan ligeramente la firmeza y la pegajosidad. No se observan diferencias significativas en la firmeza entre el gel 1:2,25 y 1:4,5, lo cual puede deberse a una falta de sensibilidad por parte del equipo o a que la combinación de alginato y almidón alcanzan un máximo en la proporción 1:2,25. Otra opción sería considerar un fallo a nivel experimental durante la preparación de los geles.

El alginato de sodio cuando interacciona con las sales de calcio forma un gel. La formación de este gel se explica mediante el modelo denominado ‘egg box’ o caja de huevos (Morris y col., 1978). El almidón podría tratarse de un coadyuvante que se intercala en la caja de huevos formada por el alginato, pudiendo así aumentar la firmeza. Por otra parte, el aumento de la pegajosidad puede deberse a la mayor retención o absorción de agua por parte del almidón. En este sentido, para concentraciones de almidón de 2,25% y 4,5 % los valores de adhesividad presentan un error experimental demasiado alto, incluso habiendo realizado 6 réplicas. Por tanto, no se puede corroborar el comportamiento de estos dos tipos de geles, aunque parece que el aumento en la proporción de almidón provoca a su vez una mayor pegajosidad.

4.2.3. Eficacia de la encapsulación

4.2.3.1. Efecto del contenido en almidón

La finalidad fue conocer la influencia de las distintas proporciones de alginato de sodio y almidón sobre la eficacia de encapsulación (A/B x100) de *L.acidophilus*. Para ello, se determinaron:

- Las células retenidas en las microcápsulas recién formadas por mL de mezcla polimérica: ufc/ mL de solución polimérica después de la encapsulación (A). Y se relacionaron con:
- La cantidad de células inoculadas inicialmente por mL de la solución de encapsulación: ufc/ mL de solución polimérica antes de la encapsulación (B).

Se siguieron el procedimiento y los cálculos indicados en el apartado 3.2.5. Para la determinación de A, fue necesario conocer el peso total de cápsulas formadas en cada ensayo (Tabla 9).

TABLA 10: Eficacia de encapsulación para mezclas alginato (1%)/almidón con distintas proporciones.

Alginato- Almidón (%)	UFC/g de cápsula	g de cápsula totales	A	B	Eficacia de encapsulación (%)
1: 1,25	2,99x10 ⁹	12 ±1	1,30x10 ⁹	1,99x10 ⁹	69,39
1: 1,75	4,19x 10 ⁹	12 ±1	1,98x10 ⁹	2,92x10 ⁹	66,58
1: 2	1,88x10 ⁹	12 ±1	9,79x10 ⁸	1,5x10 ⁹	65,27
1: 2,25	2,01x10 ⁹	12 ±1	1,11x10 ⁹	1,73x10 ⁹	64,93
1: 4,5	1,39x10 ⁹	9,5 ± 0,5	7,17x10 ⁸	1,4 x10 ⁹	51,21

La figura 31 representa la eficacia de encapsulación obtenida para cada proporción de almidón.

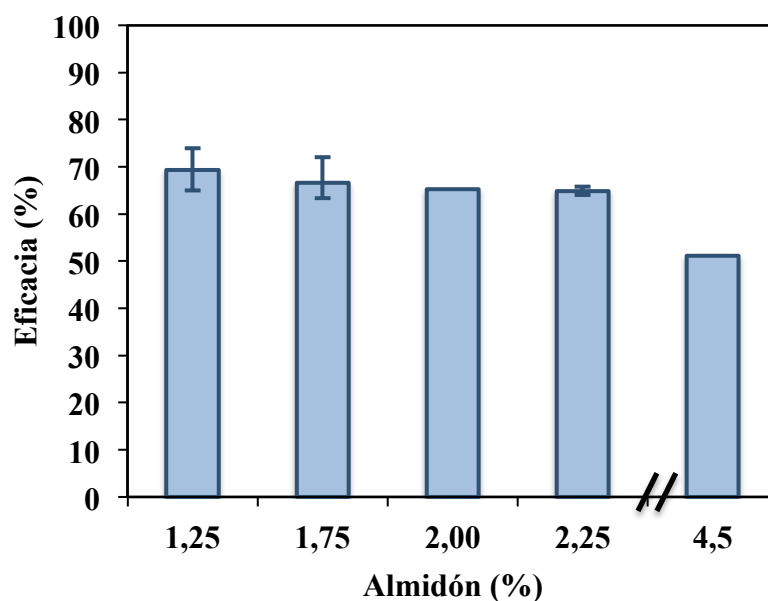


FIGURA 31: Eficacia de encapsulación de *L. acidophilus* en mezclas alginato (1%) con distintos porcentajes de almidón.

En la grafica no aparece representada la barra de error para las mezclas poliméricas con un 2 % y un 4,5 % porque se descartó una de las réplicas. La mezcla polimérica con la mayor eficacia de encapsulación fue la formada por un 1% de alginato y un 1,25 % de almidón, con una eficacia de encapsulación cercana al 70%. La menor eficacia de encapsulación se dio con una proporción de almidón de 4,5 %. Éstos valores son normales al compararlos con otros trabajos de investigación en donde la eficacia de encapsulación se mantiene en torno al 60- 65 % (del Valle, 2012). Sin embargo, se han encontrado valores de eficacia superiores en otros trabajos cuando la proporción de alginato era del 2%, siendo en este caso la eficacia de encapsulación del 91% (Guillén, 2010).

La gráfica muestra una ligera tendencia a la disminución de la eficacia conforme aumenta la proporción de almidón. Este comportamiento puede ser atribuido a que el aumento en la proporción de almidón puede disminuir el espacio físico en el interior de la cápsula.

Existen estudios que demuestran el aumento de la eficacia conforme aumentan tanto la proporción de alginato como la de almidón, por lo que se considera que puede resultar importante la relación entre las proporciones de ambos polímeros. Sultana y col. (2000)

observaron una mayor eficacia de encapsulación en microcápsulas de alginato al 2% a medida que el peso de las mismas aumentaba por adición de almidón en cantidades entre el 0 y el 2%. Sin embargo, los mismos autores observaron que la cantidad de células viables encapsuladas disminuyó en torno a dos órdenes de magnitud, cuando el almidón se encontraba en cantidades superiores al 2%, por lo que la eficacia de encapsulación fue menor.

4.2.3.2. Efecto de otros parámetros

Según Reid y col. (2005), la eficacia de encapsulación depende de:

1. La pérdida de células en la solución de cloruro de calcio, lo cual depende a su vez de la integridad física del material de encapsulación y de la velocidad de formación de gel.
2. La pérdida de viabilidad dentro de las propias cápsulas.

Se realizaron distintos ensayos con el objetivo de estudiar la influencia de distintos parámetros sobre la eficacia de encapsulación:

- **Volumen encapsulado (MRS)**

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.3 se procedió a inocular el doble de volumen de MRS para iniciar la encapsulación, es decir, partir de un volumen de 200 mL de MRS en lugar de partir de un volumen de 100 mL, manteniendo la misma cantidad de alginato y almidón. El objetivo fue aumentar la biomasa para iniciar la microencapsulación y ver la relación de este aumento con la eficacia de encapsulación. En base a los resultados obtenidos, puede deducirse que la cantidad de células encapsuladas no es directamente proporcional a la cantidad de células inoculadas inicialmente para llevar a cabo la microencapsulación, por lo que depende de otros aspectos. Esto puede observarse en la figura 32, en la que aparecen reflejadas la cantidad inicial de células en la solución de encapsulación y las células retenidas en las microcápsulas, para los distintos volúmenes de MRS empleados como inóculo. Se observa una ligera disminución de la eficacia al aumentar la cantidad de inóculo, pasando del 60 al 40%, aproximadamente. Este hecho puede atribuirse a que las microcápsulas pueden presentar una capacidad límite, pudiendo llegar a saturarse si la concentración microbiana es muy elevada.

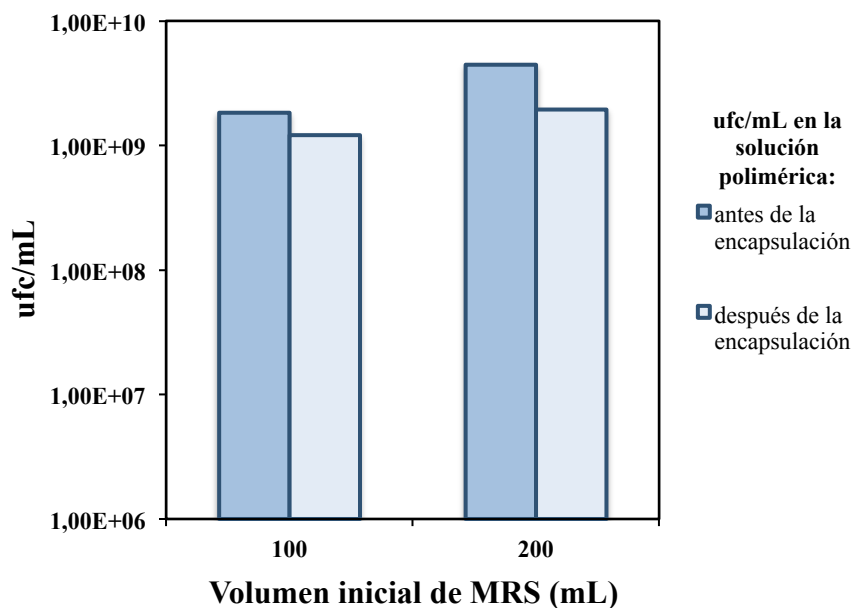


FIGURA 32: Cantidad de células retenidas en las microcápsulas (1:1,25) en función del volumen de inóculo en la solución de encapsulación.

- **Homogeneidad de las cápsula:**

Durante el procedimiento de encapsulación, se sacaron cápsulas a diferentes tiempos. Habitualmente, el tiempo de formación de las microcápsulas (goteo sobre la solución de CaCl_2) oscilaba entorno a las 2 horas. Transcurrido este tiempo, se procedía al endurecimiento de las mismas durante 30 minutos en la solución de CaCl_2 , tal y como se describe en la metodología. Siguiendo el procedimiento habitual de encapsulación, se sacaron cápsulas a los 30 y 80 minutos y se determinaron posteriormente las ufc/g de cápsulas en cada caso. La finalidad fue evaluar el comportamiento de los microorganismos en la suspensión de alginato y almidón. Se pensó que si éstos se depositaban en el fondo del tubo de microencapsulación, las microcápsulas resultantes podrían tener una mayor concentración microbiana. Esto se traduciría en una mayor eficacia de encapsulación. Sin embargo, el recuento de ufc/g de cápsulas no mostró diferencias significativas en las distintas cápsulas. Se observa una ligera tendencia al aumento que puede deberse a un mayor tiempo de contacto con la solución de endurecimiento (Figura 33).

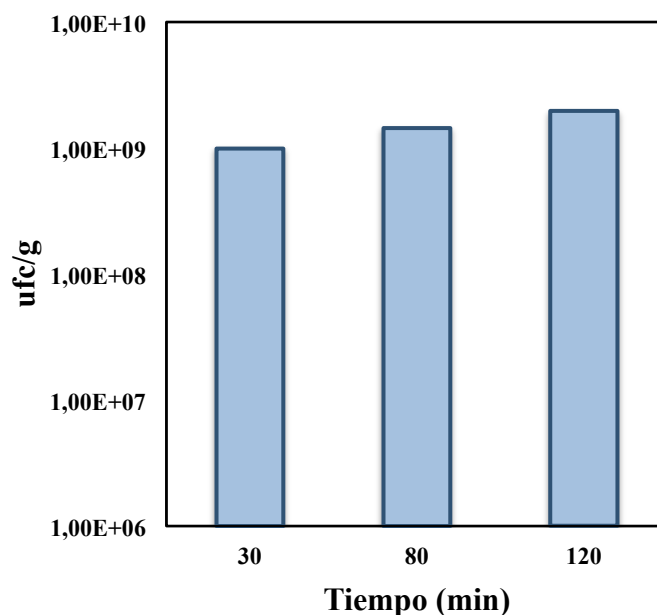


FIGURA 33: *ufc/g de cápsulas con 1,25 % de almidón, a distintos tiempos del procedimiento de encapsulación.*

- **Lavado con CaCl₂ tras la encapsulación:**

El lavado con CaCl₂ se realizó para eliminar la posible presencia de células microbianas en la superficie o sobresaliendo de las microcápsulas. Se comparó la eficacia de encapsulación en cápsulas lavadas con CaCl₂ y cápsulas no lavadas y no se obtuvieron diferencias significativas. Al mismo tiempo, se determinó la cantidad de células viables en la solución de CaCl₂, considerándose que las células no encapsuladas pudieran estar en dicha solución. Sin embargo, los resultados mostraron ausencia de microorganismos en la solución. Por tanto, teniendo en cuenta que la eficacia no es del 100% y, que los microorganismos no se encuentran en el interior del CaCl₂, existe la posibilidad de que se produzca una pérdida de viabilidad en el interior de las propias cápsulas, lo cual fue estudiado por Reid y col. (2005).

- **Fase de crecimiento del microorganismo:**

Se obtuvo el pellet de células para iniciar la microencapsulación sacando muestra a diferentes tiempos de la curva de crecimiento, tal y como se indica en el apartado 4.1. Se pretendió ver si la fase en la que se encuentra el microorganismo en su curva de crecimiento podría afectar a su viabilidad en el interior de las cápsulas y, en

consecuencia, a la eficacia de encapsulación. Para poder realizar comparaciones, se las proporciones de alginato y almidón al 1 y 1,25 % fueron las mismas en ambos casos. A partir de los resultados se dedujo que la eficacia es similar, independientemente si los microorganismos se encuentran en su fase exponencial o estacionaria. Se comparó la eficacia (Figura 34).

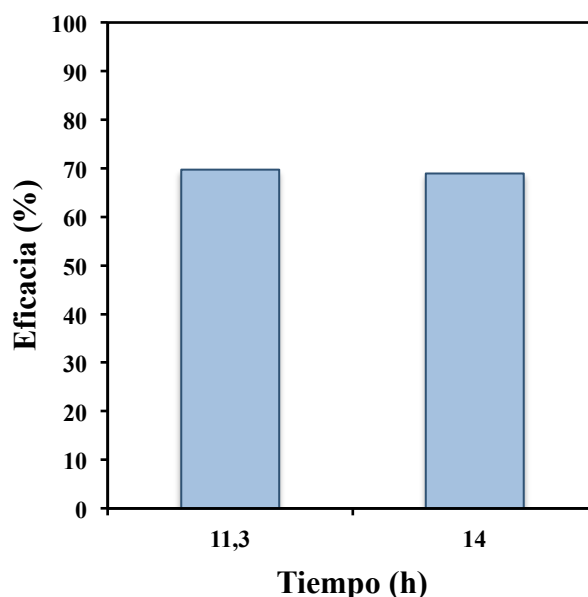


FIGURA 34: Eficacia de encapsulación a distintos tiempos de la curva de crecimiento microbiana.

4.3. Tratamiento gastrointestinal

Tras el estudio del proceso de encapsulación, se analizó el comportamiento de las microcápsulas obtenidas en condiciones gástricas e intestinales simuladas. Se evaluó el grado en que se puede reducir la muerte de los microorganismos durante el paso por el estómago y controlar su liberación en el tracto intestinal, con el objetivo de que se mantengan metabólicamente estables, activos y funcionales.

4.3.2. Comportamiento de las microcápsulas en el jugo gástrico simulado (JGS)

Las microcápsulas formadas por alginato son sensibles al ambiente ácido (Mortazavian y col., 2008), lo cual no es compatible para su resistencia al paso por el estómago, además son porosas, suponiendo esto un defecto ya que lo que se pretende es proteger a

las células microbianas de su entorno. Por este motivo, las investigaciones más recientes se centran en mezclar el alginato con otros compuestos y en el presente trabajo se estudia la incorporación del almidón en distintas proporciones.

Es importante destacar que la composición de los jugos utilizados para realizar la simulación del tratamiento gastrointestinal difiere mucho de unos autores a otros. Para la simulación gástrica, muchos autores solamente utilizan NaCl, con el correspondiente ajuste de pH con HCl (Leo y Heo., 2000), sin embargo, muy pocos utilizan enzimas (Charteris y col., 1998; Michida y col., 2006). Lo mismo ocurre con el jugo intestinal para el que algunos autores utilizan diferentes concentraciones de NaCl, con diferentes concentraciones de sales biliares (Mandal y col., 2006), pero raramente adicionan pancreatina (Michida y col., 2006). Por lo tanto, es difícil realizar comparativas entre estudios ya que la viabilidad de los microorganismos puede verse más o menos afectada en función de la ausencia o presencia de alguno de éstos componentes, por ejemplo, la pepsina, y también, en función de la concentración en la que se incorporan.

En el presente trabajo, para simular el JGS se aplicó el protocolo descrito por Salazar y col. (2009) tal y como se indica en el apartado 3.2.5. Se determinó el grado de protección que ejercen las diferentes mezclas de alginato y almidón sobre las células microbianas contenidas en su interior durante 90 minutos de exposición al JGS, ya que es el tiempo de vaciado de aproximadamente el 80% del contenido del estómago.

4.3.2.1. Efecto del contenido en almidón

Partiéndose de un experimento de referencia, en el que las proporciones de alginato y almidón fueron de 1% y 1,25 %, respectivamente, se realizaron pruebas modificando la proporción de almidón, con el objetivo de conseguir una mezcla de ambos polímeros que permitiera la mayor supervivencia de los microorganismos durante su paso por los jugos gástricos. Para todos los casos, se trabajó con *L.acidophilus* en su fase temprana de la fase estacionaria.

La figura 35 muestra la viabilidad microbiana en las microcápsulas durante el experimento de referencia tras 90 minutos de tratamiento gástrico.

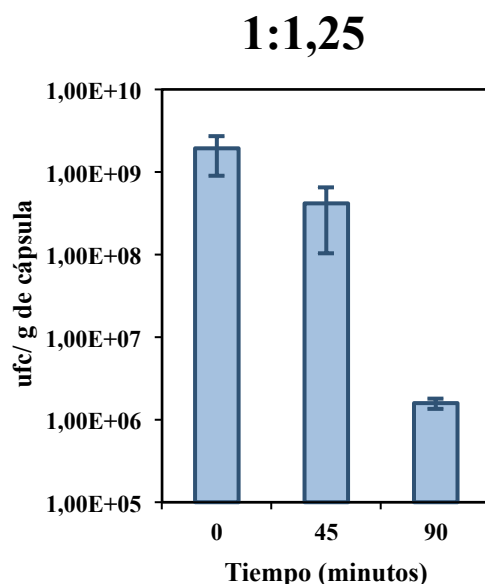


FIGURA 35: Concentración de células viables retenidas en microcápsulas con 1% de alginato y 1,25 % de almidón durante el tratamiento gástrico simulado.

La gráfica muestra que los microorganismos mantienen cierta viabilidad durante los primeros 45 minutos de exposición al JGS, con un descenso de aproximadamente 1 log. Sin embargo, puede observarse que se produce una reducción microbiana mucho mayor una vez transcurridos 90 minutos, concretamente de 3 log. Teniendo en cuenta esto, la cantidad de células retenidas que mantuvieron la viabilidad con respecto a la cantidad inicial fue del 20% aproximadamente a los 45 minutos y casi nula a los 90. Esto puede atribuirse al bajo pH del estómago junto con la acción antimicrobiana de la pepsina, teniéndose en cuenta que su máxima actividad se encuentra a pH 1,5- 2,0. Sin embargo, los probióticos tienen la capacidad de resistir pH más elevados, a partir de 3- 4 (Vinderola y col., 2011), siendo el pH óptimo de crecimiento de *L. acidophilus* por encima de 5,5.

Teniendo en cuenta estos resultados, se prepararon las microcápsulas con proporciones superiores de almidón, para poder comparar la viabilidad en el interior de las mismas con respecto al experimento de referencia. En la figura 36 se muestra la evolución del contenido de células viables en las microcápsulas durante el tratamiento gástrico.

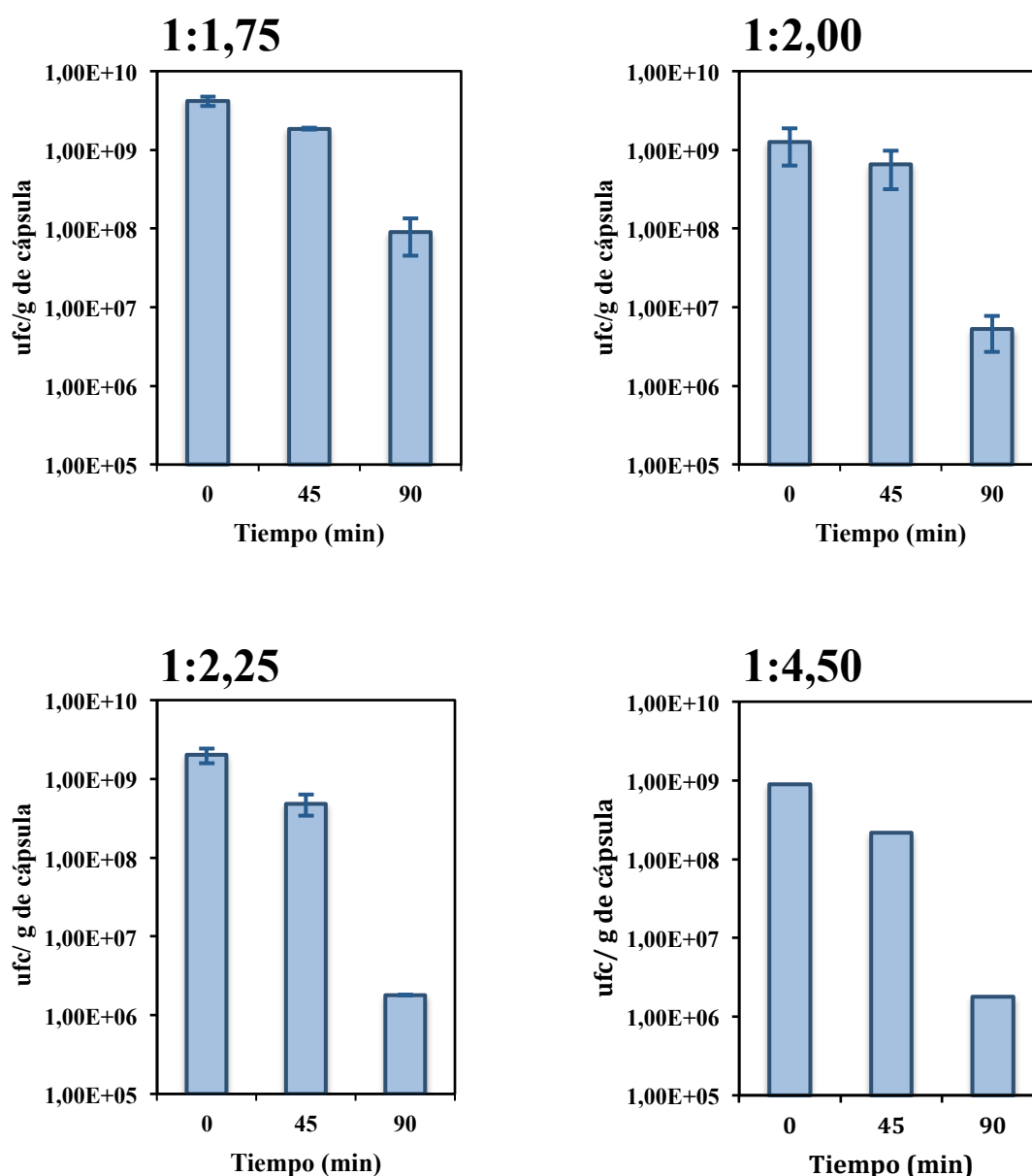


FIGURA 36: Evolución de la concentración celular en el interior de las microcápsulas con distintas proporciones de almidón durante el tratamiento gástrico.

A partir de la figura puede deducirse que para todas las proporciones de almidón ensayadas se produjo muerte celular, siendo ésta más acusada al pasar de 45 a 90 minutos.

En el mejor de los casos, con una proporción de 1: 2, se mantuvieron viables en torno a 6×10^8 ufc/g de cápsula durante 45 minutos de exposición a los jugos gástricos, partiéndose de una concentración inicial de 1×10^9 ufc/ g de cápsula. En el peor de los casos, se llegaron a valores entre $4,86 \times 10^8$, siendo la concentración inicial de 2×10^9

ufc/g de cápsula y con una proporción 1:2,25. Aun así, la supervivencia fue mayor con respecto al experimento de referencia. En cambio, tras 90 minutos de exposición al JGS, la cantidad de células viables descendió notablemente en todos los casos, a órdenes inferiores a 10^7 , a excepción de la proporción 1:1,75 que se mantuvo por encima. La reducción microbiana en la proporción 1:2,25 para los 90 minutos fue prácticamente la misma que la del experimento de referencia, en torno a 1×10^6 .

Para evaluar el efecto del almidón sobre la supervivencia del *L. acidophilus* durante el tratamiento gástrico, se construyó la figura 37, donde se representa la muerte celular con respecto al tiempo en función de la proporción de almidón.

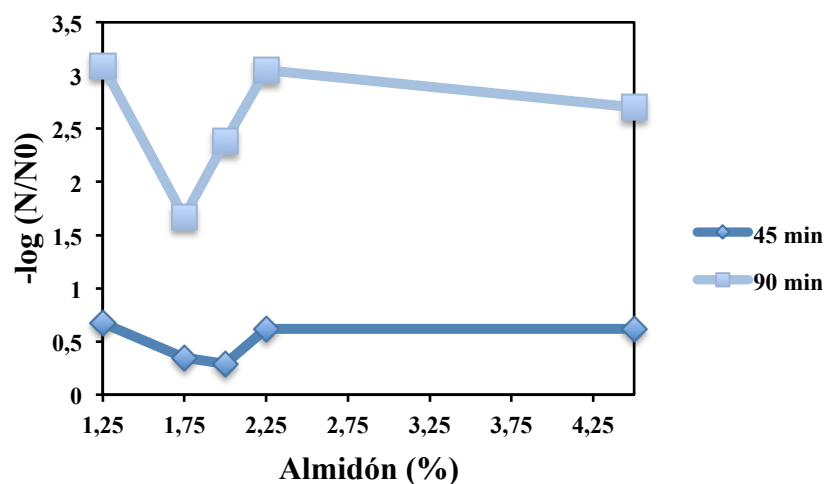


FIGURA 37: Muerte celular a los 45 y 90 minutos en función de la proporción de almidón.

Donde $-\log(N/N_0)$ representa la muerte celular, siendo N la cantidad de células viables bien a los 45 o 90 minutos y N_0 la cantidad de células viables antes de someterse a los jugos gástricos. Cuanto mayor sea $-\log(N/N_0)$, menor es la supervivencia de los microorganismos.

A partir de la figura se observa que disminuye la muerte celular con proporciones superiores al 1,25 % de almidón. Se produce un aumento en la viabilidad microbiana directamente proporcional a la cantidad de almidón, hasta concentraciones del 2%, pero a concentraciones superiores el comportamiento varía y no existe tal correlación. Una posible explicación es que existe una relación óptima de alginato/almidón y llega un

momento en el que el alginato se satura, y no tiene capacidad para captar más almidón. Como consecuencia, la cápsula se vuelve más porosa, aumentando así la muerte celular. Llegado ese punto, no existe el efecto protector de la relación alginato/ almidón, solamente el efecto del almidón. Por ello, cuando las concentraciones de almidón superan el 2,25%, parece que la muerte celular se mantenga constante, incluso con tendencia a la disminución. Esto puede deberse al aumento en la rugosidad de la superficie de las mismas por un elevado contenido en almidón, que bloquea los poros y evita la entrada del contenido ácido del estómago en su interior.

El comportamiento en función de la proporción de almidón es prácticamente el mismo para 45 y 90 minutos, siendo la pérdida de viabilidad mucho mayor en el segundo caso.

La mayor protección de las microcápsulas cuando se les incorpora almidón puede explicarse por el aumento en la rugosidad de la superficie de las mismas, que bloquea los poros y evita la entrada del contenido ácido del estómago en su interior, lo cual favorece la supervivencia de las bacterias probióticas (Kailasapathy, 2002). Además, el almidón no es atacado en el estómago por los enzimas, su degradación enzimática se inicia en la boca a partir de la amilasa salival y finaliza en el intestino con la amilasa pancreática. Aún así se ve afectado, aunque en menor grado, por la acidez.

Una reducción de 3log aproximadamente durante 90 minutos de exposición al JGS coincide con otros estudios. Sohail y col., (2011) obtuvieron una reducción logarítmica de 3 log en microcápsulas de alginato recubiertas de quitosano durante 90 minutos de exposición a JGS, siendo ésta más acusada cuando las microcápsulas no contenían quitosano, llegando a 5 log. Al igual que Ortacky y Sert, (2012), pero en este caso con microcápsulas de alginato incorporadas en el yogur. Sin embargo, Sultana y col., (2000, 2006) encapsularon a *L. acidophilus* con una mezcla de alginato y almidón y no observaron diferencias significativas en cuanto a su protección en condiciones gastrointestinales en comparación con las células libres. La utilización de otros agentes encapsulantes ha permitido una supervivencia mayor durante el JGS (Pedroso y col., 2012).

Teniendo en cuenta la baja tasa de supervivencia de los microorganismos en el interior de las microcápsulas, se procedió a determinar la cantidad de células viables en el jugo

gástrico simulado, para comprobar realmente si se había producido muerte celular por difusión de componentes gástricos hacia el interior de la microcápsula o los microorganismos se habían liberado. Como era de esperar, se observó ausencia de células viables en el JGS por lo que, si se habían liberado, murieron una vez se expusieron a éste.

4.3.2.3. Efecto de la fase de crecimiento del microorganismo

Con el objetivo de estudiar la influencia de la fase de crecimiento en la que se encuentra el microorganismo sobre su viabilidad en el interior de las microcápsulas expuestas a los jugos gástricos, se procedió a la encapsulación de *L. acidophilus* en su fase de crecimiento exponencial. Así, se pudo comparar la muerte de celular en este caso con respecto al experimento de referencia. El resultado se muestra en la figura 38, en la que aparece representada la muerte celular del microorganismos según su fase de crecimiento, a los 45 y 90 minutos del tratamiento gástrico.

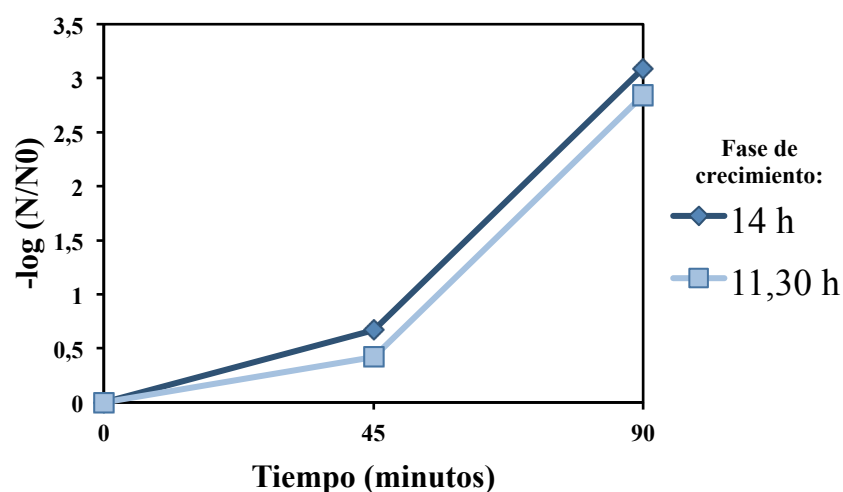


FIGURA 38: Efecto de la fase de crecimiento del microorganismo sobre su viabilidad en las microcápsulas (1:1,25) expuestas al JGS.

A partir de la figura se puede corroborar que existe una mayor viabilidad microbiana en el interior de las microcápsulas cuando *L. acidophilus* se encuentra en la fase tardía de la fase exponencial. Esto puede atribuirse al hecho de que durante esta fase el microorganismo presenta su mayor actividad y se mantiene estable. Sin embargo, en la fase estacionaria se estanca su crecimiento y debido al agotamiento de nutrientes y,

además, se generan productos tóxicos resultantes de su metabolismo, lo cual puede afectar a su estabilidad.

4.3.2.2. Caracterización de las microcápsulas tras la exposición al JGS

Además de evaluar la viabilidad en el interior de las microcápsula durante su paso por el JGS, se observó su apariencia transcurridos los 90 minutos, mediante un análisis visual directo y, paralelamente, mediante microscopía fotónica.

A continuación, se muestran las fotografías obtenidas sin el uso de la microscopía. (Figura 39). Se trata de microcápsulas con una proporción 1:2,25 expuestas al JGS durante 90 minutos.

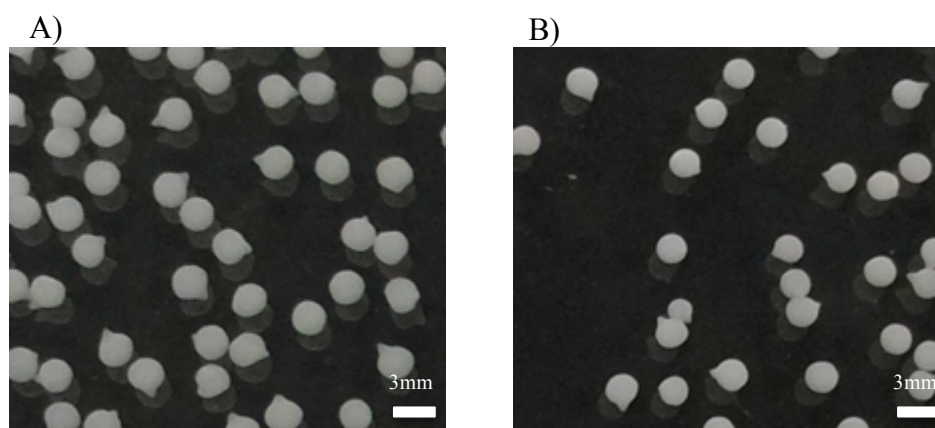


FIGURA 39: *Tamaño de las microcápsulas con 1% de alginato y 2,25% de almidón a) antes y b) tras 90 minutos de exposición al JGS.*

A partir de las fotografías puede observarse una ligera disminución en el tamaño de las microcápsulas. Durante la experimentación, también se observó una ligera disminución del peso de las mismas.

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a su análisis mediante microscopía fotónica, con el objetivo de encontrar además de diferencias en el tamaño, posibles cambios en la textura o morfología de las mismas debido a la exposición al JGS. Se realizaron fotografías a microcápsulas con proporciones 1:2 y 1:4,5.

Una vez realizado el análisis microscópico y obtenidas las fotografías, solamente pudieron compararse el diámetro y la longitud. Hubiera sido necesario un examen a

través de microscopía electrónica de barrido (SEM) para poder localizar diferencias significativas en su estructura e integridad.

La figura 40 muestra los dos tipos de microcápsulas fotografiadas, antes y durante el tratamiento gástrico.

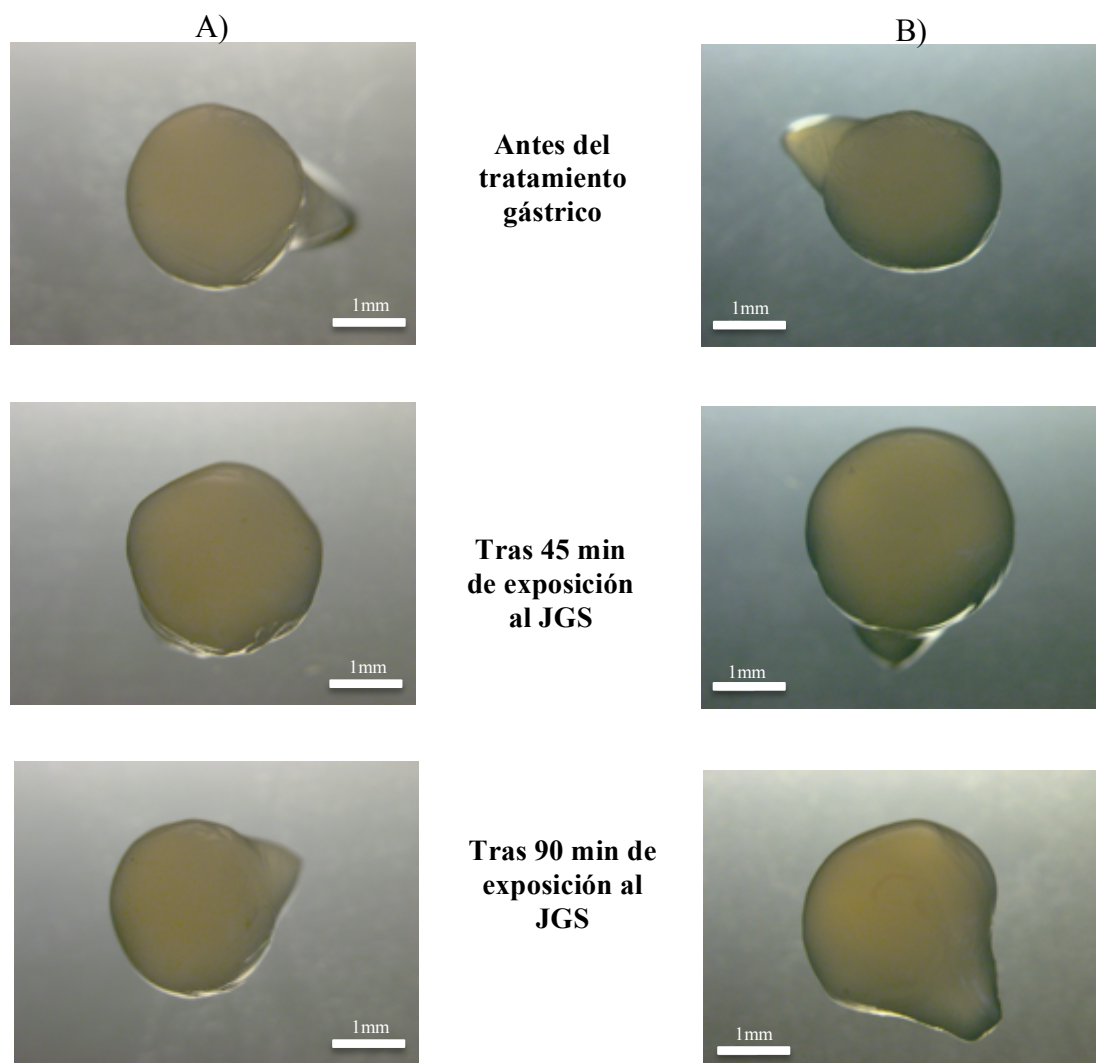


FIGURA 40: Microfotografías de microcápsulas con una proporción de a) 1:2 b) 1:4,5, a distintos tiempos de exposición al JGS. Estereomicroscopía fotónica. Luz de transmisión.

En las microcápsulas 1:2, se observa una tendencia al aumento del *diámetro* durante los primeros 45 minutos de exposición al JGS, en cambio, a tiempo 90 la microcápsula vuelve a su diámetro original. Lo mismo ocurre en las microcápsulas 1:4,5, en donde

parece que el aumento de diámetro sea algo superior con respecto a las otras. Esto último puede deberse a que cuando mayor es concentración de almidón, mayor absorción de agua se produce, lo que se traduce en un hinchamiento mayor. De ahí, que éstas presenten una disminución menos acusada en el diámetro una vez transcurridos 90 minutos.

En cuanto a la *longitud*, en ambos casos se observa una disminución conforme pasa el tiempo de exposición al JGS. El resultado es la obtención de microcápsulas con menores dimensiones durante el tratamiento gástrico, debido a la pérdida de masa y estructura.

Esto puede observarse mejor a partir de la figura 41 donde se representan gráficamente los diámetros (A) y las longitudes (B) obtenidas para cada caso en función del tiempo.

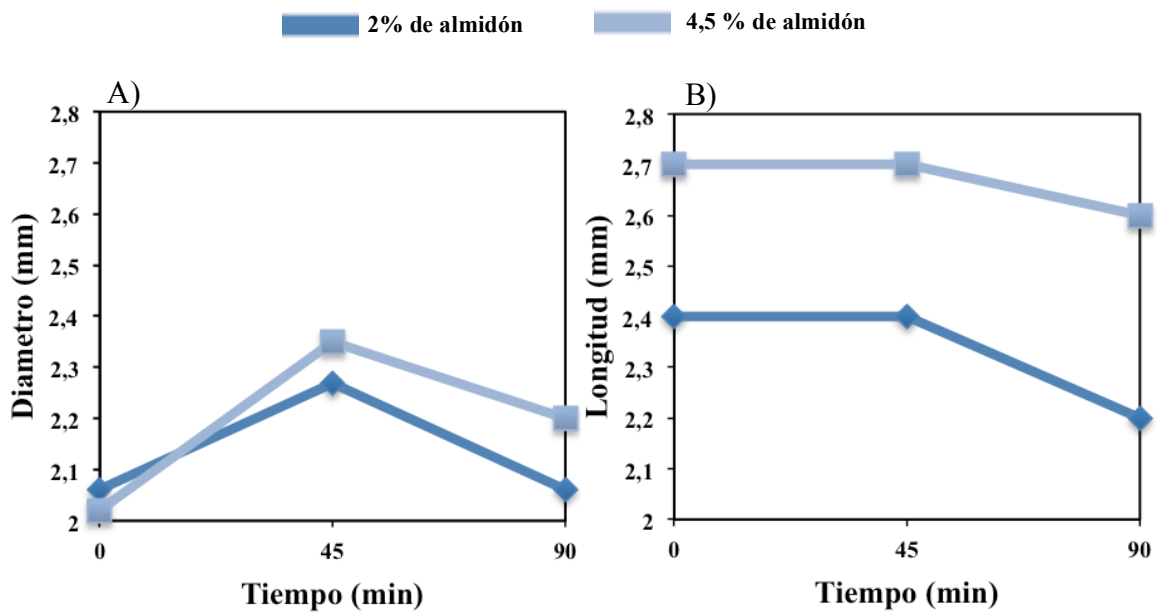


FIGURA 41: a) Diámetro y b) longitud de microcápsulas con distintas proporciones de almidón sometidas al JGS.

4.3.3. Comportamiento de las microcápsulas en el jugo intestinal simulado (JIS)

Tras el tratamiento gástrico, las microcápsulas fueron filtradas y lavadas con una solución salina estéril, como se describe en el apartado 3.2.5. En este sentido, se estudió la posible influencia del lavado con NaCl sobre la viabilidad microbiana en el interior de las microcápsulas, observándose que la cantidad de células viables se mantenía constante.

Posteriormente, se introdujeron en el jugo intestinal simulado siguiendo el protocolo utilizado por Salazar y col. (2009) al que estuvieron expuestas 120 minutos ya que los alimentos permanecen en el intestino de 2 a 5 horas (Cook y col., 2012). En este caso se determinó la cantidad de células microbianas viables presentes en el jugo intestinal a distintos tiempos, es decir, la cantidad de células liberadas de las microcápsulas. Cabe recordar que el efecto beneficioso de los probióticos se asocia principalmente al hecho de que mantengan su viabilidad una vez alcancen el intestino delgado.

Los resultados mostraron ausencia de células viables en el jugo intestinal para todas las proporciones de almidón empleadas, en un intervalo de diluciones que incluyó la solución madre (Figura 42).

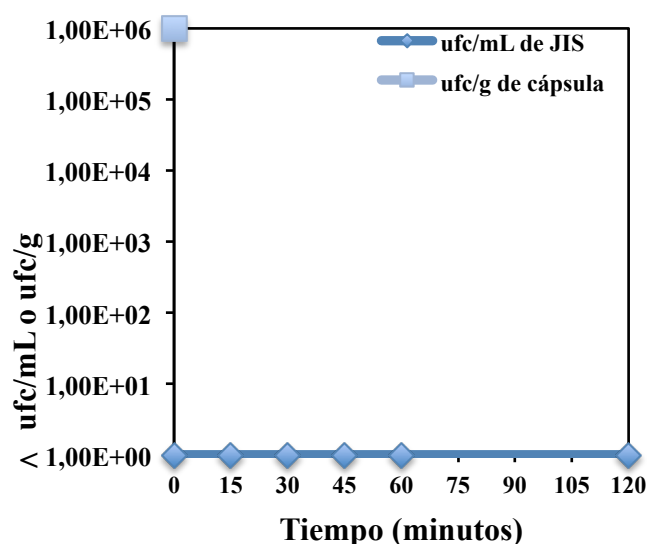


FIGURA 42: Concentración inicial de células microbianas en las microcápsulas tras el JGS y evolución de su liberación en el JIS.

Debido a este hecho, se procedió a estudiar cuáles podrían ser los principales factores causantes de las bajas tasas de supervivencia del *L. acidophilus* en el JIS.

Se pensó que, probablemente, no aparecían células libres en el JIS porque su liberación era lenta, y éstas se encontraban en el interior de las microcápsulas, con una velocidad de muerte superior a la velocidad de liberación, por lo que no da tiempo a que se acumulen en el JIS y son indetectables. Otra posibilidad es que las células se liberen más rápidamente pero una vez entren en contacto con el líquido intestinal, mueran. Teniendo en cuenta estas dos consideraciones, se procedió, por un lado, a determinar la cantidad de células viables en las microcápsulas y, por otro lado, a estudiar la influencia de los componentes del jugo intestinal simulado sobre la viabilidad microbiana.

4.3.3.1. Viabilidad en las microcápsulas

Para determinar la viabilidad de las células en el interior de las microcápsulas sometidas al JIS, tras el tratamiento gástrico previo, se tomaron muestras de las mismas en intervalos de 15 minutos durante una hora y, también a las 2 horas de exposición al jugo intestinal. Se observó ausencia total de células viables en su interior. Por lo que se pensó que las células en el interior de la microcápsula no eran capaces de soportar las condiciones intestinales.

4.3.3.2. Efecto del tratamiento gástrico previo sobre la viabilidad de los microorganismos en condiciones intestinales

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento gástrico previo sobre la viabilidad de las células en el intestino se introdujeron cápsulas directamente sobre jugos intestinales simulados, para comprobar realmente el comportamiento de las células en estas condiciones, independientemente de su paso por el JGS. La figura 43 muestra las reducciones logarítmicas obtenidas en cápsulas de proporciones 1:1,75 introducidas en el JIS, sin pasar por el tratamiento gástrico. A diferencia de cuando las células fueron sometidas previamente a los jugos gástricos, en este caso, se obtuvieron una cantidad importante de células viables en el interior de las microcápsulas, observándose una disminución microbiana de $2\log$.

Sin embargo, no se observó viabilidad en el JIS, pudiéndose deber esto a que las células no se liberan y mueren en el interior de la microcápsula conforme pasa el tiempo o, se

liberan y mueren una vez entran en contacto con los componentes del jugo intestinal, por lo que no pueden ejercer su efecto probiótico. Por ello, se procedió a estudiar la composición de los jugos intestinales para evaluar las posibles causas de la muerte celular de las mismas.

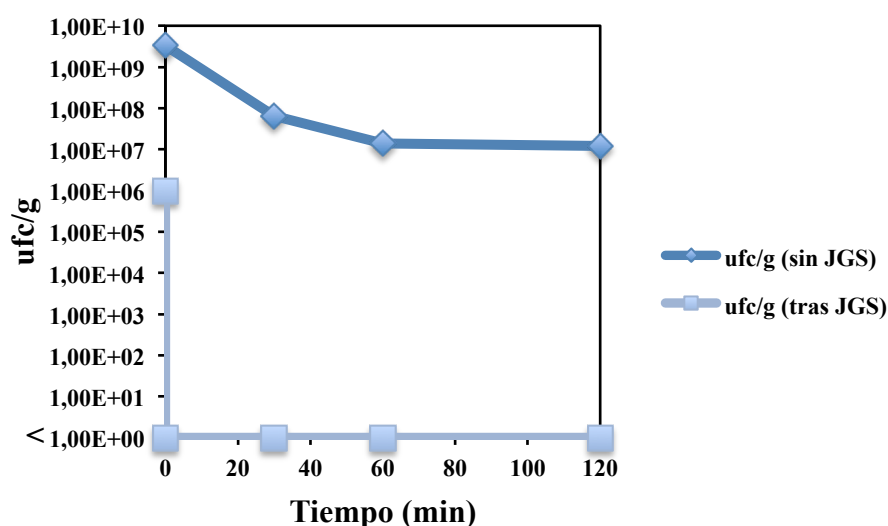


FIGURA 43: Viabilidad de *L. acidophilus* en microcápsulas (1:1,75) durante el JIS con o sin paso previo de las mismas por el JGS.

A la vista de estos resultados se dedujo que las células son capaces de resistir las condiciones intestinales gracias a la protección de la microcápsula. Sin embargo, el efecto protector se anula si existe un tratamiento gástrico previo. Lo que nos hace pensar, que el JGS afecta considerablemente a la resistencia de la microcápsula frente al ataque del JIS. Puede que las cápsulas estén muy dañadas y se vuelvan muy porosas.

Una posible explicación, por la cual no aparecen células viables en microcápsulas sometidas previamente a los JGS puede ser que, durante la exposición gástrica, se pierda de tal modo la integridad de la microcápsula, que cuando entra en contacto con el JIS, inmediatamente se produce la entrada de los componentes intestinales en su interior, por lo que las células se ven atacadas.

Cuando las microcápsulas no sufren un tratamiento gástrico anterior, mantienen su estructura y las células que contienen mantienen su viabilidad y presentan la capacidad

para liberarse y entrar en contacto con los jugos intestinales. El problema es que, una vez entran en contacto con éstos, mueren.

La figura 44 simula la integridad de las microcápsulas cuando se exponen o no a los jugos gástricos y posteriormente se incorporan en jugos intestinales:

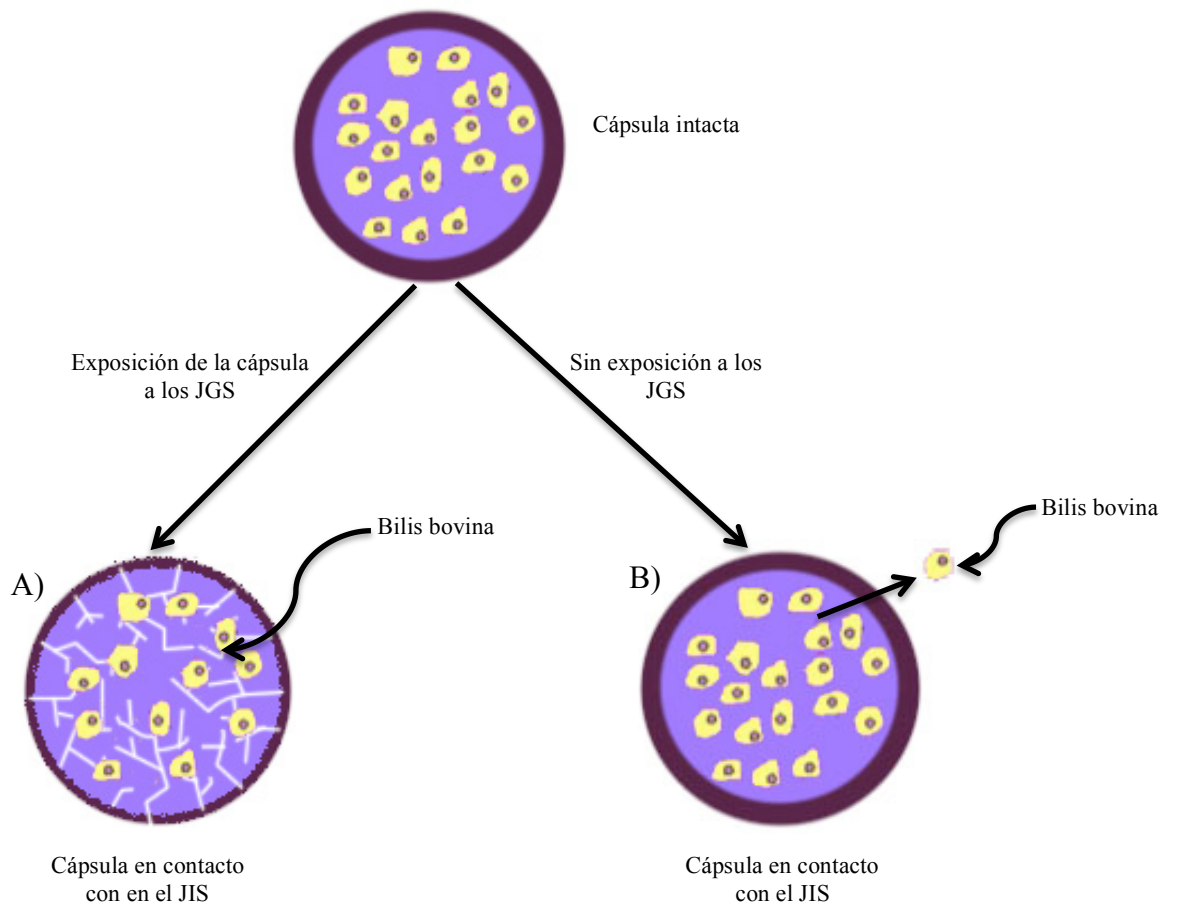


FIGURA 44: Cápsulas en contacto con el JIS tras su exposición a los JGS (a) y sin previa exposición a los mismos (b).

4.3.3.3. Influencia de la bilis sobre la supervivencia en células encapsuladas y libres

La influencia de la bilis sobre la viabilidad microbiana se estudió sometiendo las células libres y encapsuladas a dos tipos de jugos intestinales, con presencia (JIS 1) y ausencia de bilis bovina (JIS 2), según los métodos descritos por Huang y Adams (2004) (Tabla 11). En ambos casos, se omitió el paso por el JGS. Cabe destacar que la única diferencia entre JIS 1 y JIS 2 fue la presencia o no de bilis bovina, con el fin de evaluar el efecto de esta variable sobre la viabilidad celular.

TABLA 11: Composición de los JIS ensayados.

JIS 1	JIS 2
Pancreatina 0,1%	Pancreatina 0,1 %
Bilis bovina 0,3%	Sin Bilis Bovina
En solución de NaCl al 0,5% (p/v) a pH 8	
Filtración a vacío con filtro estéril de 0,45 μm (filtro Whatman 1001150)	

En el caso de los experimentos con microcápsulas, se evaluaron la cantidad de células presentes en el interior de las mismas a los 30, 60 y 120 minutos y, paralelamente, la liberación en los dos tipos de jugos intestinales. Se observó que cuando las microcápsulas eran sometidas a líquido intestinal con presencia de bilis, la viabilidad en el interior de las mismas disminuía considerablemente con el tiempo, produciéndose una disminución de 2log. Sin embargo, la ausencia de bilis se tradujo en una mayor viabilidad microbiana, con un descenso de solamente 1 log (Figura 45).

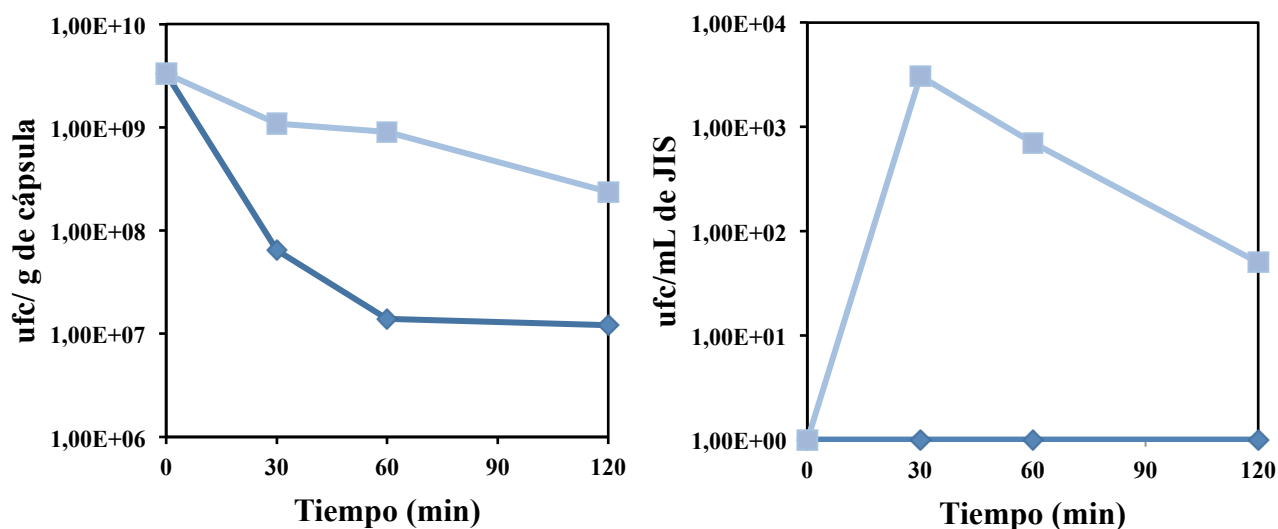


FIGURA 45: Viabilidad de *L. acidophilus* en a) el interior de cápsulas b) liberados de las cápsulas durante su exposición a distintos tipos de jugos intestinales; \blacklozenge (JIS 1: con bilis) \blacksquare (JIS 2: sin bilis).

Asumiendo que la muerte de *L. acidophilus* durante el tratamiento intestinal sigue una cinética de primer orden ($dN/dt = -k_d \cdot N$) se obtuvieron k_d $2,0 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ($r^2=0,96$) con bilis y k_d $9,1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ($r^2=0,94$) sin bilis, por lo que la presencia de un 0,3% de bilis tiene provoca tasas de muerte en torno a 4 veces superiores a las observadas sin bilis.

En cuanto a la liberación intestinal, no se obtuvo recuento de viables en el JIS 1 (con bilis); en cambio, se produjo liberación en el JIS 2 (sin bilis), siendo la cantidad de viables al final del tratamiento intestinal del orden de 10^2 ufc/mL.

La ausencia de bilis dio lugar a que se produjera liberación celular durante los primeros 30 minutos, durante los cuales, la concentración microbiana pasó de 0 a $3,05 \times 10^3$ ufc/mL. A partir de ese momento, se observó un descenso de 2 log, hasta una concentración de $5,00 \times 10^1$ ufc/mL. Por lo tanto, según estos resultados, la bilis es un parámetro clave para *L. acidophilus* y su inclusión en los jugos intestinales influye notablemente en la supervivencia de esta bacteria, pudiendo tener un impacto mayor que la pancreatina. Sin embargo, hay autores que han demostrado que *L. acidophilus* es mucho más tolerante a las sales biliares que otras especies (Buck y Gilliland, 1994, Gilliland y Walker, 1990).

Las sales biliares son detergentes naturales que facilitan la digestión y absorción de los componentes hidrofóbicos de los alimentos. Tienen naturaleza antimicrobiana lo cual se debe a su propiedad detergente que les permite disolver las membranas de las bacterias, inhibiendo su actividad gracias a su actividad anfifílica y afectando a su supervivencia a su paso por el entorno gastrointestinal (Madureira y col., 2011).

La influencia de la bilis también se estudió incorporando directamente las células libres en los dos tipos de jugos, para comparar la muerte celular con respecto a las células encapsuladas. Cuando las células libres se expusieron a los dos tipos de jugos, la viabilidad fue mayor en el caso del JIS 2 (Figura 46).

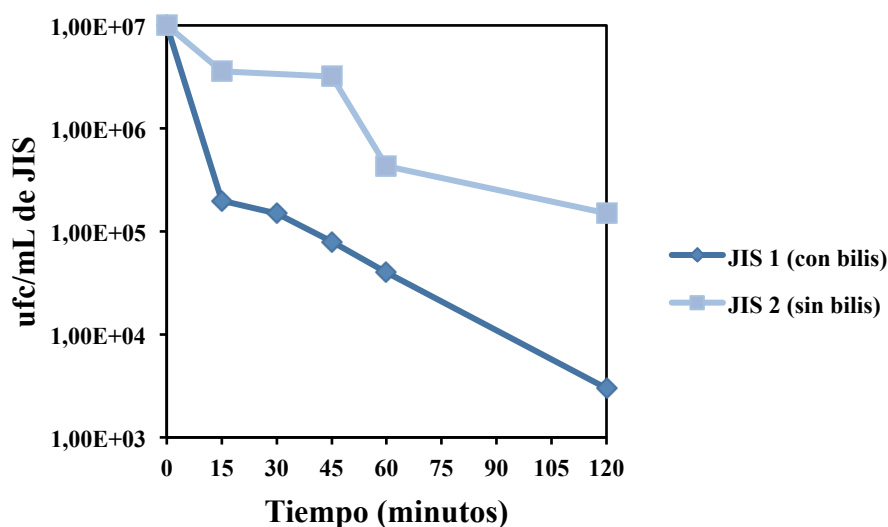


FIGURA 46: Células libres sometidas a distintos tipos de jugos intestinales.

En el JIS 1 la reducción microbiana fue de 4 log. En el JIS 2 se produjo una reducción de 2 log. Por lo que, se confirma que la bilis tiene una gran influencia sobre la viabilidad de *L.acidophilus*. Suponiendo de nuevo una cinética de muerte celular de primer orden ($dN/dt = -k_d \cdot N$) se observó que la constante de muerte celular sin bilis ($k_d = 3,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; $r^2 = 0,95$) es la mitad que en presencia de bilis ($k_d = 6,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$; $r^2 = 0,92$).

En este sentido, se demostró el grado de protección de las microcápsulas, al comparar la muerte celular de los microorganismos encapsulados y los inoculados directamente en el JIS 1, lo cual puede verse a partir de la figura 47. Se puede observar que la muerte celular es mayor cuando los microorganismos se encuentran libres que encapsulados, como era previsible. Durante los primeros 30 minutos, la viabilidad en ambos casos es similar, pero en el caso de las células encapsuladas, la reducción microbiana en el interior de la microcápsula, puede atribuirse al hecho de que se produzca liberación de las células en el líquido intestinal, como refleja la figura anterior (Figura 45). En el momento que se liberen, pasarán a comportarse de la misma manera que las células presentes en el medio que no contienen cápsula.

A partir de los 60 minutos, la viabilidad en el interior de las microcápsulas es considerablemente superior que la de las células libres.

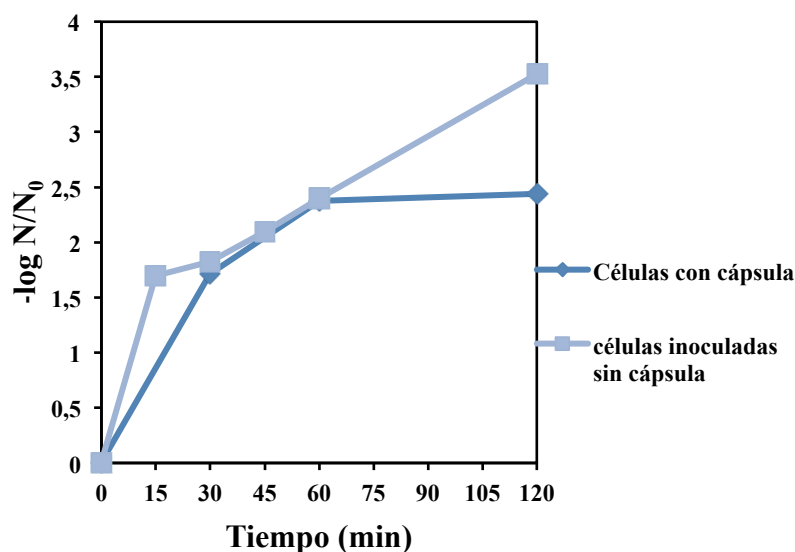


FIGURA 47: Células de *L.acidophilus* sin cápsula inoculadas directamente y encapsuladas sometidas al JIS 1.

Esto demuestra de nuevo que *L. acidophilus* es muy sensible a las condiciones intestinales que se simulan en el presente trabajo. A la vista de estos resultados, se compararon con otros estudios:

Microcápsulas de alginato cubiertas de alginato mejoraron la supervivencia de *L. acidophilus* en las sales biliares, con una reducción de 1,7 log durante 2 horas de exposición a jugos intestinales (Sohail y col., 2011). Pedroso y col., (2012) observaron que no se produce reducción microbiana en el JIS cuando las microcápsulas contienen un aceite vegetal como agente encapsulante. Ortacky y Sert (2012) vieron solamente una reducción de 1log en cápsulas de alginato incorporadas en el yogur. Sabikhi y col., (2010), mostraron una reducción de 5,57 y 2,16 log en células libres y encapsuladas de *L. acidophilus*, respectivamente, después de 3 horas de incubación con sales biliares al 2%. Kim y col., (2008) vieron que las tanto células libres como encapsuladas no pierden viabilidad durante 6 horas de exposición al JIS. Ranadherera y col., (2012) observaron una disminución entre 1-3 log en *L.acidophilus* incorporado en distintas matrices alimentarias.

4.3.3.4. Estado de las microcápsulas durante su paso por el jugo intestinal

Se evaluó la influencia del jugo intestinal sobre la apariencia física de las microcápsulas previamente expuestas a los JGS, observándose diferencias en función de la concentración de almidón (Figura 48).

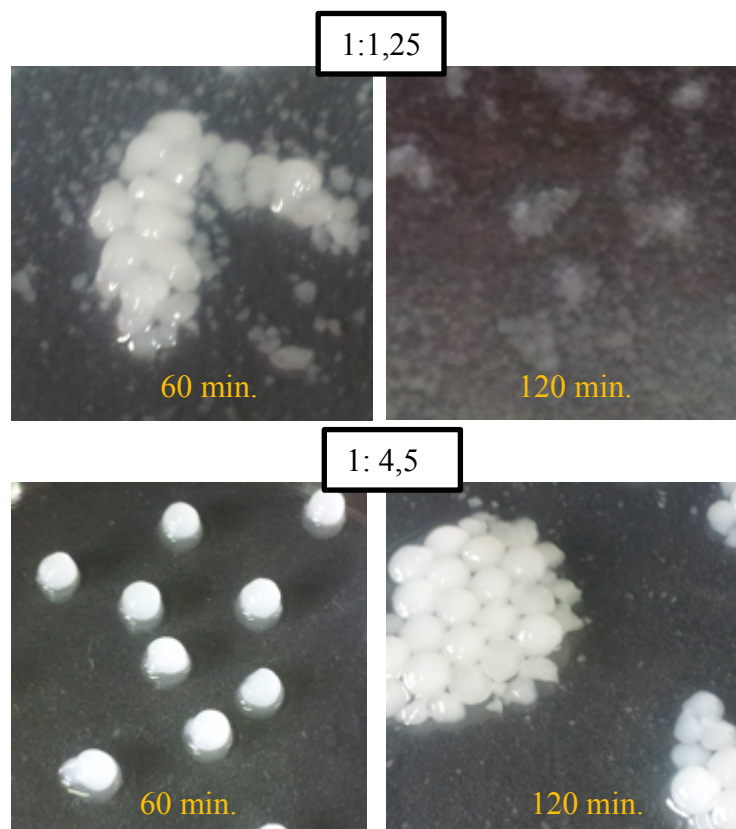


FIGURA 48: Estado de microcápsulas con distinta proporción de almidón durante la simulación intestinal.

Se compararon las mezclas poliméricas de mayor y menor proporción de almidón y se observó que las que contenían un 4,5 % presentaban una menor desintegración que las de 1,25 %. Éstas últimas, a los 60 minutos, aumentaron considerablemente de tamaño, y comenzaron a desintegrarse, siendo casi total la desintegración a los 120 minutos. Sin embargo, las microcápsulas formadas por una concentración mayor, aumentaron igualmente de tamaño a los 60 minutos, pero se desintegraron en menor medida tanto a los 60 como a los 120 minutos.

La desintegración de las microcápsulas que contienen las células probióticas permite que éstas se liberen y colonicen el tracto intestinal, confiriendo así beneficios importantes en el hospedador (Buddington, 2009). Cuando éstas pasan por el tracto

gastrointestinal humano, la desintegración se inicia por acción de los movimientos peristálticos del intestino. Luego, tienen una importante función los enzimas, en este caso, la amilasa pancreática actuaría sobre el almidón. Además de la amilasa, la pancreatina que se adiciona a los jugos intestinales, contiene lipasas y proteasas, por lo que actuarían en presencia de componentes lipolíticos y proteicos.

La razón por la que la desintegración es menor cuanto mayor es la proporción de almidón puede atribuirse a que disminuye el ratio enzima/sustrato, por lo que habrá una mayor cantidad de sustrato sobre la que debe actuar el enzima, por lo que disminuye su efectividad. El hinchamiento puede deberse a la absorción progresiva del agua presente en los jugos por parte del almidón a medida que pasa el tiempo.

4.4. Propuestas de continuación de trabajo

- Incorporación de las células encapsuladas en una matriz alimentaria para estudiar el posible efecto protector de dicha matriz en condiciones gastrointestinales. Evaluación sensorial del producto tras la incorporación de las microcápsulas.
- Aumentar la proporción de almidón en cantidades superiores a las de este trabajo, para ver hasta que punto puede ejercer un efecto protector sobre cápsulas de alginato.
- Realizar una doble capa de alginato y comparar el efecto protector de este tipo de microcápsulas con las formadas con una capa de alginato y distintas cantidades de almidón.
- Empleo de otros agentes encapsulantes (Cubiertas de quitosano...).

5. CONCLUSIONES

MICROENCAPSULACIÓN

Caracterización de las microcápsulas y eficacia de encapsulación

- Las microcápsulas con una proporción de almidón de 1,25% son las más irregulares y ovaladas, en forma de “granos de arroz”. A medida que aumenta la proporción de almidón, las microcápsulas se vuelven más regulares y esféricas, disminuye ligeramente su tamaño, y aumenta su firmeza y pegajosidad.
- Para todas las proporciones alginato/almidón ensayadas, las microcápsulas presentan una superficie lisa, sin pliegues ni grietas y en ellas no se distinguen zonas de distinto color. Se caracterizan por la presencia de una especie de “cola”.
- Las mezclas poliméricas utilizadas permiten alcanzar eficacias de encapsulación de hasta el 70%. La menor eficacia se ha obtenido para la mezcla polimérica alginato/almidón 1:4,5.
- La eficacia de encapsulación mejora cuando *L.acidophilus* es inoculado durante la fase tardía de la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, disminuye ligeramente cuando se aumenta la cantidad de inóculo (MRS) con el que se inicia la encapsulación.

TRATAMIENTO GASTROINTESTINAL

Jugos gástricos simulados

- Para todas las proporciones alginato/almidón estudiadas como encapsulantes se observa una reducción logarítmica en torno 2- 3 log al final del tratamiento gástrico, lo cual se encuentra dentro de los valores típicos encontrados en otros estudios.
- La mayor supervivencia tras 90 minutos de exposición a los jugos gástricos se ha producido con una proporción de almidón del 1,75%.
- Existe una mayor viabilidad microbiana en el interior de las microcápsulas cuando *L.acidophilus* se encuentra en la fase tardía de la fase exponencial.
- Durante el tratamiento gástrico, las microcápsulas experimentan un hinchamiento inicial a los 45 minutos (absorción de agua por parte del almidón) para revertir a su tamaño original o incluso por debajo de éste a los 90 minutos (ataque de los JGS a la integridad de la cápsula).

Jugos intestinales simulados

- Para ninguna proporción de almidón ensayada, ha habido células de *L. acidophilus* viables en los jugos intestinales tras paso previo por el jugo gástrico simulado, ni en el interior de la cápsula ni liberadas en el medio.
- El tratamiento gástrico afecta considerablemente a la resistencia de las cápsulas, anulando considerablemente el efecto protector de la mismas durante el tratamiento intestinal.
- La concentración de bilis en el JIS es un parámetro muy importante en la supervivencia de *L. acidophilus*, tanto dentro de las cápsulas como libres en el medio intestinal.
- Una posible vía para mejorar la supervivencia de *L. acidophilus* sería añadir una matriz alimentaria grasa.
- De entre todas las proporciones alginato/almidón que se han estudiado para la microencapsulación de *L. acidophilus*, ninguna sería útil para emplearla como encapsulante en un alimento que se comercialice como probiótico, ya que en ningún caso se consigue supervivencia del microorganismo en el intestino.

6. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A: UFC/g de cápsula \times g de cápsula totales/mL de suspensión polimérica después de la encapsulación.

B: UFC/mL en la suspensión polimérica antes de la encapsulación.

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

CE: Comunidad Europea.

cm: centímetros.

D: Diámetro.

d: dilución en la que aparecen las colonias.

D.O: Densidad Óptica.

g: gramos.

F1: Firmeza.

F2: Pegajosidad.

G: α - L- gulurónico.

IDF: International Dairy Federation.

JGS: Jugo Gástrico Simulado.

JIS: Jugo Intestinal Simulado.

M: molaridad.

JIS 1: jugo intestinal con bilis.

JIS 2: jugo intestinal sin bilis.

k_d : constante de muerte celular.

Kg: kilogramos.

L: Longitud.

log: logaritmo.

M: ácido β - D- manurónico.

min: minutos.

h: horas.

mL: mililitros.

mm: milímetros.

mM: milimolar.

MRS: De Man, Rogosa & Sharpe.

N: Normalidad.

n: número de colonias en placa.

N/N₀: Concentración de células viables final/ Concentración de células viables inicial

nm: nanómetros.

p: peso.

RD: Real Decreto.

rpm: revoluciones por minuto.

seg: segundos.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

L: *Lactobacillus*

SEM: microscopia electrónica de barrido.

TGI : Tractogastrointestinal.

UE: Unión Europea.

ufc: Unidades Formadoras de Colonias

v: volumen.

W/O: emulsión de agua en aceite.

W/O/W: Doble emulsión.

GRAS: Generally Recognized as Safe.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

WHO: World Health Organization.

xg: fuerza centrífuga.

λ : Longitud de onda.

μ L: microlitros.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I.U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, 68 (1), 275–280.
- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I.U., Fernando, L. (2000). Viability of microencapsulated Bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1946-1951.
- Anal, A.K., Singh, H., (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18 (5), 240–251.
- Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray- dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15(4), 399-409.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 625-651.
- Berrada, N, Lemeland, J, F., Laroche, G., Thouvenot, P., and Paia, M. (1991), *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science*, 74, 409-413.
- Buck, L. M., & Gilliland, S. E. (1994). Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *Journal of Dairy Science*, 77(10), 2925–2933.
- Buddington, R. (2009). Using probiotics and prebiotics to manage the gastrointestinal tract ecosystem. In: D. Charalampopoulos, R. A. Rastall (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (pp. 1-31). New York: Springer Science+Business Media.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder., M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467–483.

Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P. (2006). Effect of cryoprotectants, probiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39 (2), 203–211.

Champagne, C. P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Food Biotechnology*, 18, 184-190.

Champagne, C., Fustier, P. (2007b). Microencapsulation for delivery of probiotics and other ingredients in functional dairy products. In: *Functional Dairy Products*, 404–426.

Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E., Beaulieu, Y. (1991). The freeze drying of lactic acid bacteria. A review. *Canadian Institute of Science and Technology*, 24, 118–125.

Champagne, C.P., Gardner, N.J., Roy, D., (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61–84.

Charalampopoulos, D and Rastall, R. (2009). (Eds). *Prebiotics and probiotics Science and Technology*. Springer Science Business Media, New York.

Charteris, 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 probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84 (5), 759–768.

Chen, L. Y., Remondetto, G. E., Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17(5), 272-283.

Chen, L., Subirade, M. (2008). Food-protein-derived materials and their use as carriers and delivery systems for active food components. In N. Garti (Ed.), *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*, 251-278. UK: Woodhead Publishing Ltd.

- Chen, M.J., Chen, K.N., (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley-Blackwell, USA, 83–107.
- Christenson, L., Dionne, K., Lysaught, M. (1993). Biomedical application of immobilized cells. In Goosen, M.F.A (Ed.), *Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization*, 7–41.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V.V. (2012) Microencapsulation of probiotic for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled Release*, 162: 56-57.
- Correia, M.I.T.D., Juliana C., Liboredo, R.D., Marcella L.D. Consoli R.D., (2012). The role of probiotic in gastrointestinal surgery. *Nutrition*, 50, 230-234.
- Crittenden, R., Laitila, A., Forsell, P., Matto, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., (2001). Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (8), 3469–3475.
- Dalili, M., Chau, P.C. (1987). Intraparticle diffusional effects in immobilized cell particles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 500-506.
- De Castro-Cislaghi, F.P., Silva, C.D.R.E., Fritzen-Freire, C.B., Lorenz, J.G., Sant’Anna, E.S. (2012). *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, 113(2), 186-193.
- De Vos, P., Bucko, M., Gemeiner, P., Navratil, M., Svitel, J., Faas, M. (2009). Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. *Biomaterials*, 30(13), 2559- 2570.

De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.

Del valle, M. R. (2012). Caracterización de microcápsulas de alginato/almidón y evaluación de la supervivencia de *L.acidophilus* en condiciones gastrointestinales simuladas. *Proyecto de investigación de la Universidad de Oviedo*.

Dinakar, P., Mistry, V.V. (1994). Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77 (10), 2854–2864.

Ding, W.K., Shah, N.P. (2009b). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Journal of Food Science*, 74(2), M53-M61.

Diop, L., Guillou, S., Durand, H. (2008). Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a 108ogurt blind, placebo- controlled study, randomized trial suffering from daily stress. *Nutrition Research*, 28 (1), 1–5.

Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1–6.

Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Brodkorb, A. (2010). Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Microbiological Methods*, 80(3), 231-241.

Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Brodkorb, A.(2011). Development and characterisation of when protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food hydrocolloids*, 25, 1604- 1617.

FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. London Ontario. Canada.

- Fávaro-Trindade, C.S., Grosso, C.R.F. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. Lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, 19(4), 485-494.
- Fooks, L.J., Fuller, R. And Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*. 9: 53-61.
- Forrest, J.C. (1979). Fundamentos de la ciencia de la carne. Editorial Acribia. En: Minor-Pérez, H. 1999. Cambios en parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la carne de cerdo sometida a fermentación láctica como método de conservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Fuller, R (1989). Probiotics i man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66 365-378.
- Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Stanton, C. (1998). Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (6), 2192–2199.
- Generoso, S.V., Viana, M.L., Santos, R.G., Arantes, RM., Martins, F.S., Nicoli J.R. (2011). Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat killed *Saccharomyces boulardii*. *European Journal of Nutrition*, 50, 261-9.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview, *Food Research International*, 40, 1107–1121.
- Gilliland, S. E., & Walker, D. K. (1990). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*, 73(4), 905–911.
- Godward, G., Kailasapathy, K. (2003^a). Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, 58 (11–12), 624–627.

- Godward, G., Kailasapathy, K. (2003b). Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in ice cream. *Milchwissenschaft*, 58 (3–4), 161–164.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. (1999). Bifidobacterium spp. And Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 139-157.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330- 347.
- Graepi, B., A.K.A.S., Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D., Merten, O.W. (2011). Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release*, 149(3), 209-224.
- Green, K.D., Gill, I.S., Khan, J.A., Vulfson, E.N. (1996). Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalyst in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(5), 535-543.
- Guillen, J. C. (2010). Comportamiento de microcápsulas de alginato/ caseinato con *L. acidophilus* en condiciones gastrointestinales simuladas. *Proyecto de investigación de la Universidad de Oviedo*.
- Guiseley, K.B. (1989). Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(11), 706-716.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2009^a). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1670– 1677.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2009^b). Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19 (2), 77–84.
- Hernández, R.M., Orive, G., Murua, A., Pedraz, J.L. (2010). Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 711-730.

- Holzappel, W.H., Schillinger, U. (2002). Introduction to prebiotics and probiotics. *Food Research International*, 35, 109–116.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S., Razavi, S.H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111 (1), 50–55.
- Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 253–260.
- Iyer, C., Kailasapathy, K. (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science*, 70 (1), M18–M23.
- Jimenez- Pranteda, M.L., Poncelet, D., Náder- Macías, M.E., Arcos, A., Aguilera, M., Monteoliva- Sánchez. M., Ramos- Cormenzana, A. (2012). Stability of *Lactobacilli* encapsulated in various microbial polymers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113 (2), 179- 184.
- John, R.P., Tyagi, R.D., Brar, S.K., Surampalli, R.Y., Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211-226.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in intestinal Microbiology*, 3 (2), 39–48.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt. *LWT– Food Science and Technology*, 39 (10), 1221–1227.
- Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4 (6).

- Kailasapathy, K., Harmstorf, I., Phillips, M. (2008). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT– Food Science and Technology*, 41 (7), 1317–1322.
- Kailasapathy, K., Sultana, K. (2003). Survival and b-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58 (3), 223–227.
- Kim Se-Jin Seung Yong, Cho, Sae Hun, Kim, Ok-Ja, Song, II-Shik, Shin, et al. (2008). Effect of micro encapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT – Food Science and Technology*, 3, 493–500.
- Kimoto, H., Ohmomo, S., Nomura, M., Kobayashi, M., & Okamoto, T. (2000). In vitro studies on probiotic properties of *lactococci*. *Milchwissenschaft*, 55, 245–249.
- Konieczna, P., Groeger, D., Ziegler, M., Frei, R., Ferstl, R., Shanahan, F., Quigley, E.M.M., Kiely, B., Akdis, C.A., O'Mahony, L. (2012). *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: Potential role form myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut*, 61, 354- 366.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297- 1308.
- Koyama, K., Seki, M. (2004). Cultivation of yeast and plant cells entrapped in the low-viscous liquid-core of an alginate membrane capsule prepared using polyethylene 112ogurt. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(2), 111-118.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for 112ogurt. *International Dairy Journal*, 13 (1), 3–13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in 112ogurt from UHT and conventionally treated milk during storage. *LWT – Food Science and Technology*, 39 (2), 177– 183.

- Lahtinen, S.J., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Forssell, P., Myllärinen, P. (2007). Effect of starch and lipid- based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (5), 500–505.
- Lee, K.Y., Heo, T.R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2), 869–973.
- Lilly, D.M., Stillwel, R. (1965). Probiotics- growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-750.
- Livney, Y.D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15 (1–2), 73–83.
- Maan, A.A., Schroën, K., Boom, R. (2011). Spontaneous droplet formation techniques for monodisperse emulsions preparation- Perspectives for food applications. *Journal of Food Engineering*, 107(3–4), 334-346.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2004). Brock, Biología de los Microorganismos. Editorial Pearson Educación, 10ª Edición. México, 137-166; 719-746.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44(1), 465–470.
- Maillard, M., Landuyt, A. (2008). Chocolate: an ideal carrier for probiotics. *Agro Food Industry Hi-Tec*, 19 (3), 13–15.
- Mainville, I., Arcand, Y., Farnworth, E.R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 287– 296.

- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhliid, R., Ananta, E. (2012). Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology*, 162, 356–365.
- Mandal, S., Puniya, A.K., Singh, K., 2006. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *L. casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16 (10), 1190–1195.
- Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C., Requena, T. Probióticos en la salud humana. (2012) Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM).
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12 (2–3), 173–182.
- Menshutina, N.V., Gordienko, M.G., Voinovskiy, A.A., Zbicinski, I. (2010). Spray drying of probiotics, process development and scale-up. *Drying Technology*, 28, 1170–1177.
- Metchnikoff, E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The Prolongation of life: optimistic studies*, 161-183. London.
- Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S., Webb, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2006). Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *L. plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 28 (1), 73– 78.
- Mirzaei, H. Pourjafar., Homayouni, A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La 5 and sensory properties in Iranian White brined cheese. *Food Chemistry*, 132, 1966-1970.
- Morris, E. R., Rees, D.A., Thorm,D., Boyd, J. (1978). Chiroptical and Stoichiometric evidence of a specific primary dimerization process in alginate Gelation. *Carbohydrate Research*, 66, 145-148 p.

- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani M. R., Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5, 1-18.
- Mortazavian, A.M., Azizi, A., Ehsani, M.R., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J.A. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft*, 63 (4), 427–429.
- Nazaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Science Direct; Current Opinion in Biotechnology*, 23, 182-186.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food science*, 1, 1806-1815.
- Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15, 300–310.
- Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M.T., Khutoryanskiy, V.V. Charalampopoulos, D. (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1281-1287.
- O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1059-1066.
- Ogbonna, J.C., Matsumura, M., Kataoka, H. (1991). Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameters: A review. *Process Biochemistry*, 26(2), 109-121.

Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, O., Favaro-Trindade, C.S. (2007b). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24(7), 685- 693.

Ortakci., Sert. S (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of Dairy Science*, 95 (12).

Özer, B., Kirmaci, H.A., Senel, E., Atamer, M., Hayaloglu, A. (2009). Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, 19 (1), 22–29.

Özer, B., Uzun, Y.S., Kirmaci, H.A. (2008). Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during kasar cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 237-244.

Parkes, G.C., Sanderson, J.D., Whelan, K. (2010). Treating irritable bowel syndrome with probiotics: The evidence. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 187-194.

Pedroso, D. L., Thomazini, M., Barrozo Heinemann, J.H., Favaro-Trindade, C. S. (2012). Protection of *Bifidobacterium Lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*, 26, 127-132.

Peighambardoust, S.H., Golshan Tafti, A., Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 215–224.

Pereira, D.I.A., Gibson, G.R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environmental. Microbiology*, 68, 4689- 4693.

Picot, A., Lacroix, C. (2004). Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14 (6), 505–515.

Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., Van de Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*, 141 (1–2), 97–103.

Ramos-Cormenzana, A., Fuentes, S., Ferrer-Cebrian, R., Monteoliva-Sanchez, M. (2005). Probiotics and biotherapy. *Recent Research Developments in Microbiology*, 9, 97- 127.

Ranadheera, C., Evans, C.A., Adams, M.C., Baines, S.K. (2012). In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, 49, 619-625.

Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., Adams, M.C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43 (1), 1-7.

Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P.W.S. (2012) Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*.

Reid, A.A., Vuilleumard, J.C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., Champagne, C. P (2005). Micro entrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein. *Microencapsulation*, 22, 603- 619.

Reid, G., Burton, J. (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 4, 319-324.

Reyes-Nava, L.A. (2010). Optimización y caracterización de la microencapsulación de la proteasa hemisfericina refinada. *Tesis de Maestría en Ciencias en Bioprocesos*. UPIBI-IPN, México, D.F.

Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamailard, M., Ouwehand, A., Leyer, G., Carcano, D.,

- Colombel, J.F., Ardid, D., Desreumaux P. (2007). *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nature Medicine*, 13, 35–37.
- Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait*, 85, 39–56.
- Saad, N., Delatree, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Science and Technology*, 50, 1-16.
- Saarela, M., Alakomi, H.L., Matto, J., Ahonen, A.M., Puhakka, A., Tynkkynen, S. (2011). Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 106–110.
- Sabikhi, L., Babu, R., Thompkison, D, K., Kapila, S. (2010). Resistance of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to Processing Treatments and Simultades Gut Conditions. *Food Bioprocess Technology*, 3, 586- 593.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. (2006). Resistant starch- a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5 (1), 1–17.
- Salazar, N., Ruas-MaDiedo, P., Kolida, S., Collins, M., Rastall, R., Gibson, G. (2009). Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp, *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 260-267.
- Samaniego, L.M., Sosa, M. (2000). *Lactobacillus* spp: Importantes promotores de la actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Universidad de Matanzas, Cuba.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H.S., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E.J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and

survivability of entrapped *Lactobacillus casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111-117.

Santivarangkna, C., Foerst, P., Kulozik, U. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, 23, 302–315.

Santo, A.P., Perego, P., Converti, A., Oliveira, M.N. (2011). Influence of food matrices on probiotic viability – a review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 377–385.

Sato, K., & Ueno, S. (2005). Polymorphism in fats and oils. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's industrial oil and fat products* (77-120). New York, NY, USA: Wiley Interscience.

Saulnier, D.M., Kolida, S., Gibson, G.R. (2009). Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Current Pharmaceutical Design*, 15(13), 1403-1414.

Scharl M, Geisel S, Vavricka SR, Rogler G. 2011. Dying in yoghurt: the number of living bacteria in probiotic yoghurt decreases under exposure to room temperature. *Digestion* **83**:13–7

Shan, N.P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 78 (7), 894- 907.

Sharp, M. D., McMahon, D.J., Broadbent, J.R. (2008). Comparative evaluation of yogurt and low-fat Cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal Food Science*, 73, M375– M377.

Sharpe, M.E., Fryer, T.F., Smith, D.G. (1966). Identification of the lactic acid bacteria. *identification method for microbiologists part A*. London and New York: Academic Press.

Sheu, T.Y., Marshall, R.T. (1993). Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 58, 557–561.

Sheu, T.Y., Marshall, R.T., Heymann, H. (1993). Improving Survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76 (7), 1902–1907.

Shin, H.S., Lee, J.H., Pestka, J.J., Ustunel, Z. (2000). Viability of *Bifidobacterium* in commercial dairy products during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 63(3), 327-331.

Siuta-Cruce, P., Goulet, J. (2001). Improving probiotic survival rates: microencapsulation preserves the potency of probiotic microorganisms in food systems. *Food Technology*, 55 (10), 36–42.

Sohail, A., Turner, M., Coombes, A., Bostrom, T., Bhandari, B. (2011). Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 162–168.

Sperti, G. S. (1971). Probiotics. West Point, Connecticut: Avi Publishing Col.

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Ross, R.P. (1998). Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8 (5–6), 491–496.

Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (2), 198–203.

Su, L.C., Lin, C.W., Chen, M.J. (2007). Development of an oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. *International Journal of Dairy Technology*, 60 (1), 49–54.

Sugiura, S., Nakajima, M., Yamamoto, K., Iwamoto, S., Oda, T., Satake, M., Seki, M. (2004). Preparation characteristics of water-in-oil-in-water multiple emulsions using microchannel emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 270(1), 221-228.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2006). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47e55.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (1–2), 47–55.

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.

Truelstrup-Hansen, L., Allan-Wojotas, P.M., Jin, Y.L., Paulson, A.T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* In milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19 (1), 35–45.

Urbanska, A.M., Bhatena, J., Prakash, S. (2007). Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: preparation and in vitro analysis of alginate–chitosan microcapsules. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85 (9), 884–893.

Van der Zwan, E., Schroën, K., van Dijke, K., Boom, R. (2006). Visualization of droplet break-up in pre-mix membrane emulsification using microfluidic devices. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 277(1–3), 223–229.

Vega, C., Roos, Y.H. (2006). Invited review: Spray-dried dairy and dairy-like emulsions Compositional considerations. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 383–401.

Villena, M., Morales-Hernández, M.E., Gallardo, V. y Ruíz-Martínez, M.A. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica*, 50, 43–50.

Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895–904.

Vinderola, G., Cespedes, M., Mateolli, D., Cardenas, P., Lescano, M., Aimaretti, N., et al. (2011). Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 269–275.

Vos P., Faas M.M., Spasojevic M., Sikkema J. (2010). Review: Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292- 302.

Werner, T., Haller, D. (2007). Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: from the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutation Research*, 1, 42–57.

Westesen, K., Bunjes, H., Koch, M. H. J. (1997). Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *Journal of Controlled Release*, 48, 223- 236.

Zhao, R., Sun, J., Torley, P., Wang, D., Niu, S. (2008). Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1349-1354.

Zhu, H., Li, Z., Mao, S., Ma, B., Zhou, S., Deng, L., Liu, T., Cui, D., Zhao, Y., He, J., Yi, C & Huang, Y. (2011). Antitumor effect of sFlt-1 gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on Lewis lung cancer in mice. *Cancer Gene Ther*, 18, 884-896.