



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“DESARROLLO DE COACERVADOS PARA SU USO COMO  
VEHÍCULOS DE BIOACTIVOS”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A

**LANDY HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

CoDirección

Dr. E. Jaime Vernon Carter  
Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

MÉXICO, D.F.

Mayo 2014

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.

Iztapalapa, D.F. a 23 de Mayo del 2014

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**DESARROLLO DE COACERVADOS PARA SU USO COMO VEHÍCULOS DE  
BIOACTIVOS**

Que presentó

**Landy Hernández Rodríguez**

**Comité Tutorial**

Codirector: Dr. E. Jaime Vernon Carter  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Codirectora: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros  
Universidad Autónoma Chapingo

Asesora: Dra. Diana Jaqueline Pimentel González  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

**Jurado**

Presidente: Dra. María Eva Rodríguez Huevo  
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

Secretario: Dra. Diana Jaqueline Pimentel González  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

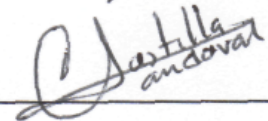
Vocal: Dra. Angélica Román Guerrero  
Universidad Autónoma Metropolitana

Vocal: Dra. Ofelia Sandoval Castilla  
Universidad Autónoma Chapingo









## **Agradecimientos**

A mis asesores Dr. E. Jaime Vernon Carter, Dra. Consuelo Lobato Calleros y Dra. Diana J. Pimentel González, por su tiempo y apoyo invaluable dedicado a este trabajo.

A los sinodales Dra. María Eva Rodríguez Huevo, Dra. Angélica Román Guerrero y Dra. Ofelia Sandoval Castilla por la revisión, sugerencias y evaluación en la defensa del mismo.

A la Biol. Yolanda Hornelas Orozco investigadora del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por su apoyo incondicional en el análisis de microestructura.

A la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-Iztapalapa), Universidad Autónoma Chapingo, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (ICAyP) y Universidad Nacional Autónoma de México (ICMyL) por haberme permitido realizar cada uno de los experimentos que conformaron la presente Tesis.

A mi familia Rosales Villagómez por su apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos por su asesoría y haber hecho un ambiente de trabajo agradable.

**Dedicado a:**

A mi pequeño Marco a quien he esperado con todo mi amor y uno de mis motivos en mi vida.

A mis padres Mario Hernández Sánchez y Eva Rodríguez Torres por dedicarme lo más valioso para mí "su tiempo" y brindarme incondicionalmente su amor, apoyo, confianza y enseñarme a valorar cada paso en mi vida.

A mi esposo Marco Polo por su siempre apoyo incondicional, caminar juntos y su estar... Te amo.

A mis hermanas Blanca y Eva María por ser mi ejemplo de persistencia y tenacidad.

A mis pequeñas luces Regina y Elizabeth por regalarme su cariño y sonrisas.

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	vi
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	01
<b>2. ANTECEDENTES</b>	03
2.1 Microorganismos probióticos	03
2.1.1 Definición	03
2.1.2 Beneficios a la salud atribuidos a los probióticos	04
2.1.3 Composición de la pared celular en Lactobacilli	06
2.1.4 <i>Lactobacillus plantarum</i>	07
2.1.5 Criterios para la selección de microorganismos probióticos para ser añadidos a productos alimenticios	08
2.1.6 Adición de probióticos en alimentos y factores que afectan su supervivencia	09
2.1.7 Fisiología del tracto gastrointestinal y supervivencia de probióticos	11
2.2 Sistemas de protección a probióticos	12
2.2.1 Método de coacervación	12
2.3 Interacciones proteína - polisacárido	13
2.4 Materiales utilizados	16
2.4.1 $\kappa$ -carragenina	16
2.4.2 Proteínas lácteas en el suero de la leche	18
2.4.2.a $\beta$ -Lactoglobulina	19

2.4.2.b $\alpha$ -Lactoalbúmina	19
2.4.3 Resistencia de biopolímeros utilizados en la protección de probióticos en condiciones gastrointestinales	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	21
<b>4. OBJETIVOS</b>	22
<b>5. HIPÓTESIS</b>	23
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	24
6.1. Ubicación del trabajo	24
6.2 Materiales	25
6.3 Cultivo de <i>L. plantarum</i> y preparación del concentrado celular	25
6.4. Soluciones base	25
6.5 Formación de los complejos	26
6.5.1 Mediciones de potencial $\zeta$ y tamaño de partícula	26
6.5.2 Puntos de equivalencia de aislado de proteína de lactosuero y $\kappa$ -carragenina	26
6.5.3 Elaboración de los complejos	27
6.6. Rendimiento, contenidos de proteína y humedad de los complejos coacervados	27
6.7. Eficiencia de entrapamiento de <i>L. plantarum</i>	28
6.8. Propiedades reológicas de los coacervados	28
6.9. Análisis de microestructura de los coacervados	29
6.10. Supervivencia de <i>L. plantarum</i> atrapado bajo condiciones gastrointestinales simuladas	29
6.11. Análisis de datos	30
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	31
7.1. Potencial $\zeta$ de <i>L. plantarum</i> y biopolímeros	31

---

7.2. Puntos de equivalencia de aislado de proteína de lactosuero y $\kappa$ -carragenina	32
7.3. Confirmación del acomplejamiento entre aislado de proteína de lactosuero y <i>Lactobacillus plantarum</i>	33
7.4. Turbidez de los complejos	34
7.5. Rendimiento, eficiencia de atrapamiento, contenidos de proteína y humedad de los complejos coacervados	36
7.6. Propiedades reológicas de los complejos coacervados	37
7.6.1. Propiedades de flujo	37
7.6.2. Propiedades viscoelásticas	39
7.7. Microestructura y tamaño de partícula de los complejos coacervados	41
7.8. Efecto protector proporcionado a <i>L. plantarum</i> por los complejos coacervados	42
<b>8. CONCLUSIONES</b>	45
<b>9. REFERENCIAS</b>	46
<b>10. ANEXO</b>	56



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Células de <i>L. plantarum</i> Lp-115	07
Figura 2.2.	Interacciones entre proteínas y polisacáridos (Fuente: Weinbreck, 2004).	14
Figura 2.3.	Tipos de carragenina: (a) $\kappa$ , (b) $\iota$ y (c) $\lambda$ (Fuente: Mangione y col., 2003).	17
Figura 2.4.	Diagrama de la estructura dimérica de la $\beta$ -lactoglobulina A (Fuente: Delano, 2002).	19
Figura 2.5.	Diagrama de la estructura de la $\alpha$ -lactoalbúmina (Fuente: Delano, 2002).	19
Figura 6.1.	Protocolo experimental empleado para el desarrollo de la presente investigación	24
Figura 7.1.	Potencial $\zeta$ de soluciones de aislado de proteína de lactosuero (1% p/v, ■), $\kappa$ -carragenina (0.5% p/v, ●) y <i>L. plantarum</i> Lp-115 ( $9.25 \log_{10}$ ufc mL <sup>-1</sup> , ▲).	32
Figura 7.2.	Potencial $\zeta$ de aislado de proteína de lactosuero (W, 1% p/v, *) y complejos solubles W - <i>L. plantarum</i> (L, $9.1 \log_{10}$ ufc mL <sup>-1</sup> ) a diferentes % de W: (■) (W - L) <sub>1%</sub> , (○) (W - L) <sub>3%</sub> y (▲) (W - L) <sub>5%</sub> .	33
Figura 7.3.	Micrografía óptica del complejo coacervado obtenido a una relación en peso aislado de proteína de lactosuero : $\kappa$ -carragenina de 16.7:1 a pH 4.5, donde células de <i>L. plantarum</i> entrampadas pueden ser observadas.	34
Figura 7.4.	Absorbancia del sobrenadante como función del pH durante la formación de complejos aislado de proteína de lactosuero (W) - <i>L. plantarum</i> - $\kappa$ -carragenina (K) a diferentes relaciones en peso W : K: 3.3:1 (■), 10:1 (●) y 16.7:1 (▲).	35
Figura 7.5.	Curva de flujo de los complejos coacervados de aislado de proteína de lactosuero (W)- <i>L. plantarum</i> - $\kappa$ -carragenina (K) a diferentes relaciones en peso W:K (■)3.3:1; (●) 10:1; (▲)16.7:1; (□) 3.3:1; (○)10:1; y (△)16.7:1 a pH 4.0 (símbolos sólidos) y pH 4.5 (símbolos vacíos).	37
Figura 7.6.	(a). Variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) como función del % de deformación de complejos coacervados de aislado de proteína de lactosuero (W)- <i>L. plantarum</i> - $\kappa$ -carragenina (K) elaborados a diferentes relaciones W:K (■) 3.3:1; (●) 10:1; (▲) 16.7:1; (□) 3.3:1; (○) 10:1; (△) 16.7:1 a pH 4.0 (símbolos sólidos) y pH 4.5 (símbolos vacíos). (b). Variación del módulo de pérdida ( $G''$ )	40

como función del % de deformación de complejos coacervados W-*L. plantarum*-K elaborados a diferentes relaciones W:K (■) 3.3:1; (●) 10:1; (▲) 16.7:1; (□) 3.3:1; (○) 10:1; (△) 16.7:1 a pH 4.0 (símbolos sólidos) y pH 4.5 (símbolos vacíos).

Figura 7.7. Micrografías SEM de complejos coacervados de aislado de proteína de lactosuero (W)-*L. plantarum*-κ-carragenina (K) elaborados con diferentes relaciones en peso W:K: (a) 3.3:1, pH 4.0; (b) 10:1, pH 4.0; (c) 16.7:1, pH 4.0; (d) 3.3:1, pH 4.5; (e) 10:1, pH 4.5; (f) 16.7:1, pH 4.5. 42

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 2.1.	Bacterias probióticas utilizadas comúnmente en la industria alimentaria	04
Tabla 2.2.	Mecanismos de acción de los efectos benéficos otorgados por los probióticos a la salud	05
Tabla 2.3.	Alimentos conteniendo <i>Lactobacillus plantarum</i>	10
Tabla 2.4.	Composición de las proteínas del lactosuero $\beta$ -lactoglobulina y $\alpha$ -lactoalbúmina.	18
Tabla 7.1.	Valores medios del rendimiento, eficiencia de atrapamiento y contenidos de humedad y proteína de los complejos coacervados.	36
Tabla 7.2.	Valores medios de los parámetros del modelo de Ellis	38
Tabla 7.3.	Valores medios de diámetros hidrodinámicos ( $d_h$ ) en los complejos coacervados.	42
Tabla 7.4.	Viabilidad de células de <i>Lactobacillus plantarum</i> libres y atrapadas en los diferentes complejos coacervados, después de su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.	44

## “DESARROLLO DE COACERVADOS PARA SU USO COMO VEHÍCULOS DE BIOACTIVOS”

### RESUMEN

*Lactobacillus plantarum* fue atrapado en complejos coacervados formados por aislado de proteína de lactosuero (W) y  $\kappa$ -carragenina (K). La ventana de interacción que condujo a la formación de complejos W-*L. plantarum*-K a diferentes valores de pH y relación en peso de biopolímeros, fue establecido a través de mediciones de potencial  $\zeta$  y análisis turbidimétrico. Los complejos coacervados obtenidos a valores de pH de 4.0 y 4.5 y una relación en peso de biopolímeros W:K de 16.7:1 produjeron eficiencias de atrapamiento del 39.6 % y una viabilidad significativamente mayor de  $9.75 \pm 0.01 \log \text{ ufc g}^{-1}$  después de la exposición a pH bajo y  $9.66 \pm 0.01 \log \text{ ufc g}^{-1}$  después de la exposición consecutiva a sales biliares, en comparación a células libres ( $9.51 \pm 0.03 \log \text{ ufc g}^{-1}$  y  $5.93 \pm 0.02 \log \text{ ufc g}^{-1}$ , respectivamente), con respecto a un conteo inicial de células de  $9.78 \pm 0.03 \log \text{ ufc g}^{-1}$ . Una mayor supervivencia de células se produjo en los complejos coacervados que presentaron microestructura más compacta, así como propiedades viscoelásticas superiores. Micrografías ópticas y electrónicas de barrido mostraron claramente que las células de *L. plantarum* fueron atrapadas en las matrices de los complejos coacervados.

Palabras clave: complejos coacervados; aislado de proteína de lactosuero; *Lactobacillus plantarum*;  $\kappa$ -carragenina; propiedades reológicas; microestructura.

**ABSTRACT**

*Lactobacillus plantarum* was entrapped in whey protein isolate (W) and  $\kappa$ -carrageenan (K) complex coacervates. The interaction window leading to W-*L. plantarum*-K complexation at different pH values and components ratio was established by  $\zeta$ -potential measurements and turbidimetric analysis. Complex coacervates obtained at pH values of 4.0 and 4.5 and W:K weight ratio of 16.7:1 yielded cells entrapment efficiency of 39.6%, a significantly higher viability of 9.75 log cfu g<sup>-1</sup> after exposure to low pH and of 9.66 log cfu g<sup>-1</sup> after sequential exposure to bile salts, than free cells (9.51 log cfu g<sup>-1</sup> and 5.93 log cfu g<sup>-1</sup>, respectively), with respect to an initial cells count of 9.78 log cfu g<sup>-1</sup>. Higher survivability of cells occurred in the complex coacervates exhibiting a more compact microstructure and higher viscoelastic properties. Light and scanning electron micrographs clearly show that *L. plantarum* cells were effectively entrapped in the complex coacervates matrices.

Keywords: complex coacervates; whey protein; *Lactobacillus plantarum*;  $\kappa$ -carrageenan; rheological properties; microstructure.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El mercado mundial de los alimentos y bebidas funcionales representa un segmento dinámico y creciente en la industria de los alimentos, debido a sus efectos benéficos sobre la salud humana. Se estima que este mercado alcanzará una ganancia económica de \$130 mil millones de dólares para el año 2015 en Estados Unidos de América (EUA) (Global Industry Analysts, Inc., 2012). Los alimentos probióticos funcionales son una parte importante de este mercado, representando en el 2008 un valor aproximado de \$15.9 mil millones de dólares en EUA y se espera que alcance para el año 2015 aproximadamente \$28.8 billones (Marco Trade News, 2012). Sin embargo, comercialmente los productos y suplementos probióticos proporcionan a menudo concentraciones insuficientes de células disponibles ( $<10^7$  células viables), debido al procesamiento y condiciones a las que se enfrentan durante la fabricación del sistema utilizado como vehículo (Doherty y col., 2012). Además, la supervivencia de estos probióticos durante su paso a través del tracto gastrointestinal humano sigue siendo un reto importante para la entrega efectiva de estas bacterias benéficas (Anal y Singh, 2007).

La técnica preferida de inmovilización para aplicaciones en alimentos, que tiene como propósito la protección celular en condiciones hostiles, puede ser el entrapamiento de células dentro de una matriz polimérica grado alimenticio (Heidebach y col., 2009), de manera que una selección apropiada de la matriz alimentaria es de suma importancia durante el desarrollo de alimentos funcionales probióticos (Doherty y col., 2010).

Los materiales basados en polímeros naturales representan matrices promisorias para la fabricación de sistemas de protección y liberación controlada, debido a la biodegradabilidad, biocompatibilidad y su amplia disponibilidad (Doherty y col., 2011). Las matrices geladas a partir del uso de biopolímeros como alginato de calcio y  $\kappa$ -carragenina se han empleado para la inmovilización de probióticos; no obstante, existen informes contradictorios en cuanto a la protección que ofrece la inmovilización ante ambientes químicos agresivos (Prakash y Martoni, 2006), o bien a las tasas de liberación controlada (Hébrard y col., 2006). Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas que permitan aumentar la estabilidad mecánica de la matriz con un mejor transporte de masa, aumento de la carga celular y un mayor control en los parámetros que se evalúan.

Recientemente las proteínas de lactosuero han sido consideradas como una alternativa potencial al uso de polisacáridos como matrices para bacterias probióticas. Beaulieu y col. (2002) utilizaron un método de emulsificación/gelificación en frío para formar cápsulas de proteína atrapando retinol. Ellos encontraron que la proteína de lactosuero forma matrices de cápsulas adecuadas que no fueron afectadas por ataque enzimático, proporcionando una lenta y progresiva liberación del retinol en los sitios de absorción intestinal y protección contra la oxidación. Hébrard y col. (2006) inmovilizaron *Saccharomyces cerevisiae* recombinada en aislado de proteína de lactosuero usando gelificación inducida por frío, donde la matriz de proteína promovió la obtención de un microambiente que favoreció la actividad de las levaduras en condiciones gástricas.

Otra alternativa para mejorar las propiedades funcionales de los microorganismos probióticos inmovilizados puede ser mediante el uso de complejos electrostáticos proteína-polisacárido. Las propiedades funcionales mejoradas resultantes en los complejos proteína – polisacárido, en comparación con las proteínas y los polisacáridos utilizados por separado pudieran ser atribuidas a la estructura de los complejos (efectos estéricos, matriz polimérica más cerrada, etc) (Ramírez-Santiago y col., 2012). Weinbreck en el 2004 evidenció la formación de complejos electrostáticos de proteína de lactosuero y una carragenina no gelificable en función del pH, la fuerza iónica, la temperatura y la relación proteína-polisacárido, estableciendo el intervalo de pH donde se observó la presencia de complejos solubles o complejos insolubles (coacervados). Basados en este estudio, se decidió investigar el potencial de coacervados de proteína de lactosuero -  $\kappa$ -carragenina para atrapar *L. plantarum*, una bacteria probiótica conocida por sus efectos benéficos sobre los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Naruszewicz y col., 2002).

Con base en lo expuesto anteriormente, los objetivos de esta investigación fueron: (a) formar complejos coacervados de proteína de lactosuero-*L. plantarum* y  $\kappa$ -carragenina y (b) evaluar la eficiencia de atrapamiento, propiedades reológicas, microestructura, supervivencia de *L. plantarum* atrapado en los complejos coacervados después de su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas, en comparación a células libres control.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Microorganismos probióticos

#### 2.1.1 Definición

Los probióticos han sido definidos por Fuller (1989) como "un suplemento alimenticio microbiano vivo el cual afecta benéficamente al huésped animal, mejorando su equilibrio intestinal". Esta definición destaca el carácter microbiano de los probióticos. Del mismo modo Huis In't Veld y col. (1994), los definió como "un cultivo sólo o mixto de bacterias, que cuando son suministrados a los animales o al hombre, afectan de manera benéfica al huésped, mejorando las propiedades de la flora nativa". Por otro lado Araya y col. (2002), definieron a los probióticos como "microorganismos vivos que cuando son administrados en una cantidad adecuada, confieren un beneficio a la salud del huésped". Estas definiciones tienden a reiterar la definición básica de que los probióticos son microorganismos vivos que en dosis adecuadas pueden ser benéficos para los seres humanos. Actualmente, los microorganismos probióticos han sido incorporados a diversos productos alimenticios para crear "alimentos funcionales o nutraceuticos" en los mercados mundiales (Stanton y col., 2001). Los microorganismos probióticos son un grupo de bacterias ácido lácticas, con capacidad para fermentar hidratos de carbono y producir ácido láctico; taxonómicamente, comprenden diversos géneros de bacterias, siendo los más importantes los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

La cantidad mínima de probióticos recomendada por diversos institutos de investigación de productos lácteos para asegurar un efecto benéfico sobre la salud del consumidor, es del orden de  $10^7$  microorganismos viables  $g^{-1}$  de alimento (Lopez-Rubio y col., 2006). En la Tabla 2.1 se listan las bacterias probióticas más utilizadas en la industria alimentaria.

Debido a la creciente popularidad de los productos probióticos entre los consumidores, la fermentación de estos microorganismos a gran escala está cobrando importancia. La actividad de crecimiento de los probióticos depende de las condiciones de fermentación, tales como pH, temperatura y composición del medio, entre otros. Las bacterias ácido lácticas en general, tienen una capacidad limitada de biosíntesis, por lo que requieren múltiples aminoácidos y vitaminas para su crecimiento (Tseng y Montville,



1993); a menudo se suministran componentes complejos, como el extracto de levadura (Berry y col., 1999). Asimismo, existen estudios que revelan el aumento sobre la resistencia de estos microorganismos contra condiciones adversas, debido al uso de recipientes impermeables al oxígeno, incorporación de micronutrientes (péptidos y aminoácidos) y su microencapsulación (Gismondo y col., 1999).

**Tabla 2.1. Bacterias probióticas utilizadas comúnmente en la industria alimentaria**

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. Faecium</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. francium</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. breve</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. essensis</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		

Fuente: Shah, (2007).

### 2.1.2 Beneficios a la salud atribuidos a los probióticos

Se ha informado en la literatura una variedad de beneficios a la salud proporcionada por los probióticos cuando están presentes en el intestino delgado y grueso del ser humano. Los mecanismos propuestos por los cuales se cree que estas bacterias probióticas proporcionan respuestas positivas a la salud, han sido agrupados en tres áreas: la producción de nutrientes y cofactores, la competencia con patógenos por la unión de sitios activos y la estimulación de la respuesta inmune del huésped (Saier y Mansour, 2005). Los mecanismos de acción propuestos para los efectos benéficos otorgados por los probióticos en algunas enfermedades de los seres humanos, se presentan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2. Mecanismos de acción de los efectos benéficos otorgados por los probióticos a la salud**

Beneficio a la salud	Mecanismo propuesto
Resistencia a patógenos entéricos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Antagonismo</li> <li>▲ Incremento en la producción de anticuerpos</li> <li>▲ Limitación del acceso a patógenos entéricos (pH, bacteriocinas, péptidos antimicrobianos, producción de ácido láctico).</li> </ul>
Contribución al metabolismo de la lactosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Actuación de la lactasa bacteriana sobre la lactosa en el intestino delgado</li> </ul>
Crecimiento bacteriano en el intestino delgado	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Disminución en la producción de metabolitos tóxicos</li> <li>▲ Normalización de la flora intestinal</li> <li>▲ Función antibacterial</li> </ul>
Modulación del sistema inmune	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Fortalecimiento de la defensa no específica y específica de antígenos</li> <li>▲ Regulación/influencia en la activación de células Th1/Th2</li> <li>▲ Producción de citocinas anti-inflamatorias</li> </ul>
Efecto anticáncer de colon	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Actividad antimutagénica y anticarcinogénica</li> <li>▲ Desintoxicación de metabolitos carcinogénicos</li> <li>▲ Estimulación de la función inmune</li> </ul>
Disminución de la desintoxicación / Excreción de metabolitos microbianos tóxicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Aumento en los recuentos de bifidobacterias</li> <li>▲ Cambio de sustrato metabolizante por la comunidad microbiana</li> </ul>
Actividad antialérgica (eccema o dermatitis atópica, asma)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Prevención de la translocación de antígenos en el torrente sanguíneo</li> <li>▲ Inhibición de las respuestas inmunológicas excesivas ante una mayor cantidad de antígeno</li> </ul>
Lípidos en la sangre, enfermedades del corazón	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Asimilación de colesterol por células bacterianas</li> <li>▲ Aumento en la actividad de la hidrolasa de las sales biliares</li> </ul>
Infecciones urogenitales	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Adherencia a las células del tracto urinario y vaginal</li> <li>▲ Exclusión competitiva</li> </ul>
Inflamación del intestino	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Mejoramiento en la función de la barrera mucosa</li> </ul>
Gastroenteritis por rotavirus	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Incremento en la respuesta del IgA al virus</li> </ul>

Fuente: Nagpal y col. (2012).

### 2.1.3 Composición de la pared celular en Lactobacilli

La literatura ha mencionado que las propiedades fisicoquímicas de la pared celular, controlan aspectos importantes del comportamiento microbiano. Una propiedad es la interacción de la superficie de las bacterias relacionada con su carga eléctrica global representadas por el potencial zeta ( $\zeta$ ) (Van der Mei y Busscher, 2001).

Las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* se han utilizado como sistemas modelo para estudiar la estructura de la pared celular bacteriana, debido a que son Gram-positivas. La pared celular de bacterias ácido lácticas Gram-positivas está compuesta principalmente de peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, proteínas y polisacáridos. La capa interna de la pared celular contiene una red de péptidoglucano (cadenas de polisacáridos lineales alternadas con N-acetilglucosamina y unidades de ácido N-acetil-murámico). La capa de péptidoglucano está cubierta por una variedad de sustancias, las más importantes son los ácidos lipoteicoicos, polisacáridos (ácidos y neutros) y proteínas (de la superficie). Los ácidos teicoicos forman una clase diversa de sustancias, cuya estructura está compuesta de un polímero lineal de un polirol (tal como el glicerol o varios monosacáridos) unidos por enlaces fosfodiéster. Los ácidos lipoteicoicos están anclados en la membrana citoplasmática mediante su extremo lipídico; mientras que los ácidos teicoicos se encuentran unidos covalentemente al sáculo. Como sus grupos fosfato son ácidos fuertes, los ácidos lipoteicoicos muestran un pronunciado carácter como polielectrolitos (Delcour y col., 1999).

Los polisacáridos asociados con la pared celular bacteriana y los polisacáridos extracelulares de bacterias ácido lácticas son neutros o ácidos (Ricciardi y Clementi, 2000). Debido a su abundancia y presencia en la superficie externa de la pared celular, los polisacáridos extracelulares y de la pared celular determinan en gran medida las propiedades de la superficie de los microorganismos.

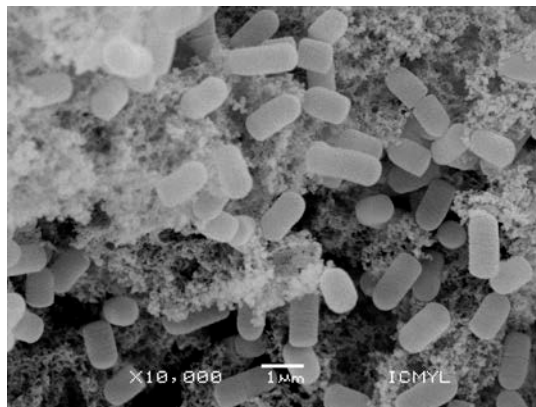
Las proteínas de la superficie más abundantes en diversas especies de *Lactobacillus* son las proteínas de la capa S (Smit y col., 2001). En contraste con la mayoría de las especies bacterianas, las proteínas de la capa S en lactobacilos son altamente básicas, con un punto isoelectrico por arriba de pH=9. Debido a que cubren totalmente la pared celular y a su alto punto isoelectrico, las proteínas de la capa S ejercen efectos sobre la

adherencia a la pared celular en distintas superficies de cepas de *Lactobacillus* (Ventura y col., 2002).

#### 2.1.4 *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum* son bacterias no esporuladas rectas con extremos redondeados (Figura 2.1); Gram-positivas, heterofermentativas y anaerobias facultativas; tienen un intervalo de temperatura de crecimiento entre 34 y 37°C. El tamaño de las células tienden a ser de 0.9-1.2 × 3.0-8.0 μm; están dispuestas de forma aislada, en parejas o en cadenas cortas. *L. plantarum* es una bacteria que puede ser encontrada en diversos ambientes, como productos lácteos, carne y en diversas fermentaciones vegetales.

*L. plantarum* tiene la capacidad de codificación para la captación y utilización de diversos azúcares, la absorción de péptidos y la formación de la mayoría de los aminoácidos. El gran número de proteínas ancladas a la superficie sugiere que *L. plantarum* tiene el potencial de asociarse con diferentes superficies y sustratos potenciales para su crecimiento (de Vries y col., 2006).



**Figura 2.1. Células de *L. plantarum* Lp-115**

Se ha estudiado y probado su uso como tratamiento para el síndrome del intestino irritable, sugiriendo sus efectos en la reducción del dolor y distensión abdominal (Bixquert, 2009).

Nissen y col. (2009) mostraron *in vitro* que *L. plantarum* puede mejorar la flora intestinal, integridad, actividad metabólica de las células intestinales y estimular la respuesta inmune. Además, la ingesta de *L. plantarum* reduce ciertos síntomas gastrointestinales durante el tratamiento con antibióticos.

### **2.1.5 Criterios para la selección de microorganismos probióticos para ser añadidos a productos alimenticios**

Existen diversos criterios de selección de una bacteria para su adición a un alimento; a continuación se mencionan algunos de ellos (Roshni y col., 2012):

Seguridad:

- Generalmente reconocidos como seguros
- Validado clínicamente y con evidencia de beneficios a la salud

Viabilidad *in vivo*

- Resistente a la bilis, ácido clorhídrico, y jugo pancreático
- Capacidad de sobrevivir tanto en condiciones ácidas del estómago y alcalinas del intestino
- Adherencia al epitelio para evitar la remoción física
- Capacidad de permanecer en el intestino, incluso si no lo coloniza

Consideraciones tecnológicas

- Resistencia a factores ambientales durante el procesamiento y almacenamiento del producto alimenticio.
- Conservación de características sensoriales adecuadas en el alimento (aroma, sabor, textura, color) durante el procesamiento, almacenamiento y liberación
- Bajo costo final del producto

### **2.1.6 Adición de probióticos en alimentos y factores que afectan su sobrevivencia**

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia alimentos que además del valor nutricional, aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación generan una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los alimentos funcionales (Alvidrez-Morales y col., 2002).

Los alimentos funcionales son aquellos que proporcionan un beneficio para la salud superior al de los nutrientes tradicionales que contiene (Garduño, 2000). Los alimentos llamados probióticos se encuentran entre los alimentos funcionales y son aquellos que contienen microorganismos viables en concentraciones tales, que son capaces de ejercer un efecto benéfico sobre la salud humana.

La protección de la viabilidad de las bacterias probióticas en diferentes productos alimenticios (en especial productos fermentados) hasta el momento del consumo ha sido objeto de diversos estudios, ya que se ha observado que al incorporar microorganismos probióticos en forma libre a los alimentos a través de su procesamiento, vida de almacenaje y durante su paso a través del tracto gastrointestinal disminuye significativamente la viabilidad de dichos microorganismos. El número de células viables por gramo o mililitro de producto alimenticio probiótico en el momento del consumo es un parámetro crítico, ya que determina su verdadero efecto en la salud (Korbekandi y col., 2011). Por lo tanto, con el fin de mantener la confianza del consumidor en productos probióticos es importante garantizar una alta tasa de supervivencia de las bacterias durante el procesamiento y vida útil del producto (Saxelin y col., 1999). Cuando un alimento tiene concentraciones de  $10^7$ - $10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  (ufc  $\text{g}^{-1}$ ), estos pueden considerarse como alimentos probióticos (Karimi y col., 2011) ya que estas concentraciones son las mínimas necesarias para notar un efecto benéfico a la salud. Con el fin de tener un efecto positivo durante su paso por el tracto gastrointestinal se debe considerar que las bacterias probióticas deben resistir el proceso de fabricación y periodo de almacenamiento en los productos comerciales hasta el final de su vida útil.

Diversos son los factores que influyen en la viabilidad de los microorganismos probióticos en productos alimenticios durante los períodos de producción y almacenamiento; los principales factores son: pH, acidez, oxígeno molecular, potencial redox, concentración de peróxido de hidrógeno, presencia de bacteriocinas, ácidos grasos de cadena corta, competencia con otros microorganismos, materiales de embalaje, concentración del inóculo, contenido de sólidos no grasos de la leche, suplementación del medio con nutrientes, tratamiento térmico, temperatura de incubación, temperatura de almacenamiento, velocidad de enfriamiento del producto y escala de producción, entre otros (Mortazavian y col., 2011).

*L. plantarum* al ser productora de ácido láctico tiene diversas aplicaciones en la biotecnología y en la industria alimentaria como se observa en la Tabla 2.3. Zomorodi y col. (2010) encontraron que la viabilidad de células de *L. casei*, *L. plantarum* y *B. bifidum* no se afectó durante la fabricación y vida de anaquel (60 días) de queso blanco iraní.

**Tabla 2.3. Alimentos conteniendo *Lactobacillus plantarum***

<b>Materia prima</b>	<b>Producto</b>	<b>Referencia</b>
Productos vegetales	Aceitunas	(Randazzo y col., 2004)
	Granos de cacao	(Ardhana y Fleet, 2003)
	Mandioca	(Lei y col., 1999)
	Vino	(Spano y col., 2004)
Productos lácteos	Queso stilton	(Ercolini y col., 2003)
	Queso feta tradicional	(Manolopoulou y col., 2003)
	Queso ricotta forte	(Baruzzi y col., 2000)
Productos cárnicos	Embutidos secos	(Gevers y col., 2003)
	fermentados	
	Salchicha italiana fermentada	(Cocolin y col., 2000)

Fuente: de Vries y col. (2006).

### 2.1.7 Fisiología del tracto gastrointestinal y supervivencia de probióticos

Para el diseño de sistemas de liberación de probióticos encapsulados o inmovilizados, es necesario tener en cuenta la compleja fisiología del tracto gastrointestinal. Normalmente, la liberación de las bacterias es provocada por la degradación, la desintegración o disolución de la matriz que las contiene. Existen diversos métodos de liberación a lo largo del tracto gastrointestinal basados en el pH, tiempo, presiones peristálticas y fermentaciones bacterianas (Cook y col., 2012). Una vez iniciada la ingestión, un probiótico pasa rápidamente a través del esófago y llega al estómago; este es el punto en donde existe la mayor pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas ( $\leq 10^4$  cfu g<sup>-1</sup>) debido a los altos niveles de acidez. El pH y tiempo de tránsito a través del estómago es variable entre las personas y depende de diversos factores, tales como el tiempo desde la última comida y su edad. Los valores de pH del estómago han sido reportados entre 1 y 2.5 en grupos no controlados (ayuno), pero puede ser tan alto como pH 5 para los pacientes recién alimentados. Después del paso a través del estómago, las bacterias probióticas llegan al intestino delgado cuyo pH está entre 6.15 y 7.35 en la región proximal, alcanzando valores entre 6.80 a 7.88 en el intestino delgado distal. Después del paso a través del intestino delgado, las bacterias alcanzan el intestino grueso, momento en el que el pH disminuye ligeramente a valores de 5.26 a 6.72 en el colon ascendente y de 5.20 a 7.02 en el colon descendente (Aulton, 2007). Los cambios de pH anteriormente mencionados deben ser resistidos por los microorganismos probióticos, siendo ésta una de las razones por la cual la concentración final de células viables es baja al final del paso por el tracto gastrointestinal.

Haller y col. (2001) observaron que células libres de *L. plantarum* después de someterse a condiciones ácidas (HCl, pH=2) y sales biliares, presentaron bajos porcentajes de supervivencia (0.003-10 %).

Por otro lado, Vesa y col. (2000) encontraron pérdida en la viabilidad en un estudio *in vivo* de *L. plantarum* NCIMB 8826 después de la ingestión. La supervivencia fue probada usando muestras extraídas del íleon humano después de una sola dosis de  $10^8$  células a voluntarios sanos, la siembra directa mostró una supervivencia del  $7 \pm 2$  %.



## **2.2 Sistemas de protección a probióticos**

La literatura ha evidenciado diversas tecnologías como sistemas de protección a probióticos (microencapsulación y entrapamiento). La encapsulación es un proceso de formación de revestimiento continuo (pared) de una matriz interna que forma una cápsula (secado por aspersión, extrusión, emulsificación, etc.); mientras que el entrapamiento se refiere a la captura de un probiótico dentro o a lo largo de una matriz preservando su viabilidad (Vidhyalakshmi y col., 2009).

Los métodos para proteger las bacterias probióticas pueden ser divididos de manera general en tres grupos:

1. Procesos físicos: secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión.
2. Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas.
3. Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

Dependiendo del campo de aplicación, los probióticos se pueden entrapar o encapsular con el propósito de aislarlas, protegerlas y/o de liberarlas controladamente. Cada metodología tiene sus propias características y la selección de un método particular se basa en la aplicación final.

### **2.2.1 Método de coacervación**

Como un método de entrapamiento celular, la técnica de coacervación ha sido utilizada como medio de protección o vehículo de saborizantes, conservadores, enzimas y células microbianas, entre otros (John y col., 2011; Oliveira y col., 2007).

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a la coacervación como la separación en dos fases líquidas de sistemas coloidales; la fase más concentrada en coloides es conocida como "fase coacervada" y la segunda como "fase en equilibrio". En general, el fenómeno es dividido en coacervación simple y coacervación compleja. La coacervación simple involucra el uso de una sola macromolécula y una sal, mientras que

la coacervación compleja involucra el uso de dos biopolímeros con carga opuesta (Walstra, 2003).

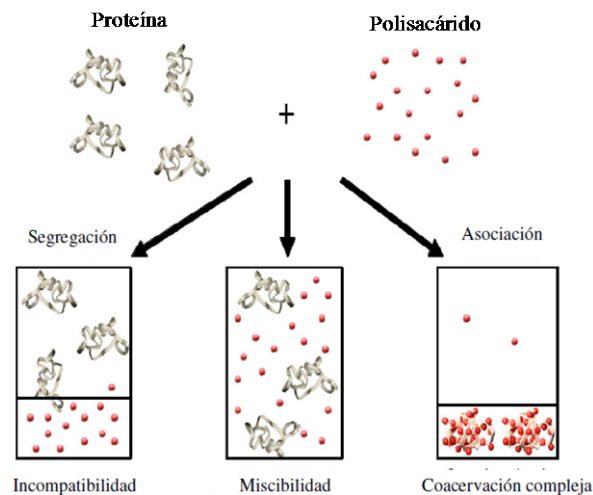
La coacervación es una tecnología prometedora en vista de su buena capacidad de atrapamiento y liberación controlada de bioactivos, debido al estrés mecánico, temperatura y cambios de pH (Oliveira y col., 2007). Esto último es especialmente útil para la protección de bacterias probióticas, ya que se requiere tener un control de pH para ser liberadas cuando se exponen a un mayor pH en el intestino grueso.

Considerando lo anterior es importante conocer las interacciones que se pueden dar entre los biopolímeros de carga opuesta (proteínas y carbohidratos) que pueden participar en la formación de coacervados.

### **2.3 Interacciones proteína - polisacárido**

Las moléculas de proteínas las cuales presentan grupos amino y ácido carboxílico pueden interactuar con cadenas de polisacáridos como por ejemplo con grupos sulfato para generar una coacervación, en el que una solución mixta de proteína/polisacárido se separa en una fase densa llamada coacervado y una fase líquida relativamente diluida denominada sobrenadante. La coacervación entre una proteína y un polisacárido aniónico consiste en la formación de un complejo primario soluble que es formado inicialmente a partir de la unión de moléculas de proteína con cadenas de polisacáridos a un primer pH crítico ( $pH_c$ ); posteriormente, los complejos de proteína/polisacárido solubles comienzan a agregarse en complejos insolubles a un segundo pH crítico ( $pH_{\phi_1}$ ), sedimentando en una fase densa coacervada. Cuando el pH disminuye hasta un tercer pH crítico ( $pH_{\phi_2}$ ), los coacervados pueden disociarse en complejos solubles (Wang y col., 2007) (Figura 2.2).

Debido a que los coacervados formados por proteínas y polisacáridos con carga opuesta son formados principalmente por la interacción electrostática, parámetros físico-químicos como el pH, fuerza iónica, densidad de carga del polisacárido, densidad de carga superficial de proteínas, rigidez de la cadena de polisacárido y la relación en peso proteína/polisacárido son características que influyen directamente en la formación, estructura y estabilidad de coacervados proteína/ polisacárido (Schmitt y col., 1998).



**Figura 2.2. Interacciones entre proteínas y polisacáridos (Fuente: Weinbreck, 2004).**

Puede haber interacciones sinérgicas o antagonistas entre diferentes tipos de biopolímeros que causan cambios en sus propiedades funcionales (Benichou y col., 2002; de Kruif y col., 2004). El conocimiento de la naturaleza de las interacciones implicadas, a menudo se utiliza para diseñar nuevas estructuras y de esta forma tener un efecto en las propiedades físico-químicas en los sistemas alimenticios.

Las principales interacciones no covalentes entre proteínas y polisacáridos son:

- Interacciones electrostáticas. Esta interacción es importante para biopolímeros que tienen una carga eléctrica en función de las condiciones experimentadas (pH y fuerza iónica). Pueden ser atractivas o repulsivas dependiendo si la carga de los grupos involucrados son similares o de carga opuesta. La fuerza y la gama de estas interacciones disminuye con el aumento de la fuerza iónica debido a la interacción con los iones presentes.
- Exclusión estérica. El volumen ocupado por diversos biopolímeros en solución, puede involucrar efectos de exclusión estérica; es decir, puede haber una reducción en la entropía del sistema debido a la reducción en el volumen disponible por el espacio ocupado de las moléculas de biopolímero.

- Interacciones hidrofóbicas. Esta interacción es importante para biopolímeros en soluciones acuosas que tienen grupos no polares y se manifiesta como una tendencia por los grupos no polares para asociarse entre sí.
- Puentes de hidrógeno. Esta interacción es importante para biopolímeros que tienen segmentos a lo largo de su cadena que pueden formar puentes de hidrógeno relativamente fuertes con segmentos de otras moléculas; por ejemplo, a través de estructuras helicoidales o laminares.

La importancia de estas interacciones en un sistema en particular depende de los tipos de biopolímeros utilizados (por ejemplo, peso molecular y densidad de carga), la composición de la solución (pH y fuerza iónica) y las condiciones ambientales (temperatura y cizallamiento). Mediante la modulación de estos parámetros es posible controlar las interacciones entre biopolímeros y por lo tanto, crear diferentes atributos funcionales en un sistema alimenticio (McClements, 2006).

El tipo, número, secuencia y unión de monómeros en la estructura interna de un biopolímero determina sus características moleculares en solución; por ejemplo, longitud de la cadena, ramificación, carga, flexibilidad e hidrofobicidad (Cui, 2005). Estas características moleculares determinan en gran medida los atributos funcionales de los biopolímeros en los alimentos; por ejemplo, su capacidad espesante y la formación de geles. Los biopolímeros se pueden utilizar de manera individual y proporcionar muchos de estos atributos funcionales; sin embargo, nuevas o mejores funcionalidades a menudo pueden ser diseñadas en un sistema utilizando mezclas de biopolímeros (McClements, 2006).

Una ventaja sobre la formación de complejos de proteínas con polisacáridos sulfatados, es la protección otorgada contra la pérdida de solubilidad como resultado de la agregación de las proteínas durante el calentamiento o después de un tratamiento a una alta presión. El efecto protector se debe probablemente al bloqueo de los sitios hidrófobos de la proteína por el polisacárido. Interacciones de la caseína con carragenina o pectina son ampliamente utilizados en el control de la textura y estabilidad de algunos productos lácteos (yogur) (Weinbreck, 2004). Sin embargo, se ha evidenciado un trabajo

muy limitado sobre la interacción electrostática entre proteínas de lactosuero y carrageninas.

## 2.4 Materiales utilizados

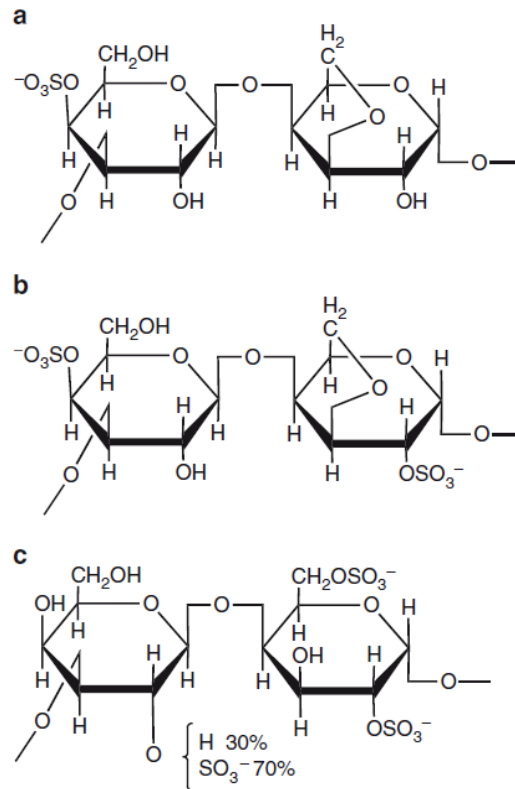
Se han evidenciado en la literatura diversos materiales que se pueden utilizar para entrapar bacterias probióticas. Sin embargo, sólo un número limitado de los mismos han sido certificados para aplicaciones alimentarias como "materiales generalmente reconocidos como seguros" o bien por sus siglas en inglés GRAS. Algunos de estos polisacáridos (pectina, almidón modificado, goma de xantana, goma de algarrobo, goma guar, alginato, etc) a menudo se agregan a productos lácteos para estabilizar su estructura, mejorar su viscosidad y alterar las características texturales.

Específicamente, las carrageninas se han utilizado como agentes espesantes y estabilizadores en la industria láctea (Simeone y col., 2004; Thaiudom y Goff, 2003).

### 2.4.1 $\kappa$ -carragenina

La carragenina es un polisacárido lineal de alto peso molecular que proviene de la pared celular de algas marinas rojas (*Rhodofíceas*). Su fórmula química consiste en unidades de D-galactosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1→3) y  $\beta$ -(1→4) alternadamente; se diferencian por la concentración de azúcares anhidros 3,6-anhidro-D-galactosa (3,6-AG) que contengan y por la posición en que se encuentren los grupos sulfato; así como por la cantidad de estos últimos. A continuación se presentan los tipos de carragenina (Figura 2.3) (Wandrey y Hunkeler, 2002).

- $\kappa$ - carragenina: 25 a 30% éster sulfato y 28 a 35% 3,6-AG
- $\iota$ -carragenina: 28 a 35% éster sulfato y 25 a 30% 3,6-AG
- $\lambda$ -carragenina: 32 a 39% éster sulfato y no contiene 3,6-AG



**Figura 2.3. Tipos de carragenina: (a)  $\kappa$ , (b)  $\iota$  y (c)  $\lambda$  (Fuente: Mangione y col., 2003).**

La  $\kappa$ -carragenina comercial tiene un peso molecular aproximado entre 400-560 kDa, aunque las que son procesadas de algas *Eucheuma* tienen un peso molecular ligeramente más alto (615 kDa) (Hoffmann y col., 1996).

Las propiedades espesantes y gelificantes son diferentes en los tres tipos de carrageninas. Por ejemplo, la forma kappa forma geles firmes con iones de potasio; mientras que los de tipo iota y lambda son sólo ligeramente afectadas por estos iones. La carragenina iota interactúa con iones calcio y forma geles elásticos ligeros; sin embargo, las sales no tienen efecto sobre las propiedades del tipo lambda (Imeson, 2007). Las soluciones de carragenina pierden su viscosidad y los geles su fuerza en sistemas con pH por debajo de 4.3. Este efecto se debe a la hidrólisis que se produce cuando se rompen los enlaces de la molécula 3,6-anhidrogalactosa. La tasa de hidrólisis se incrementa a temperaturas elevadas y a niveles bajos de cationes. No obstante, una vez que se ha enfriado por debajo de la temperatura de gelificación, la carragenina retiene los iones potasio y grupos sulfato, impidiendo de esta forma que siga el proceso de hidrólisis. En

consecuencia, en los productos ácidos, la carragenina se debe añadir en el último momento para evitar su degradación excesiva por la presencia de ácido (Hoffmann y col., 1996).

#### 2.4.2 Proteínas lácteas en el suero de la leche

Las proteínas del suero de la leche son materias primas ampliamente disponibles, económicas, naturales y GRAS, con alto valor nutricional y buenas propiedades sensoriales; tienen diversas propiedades estructurales y funcionalidades que facilitan en gran medida su uso como vehículos de diversos bioactivos (Livney y col., 2010), además de contar con propiedades estructurales y fisicoquímicas que facilitan su funcionalidad en los sistemas de liberación. Estas propiedades incluyen la unión de iones y moléculas pequeñas, tienen excelentes propiedades de superficie, autoensamblaje, gelificación, aumento del volumen del gel sensible al pH de utilidad para liberación controlada, interacciones con otras macromoléculas para formar complejos coacervados. Lo anterior, permite controlar la biodisponibilidad del bioactivo entrampado y promover su biodisponibilidad (Livney y col., 2010).

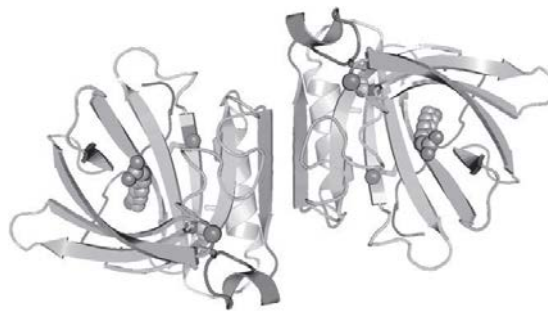
En la Tabla 2.4 se menciona la composición de las dos principales proteínas del lactosuero ( $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina).

**Tabla 2.4. Composición de las proteínas del lactosuero  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina.**

Proteína	Proporción en masa	Número de aminoácidos	Masa molecular (Da)	Punto isoelectrico	Enlaces disulfuro/tioles	Comentarios
$\beta$ -lactoglobulina	60	162	18,363	5.35	2/1	Dos variantes comunes (A y B)
$\alpha$ -lactoalbúmina	20	123	14,178	4.80	4	Cerca del 10% de las moléculas son glicosiladas.

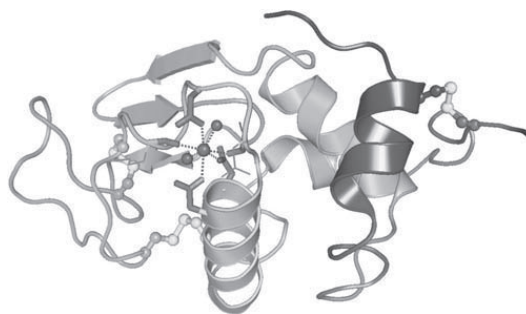
Fuente: Farrel y col. (2004)

**2.4.2.a  $\beta$ -lactoglobulina.** La proteína  $\beta$ -lactoglobulina (Figura 2.4) es la proteína de lactosuero más abundante en la leche de la mayoría de los mamíferos ( $\sim 10\%$  de la proteína total o  $\sim 50\%$  de la proteína del lactosuero). Es una pequeña proteína globular, tiene 2 puentes disulfuro y un grupo tiol libre. Se encuentra principalmente como dímero en el pH de la leche ( $\sim 6.7$ ). Las variantes más abundantes son la  $\beta$ -lactoglobulina A y  $\beta$ -lactoglobulina B (Farrell y col., 2004) y difieren por dos sustituciones de aminoácidos, la Asp64Gly y Val118A respectivamente.



**Figura 2.4. Diagrama de la estructura dimérica de la  $\beta$ -lactoglobulina A (Fuente: Delano, 2002).**

**2.4.2.b  $\alpha$ -lactoalbúmina.** Proteína globular que se encuentra en la leche de todos los mamíferos. La  $\alpha$ -lactoalbúmina (Figura 2.5) es la segunda proteína de lactosuero más abundante en la leche de vaca, es una metaloproteína globular con cuatro puentes disulfuro, estructuralmente es homóloga a la lisozima y requiere calcio para asumir su pliegue funcional. Es una proteína reguladora de la lactosa, sistema de la enzima sintetasa en la glándula mamaria. En el aparato de Golgi de la célula epitelial la  $\alpha$ -Lactoalbúmina es el componente regulador del complejo de la lactosa sintetasa (en la que se combina con la enzima  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa-I) (Brew, 2003).



**Figura 2.5. Diagrama de la estructura de la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Fuente: Delano, 2002).**



### 2.4.3 Resistencia de biopolímeros utilizados en la protección de probióticos en condiciones gastrointestinales

Ding y Shah (2009) evidenciaron la encapsulación de diez tipos de bacterias probióticas (*L. rhamnosus*, *B. longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* tipo Bl-04, *B. lactis* tipo Bi-07, *L. rhamnosus* HOWARU y HOWARU *B. bifidum*) utilizando diversos materiales de pared (alginato, goma guar, goma xantana, goma de algarrobo y carragenina). Los resultados indicaron que las bacterias probióticas encapsuladas en alginato, goma xantana y carragenina mostraron una mejor viabilidad que las bacterias probióticas libres bajo condiciones ácidas. Cuando las bacterias probióticas libres fueron expuestas a condiciones ácidas, partiendo de una concentración inicial de  $10.45 \log \text{ ufc mL}^{-1}$ , se redujo la viabilidad de las bacterias probióticas a una población final de  $3.1 \log \text{ ufc mL}^{-1}$ ; mientras que en presencia de alginato, goma xantana y carragenina disminuyó la concentración celular hasta 5.9, 3.5, y  $5.7 \log \text{ ufc mL}^{-1}$  respectivamente.

Por otra parte microcápsulas de coacervado conteniendo a *B. Lactis* y *L. acidophilus* en complejos de caseína/pectina protegieron la viabilidad de estas bacterias hasta por 90 días de almacenamiento (Oliveira y col., 2007). Por otra parte, *Lactobacillus* E1 inmovilizado mediante coacervación compleja utilizando alginato de sodio (2 % p/v), dextrina (5 % p/v) y gelatina (4 % p/v), conservó su viabilidad hasta por 37 días (Xin y col., 2009).

Finalmente, cabe mencionar que son pocos los trabajos en los que se ha estudiado el entrapamiento y protección de bacterias probióticas por el método de coacervación compleja y aún más específicamente a *L. plantarum*, por lo que es necesario desarrollar estudios sistemáticos en los que se evalúe la interacción entre biopolímeros y agentes bioactivos (proteína-probiótico-polisacárido), así como la protección celular y propiedades estructurales que mejoren las características de un alimento en el que puedan ser incorporados los complejos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los profesionales de la salud están prestando cada vez más atención a los efectos benéficos en la salud humana por parte de alimentos conteniendo probióticos. Se ha informado que los microorganismos probióticos pueden desempeñar un importante papel en las funciones inmunitaria, digestiva y respiratoria; además de reducir de forma significativa las enfermedades infecciosas en niños (FAO, 2001). Para que las bacterias probióticas cumplan su funcionalidad en el ser humano, es necesario que sobrevivan durante el proceso de preparación y vida de anaquel del alimento usado como vehículo; así como durante su paso a través del tracto gastrointestinal. Es necesario entonces el diseño y evaluación de sistemas grado alimenticio de protección y liberación controlada de probióticos en el colon. En este contexto, resulta interesante explorar la preparación de coacervados de proteína de lactosuero- $\kappa$ -carragenina (proteína – polisacárido) como sistemas de protección y liberación controlada de probióticos, en los cuales como primera etapa de fabricación se acompleje la bacteria probiótica con la proteína y en una segunda etapa este complejo se haga interaccionar con el polisacárido para formar un coacervado proteína de lactosuero – *L. plantarum* -  $\kappa$ - carragenina, con el fin de mejorar la eficiencia de atrapamiento de las bacterias y su protección contra el efecto de las condiciones gastrointestinales. Además, esta tecnología podría ofrecer ventajas sobre tecnologías ya existentes, debido a su fácil implementación y costo relativamente bajo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Obtener un complejo coacervado formado por aislado de proteína de lactosuero - *L. plantarum* -  $\kappa$ -carragenina y caracterizar el efecto de entrapamiento y protección de los complejos coacervados sobre *L. plantarum* bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

### 4.2 Objetivos Específicos

- ▲ Establecer los parámetros para la formación del complejo coacervado proteína de lactosuero - *L. plantarum* -  $\kappa$ -carragenina.
- ▲ Evaluar el rendimiento y la capacidad de inclusión de *L. plantarum* entrampado en los coacervados.
- ▲ Estudiar la estructura microscópica y diámetro hidrodinámico de los complejos coacervados.
- ▲ Evaluar las propiedades reológicas de los complejos coacervados.
- ▲ Determinar la supervivencia de *L. plantarum* entrampado en los complejos coacervados después de su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas, en comparación con células libres.

## **5. HIPÓTESIS**

Los complejos proteína de lactosuero - *L. plantarum* -  $\kappa$ -carragenina son capaces de proporcionar protección comparable o superior a *L. plantarum* contra condiciones gastrointestinales simuladas en comparación con células libres.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental para llevar a cabo la realización de este trabajo fue de acuerdo con el siguiente diagrama de flujo (Figura 6.1).



**Figura 6.1. Protocolo experimental empleado para el desarrollo de la presente investigación**

### 6.1. Ubicación del trabajo

La formación del coacervado se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa en el Laboratorio de Aprovechamiento Agroalimentario ubicado en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en el Laboratorio de Tecnología de los Alimentos, ubicado en el Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. En este último, también se llevó a cabo el análisis fisicoquímico, microbiológico y reológico. Finalmente el estudio de la microestructura se efectuó en el Laboratorio de Servicio Académico del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## 6.2. Materiales

Aislado de proteína de lactosuero (W; Hilmar™ 9400, 93 % proteína en base seca; Hilmar Ingredients, Hilmar, CA, EUA) y  $\kappa$ -carragenina (K; Grindsted® Carrageenan CH 407, Danisco, Dinamarca). Ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etanol absoluto y cloruro de sodio grado analítico fueron adquiridos en Química Laitz, S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). Caldo para Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe (MRS) y agar fueron obtenidos en BD DIFCO Becton Dickinson and Company (Detroit, MI, EUA). El fosfato de sodio fue adquirido en J.T. Baker, Xalostoc, Estado de México, México y glutaraldehído al 2.5 % (v/v) (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA). Toda el agua usada en los experimentos fue destilada y desionizada.

## 6.3. Cultivo de *L. plantarum* y preparación del concentrado celular

Un cultivo liofilizado de *L. plantarum* Lp-115 ATCC:SD5209 (Danisco, Brabrand, Dinamarca) fue cultivado por 18 h a 37 °C (1 % p/v) en caldo MRS estéril. El cultivo obtenido fue subcultivado (37 °C, 18 h) dos veces en caldo MRS estéril usando 1 % (p/v) de inóculo para realizar la activación y adaptación de *L. plantarum*. Las células fueron cosechadas en la etapa final de crecimiento logarítmico usando una centrífuga minispin plus (Eppendorf Centrifuge Type 22331, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) operada a 15800  $\times g$  por 10 min. El sobrenadante fue decantado y las células fueron resuspendidas en solución fisiológica (0.1 g NaCl 100 mL<sup>-1</sup>), obteniendo un concentrado celular (L) conteniendo  $9.5 \pm 0.11$  log ufc mL<sup>-1</sup>.

## 6.4. Soluciones base

Las soluciones base de biopolímeros se prepararon en condiciones estériles, mediante la dispersión de W (1, 3 y 5 % p/v, pH 6.60, 6.89 y 6.99, respectivamente) y K (0.5 y 1 % p/v, pH 9.4) en agua desionizada a temperatura ambiente ( $22 \pm 3$  °C) aplicando agitación moderada (600 rpm) por 1 h mediante un equipo caframo (modelo RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA). Las soluciones fueron almacenadas durante 24 h a 4°C para permitir su completa hidratación.

El concentrado celular L fue resuspendido en una solución 1 mM de  $\text{KNO}_3$  (pH 6.8) obteniendo una concentración de  $9.25 \log \text{ufc mL}^{-1}$  (Pelletier y col., 1997).

## 6.5. Formación de los complejos

### 6.5.1. Mediciones de potencial $\zeta$ y tamaño de partícula

Se determinó el potencial  $\zeta$  de las soluciones de W (1 % p/v) y K (0.5 % p/v) en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, Worcestershire, RU), en un intervalo de pH de 2 a 7, con el fin de obtener un panorama sobre la posible ventana de interacción entre ellos. El potencial  $\zeta$  de *L. plantarum* como función del pH fue determinado en una solución de  $\text{KNO}_3$  1 mM (Pelletier y col., 1997). El pH de las soluciones de los biopolímeros se ajustó al valor requerido mediante la adición de HCl 0.1N o NaOH 0.1N.

El diámetro hidrodinámico medio ( $d_h$ ) de los complejos coacervados se determinó mediante mediciones de dispersión de luz dinámicas en el equipo Zetasizer Nano ZS. Los coacervados fueron diluidos en agua desionizada ajustando el pH a 4.0 y 4.5 dependiendo del complejo formado a una concentración de 0.01 % p/p (Harnsilawat y col., 2006).

### 6.5.2. Puntos de equivalencia de aislado de proteína de lactosuero y $\kappa$ -carragenina

Las curvas de titulación potenciométricas fueron obtenidas para las soluciones de biopolímeros con el fin de determinar su punto de equivalencia. Muestras de 40 mL de las soluciones de W (1 % p/v) y K (1 % p/v) se titularon con alícuotas de 0.1 mL de HCl 0.05 N. Un tiempo de 60 s transcurrió entre la adición de alícuotas consecutivas con el fin de que la reacción alcanzara el equilibrio (Espinosa-Andrews y col., 2010). El valor de pH de las soluciones de los biopolímeros se monitoreó continuamente con un potenciómetro (Hanna Instruments, modelo HI 98240, Smithfield, RI, EUA) a 25 °C. Para obtener los puntos de equivalencia de las soluciones se determinó el punto de inflexión de las curvas de titulación.

### 6.5.3. Elaboración de los complejos

Las soluciones de W (30 g; 1, 3 y 5 % p/v) se adicionaron a la solución de L, resultando las soluciones (W-L)<sub>1%</sub>, (W-L)<sub>3%</sub> y (W-L)<sub>5%</sub> con una carga celular de  $9.15 \pm 0.11 \log \text{ ufc g}^{-1}$ . El comportamiento del potencial  $\zeta$  - pH de las soluciones W-L se determinó con el fin de confirmar la posible formación de complejos entre las células de *L. plantarum* y W. Posteriormente, las soluciones W-L se adicionaron a 9 g de solución de K (1 % p/v), ajustando el pH entre 2.0 y 6.0, usando HCl 0.1 N. Las mezclas se mantuvieron a 4 °C durante 48 h para asegurar la formación completa de los complejos. Después, las mezclas se centrifugaron a 1350 rpm por 30 min con el fin de separar los diferentes complejos coacervados W-L-K (CC<sub>y/z</sub>), donde "y" representa las relaciones en peso 3.3:1; 10:1 y 16.7:1 entre W y K, y "z" el valor de pH. El procedimiento turbidimétrico descrito por Ramírez - Santiago y col. (2012) fue usado para determinar el pH al cual ocurrió la máxima coacervación; esto es, cuando el sobrenadante mostró la absorbancia más baja (turbidez). La absorbancia del sobrenadante se midió a 350 nm (a esta longitud de onda la absorbancia de los complejos fue significativamente mayor que para cualquiera de las soluciones de biopolímeros), usando un espectrofotómetro Spectronics Genesys 5 UV/Vis (Spectronic Unicam, Rochester, NY, EUA).

### 6.6. Rendimiento, contenidos de proteína y humedad de los complejos coacervados

Los complejos coacervados fueron sometidos a determinación de contenido de proteína por el método de Kjeldahl considerando un factor de conversión de 6.25 y reportándose en base húmeda. El contenido de humedad se determinó por el método de secado en estufa (AOAC, 1995).

El rendimiento de coacervación se obtuvo mediante la siguiente ecuación (Xiao y col., 2011):

$$\% \text{ RC} = (m_C / m_{BT}) \times 100$$

Donde: % RC = rendimiento de la coacervación;  $m_C$  = peso de coacervado en base seca;  $m_{BT}$  = peso total de biopolímeros utilizados en base seca.



### 6.7. Eficiencia de entrapamiento de *L. plantarum*

Lotes de  $CC_{y/z}$  se dispersaron (1:10 v/v) en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) (Pimentel-González y col., 2009), mediante agitación (400 rpm) mediante un equipo caframo (modelo RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA) por 10 min a temperatura ambiente ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 2 h, con el fin de liberar las células entrapadas. El número de células viables en la dispersión se determinó por conteo en placa usando agar MRS, a una temperatura de incubación de  $37^\circ\text{C}$  por 48 h. La eficiencia de entrapamiento (EE), la cual es una medida combinada de eficacia de entrapamiento y supervivencia de células viables se calculó mediante la siguiente ecuación (Doherty y col., 2011):

$$EE = N/N_0 \times 100$$

Donde:  $N = \log$  ufc de células viables entrapadas y liberadas del  $CC_{y/z}$  y  $N_0 = \log$  ufc de células libres adicionadas a la dispersión de biopolímeros usada para la preparación del  $CC_{y/z}$ .

Los  $CC_{y/z}$  fueron observados con un microscopio óptico (Olympus BX53, Olympus Optical Co., Tokio, Japón) acoplado a un sistema de análisis de imágenes (cámara digital Olympus C3030, Olympus America Inc., EUA y al software Image Pro-Plus versión 4.5, Media Cybernetics, Inc., L.P., Silver Spring, EUA), para confirmar el entrapamiento de las células en los complejos coacervados. Para este fin, las células se tiñeron con cristal violeta utilizando una técnica estándar (Madigan, 2012).

### 6.8. Propiedades reológicas de los coacervados

Las propiedades reológicas de los complejos coacervados se determinaron en un reómetro Physica MCR 301 (Dynamic Shear Rheometer, Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania), utilizando una geometría cono-plato ( $1^\circ$ , 50 mm de diámetro). 1.5 g de  $CC_{y/z}$  se colocaron cuidadosamente en el plato a temperatura ambiente y dejaron reposar por 30 min para permitir la recuperación de la estructura. Las muestras fueron sometidas a barridos de amplitud (0.01 – 100 % de deformación, 1 Hz) para caracterizar la región

viscoelástica lineal de los  $CC_{y/z}$ . Posteriormente, los  $CC_{y/z}$  (1.5 g) se sometieron a un barrido de tasa de corte ( $10^{-3}$  a  $10^3$   $s^{-1}$ ) registrándose la viscosidad aparente de los  $CC_{y/z}$  (Chien y col., 2009). La temperatura se mantuvo a 4 °C en todos los experimentos, mediante un sistema de medición y control de temperatura Physica TEK 150P.

### 6.9. Análisis de microestructura de los coacervados

Muestras de  $CC_{y/z}$  se fijaron con una disolución de glutaraldehído al 2% p/v en buffer de fosfato (0.1 M, pH 7.2) por 6 h; seguido de su deshidratación en disoluciones acuosas de etanol con concentraciones crecientes (50, 60, 70, 80, 90 y 100 %) por 30 min en cada una (Lobato-Calleros y col., 2006). Posteriormente, las muestras se secaron a punto crítico en un CPA II Technics Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, EUA) y fueron cubiertas con una fina capa de oro en un Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón) (Kálab, 1979). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL, modelo JMS-035, Jeol Ltd., Akishima, Japón) operado a 20 KV, a una amplificación de 10 000 x para detectar células de *L. plantarum* y microestructura de los  $CC_{y/z}$ .

### 6.10. Supervivencia de *L. plantarum* atrapado bajo condiciones gastrointestinales simuladas

Para determinar la supervivencia de *L. plantarum* en jugo gástrico simulado, 1 g de cada  $CC_{y/z}$  se colocó por separado en tubos conteniendo 9 mL de solución de jugo gástrico simulado (pH 3.0, HCl 0.1 N). Las muestras se incubaron a 37°C por 3 h en un baño de agitación orbital (Precision Scientific 360, Chicago, Illinois, EUA). Posteriormente, las muestras se filtraron; el filtrado se lavó con solución salina estéril y se depositó en 9 mL de una solución estéril (1 g 100 mL<sup>-1</sup>) de extracto de bilis porcina (B8631, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) a pH 6.5. Los  $CC_{y/z}$  se incubaron a 37°C por 3 h bajo agitación. Al final del período de incubación los  $CC_{y/z}$  se colocaron en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) y se cultivaron en agar MRS a 37 °C por 48 h. La supervivencia de *L. plantarum* se expresó como el porcentaje de colonias que crecieron con respecto a las iniciales (Sandoval-Castilla y col., 2010).

### **6.11. Análisis de datos**

Los análisis se llevaron a cabo por triplicado a partir de 3 experimentos independientes llevados a cabo utilizando un diseño experimental completamente al azar. Los datos se sometieron a Análisis de Varianza de Clasificación Simple y un análisis de comparación de medias de Tukey. Se empleó un Análisis Multifactorial de Varianza para determinar cuáles factores (pH y relación en peso W - K) tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre las características de los CC<sub>yz</sub>. El valor de significancia se estableció en  $p \leq 0.05$ . El análisis de datos se realizó utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc, Cambridge, MA, EUA).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

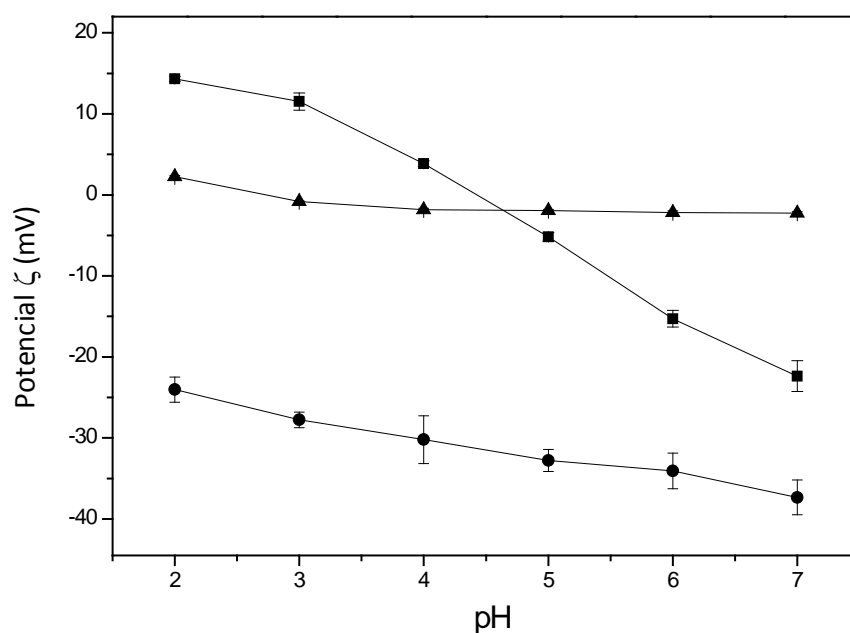
### 7.1. Potencial $\zeta$ de *Lactobacillus plantarum* y biopolímeros

La variación del potencial  $\zeta$  con respecto al pH para las soluciones de W (1 % p/v), K (0.5 % p/v) y L (9.25 log ufc mL<sup>-1</sup>, 1 mM KNO<sub>3</sub>) se muestran en la Figura 7.1. Pelletier y col., (1997) estudiaron la influencia de soluciones de KNO<sub>3</sub> con diferente fuerza iónica sobre la movilidad electroforética de diferentes cepas de *Lactobacillus* en un intervalo de pH de 2 a 8, encontrando que la movilidad electroforética se reducía drásticamente con el aumento de la fuerza iónica. Sin embargo, a una fuerza iónica 1mM de KNO<sub>3</sub> las cepas bacterianas estuvieron cargadas negativamente a valores altos de pH y progresivamente se convirtieron en positivamente cargadas con la disminución del pH. De esta forma, para evitar el enmascaramiento de la movilidad electroforética de las células por la fuerza iónica, un medio de referencia 1 mM de KNO<sub>3</sub> es comúnmente utilizado para evitar la absorción no específica de iones en las superficies celulares.

Para L el potencial  $\zeta$  varió entre  $5.25 \pm 0.35$  mV a pH 2.0 a  $-4.4 \pm 0.28$  mV a pH 7.0. Un valor de potencial  $\zeta=0$  se produjo a pH 2.6 (punto isoeléctrico), así valores de  $\zeta$  negativos se presentaron con incrementos en el pH. La pared celular de bacterias ácido lácticas Gram-positivas consiste principalmente de peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, proteínas y polisacáridos (Delcour y col., 1999). La disminución en el potencial  $\zeta$  entre pH 2 y 7 probablemente fue causada por el aumento en la disociación de grupos ácido débiles, tanto de los polisacáridos constituyentes de la pared celular, como de las proteínas de la superficie (Schär-Zammaretti y Ubbink, 2003).

Los valores de potencial  $\zeta$  para la solución de K fueron negativos en todo el intervalo de pH estudiado, variando desde  $-17.30 \pm 2.11$  a pH 2.0 a  $-39.10 \pm 3.80$  mV a pH 8.0. Esta tendencia concuerda con lo informado por Jones y col. (2011). Los valores de potencial  $\zeta$  para la solución de W fueron positivos en el intervalo de pH 2.0 a 4.3, con un cambio de valores negativos a valores de pH superiores a 4.5. El valor de  $\zeta$  fue de  $-5.19 \pm 0.55$  mV a pH 5.0 y de  $-23.43 \pm 1.06$  mV a pH 8.0. El punto isoeléctrico (PI) se produjo a un pH de 4.0. Se ha informado que el PI de W se puede encontrar en el intervalo de pH de 4.1 a 5.2, debido a la presencia de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina (Winbreck y col., 2004). Los valores de  $\zeta$  negativos se deben a la ionización de los restos de grupos carboxílicos

(-COOH) en grupos carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ); mientras que valores positivos de  $\zeta$  son debidos a la protonación de los restos de aminoácidos ( $-\text{NH}_2$ ) dando lugar a grupos amonio ( $-\text{NH}_3^+$ ) (Conn y Stumpf, 1980).



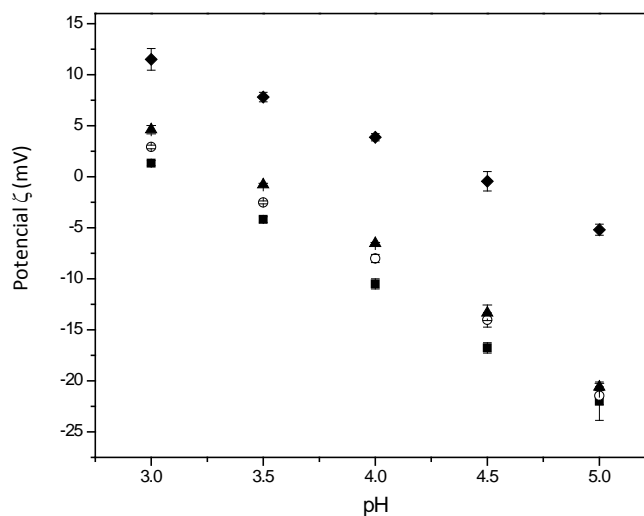
**Figura 7.1. Potencial  $\zeta$  de soluciones de aislado de proteína de lactosuero (1% p/v, ■),  $\kappa$ -carragenina (0.5% p/v, ●) y *L. plantarum* (9.25 log<sub>10</sub> ufc mL<sup>-1</sup>, ▲).**

## 7.2. Puntos de equivalencia de aislado de proteína de lactosuero y $\kappa$ -carragenina

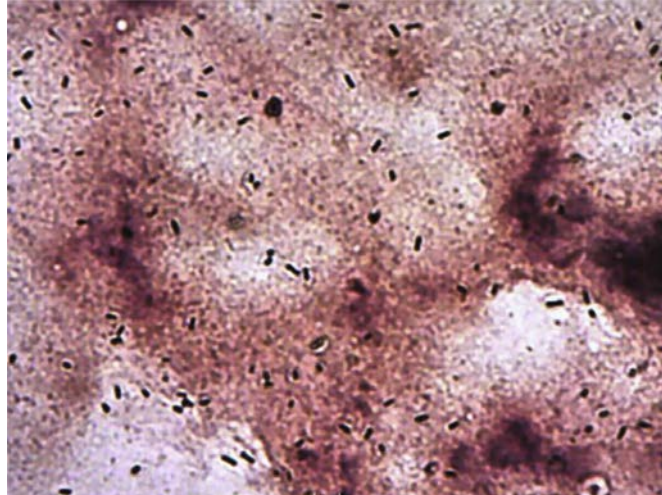
Los puntos de equivalencia de las soluciones de biopolímeros (W 1 % p/v y  $\kappa$ -carragenina 1 % p/v) se determinaron a partir de los puntos de inflexión de las curvas de titulación con HCl 0.05 N (datos no mostrados). Los miliequivalentes de HCl necesarios para alcanzar el punto de inflexión fueron 0.624 y 0.187 unidades para las soluciones de W y K, respectivamente. A partir de estos resultados, la máxima coacervación teórica entre W y K debería ocurrir a una relación en peso de 3.3:1, respectivamente; esto es, 3.3 g de W a 1 g de K. A esta relación en peso, las macromoléculas muestran cargas opuestas de magnitud equivalente; tal que las fuerzas de atracción entre ambos biopolímeros es máxima y toma lugar una mayor interacción; esto es, los grupos ionizados de ambas macromoléculas son mutuamente neutralizados permitiendo la formación de complejos insolubles (Espinosa-Andrews y col., 2010).

### 7.3. Confirmación del acomplejamiento entre aislado de proteína de lactosuero y *Lactobacillus plantarum*

La Figura 7.2 muestra la variación del potencial  $\zeta$  como una función del pH (3.0 - 5.0) para la solución de W (1 % p/v) y las dispersiones W - L. En todos los casos se presentó una relación lineal entre la disminución del potencial  $\zeta$  y el aumento del pH. Los valores de potencial  $\zeta$  en todo el rango de pH variaron de la siguiente manera: 1 % p/v W > (W-L)<sub>5</sub> % > (W-L)<sub>3</sub> % > (W-L)<sub>1</sub> %. La disminución en el potencial  $\zeta$  de las soluciones (W-L) con respecto a la de W 1 % p/v indicó la formación de complejos W-L, a pesar de la carga relativamente débil de las células de *L. plantarum*. El entrapamiento de las células en la matriz del complejo coacervado es debido no solamente a las interacciones electrostáticas, sino a una interacción más compleja entre las propiedades de la superficie de la matriz y los componentes celulares (Thonart y col., 1982). Las cargas en el sistema no están presentes en una superficie bien definida, sino que se distribuyen a lo largo de la pared celular. Además, los restos hidrófobos dentro de la pared celular pudieron inducir la adhesión de células de *L. plantarum* a los restos hidrófobos de W (Schär - Zammaretti y Ubbink, 2003). Así, concentraciones mayores de W incrementaron la formación de complejos con células de *L. plantarum*, a medida que más sitios hidrófobos están disponibles para este propósito. La Figura 7.3 muestra una micrografía tomada en un microscopio óptico que confirma que un número relativamente alto de células de *L. plantarum* están entrapadas en la matriz del complejo coacervado CC<sub>16.7:1.4.5</sub>.



**Figura 7.2. Potencial  $\zeta$  de aislado de proteína de lactosuero (W, 1% p/v, ◆) y complejos solubles W - *L. plantarum* (L, 9.1 log<sub>10</sub> ufc mL<sup>-1</sup>) a diferentes % de W: (■) (W - L)<sub>1</sub>%, (○) (W - L)<sub>3</sub>% y (▲) (W - L)<sub>5</sub>%.**



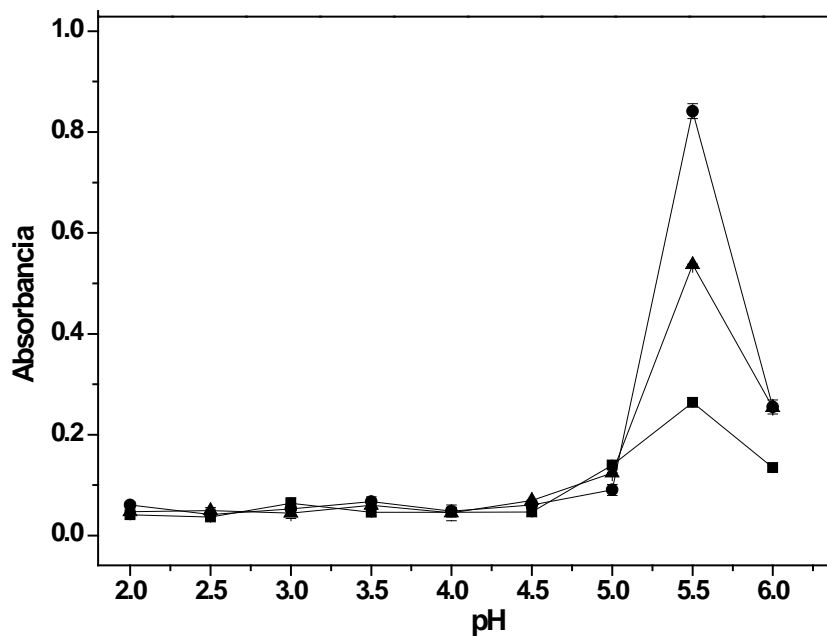
**Figura 7.3. Micrografía óptica del complejo coacervado obtenido a una relación en peso aislado de proteína de lactosuero :  $\kappa$ -carragenina de 16.7:1 a pH 4.5, donde células de *L. plantarum* entrampadas pueden ser observadas.**

#### **7.4. Turbidez de los complejos**

La Figura 7.4 muestra la absorbancia del sobrenadante *versus* pH durante el acomplejamiento de W-L con K. La absorbancia de dispersiones proteína/polisacárido puede ser considerada como un indicador de la formación y disociación de complejos proteína/polisacárido (Ramírez -Santiago y col., 2012).

Todos los perfiles mostraron tendencias similares y se caracterizaron por tres regiones observadas de altos a bajos valores de pH, de la siguiente manera: (A) una región a valores de pH relativamente altos (~5.5 a 6.0) donde la absorbancia aumentó bruscamente para todas las mezclas W-L y K. En este intervalo de pH los complejos W-L comenzaron a interactuar con K alcanzando una absorbancia máxima aproximadamente a pH 5.5, debido a un aumento en el número y el tamaño de complejos (W-L) – K, los cuales permanecieron solubles debido a una neutralización incompleta de los restos K con carga negativa y los restos de W cargados positivamente (Ramírez-Santiago y col., 2012; Weinbreck, 2004); (B) una región intermedia de pH (5.5 a 4.5) caracterizada por un decremento pronunciado de las lecturas de absorbancia, en la cual los complejos solubles comenzaron a

agregarse y eventualmente a precipitar como complejos coacervados ( $CC_{y/z}$ ). En esta región, se presentó una distribución más equilibrada entre las moléculas de W con carga positiva y las moléculas de K cargadas negativamente, ocurriendo una neutralización de cargas, y (C) una región final en el rango de pH aproximado entre 4.5 y 2.0, donde la absorbancia alcanzó valores mínimos prácticamente constantes, indicando la máxima separación de fases. Las proteínas de W se cargaron positivamente por debajo de su punto isoeléctrico e interactuaron electrostáticamente con los grupos carboxilato cargados negativamente de K, ocurriendo una neutralización entre biomoléculas. Con base en estos resultados, los estudios posteriores se limitaron a complejos coacervados obtenidos a valores de pH de 4.0 y 4.5.



**Figura 7.4.** Absorbancia del sobrenadante como función del pH durante la formación de complejos aislado de proteína de lactosuero (W) - *L. plantarum* -  $\kappa$ -carragenina (K) a diferentes relaciones en peso W : K: 3.3:1 (■), 10:1 (●) y 16.7:1 (▲).



### 7.5. Rendimiento, eficiencia de entrapamiento, contenidos de proteína y humedad de los complejos coacervados

El Análisis de Varianza Multifactorial mostró que conforme la relación en peso W:K se incrementó, el rendimiento y la eficiencia de entrapamiento de los CC<sub>y/z</sub> disminuyeron, mientras que su contenido de proteína aumentó (Tabla 7.1). Estos resultados se pueden atribuir a dos mecanismos opuestos tomando lugar. A medida que la relación en peso W:K aumentó de 3.3:1 (donde ambas macromoléculas mostraron cargas opuestas en la misma magnitud) a relaciones en peso mayores de W:K (10.0:1 y 16.7:1), el rendimiento de los CC<sub>y/z</sub> disminuyó, resultando en una relación más baja de células atrapadas sobre el número total inicial presente en las dispersiones de los biopolímeros.

**Tabla 7.1. Valores medios del rendimiento, eficiencia de entrapamiento y contenidos de humedad y proteína de los complejos coacervados.**

Parámetro	Relación en peso de W:K			pH	
	3.3:1	10:1	16:1	4	4.5
Parámetro (%)					
Rendimiento	75.4 ± 1.7 <sup>c</sup>	55.9 ± 5.8 <sup>b</sup>	40.7 ± 6.2 <sup>a</sup>	53.9 ± 17.8 <sup>a</sup>	60.8 ± 12.4 <sup>b</sup>
Humedad	86.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	86.7 ± 1.5 <sup>a</sup>	86.2 ± 1.6 <sup>a</sup>	85.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	87.6 ± 1.3 <sup>b</sup>
Proteína	70.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	80.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	81.8 ± 1.7 <sup>c</sup>	76.5 ± 4.8 <sup>a</sup>	78.2 ± 6.3 <sup>b</sup>
EE	72.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	54.3 ± 5.6 <sup>b</sup>	39.6 ± 6.0 <sup>a</sup>	51.9 ± 16.7 <sup>a</sup>	59.1 ± 11.9 <sup>b</sup>

Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas entre medias ( $p \leq 0.05$ ).

Una disminución significativa en los rendimientos, eficiencia de entrapamiento y contenidos de proteína y humedad de los CC<sub>y/z</sub> se presentó cuando el pH se redujo de 4.5 a 4.0, debido a que el grado de ionización de los grupos carboxilato (COO<sup>-</sup>) disminuyó por un exceso de contraiones H<sup>+</sup>, así un número reducido de moléculas de K estuvieron disponibles para interactuar con los complejos W-L (Pasika, 1977).

## 7.6. Propiedades reológicas de los complejos coacervados

### 7.6.1. Propiedades de flujo

Las variaciones de la viscosidad aparente como función de la tasa de corte para los diferentes complejos coacervados se muestran en la Figura 7.5. Todos los  $CC_{y/z}$  exhibieron curvas de flujo típicas de materiales caracterizados por una viscosidad estructural; esto es, mostrando una región Newtoniana a bajas tasas de corte (0.001 – 0.003 1/s), seguida de una región de adelgazamiento al corte a tasas de corte intermedias (0.003 – 100 1/s). Este tipo de comportamiento de flujo se debe probablemente a la formación de una red reversible "enredada"; estructura que bajo la aplicación de un esfuerzo cortante sufre ruptura y presenta un comportamiento dependiente del corte, pero que puede ser recuperada bajo reposo o condiciones de equilibrio (Murillo-Martínez y col., 2011).

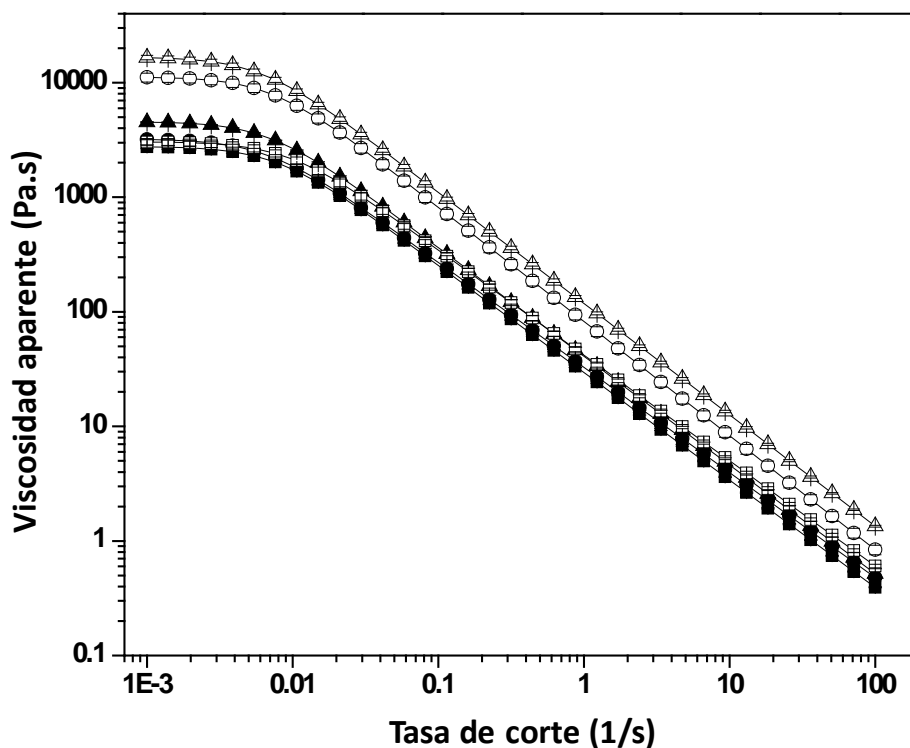


Figura 7.5. Curva de flujo de los complejos coacervados de aislado de proteína de lactosuero (W)-*L. plantarum*-  $\kappa$ -carragenina (K) a diferentes relaciones en peso W:K (■) 3.3:1; (●) 10:1; (▲) 16.7:1; (□) 3.3:1; (○) 10:1; y (△) 16.7:1 a pH 4.0 (símbolos sólidos) y pH 4.5 (símbolos vacíos).

Los datos experimentales de la Figura 7.5 se ajustaron ( $R^2 > 0.97$ ) al modelo de Ellis:

$$\eta = \frac{\eta_0}{[1 + (\lambda\dot{\gamma})^2]^p} \quad (3)$$

Donde:  $\eta$  = viscosidad aparente;  $\dot{\gamma}$  = tasa de corte;  $\eta_0$  = viscosidad a baja tasa de corte;  $\lambda$  = tiempo constante asociado al tiempo de relajación de los biopolímeros en solución y  $p$  = índice de adelgazamiento al corte.

Los valores de los parámetros reológicos del modelo de Ellis para los  $CC_{y/z}$  como función de la relación en peso W:K y el pH se presentan en la Tabla 7.2.

**Tabla 7.2. Valores medios de los parámetros del modelo de Ellis**

$CC_{y/z}$	$\lambda$ (s)	$p$	$\eta_0$ (Pa.s)
$CC_{3.3:1/4.0}$	$106.3 \pm 5.4^a$	$0.46 \pm 0.0^a$	$2777.6 \pm 110.2^a$
$CC_{10:1/4.0}$	$138.9 \pm 9.2^{abc}$	$0.46 \pm 0.0^a$	$3052.8 \pm 225.7^a$
$CC_{16.7:1/4.0}$	$151.8 \pm 26.1^{bc}$	$0.48 \pm 0.0^{bc}$	$4576.6 \pm 44.7^b$
$CC_{3.3:1/4.5}$	$128.1 \pm 8.11^{ab}$	$0.47 \pm 0.0^{ab}$	$3232.1 \pm 27.1^{ab}$
$CC_{10:1/4.5}$	$144.2 \pm 1.6^{bc}$	$0.49 \pm 0.0^c$	$11247.0 \pm 974.6^c$
$CC_{16.7:1/4.5}$	$164.4 \pm 0.7^c$	$0.50 \pm 0.0^d$	$16759.0 \pm 748.3^d$

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre medias ( $p \leq 0.05$ ).

Para una determinada relación en peso W:K los parámetros  $\eta_0$ ,  $\lambda$  y  $p$  exhibieron valores más elevados a pH 4.5 que a pH 4.0. Conforme la relación en peso W:K aumentó, los valores de los tres parámetros reológicos también aumentaron. Así, el  $CC_{16.7:1/4.5}$  presentó el mayor valor para  $\eta_0$ , mientras que el valor más bajo lo presentó el  $CC_{3.3:1/4.0}$ . Estos resultados indicaron claramente que a medida que más moléculas de proteína están disponibles para interactuar con moléculas de polisacárido, se forma una red más fuerte, y que una red más fuerte se produce a pH 4.5 en comparación a pH 4.0, independientemente de la relación en peso W:K.

Los valores de  $\lambda$  y  $p$  presentados por todos los  $CC_{y/z}$  confirman la tendencia exhibida por  $\eta_0$ . Los valores de  $\lambda$  y  $p$  también presentaron un aumento conforme la relación en peso W:K y pH aumentaron. Lobato Calleros y col., (2004) establecieron que el parámetro

$\lambda$  proporciona un orden de la tasa de corte crítica marcando el final de la región Newtoniana y el inicio de la región de adelgazamiento al corte. A partir de la Tabla 7.2 es evidente que el inicio de la región de adelgazamiento al corte se desplaza a la derecha a un pH dado, conforme la relación en peso W:K aumenta y que el desplazamiento a la derecha es más marcado a pH 4.5. Rao (1999) informó que  $p$  tiende a un valor de  $(1-n)$ , donde  $n$  es el índice de flujo de la Ley de Potencia. Así, valores más altos de  $p$  significan menores valores de  $n$ , y un comportamiento de adelgazamiento al corte más extensivo.

Una regla general para la posible aplicación de complejos biopoliméricos como agentes estructurales de sistemas alimenticios, requiere que estos presenten una alta viscosidad a bajas tasas de corte, marcadas propiedades de adelgazamiento al corte a tasas de corte relativamente más elevadas y una viscoelasticidad significativa, donde el componente elástico predomine sobre el componente viscoso.

### 7.6.2. Propiedades viscoelásticas

Los barridos de deformación mostraron que tanto la relación de biopolímeros, como el pH afectaron la respuesta viscoelástica de los  $CC_{y/z}$ . Los valores del módulo elástico ( $G'$ ) (Fig. 7.6a) indicaron que los  $CC_{y/z}$  presentaron una región viscoelástica lineal (RVL) hasta una deformación de 0.2 %, caracterizada por un valor constante de  $G'$  a bajos porcentajes de deformación; seguida de una inflexión y disminución pronunciada de los valores de  $G'$  a porcentajes de deformación mayores. Es en esta última región donde ocurre una ruptura y restructuración de enlaces a diferentes velocidades, dependiendo de la estructura de los  $CC_{y/z}$ . Los valores de  $G'$  en la RVL variaron de mayor a menor de la siguiente manera:  $CC_{16.7:1/4.5}$  (1786.7 Pa) >  $CC_{10:1/4.5}$  (910.7 Pa) >  $CC_{16.7:1/4.0}$  (703.0 Pa) >  $C_{C3.3:1/4.5}$  (591.7 Pa) >  $CC_{10:1/4.0}$  (464.0 Pa) >  $CC_{3.3:1/4.0}$  (380.7 Pa).

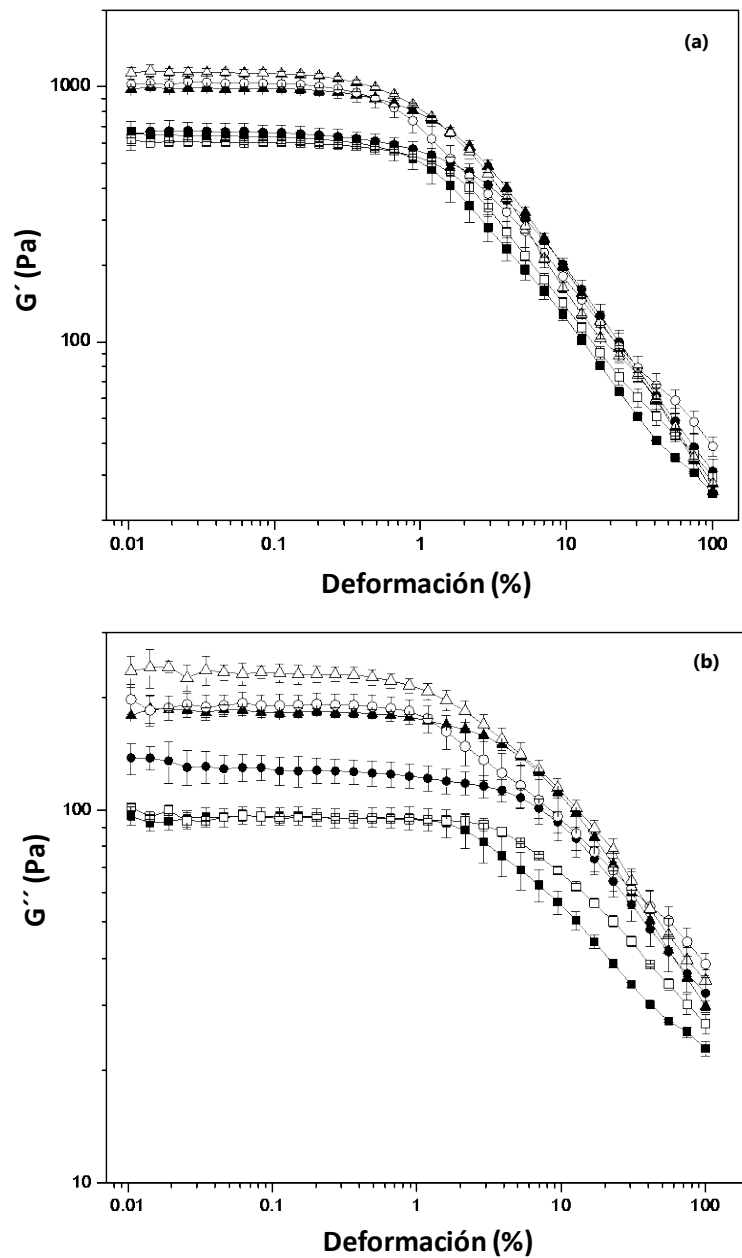
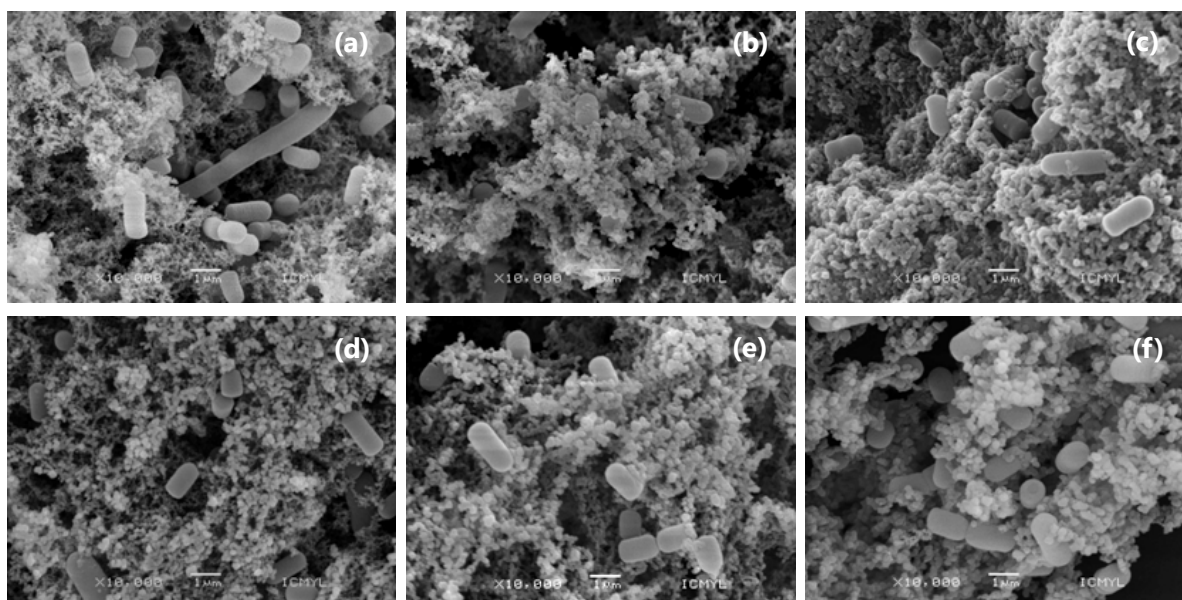


Figura 7.6. (a). Variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) como función del % de deformación de complejos coacervados de aislado de proteína de lactosuero (W)-*L. plantarum*- $\kappa$ -carragenina (K) elaborados a diferentes relaciones W:K (■) 3.3:1; (●) 10:1; (▲) 16.7:1; (□) 3.3:1; (○) 10:1; (△) 16.7:1 a pH 4.0 (símbolos sólidos) y pH 4.5 (símbolos vacíos). (b). Variación del módulo de pérdida ( $G''$ ) como función del % de deformación de complejos coacervados W-*L. plantarum*-K elaborados a diferentes relaciones W:K (■) 3.3:1; (●) 10:1; (▲) 16.7:1; (□) 3.3:1; (○) 10:1; (△) 16.7:1 a pH 4.0 (símbolos sólidos) y pH 4.5 (símbolos vacíos).

Los valores del módulo viscoso ( $G''$ ) (Fig. 7.6b) exhibidos por los  $CC_{y/z}$  en la RVL fueron inferiores a los mostrados por el módulo elástico, y variaron de mayor a menor de la siguiente manera:  $CC_{16.7: 1/4.5}$  (409.7 Pa) >  $CC_{10: 1/4.5}$  (208.0 Pa) >  $CC_{16.7: 1/4.0}$  (123.7 Pa) >  $CC_{3.3: 1/4.5}$  (109.0 Pa) >  $CC_{10: 1/4.0}$  (107.3 Pa) >  $CC_{3.3: 1/4.0}$  (87.6 Pa). A un porcentaje de deformación determinado en la RVL, el valor de  $G''$  fue significativamente menor que el de  $G'$ , indicando un carácter elástico dominante de todos los  $CC_{y/z}$ . Los resultados viscoelásticos están en estrecha concordancia con los resultados encontrados en las curvas de flujo de los  $CC_{y/z}$ , en los que las relaciones más altas de W:K y un pH de 4.5 tendieron a producir  $CC_{y/z}$  más estructurados. Así, en términos generales, a mayor número de interacciones entre W y K, mayor es el número de uniones dentro de la red y mayor es la elasticidad de los  $CC_{y/z}$ .

### 7.7. Microestructura y tamaño de partícula de los complejos coacervados

Las morfologías superficiales de los  $CC_{y/z}$  se muestran en la Figura 7.7. Todas las micrografías electrónicas de barrido mostradas tienen un aumento de  $10\ 000\times$  para facilitar la comparación de las características estructurales mostradas por los  $CC_{y/z}$ . Todos los  $CC_{y/z}$  formaron redes homogéneas, independientemente de la relación en peso W:K y pH, lo que indica que la formación de los complejos se llevó a cabo bajo las condiciones estudiadas. En todos los casos se observó que los complejos biopoliméricos formaron micropartículas esféricas con superficie lisa, formando una matriz interconectada con *L. plantarum* unido a dicha matriz. A medida que la relación en peso W:K aumentó, se observaron partículas más grandes y más esféricas, agrupadas en grandes aglomerados, lo cual se evidenció más a pH 4.5 que a pH 4.0 para una relación W:K dada (Tabla 7.3). Así, redes interconectadas más fuertemente ocurrieron como sigue:  $CC_{16.7: 1/4.5} > CC_{10: 1/4.5} > CC_{16.7: 1/4.0} > CC_{3.3: 1/4.5} > CC_{10: 1/4.0} > CC_{3.3: 1/4.0}$ . Las características estructurales de los  $CC_{y/z}$  se reflejaron en sus propiedades reológicas.  $CC_{y/z}$  con menor  $d_h$  tendieron a mostrar un menor grado de conectividad, lo que resultó en valores menores de  $G'$  y  $G''$ ; mientras que  $CC_{y/z}$  con mayor  $d_h$  tendieron a exhibir mayor conectividad y fuerza en la red.



**Figura 7.7.** Micrografías SEM de complejos coacervados de aislado de proteína de lactosuero (W)-*L. plantarum*-κ-carragenina (K) elaborados con diferentes relaciones en peso W:K: (a) 3.3:1, pH 4.0; (b) 10:1, pH 4.0; (c) 16.7:1, pH 4.0; (d) 3.3:1, pH 4.5; (e) 10:1, pH 4.5; (f) 16.7:1, pH 4.5.

**Tabla 7.3.** Valores medios de diámetros hidrodinámicos ( $d_h$ ) en los complejos coacervados.

$CC_{y/z}$	$d_h$ (nm)
$CC_{3.3:1/4.0}$	$141.0 \pm 2.0^a$
$CC_{10:1/4.0}$	$160.7 \pm 0.6^b$
$CC_{16.7:1/4.0}$	$220.3 \pm 6.7^d$
$CC_{3.3:1/4.5}$	$159.7 \pm 0.6^b$
$CC_{10:1/4.5}$	$179.3 \pm 0.6^c$
$CC_{16.7:1/4.5}$	$231.7 \pm 1.5^e$

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre medias ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.8. Efecto protector proporcionado a *L. plantarum* por los complejos coacervados

Las cuentas iniciales de las células libres y atrapadas de *L. plantarum* no difirieron significativamente entre sí ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 7.4). El número de células libres viables respecto a la cuenta inicial, después de ser expuestas a bajo pH, disminuyó 0.27 ciclos logarítmicos (de  $9.78 \log \text{ufc g}^{-1}$  a  $9.51 \log \text{ufc g}^{-1}$ , 54.77 % de sobrevivencia), y decreció 3.85 ciclos logarítmicos después de la exposición subsecuente de las células a sales

biliares ( $5.93 \log \text{ ufc g}^{-1}$ , 0.01% de sobrevivencia). La viabilidad de las células atrapadas después de su exposición a bajo pH fue significativamente mayor que aquella de las células libres, sufriendo disminuciones en los recuentos celulares que oscilaron entre 0.18 y 0.03 ciclos logarítmicos, dependiendo de la matriz del  $\text{CC}_{y/z}$  en el que fueron atrapadas. Los porcentajes de sobrevivencia para las células atrapadas sometidas a bajo pH variaron entre 65.32 ( $\text{CC}_{3.3:1/4.0}$ ) y 92.37 ( $\text{CC}_{16.7:1/4.5}$ ) unidades.

En términos generales, las células libres y atrapadas fueron más sensibles a las sales biliares que a un pH bajo. El porcentaje de sobrevivencia a sales biliares de las células de *L. plantarum*, previamente sometidas a bajo valor de pH, fue mayor a valores más elevados de relación W:K, independientemente del pH al que se obtuvieron los  $\text{CC}_{y/z}$ . Los porcentajes de sobrevivencia de *L. plantarum* atrapado después de su exposición a sales biliares variaron de 0.03 a 75.78 %. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de sobrevivencia de *L. plantarum* atrapado en  $\text{CC}_{16.7:1/4.0}$  (75.78 %) y  $\text{CC}_{16.7:1/4.5}$  (70.7 %).

Los resultados expuestos indican que la mejor protección proporcionada a las células atrapadas cuando se exponen a un pH bajo que cuando se exponen a sales biliares está estrechamente relacionada con la microestructura de los  $\text{CC}_{y/z}$ . La integridad de los coacervados fue mayor a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico de W, ya que en estas condiciones las moléculas de W poseen cargas positivas y son capaces de mantener unidas más firmemente a las células de *L. plantarum* y de interactuar con las moléculas de K. Bajo condiciones de sales biliares, el pH del sistema se desplaza hacia valores por encima del punto isoeléctrico de W, favoreciéndose así la disociación entre W y L y entre W y K, así como la desintegración de la estructura de los  $\text{CC}_{y/z}$ .



**Tabla 7.4. Viabilidad de células de *Lactobacillus plantarum* libres y entrampadas en los diferentes complejos coacervados, después de su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.**

$CC_{y/z}$	Células iniciales (log ufc g <sup>-1</sup> )	Células después de exposición a jugo gástrico simulado (log ufc g <sup>-1</sup> )	Cuenta después de exposición a jugo gástrico simulado y sales biliares (log ufc g <sup>-1</sup> )
Células libres	9.78 ± 0.03 <sup>a</sup>	9.51 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.02 <sup>a</sup>
CC <sub>3.3:1/4.0</sub>	9.67 ± 0.01 <sup>a</sup>	9.49 ± 0.04 <sup>a</sup>	6.16 ± 0.01 <sup>b</sup>
CC <sub>10:1/4.0</sub>	9.75 ± 0.01 <sup>a</sup>	9.66 ± 0.04 <sup>b</sup>	8.54 ± 0.06 <sup>c</sup>
CC <sub>16.7:1/4.0</sub>	9.77 ± 0.00 <sup>a</sup>	9.72 ± 0.02 <sup>bc</sup>	9.62 ± 0.02 <sup>d</sup>
CC <sub>3.3:1/4.5</sub>	9.76 ± 0.00 <sup>a</sup>	9.67 ± 0.03 <sup>bc</sup>	6.13 ± 0.01 <sup>b</sup>
CC <sub>10:1/4.5</sub>	9.77 ± 0.01 <sup>a</sup>	9.72 ± 0.02 <sup>bc</sup>	8.63 ± 0.08 <sup>c</sup>
CC <sub>16.7:1/4.5</sub>	9.78 ± 0.00 <sup>a</sup>	9.75 ± 0.01 <sup>c</sup>	9.66 ± 0.01 <sup>d</sup>

Letras diferentes en una columna indican que las medias difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

Los coacervados con mayor contenido de W proporcionaron una mejor protección a las células de *L. plantarum*, debido a que un mayor número de sitios de unión estuvieron disponibles. Las explicaciones anteriores concuerdan con los datos reológicos, ya que los módulos reológicos más elevados fueron exhibidos por los  $CC_{y/z}$  que mostraron una mayor integridad microestructural y en consecuencia proporcionaron mayor grado de protección celular.

## 8. CONCLUSIONES

Los complejos coacervados  $CC_{16.7:1/4.0}$  y  $CC_{16.7:1/4.5}$ , obtenidos a partir de la interacción entre aislado de proteína de lactosuero (W) y  $\kappa$ -carragenina (K) en una relación en peso W:K 16.7:1, a valores de pH de 4.0 y 4.5, respectivamente, proporcionaron a células de *L. plantarum* un medio de protección adecuado contra condiciones gastrointestinales, obteniéndose porcentajes de sobrevivencia de 75.8 ( $CC_{16.7:1/4.0}$ ) y 70.7 ( $CC_{16.7:1/4.5}$ ). Estos porcentajes de sobrevivencia fueron superiores a los observados para células de *L. plantarum* entrampadas en los coacervados formados a relaciones W:K de 10.0:1 y 3.3:1, independientemente del pH (variando de 0.02 a 7.6). Y con respecto a células libres presentando una sobrevivencia de 0.01%. Los coacervados  $CC_{16.7:1/4.0}$  y  $CC_{16.7:1/4.5}$  presentaron propiedades viscoelásticas elevadas, las cuales pudieran estar asociadas a la formación de una estructura tridimensional más compacta y mecánicamente resistente.

En conclusión, los complejos coacervados elaborados con una relación en peso W:K de 16.7:1, a valores de pH de 4.0 y 4.5, podrían ser utilizados como elementos estructurales y portadores de probióticos en alimentos funcionales, tales como cremas, yogures, bebidas lácteas fermentadas, y cierto tipo de quesos como el Petit Suisse.

## 9. REFERENCIAS

- Alvidrez-Morales, A., González-Martínez, B., Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: Funcionales. *Revista de la Salud Pública y Nutrición*, 3: 3-8.
- Anal, A. K. y Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 240-251.
- AOAC. (1995). Association of official analytical chemists (16 ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M.E. and Stanton, C. (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting the Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada: FAO/WHO. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> [Consulta: 2 Febrero 2014].
- Ardhana, M. M. y Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2): 87-99.
- Aulton, M.E. (2007). *Aulton's Pharmaceutics*, Third ed. Amsterdam: Elsevier.
- Baruzzi, F., Morea, M., Matarante, A. y Cocconcelli, P. S. (2000). Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5): 807-814.
- Beaulieu, L., Savoie, L., Paquin, P. y Subirade, M. (2002). Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol. *Biomacromolecules*, 3: 239-248.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N. (2002). Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2: 23-93.
- Berry, A. R., Franco, C. M. M., Zhang, W., Middelberg, A. P. J. (1999). Growth and lactic production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a refined medium. *Biotechnology Letters*, 21: 163-167.

- Brew, K. (2003).  $\alpha$ -Lactalbumin. En P. F. Fox y P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry* (3rd edition)—Vol. 1. Proteins (pp. 387–419). Nueva York: Kluwer Academic.
- Bixquert, J. M. (2009). Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: an etiopathogenic approach at last. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 101(8): 553-564.
- Chien, C. H., Kuo, W. S., Lai, L. S. (2009). Rheological and physical characterization of film-forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsoa leaf gum. *Food Hydrocolloids*, 23: 2132-2140.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. y Comi, G. (2000). Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction–temperature gradient gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2): 126–129.
- Conn, E. E. y Stumpf, P. K. (1980). *Bioquímica Fundamental* (3ª. ed.). México, D. F.: Editorial Limusa, S. A.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162: 56–67.
- Cui, S. W. (2005). *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications*. Boca Raton, FL: Taylor and Francis.
- de Kruif, C. G., Weinbreck, F. y de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 204(9): 340–349.
- Delano, W. L. (2002). *PyMOL*. Palo Alto, California: Delano Scientific.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 159–184.
- de Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., De Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16: 1018–1028.

- Ding, W. K., Shah, N. P. (2009). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 74(2): M100–M107.
- Doherty, S. B., Auty, M. A., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. y Brodkorb, A. (2012). Survival of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit. *International Dairy Journal*, 22: 31-43.
- Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Brodkorb, A. (2011). Development and characterization of whey protein micro-beds as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*, 25: 1604-1617.
- Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. y 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: 231-241.
- Ercolini, D., Hill, P. J. y Dodd, C. E. R. (2003). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3540–3548.
- Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum arabic-chitosan interactions by Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79: 541-546.
- FAO/OMS (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html). [Consulta: 2 Febrero 2014].
- Farrell, H. M. J., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cow's milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87: 1641–1674.

- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365–378.
- Garduño, T.A. (2000). Haga de sus alimentos medicinas y de sus medicinas alimentos. *Industria Alimentaria*, 22(6), 3.
- Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G. y Swings, J. (2003). Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2): 1270–1275.
- Gismondo, M. R., Drago, L., Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12: 287–292.
- Global Industry Analysts Inc. (2012). Functional food industry: Market research reports, statistics and analysis. <http://www.reportlinker.com/ci02036/Functional-Food.html> [Consulta: 15 Junio 2012.]
- Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C. y Hammes, W. P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 218–226.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., McClements, D. J. (2006). Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions. A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20: 577-585.
- Hébrard, G., Blanquet, S., Beyssac, E., Remondetto, G., Subirade, M. y Alric, M. (2006). Use of whey protein beads as a new carrier system for recombinant yeasts in human digestive tract. *Journal of Biotechnology*, 127: 151-160.
- Heidebach, T., Först, P. y Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23: 1670-1677.
- Hoffmann, R. A., Rusell, A. R., Gidley, M. J. (1996). Molecular weight distribution of carrageenans. En *Gums and Stabilisers for the Food Industry*, G. O. Phillips, P. J. Williams, D. J. Wedlock eds, pp. 137–48. Oxford: IRL Press at the Oxford University Press.
- Huis in't Veld, J. H. J., Havenaar, R., Marteau, P. (1994). Establishing a scientific basis for probiotic R&D. *Trends in Biotechnology*, 12: 6–8.

- Imeson, A. (2007). Carrageenan. En *Handbook of hydrocolloids*. G.O. Phillips, P. A. Williams (eds), pp 87–102. Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., Prevost, D. (2011). Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31 (3): 211–226.
- Jones, O. G., Handschin, S., Adamcik, J., Harnau, L., Bolisetty, S., Mezzenga, R. (2011). Complexation of  $\beta$ -lactoglobulin fibrils and sulfated polysaccharides. *Biomacromolecules*, 12: 3056-3065.
- Kálab, M. (1979). Scanning electron microscopy of dairy products: an overview. *Scanning Electron Microscopy*, 3: 261-272.
- Karimi, R., Mortazavian, A. M. y Da Cruz, A. G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science and Technology*, 91: 283–308.
- Korbekandi, H., Mortazavian, A. M. y Iravani, S. (2011) Technology and stability of probiotic in fermented milks. In *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the human health*, Nueva York, Nova Science Publishers.
- Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15: 73-83.
- Lei, V., Amoa-Awua, W. K. y Brimer, L. (1999). Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 53(2–3): 169–184.
- Lobato-Calleros, C., Martínez-Torrijos, O., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Orozco, J. P., Vernon-Carter, E. J. (2004). Flow and creep compliance properties of reduced fat yogurts containing protein-based fat replacers. *International Dairy Journal*, 14: 777-782.
- Lobato-Calleros, C., Ramos-Solís, L., Santos-Moreno, A., Rodríguez-Huezo, M. E. (2006). Microstructure and texture of Panela type cheese-like products: use of low methoxyl pectin and canola oil as milk-fat substitutes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 5: 71-79.

- Lopez-Rubio, A., Gavara, R., Lagaron, M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through materials. *Trends in Food Science and Technology*, 17(10): 567-575.
- Madigan, M. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed.). Upper Saddle River, NJ: Pearson Education.
- Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V. y San Biagio, P. L. (2003) Thermoreversible gelation of k-carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical Chemistry*, 104: 95–105.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G., et al. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), 153–161.
- Marco Trade News. (2012). Market for probiotics.  
[http://www.google.com.mx/search?sourceid=navclient&hl=es&ie=UTF-8&rlz=1T4ADSA\\_esMX374&q=probiotic+functional+foods+and+drinks+world+market](http://www.google.com.mx/search?sourceid=navclient&hl=es&ie=UTF-8&rlz=1T4ADSA_esMX374&q=probiotic+functional+foods+and+drinks+world+market) [Consulta: 15 Junio 2012]
- McClements, D. J. 2006. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24: 621–625.
- Mortazavian, A. M., Mohammadi, R., Cruz, A. G. y Faria, J. A. F. (2011) Technology and Stability of Probiotics in Dairy Desserts, In: *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the human health*, Nueva York, Nova Science Publishers.
- Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Férez, A., Vernon-Carter, E. J. (2011). Designing  $W_1/O/W_2$  double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 5: 577-585.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiology Letters*, 334(1): 1-15.



- Naruszewicz, M., Johansson, M. L., Zapolska-Downar, D. y Bukowska, H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 1249-1255.
- Nissen, L., Chingwaru, W., Sgobarti, B. (2009). Gut health promoting activity of new putative probiótico/protective *Lactobacillus* spp. strains: a functional study in the small intestinal cell model. *International Journal of Food Microbiology*, 135(3): 288-294.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, L. A. P., Freitas, O., Favaro-Trindade, S. (2007). Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology*, 25(10): 1687-1693.
- Pasika, W. M. (1977). Polysaccharide polyelectrolytes. En *Extracellular Microbial Polysaccharides*. P. A. Sandford (ed.), pp. 128-143. *ACS Symposium Series: Vol. 45*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Prakash, S. y Martoni, C. (2006). Towards a new generation of therapeutics: artificial cell targeted delivery of live cells for therapy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128: 1-22.
- Pelletier, Ch., Bouley, Ch., Cayuela, Ch., Bouttier, S., Bourlioux, P., Bellon, N. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1725-1731.
- Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., Vernon-Carter, E. J. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42: 292-297.
- Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Vernon-Carter, E. J. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science and Technology*, 92: 383-398.

- Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D., & Caggia, C. (2004). *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 9–14.
- Rao, M. A. (1999). *Rheology of fluid and semisolid foods*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- Ricciardi, A., Clementi, F. (2000). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications. *Italian Journal of Food Science*, 12: 23–45.
- Roshni, M. A., Bhunia, A. K. (2012). Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67: 185-239.
- Saier, M. H. y Mansour, N. M. (2005). Probiotics and prebiotics in human health. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 10: 22–25.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43: 111-117.
- Spano, G., Chieppa, G., Beneduce, L. y Massa, S. (2004). Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1): 185–193.
- Saxelin, B., Grenov, U., Svensson, R., Fonden, R., Reniero, T. y Mattila-Andholm, T. (1999). The technology of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 387–392
- Schär-Zammaretti, P., Ubbink, J. (2003). The cell wall of lactic acid bacteria: Surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*, 85: 4076–4092.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-banon, S., Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8): 689-753.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11): 1262-1277.

- Simeone, M., Alfani, A., Guido, S. (2004). Phase diagram, rheology and interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate. *Food Hydrocolloids*, 18: 463–470.
- Smit, E., Oling, F., Demel, R., Martínez, B., Pouwels, P. H. (2001). The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *Journal of Molecular Biology*, 305: 245–257.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B. (2001). Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical and Nutrition*, 73: 476S–483S.
- Thaiudom, S., Goff, H. D. (2003). Effect of  $\kappa$ -carrageenan on milk protein polysaccharide mixtures. *International Dairy Journal*, 13: 763–771.
- Thonart, Ph., Custinne, M., Paquot, M. (1982). Zeta potential of yeast cells: application in cell immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 4: 191-194.
- Tseng, C. P., Montville, T. J. (1993). Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: Causes and consequences. *Biotechnology Progress*, 9(2): 113–121.
- Van der Mei, H. C., Busscher, H. J. (2001). Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:491–494.
- Ventura, M., Jankovic, I., Walker, D. C., Pridmore, R. D., Zink, R. (2002). Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasserii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 6172–6181.
- Vesa, T., Pochart, P. y Marteau, P., (2000). Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14: 823–828.
- Vidhyalakshmi, R., Bhakayaraj, R., Subhasree, R. S. (2009). Encapsulation “The future of probiotic”. *Advances in Biological Research*. 3(3-4): 96-103.
- Walstra, P. (2003). *Physical Chemistry of Foods*. Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- Wandrey, C., Hunkeler, D. (2002). Study of polyion counterion interaction by electrochemical methods. En *Handbook of polyelectrolytes and their applications*. S. Tripathy, J. Kumar, HS Nalwa (eds), pp 147–172. Vol. 2. EUA, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch.

- Wang, X., Lee, J., Wang, Y-W., Huang, Q. (2007). Composition and rheological properties of  $\beta$ -Lactoglobulin/pectin coacervates: Effects of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *Biomacromolecules*, 8: 992-997.
- Weinbreck, F. (2004). *Whey Protein/Gum Arabic Coacervates: Structure and Dynamics*. Holanda: Tesis de doctorado, Universidad de Utrecht.
- Xiao, J., Yu, H., Yang, J. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125: 1267-1272.
- Xin, S., Xiguang, Ch., Chengsheng, L., Dongsu, Ch., Hongni, P. (2009). Influence of *Lactobacillus* E1 on the storage stability in emulsion immobilization. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater*, 75-80.
- Zomorodi, Sh., Asl, A. K., Rohani, S. M. R., Miraghaei, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms of Iranian white cheese produced by ultrafiltration. *International Journal of Dairy Technology*. 63, 1-8.

## **10. ANEXO**

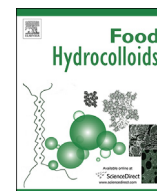
### **Publicación**

***Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate:  $\kappa$ -carrageenan complex coacervates.**

Hernández-Rodríguez, L, Lobato-Calleros, C,

Pimentel-González, D.J, Vernon-Carter, E.J.

*Food Hydrocolloids* 36: 181 - 188



## *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: $\kappa$ -carrageenan complex coacervates



L. Hernández-Rodríguez<sup>a,b</sup>, C. Lobato-Calleros<sup>b,\*</sup>, D.J. Pimentel-González<sup>c</sup>, E.J. Vernon-Carter<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Mexico D.F. 09340, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera Mexico-Texcoco, 56230 Texcoco, Mexico

<sup>c</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Av. Universidad s/n km 1, Ex Hacienda de Aquetzalpa, 56230 Tulancingo, Hidalgo, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Mexico D.F. 09340, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2012

Accepted 25 September 2013

#### Keywords:

Complex coacervates

Whey protein

*Lactobacillus plantarum*

$\kappa$ -Carrageenan

Rheological properties

Microstructure

### ABSTRACT

*Lactobacillus plantarum* (L) was entrapped in whey protein isolate (W) and  $\kappa$ -carrageenan (K) complex coacervates (CC). The interaction window leading to W–L–K complexation at different pH values and components ratio was established by  $\zeta$ -potential measurements and turbidimetric analysis. CC obtained at pH values of 4.0 and 4.5 and W:K weight ratio of 16.7:1 yielded cells entrapment efficiency of 39.6%, a significantly higher viability of  $9.75 \log \text{cfu g}^{-1}$  after exposure to low pH and of  $9.66 \log \text{cfu g}^{-1}$  after exposure to bile salts, than free cells ( $9.51 \log \text{cfu g}^{-1}$  and  $5.93 \log \text{cfu g}^{-1}$ , respectively), with respect to an initial cells count of  $9.78 \log \text{cfu g}^{-1}$ . Higher survivability of cells occurred in CC exhibiting a more compact microstructure and higher viscoelastic properties. Light and scanning electron micrographs clearly show that *L. plantarum* cells were effectively entrapped in the CC matrices.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The world market of functional foods and drinks represents a dynamic and growing segment of the food industry due to its beneficial effects on human health, and will reach US \$130 billion by the year 2015 (Global Industry Analysts, Inc., 2012). Probiotic functional foods, a significant part of this market, had a worth about US \$15.9 billion in 2008 and is projected to reach a value of US \$28.8 billion by 2015 (Marco Trade News, 2012). However, commercially available probiotic products and supplements often provide insufficient cell populations ( $<10^7$  viable cells) due to harsh processing conditions encountered during manufacture of the carrier system (Doherty et al., 2012). Also, probiotic survival in sufficiently high numbers during passage through the human gastro-intestinal tract (GIT) remains a major challenge for effective delivery of these beneficial bacteria (Anal & Singh, 2007). The preferred immobilization technique for food applications with the purpose of providing cell protection from hostile environments is the entrapment of cells within a food grade polymeric matrix (Heidebach, Först, & Kulozik, 2009), so that an appropriate selection of the

delivery food matrix is of paramount importance during the development of probiotic functional foods (Doherty et al., 2010). Natural polymer-based materials represent promising matrices for protecting and controlling delivery systems, due to the biodegradability, biocompatibility and wide availability (Doherty et al., 2011). Calcium alginate and  $\kappa$ -carrageenan gel matrices have frequently been employed for immobilization of probiotics, but conflicting reports exist regarding the protection offered by immobilization from harsh chemical environments (Prakash & Martoni, 2006) or of controlled release rates (Hébrard et al., 2006). This has led to seek alternative approaches that permit to enhance the mechanical stability of the capsule membrane with improved mass transport, increased cell loading, and a greater control of parameters. More recently the use of whey proteins has been considered as a potential alternative to the use of polysaccharides as matrices for probiotic bacteria. Beaulieu, Savoie, Paquin, and Subirade (2002) used an emulsification/cold gelation method for forming protein beads entrapping retinol. They found that whey protein formed good matrices beads that were not susceptible to enzymatic attack providing a slow and progressive retinol release in the intestinal absorption sites and protection against oxidation. Hébrard et al. (2006) immobilized recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in whey protein isolates using cold-

\* Corresponding author. Tel.: +52 5959521618; fax: +52 5959521617.

E-mail address: [consuelobato@yahoo.com](mailto:consuelobato@yahoo.com) (C. Lobato-Calleros).

induced gelation. The protein matrix seemed to create a microenvironment favoring the activity of yeasts in the stringent gastric conditions. Doherty et al. (2010) immobilized *Lactobacillus rhamnosus* GG in native, denatured and hydrolyzed whey protein isolate. Cells immobilization in hydrolyzed and denatured whey protein isolate enhanced survival under storage conditions. Doherty et al. (2011) extruded whey protein isolates-*L. rhamnosus* GG blends into acetate buffer, tempered to 35 °C in the presence of Tween 20 inducing instant gelation. The resulting protein-probiotic amalgams exhibited acid-stability, peptic-resistance and controlled probiotic release. Egan, Jacquier, Rosenberg, and Rosenberg (2013) immobilized lipids in whey protein microgels by the emulsification/internal gelation technique. The microgels retained more than 93% of lipids. Another alternative approach for improved functional properties of immobilized probiotics can be achieved from the use of protein-polysaccharide complexes. The improved functional properties resulting from the protein-polysaccharide complexes in comparison to the proteins and polysaccharides alone could be attributed to the structure of the complexes (Ramírez-Santiago, Lobato-Calleros, Espinosa-Andrews, & Vernon-Carter, 2012). Weinbreck, Nieuwenhuijse, Robijn, and de Kruif (2004) investigated the formation of electrostatic complexes of whey protein and a non-gelling carrageenan as a function of pH, ionic strength, temperature and protein to polysaccharide ratio, establishing the pH ranges where soluble complexes or insoluble complexes (coacervates) were formed. Based on this study, we decided to investigate the potential of whey protein- $\kappa$ -carrageenan coacervates to entrap *L. plantarum*, a probiotic bacteria with known beneficial effects on cardiovascular risk factors (Naruszewicz, Johansson, Zapolska-Downar, & Bukowska, 2002). In this context it would be interesting to explore the electrostatic interaction among the bacteria charged surface (Kłodzinśka et al., 2010) and a polycation with subsequent interaction of the bacteria-polycation complex with a polyanion in order to improve the bacteria entrapment efficiency and protecting effect against gastrointestinal conditions. Furthermore, this technology could offer advantages over existing technologies in use, as it is easily implemented and has a relatively low cost.

The objectives of this work were to: (a) obtain an electrostatic complex between whey protein isolate-*Lactobacillus plantarum*; (b) form a complex coacervate between whey protein isolate-*L. plantarum* and  $\kappa$ -carrageenan; (c) evaluate the entrapment efficiency, rheological and microstructural properties of the protein isolate-*L. plantarum* and  $\kappa$ -carrageenan complex coacervates; and (d) determine the survivability of the entrapped *L. plantarum* in the complex coacervates after exposure to simulated gastrointestinal conditions in comparison to free control cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The biopolymers used for the formation of the complex coacervates were whey protein isolate (W) with 93% protein in dry weight (Hilmar™ 9400, Hilmar Ingredients, Hilmar, CA, USA) and  $\kappa$ -carrageenan (K) purchased from Danisco Mexico, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico (Grinsted® Carrageenan CH 407). Hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), absolute ethanol (EtOH), potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>) and sodium chloride (NaCl) analytical grade reagents were obtained from Quimica Laitz, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico); sodium phosphate (J.T. Baker, Xalostoc, State of Mexico, Mexico) and glutaraldehyde solution (G5882, Grade I, 25% in H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich Mexico, Toluca, State of Mexico, Mexico). Man Rogosa Sharp (MRS) *Lactobacillus* Broth and Agar were purchase from Becton Dickinson de Mexico, S.A. de C.V.

(Mexico City, Mexico). All the water used was double distilled and deionized.

### 2.2. Cell culture and concentrate preparation

Freeze-dried *L. plantarum* Lp-115 ATCC:SD5209 (Danisco, Brand, Denmark) was cultured for 18 h at 37 °C (1% w/v) in sterile MRS broth. The obtained culture was sub-cultured (37 °C, 18 h) twice in sterile MRS broth using 1% (w/v) of inoculum for activation and adaptation. Cells were harvested in the late logarithmic growth phase with the help of a minispin plus Eppendorf centrifuge (Type 22331, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) operated at 15,800 × g for 10 min. The supernatant was decanted and the cells were resuspended in physiological solution, obtaining a cell pellet containing  $9.5 \pm 0.11 \log \text{ cfu mL}^{-1}$ .

### 2.3. Stock solutions

Sterile W (1, 3, and 5% w/v, pH 6.60, 6.89, and 6.99, respectively) and K (0.5 and 1% w/v, pH 9.40) solutions were prepared and stored for 24 h at 4 °C for allowing full hydration. The cell pellet was resuspended in 1 mM KNO<sub>3</sub> (pH 6.8) obtaining a *L. plantarum* concentrate (L) containing  $9.25 \log \text{ cfu mL}^{-1}$  of cells (Pelletier et al., 1997).

### 2.4. Complexes formation

#### 2.4.1. Zeta potential and particle size measurements

The zeta potential ( $\zeta$ ) of the W (1% w/v), K (0.5% w/v) and of L solutions was determined with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at different pH values, in order to gain a picture of the possible interaction window among them. The  $\zeta$  potential of *L. plantarum* as a function of pH was determined in 1 mM KNO<sub>3</sub> (Pelletier et al., 1997). The pH of the solutions was adjusted to the required value by the addition of either 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl. The mean volume diameter ( $d_v$ ) of the biopolymer complexes was determined by dynamic light scattering measurements with the zetasizer. The coacervates were diluted in deionized water to a concentration of 0.01% w/w (Harnsilawat, Pongsawatmanit, & McClements, 2006).

#### 2.4.2. Equivalence point

Titration potentiometric curves were obtained for the solutions in order to determine their equivalence point. Samples of 40 mL of the 1% w/v W and 1% w/v K solutions were titrated with 0.1 mL aliquots of 0.05 N HCl. A 60 s time lag elapsed between two aliquots to allow the reaction to reach equilibrium (Espinosa-Andrews, Sandoval-Castilla, Vázquez-Torres, Vernon-Carter, & Lobato-Calleros, 2010). Biopolymers solution pH was continuously monitored with a pH meter (Hanna Instruments, model HI 98240, Smithfield, RI, USA) at 25 °C. The inflexion point in the titration curves was taken as the equivalence point of the biopolymers solutions.

#### 2.4.3. Complexes formation

W solutions (30 g; 1, 3, and 5% w/v) were loaded with L yielding the (W-L)<sub>1%</sub>, (W-L)<sub>3%</sub> and (W-L)<sub>5%</sub> dispersions with a cell load of  $9.15 \pm 0.11 \log \text{ cfu g}^{-1}$ . The  $\zeta$ -pH behavior of the W-L dispersions was determined in order to confirm the complexation between *L. plantarum* cells and W. Afterward, the W-L dispersions were added to 9 g of K solution (1% w/v), adjusting the pH between 2.0 and 6.0 using 0.1 N HCl. Mixtures were kept at 4 °C for 48 h to ensure complete formation of the complexes. Afterward, the samples were centrifuged at 1350 rpm for 30 min in order to separate the different W-L-K complex coacervates (CC<sub>y/z</sub>) batches, where y stands for the

weight ratios 3.3:1; 10:1; and 16.7:1 between W:K, and z for the pH value. The turbidimetric procedure described by Ramírez-Santiago et al. (2012) was followed for determining the pH at which maximum coacervation occurred when the supernatant displayed lowest absorbance (turbidity). The absorbance of the supernatant was measured at 350 nm (at this wavelength the absorbance of the complexes was significantly higher than for either biopolymer solution on its own) using a Spectronics Genesys 5 UV/Vis spectrophotometer (Spectronic Unicam, Rochester, NY, USA).

### 2.5. Yield, protein and moisture content of complex coacervates

The CC<sub>y/z</sub> were analyzed for protein content by the Kjeldahl method and moisture by oven drying (AOAC, 1995); yield was obtained with the following equation (Xiao, Yu, & Yang, 2011):

$$\% \text{CY} = (m_C/m_{\text{TB}}) \times 100$$

Where % CY = complex coacervate yield;  $m_C$  = CC<sub>y/z</sub> mass in dry weight; and  $m_{\text{TB}}$  = total biopolymer mass used in dry weight.

### 2.6. Cells entrapment efficiency

CC<sub>y/z</sub> batches were dispersed (1:10 v/v) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) (Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter, 2009), stirred for 10 min at room temperature and stored at 4 °C for 2 h in order to release the entrapped cells. The number of released viable cells in the dispersion was determined by plate count on MRS agar at 37 °C for 48 h. The entrapment efficiency (EE), which is a combined measurement of efficacy of entrapment and survival of viable cells was calculated as (Doherty et al., 2011):

$$EE = N/N_0 \times 100$$

Where  $N$  = log cfu of viable entrapped cells released from CC<sub>y/z</sub> and  $N_0$  = log cfu of free cells added to the biopolymer mixture used to prepare the CC<sub>y/z</sub>.

The CC<sub>y/z</sub> were observed with an optical microscope (Olympus BX53, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) coupled to an image analyzer system (digital Olympus camera C3030, Olympus America Inc., USA and Image Pro-Plus version 4.5 software, Media Cybernetics, Inc., L.P., Silver Spring, USA), in order to confirm the entrapment of cells in the complex coacervates. To this end, the cells were stained with crystal violet following a standard technique (Madigan, 2012).

### 2.7. Rheological properties of coacervates

The rheological properties of the CC<sub>y/z</sub> were determined with a Physica MCR 301 Dynamic Shear Rheometer (Physica Messtechnik, Stuttgart, Germany), using a cone–plate (1°, 50 mm diameter) geometry. Samples of 1.5 g of CC<sub>y/z</sub> were put into the measuring system geometry and let to rest for 30 min for allowing structure recovery. Samples were subjected to amplitude sweep (0.01–100% strain, 1 Hz) in order to determine their linear viscoelastic region. Samples were also subjected to a shear rate sweep ( $10^{-3}$  to  $10^3$  s<sup>-1</sup>) and the apparent viscosity of the CC<sub>y/z</sub> was recorded (Chien, Kuo, & Lai, 2009). Temperature was maintained at 4 °C with the help of the Physica TEK 150P Peltier system in all the experiments.

### 2.8. Coacervates microstructure

CC<sub>y/z</sub> samples were fixed with a 2% (w/v) glutaraldehyde solution in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) for 6 h, followed by

dehydration in increasing EtOH concentration solutions (50, 60, 70, 80, 90 and 100%) for 30 min in each (Lobato-Calleros, Ramos-Solís, Santos-Moreno, & Rodríguez-Huezo, 2006). Samples were then critical point dried with a CPA II Technics Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, USA) and coated with a fine gold layer with a Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japan). The samples were viewed in scanning electron microscope (Jeol, model JMS-035, Jeol Ltd., Akishima, Japan) operated at 20 KV, at a magnification of 10,000× for detecting *L. plantarum* cells in the CC<sub>y/z</sub>.

### 2.9. Survivability of entrapped cells

In order to determine the survivability of cells in simulated gastric juice, 1 g of each CC<sub>y/z</sub> was placed by separate in glass tubes containing 9 mL of simulated gastric juice solution (pH 3.0, 0.1 N HCl). Samples were incubated at 37 °C for 3 h in an orbital shaking incubator (Precision Scientific 360, Chicago, IL, USA). Afterward the samples were filtered, and the filtrate was washed with sterile saline solution and put into 9 mL of sterile solution (1 g 100 mL<sup>-1</sup>) of porcine bile extract (B8631, Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) at pH 6.5. The CC<sub>y/z</sub> were incubated at 37 °C for 3 h under shaking. At the end of the incubation period the CC<sub>y/z</sub> were put into phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) and cultured in MRS agar at 37 °C for 48 h (Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, García Galindo, Alvarez-Ramírez, & Vernon-Carter, 2010).

### 2.10. Data analysis

Analyses were carried out in triplicates from 3 independent experiments carried out using a randomized experimental design. Data were subjected to simple classification analysis of variance and to Tukey's means comparison analysis. Multifactor analysis of variance was carried out to determine which factors, the pH and the W:K weight ratio, had a statistically significant effect on the CC<sub>y/z</sub> characteristics. Significance was established at  $p \leq 0.05$ . Data analysis was done using the Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc, Cambridge, MA, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Zeta potential

The zeta potential ( $\zeta$ ) variation with pH for the W (1% w/v) and K (0.5% w/v), and L (9.25 log ufc mL<sup>-1</sup>, 1 mM KNO<sub>3</sub>) solutions is shown in Fig. 1. Pelletier et al. (1997) studied the influence of different ionic strength solutions of KNO<sub>3</sub> on the electrophoretic mobility (EM) at pH's ranging from 2 to 8 of different *Lactobacillus* strains, finding that EM was drastically reduced with increasing ionic strength. Nevertheless, at an ionic strength of 1 mM all bacterial strains were negatively charged at high pH values and progressively became positively charged with decreasing pH values. Thus to avoid masking of the EM of cells by ionic strength, a reference medium 1 mM KNO<sub>3</sub> is commonly used to avoid nonspecific absorption of ions on cell surfaces. For L the  $\zeta$  varied between  $5.25 \pm 0.35$  mV at pH = 2.0 to  $-4.4 \pm 0.28$  mV at pH = 7.0. A zero  $\zeta$  value occurred at pH = 2.6 (isoelectric point), so that negative  $\zeta$  values occurred with increasing pH values. The gram-positive cell wall of lactic acid bacteria consists mainly of peptidoglycans, (lipo) teichoic acids, proteins and polysaccharides (Delcour, Ferain, Deghorain, Palumbo, & Hols, 1999). The decrease in  $\zeta$  potential between pH 2 and 7 was likely to be caused by the increase in the dissociation of weak acid groups, of both the polysaccharide constituents of the cell wall and the surface proteins (Schär-Zammaretti & Ubbink, 2003).



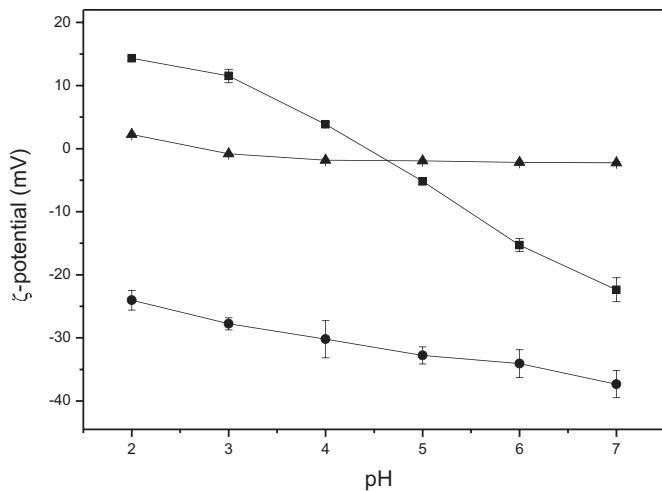


Fig. 1. Zeta potential ( $\zeta$ ) variation with pH for whey protein isolate (1% w/w, ■),  $\kappa$ -carrageenan (0.5% w/w, ●) and *Lactobacillus plantarum* ( $9.25 \log_{10} \text{ ufc mL}^{-1}$ , 1 mM  $\text{KNO}_3$ , ▲) solutions.

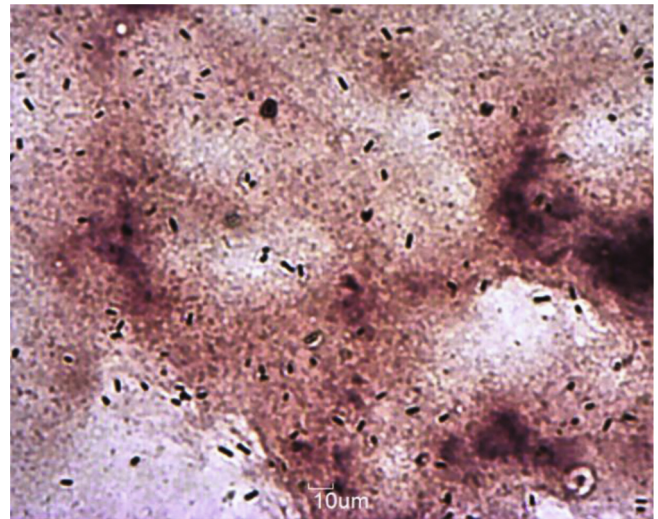


Fig. 3. Light microscope micrograph of the complex coacervate obtained at a whey protein isolate:  $\kappa$ -carrageenan weight ratio of 16.7:1 at pH 4.5, where entrapped *L. plantarum* cells can be observed.

The  $\zeta$  values for the K solution were negative throughout the pH range studied, varying from  $-17.30 \pm 2.11$  at pH 2.0 to  $-39.10 \pm 3.80$  mV at pH 8.0. This trend is in agreement with that reported by Jones et al. (2011). The  $\zeta$  values for the W solution were positive in the pH range from 2.0 to 4.3, with a switchover to negative values at pH's above 4.5. The  $\zeta$  value was of  $-5.19 \pm 0.55$  mV at pH 5.0 and of  $-23.43 \pm 1.06$  mV at pH 8.0. The isoelectric point occurred at pH 4.0. Negative  $\zeta$  values are due to the ionization of the carboxylic moieties ( $-\text{COOH}$ ) giving rise to carboxylate groups ( $-\text{COO}^-$ ), while positive  $\zeta$  values are due to the protonation of the amino moieties ( $-\text{NH}_2$ ) giving rise to ammonium groups ( $-\text{NH}_3^+$ ) (Conn & Stumpf, 1980).

### 3.2. W:K equivalence point

The equivalence point of biopolymers solutions (1% w/w W and 1% w/w K solutions) was determined by the pH inflexion point from the titrations curves of the biopolymers stocks solutions with HCl 0.05 N (data not shown). The HCl milliequivalents necessary to reach

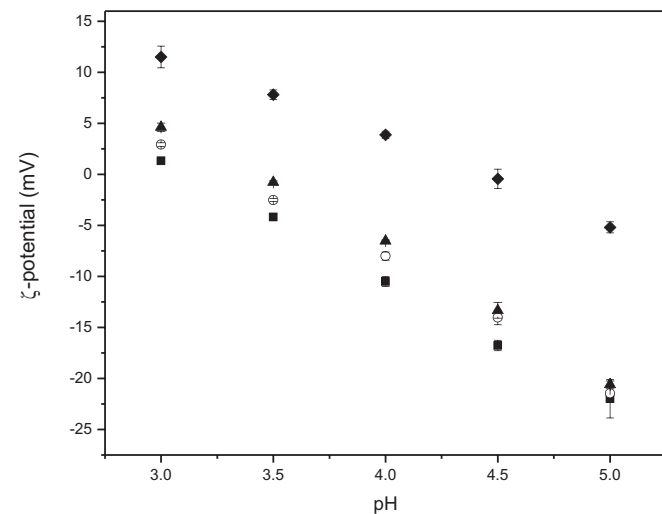


Fig. 2. Zeta potential ( $\zeta$ ) of (◆) whey protein isolate (W, 1% w/w) and of W-*Lactobacillus plantarum* (L,  $9.1 \log \text{ cfu mL}^{-1}$ ) soluble complexes at different % of W: (■) (W-L)<sub>1%</sub>, (○) (W-L)<sub>3%</sub> and (▲) (W-L)<sub>5%</sub>.

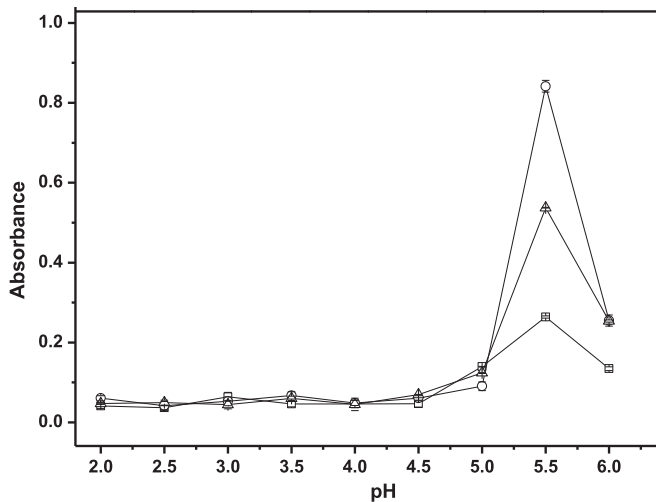
the pH inflexion point were of 0.624 and 0.187 for the W and K solutions, respectively. From these results, the theoretical maximum coacervation between W and K should occur at a weight ratio of 3.3:1, respectively, i.e. 3.3 g of W to 1 g of K. At this biopolymers weight ratio the macromolecules show opposite charges of equivalent magnitude, so that the attraction forces between both biopolymers is maximized and an intense interaction takes place; i.e. the ionized groups of both macromolecules are mutually neutralized leading the formation of insoluble complexes (Espinosa-Andrews et al., 2010).

### 3.3. Confirmation of W-L complexation

Fig. 2 shows the  $\zeta$ -potential variation as a function of pH (3.0–5.0) for the 1% w/w W solution and the W-L dispersions. In all cases a linear relationship between  $\zeta$ -potential decay and pH occurred. The  $\zeta$ -potential values over the whole pH range varied as follows: 1% w/w W > (W-L)<sub>5%</sub> > (W-L)<sub>3%</sub> > (W-L)<sub>1%</sub>. The diminution in  $\zeta$ -potential of the W-L dispersions with respect to that of the 1% w/w W solution indicated that W-L complexes were formed, despite the relatively weak charge carried out by the *L. plantarum* cells. Entrapment of cells in the complex coacervate matrix is not only due to electrostatic interactions, but to a much more complex interaction between the surface properties of the matrix and the cells components (Thonart, Custinne, & Paquot, 1982). The charges in the system are not present at a well-defined surface, but are distributed throughout the cell wall. Furthermore, the hydrophobic moieties within the cell wall could induce adhesion of *L. plantarum* cells to the hydrophobic moieties of W (Schär-Zammaretti & Ubbink, 2003). Thus, higher W concentrations are likely to increase the complexation with *L. plantarum* cells, as more hydrophobic sites are available for this purpose. Fig. 3 shows a light microscope micrograph confirming that a relatively large number *L. plantarum* cells are entrapped in the CC<sub>16.7:1/4.5</sub> matrix.

### 3.4. Turbidity of the complexes

Fig. 4 shows the supernatant absorbance versus the pH profiles during the complexation of W-L with K. Absorbance of protein/polysaccharide dispersions can be considered as an indicator of the



**Fig. 4.** Supernatant absorbance as a function of pH during whey protein isolate (W)-*Lactobacillus plantarum*-κ-carrageenan (K) complexes formation at different W:K weight ratios: (□) 3.3:1; (○) 10:1; and (△) 16.7:1.

formation and dissociation of protein/polysaccharide complexes (Ramírez-Santiago et al., 2012). All the profiles showed similar trends and were characterized by three regions observed from high to low pH values as follows: (A) a region at relatively high pH values (~6.0 to 5.5) where absorbance increased abruptly for all the W–L and K blends. At this pH range W–L complexes begin to interact with K reaching a maximum absorbance at ca. pH 5.5 due to an increase in number and size of (W–L)–K complexes, which remain soluble due to an incomplete neutralization of the negatively charged K moieties and the positively charged W moieties (Ramírez-Santiago et al., 2012; Weinbreck et al., 2004); (B) an intermediate pH region (5.5 to 4.5) characterized by a sharp decrease in the absorbance readings, at which the soluble complexes begin to aggregate and eventually precipitate as complex coacervates ( $CC_{y/z}$ ). In this region, a more balanced distribution between the positively charged W molecules and the negatively charged K molecules develop and charge neutralization occurs; and (C) an end region in the pH range of ca. 4.5 to 2.0, where the absorbance reaches practically constant minimum values, indicating maximum phase separation. The W proteins became positively charged below their pI, electrostatically interacting with the K negatively charged carboxylate groups, eventually neutralizing each other charge.

Based on these results, further studies were limited to  $CC_{y/z}$  obtained at pH's of 4.0 and 4.5.

### 3.5. Yield, entrapment efficiency, protein and moisture contents of the complex coacervates

Multifactor ANOVA showed that as W:K weight ratio increased, both the yield and the EE decreased, while the protein content increased for the  $CC_{y/z}$  (Table 1). These results may be attributed to two opposite mechanisms taking place. At high W:K weight ratios there is an excess of W molecules which are available for interacting with *L. plantarum* cells, resulting in an enhanced cell entrapment. As the W:K weight ratio shifted from 3.3:1 (where both macromolecules show opposite charges of the same magnitude) towards higher W:K ratios (10.0:1 and 16.7:1), the yield of the  $CC_{y/z}$  decreased, resulting in lower ratio of entrapped cells over the initially total number present in the biopolymers dispersions.

A significant decrease in  $CC_{y/z}$  yield, entrapment efficiency, protein and moisture contents occurred when the pH was lowered from 4.5 to 4.0, as the degree of ionization of the  $COO^-$  moieties

**Table 1**

Multifactor analysis of variance for the yield, entrapment efficiency, protein and moisture contents of the complex coacervates.

Parameter	W:K weight ratio			pH	
	3.3:1	10:1	16.7:1	4	4.5
Yield (%)	75.4 ± 1.7 <sup>c</sup>	55.9 ± 5.8 <sup>b</sup>	40.7 ± 6.2 <sup>a</sup>	53.9 ± 17.8 <sup>a</sup>	60.8 ± 12.4 <sup>b</sup>
Moisture (%)	86.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	86.7 ± 1.5 <sup>a</sup>	86.2 ± 1.6 <sup>a</sup>	85.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	87.6 ± 1.3 <sup>b</sup>
Protein (%)	70.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	80.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	81.8 ± 1.7 <sup>c</sup>	76.5 ± 4.8 <sup>a</sup>	78.2 ± 6.3 <sup>b</sup>
Entrapment efficiency (%)	72.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	54.3 ± 5.6 <sup>b</sup>	39.6 ± 6.0 <sup>a</sup>	51.9 ± 16.7 <sup>a</sup>	59.1 ± 11.9 <sup>b</sup>

W: whey protein isolate; K: κ-carrageenan. Different letters in the same row indicate significant difference between means ( $p \leq 0.05$ ).

was lowered by an excess of  $H^+$  counterions, so that a reduced number of K molecules were available for interacting with the W–L complexes (Pasika, 1977).

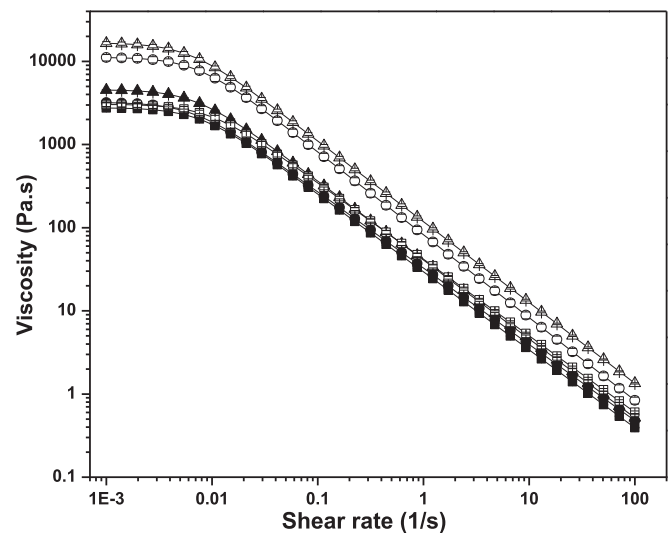
### 3.6. Steady-shear rheological properties of complex coacervates

The apparent viscosity–shear rate plots for the different  $CC_{y/z}$  are shown in Fig. 5. All of the  $CC_{y/z}$  exhibited typical flow curves of materials characterized by a structural viscosity, i.e., showing a Newtonian region at low shear rates, followed by a shear-thinning region at intermediate shear rates. This type of flow behavior is probably due to the formation of an entangled network reversible “structure” which upon shearing suffers break-down, resulting in a shear-dependent behavior, which may be recovered under “rest” or equilibrium conditions (Murillo-Martínez, Pedroza-Islas, Lobato-Calleros, Martínez-Férez, & Vernon-Carter, 2011). The experimental data of Fig. 5 fitted well ( $R^2 > 0.97$ ) the Ellis model:

$$\eta = \frac{\eta_0}{[1 + (\lambda\dot{\gamma})^2]^p}$$

where  $\eta$  = apparent viscosity;  $\dot{\gamma}$  = shear rate;  $\eta_0$  = low shear limiting viscosity;  $\lambda$  = time constant associated to the relaxation time of polymers in solution; and  $p$  = shear thinning index.

The values of the Ellis equation rheological parameters for the  $CC_{y/z}$  as a function of W:K weight ratio and pH are given in Table 2.



**Fig. 5.** Apparent viscosity–shear rate dependence of the whey protein isolate (W)-*Lactobacillus plantarum*-κ-carrageenan (K) complex coacervates made with different W:K weight ratios (■) 3.3:1; (●) 10:1; (▲) 16.7:1; (□) 3.3:1; (○) 10:1; and (△) 16.7:1 at pH of 4.0 (filled symbols) and pH of 4.5 (empty symbols).

**Table 2**  
Mean values for the Ellis model parameters.

CC <sub>y/z</sub>	$\lambda$ (s)	$p$	$\eta_0$ (Pa.s)
CC <sub>3.3:1/4.0</sub>	106.3 ± 5.4 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.0 <sup>a</sup>	2777.6 ± 110.2 <sup>a</sup>
CC <sub>10:1/4.0</sub>	138.9 ± 9.2 <sup>abc</sup>	0.46 ± 0.0 <sup>a</sup>	3052.8 ± 225.7 <sup>a</sup>
CC <sub>16.7:1/4.0</sub>	151.8 ± 26.1 <sup>bc</sup>	0.48 ± 0.0 <sup>bc</sup>	4576.6 ± 44.7 <sup>b</sup>
CC <sub>3.3:1/4.5</sub>	128.1 ± 8.1 <sup>ab</sup>	0.47 ± 0.0 <sup>ab</sup>	3232.1 ± 27.1 <sup>ab</sup>
CC <sub>10:1/4.5</sub>	144.2 ± 1.6 <sup>bc</sup>	0.49 ± 0.0 <sup>c</sup>	11247.0 ± 974.6 <sup>c</sup>
CC <sub>16.7:1/4.5</sub>	164.4 ± 0.7 <sup>c</sup>	0.50 ± 0.0 <sup>d</sup>	16759.0 ± 748.3 <sup>d</sup>

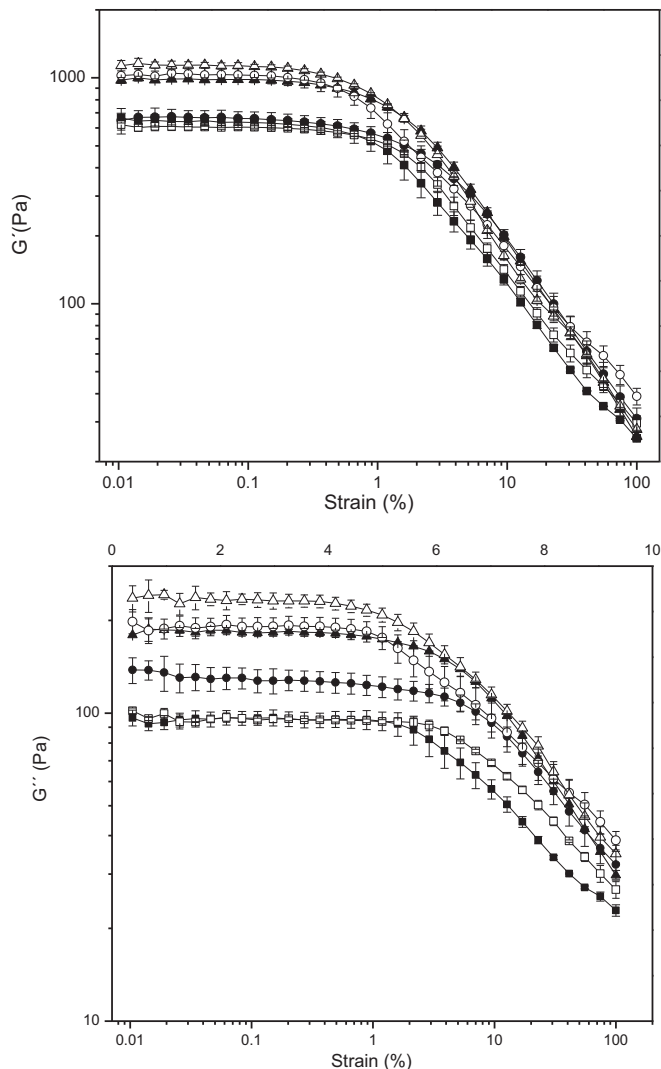
CC<sub>y,z</sub>: complex coacervate, where y stands for the weight ratios between whey protein isolate and  $\kappa$ -carrageenan, and z for the pH value;  $\lambda$ : time constant associated to the relaxation time of polymers in solution;  $p$ : shear thinning index;  $\eta_0$ : low shear limiting viscosity. Different letters in the same column indicate significant difference between means ( $p \leq 0.05$ ).

For a given W:K weight ratio the parameters  $\eta_0$ ,  $\lambda$  and  $p$  exhibited higher values at pH 4.5 than at pH 4.0. Likewise, as the W:K weight ratio increased so did the values of the three rheological parameters. Thus, the CC<sub>16.7:1/4.5</sub> presented the highest  $\eta_0$  value, while the lowest  $\eta_0$  value was displayed by CC<sub>3.3:1/4.0</sub>. These results clearly indicate that as more protein molecules are available for interacting with the polysaccharide molecules, a stronger network is formed, and that a stronger network formation occurs at pH 4.5 than at pH 4.0, irrespective of W:K proportion. The values of  $\lambda$  and  $p$  exhibited by the CC<sub>y/z</sub> confirm the trend exhibited by  $\eta_0$ . The values of  $\lambda$  and  $p$  also increased as the W:K weight ratio and pH increased (Table 2). Lobato-Calleros, Martínez-Torrijos, Sandoval-Castilla, Pérez-Orozco, and Vernon-Carter (2004) stated that  $\lambda$  provides an order of the critical shear rate marking the end of the zero shear rate Newtonian region and the onset of the shear thinning region. From Table 2 it is clear that the onset of the shear thinning region is displaced to the right as the W:K weight ratio increases for a given pH, and that the displacement to the right is more marked at pH 4.5. Rao (1999) informed that  $p$  tends to a value of  $(1 - n)$ , where  $n$  is the power-law flow behavior index. Thus, higher  $p$  values mean lower  $n$  values, and a more extensive shear thinning behavior. A general rule of thumb for the potential application of biopolymers complexes as structuring agents in food systems requires that they exhibit a high zero-shear viscosity, marked shear thinning properties at relatively higher shear rates and significant viscoelasticity, where the elastic component predominates over the viscous component.

### 3.7. Viscoelastic properties of complex coacervates

The strain sweeps showed that both the biopolymers ratio and pH affected the viscoelastic response of the CC<sub>y/z</sub> (Fig. 6). The elastic modulus ( $G'$ ) data values (Fig. 6a) indicated that the CC<sub>y/z</sub> presented linear viscoelastic region (LVR) within a strain % of 0.2, characterized by a constant value of  $G'$  at a low strain %, followed by a sharp downward inflexion in  $G'$  at larger strains, where break-down and reformations of bonds occurring at different rates depended on the CC<sub>y/z</sub> structure network.  $G'$  values in the LVR were from higher to lower as follows: CC<sub>16.7:1/4.5</sub> (1786.7 Pa) > CC<sub>10:1/4.5</sub> (910.7 Pa) > CC<sub>16.7:1/4.0</sub> (703.0 Pa) > CC<sub>3.3:1/4.5</sub> (591.7 Pa) > CC<sub>10:1/4.0</sub> (464.0 Pa) > CC<sub>3.3:1/4.0</sub> (380.7 Pa).

The viscous modulus ( $G''$ ) values (Fig. 6b) exhibited by the CC<sub>y/z</sub> in the LVR were lower than those shown by  $G'$ , and were from higher to lower as follows: CC<sub>16.7:1/4.5</sub> (409.7 Pa) > CC<sub>10:1/4.5</sub> (208.0 Pa) > CC<sub>16.7:1/4.0</sub> (123.7 Pa) > CC<sub>3.3:1/4.5</sub> (109.0 Pa) > CC<sub>10:1/4.0</sub> (107.3 Pa) > CC<sub>3.3:1/4.0</sub> (87.6 Pa). At a given strain% in the LVR the value of  $G''$  was significantly lower than  $G'$ , pinpointing a dominant elastic character of all of the coacervates. The viscoelastic results are in close agreement with the results found for the CC<sub>y/z</sub> flow curves in that higher W:K proportions and a pH of 4.5 tended to produce

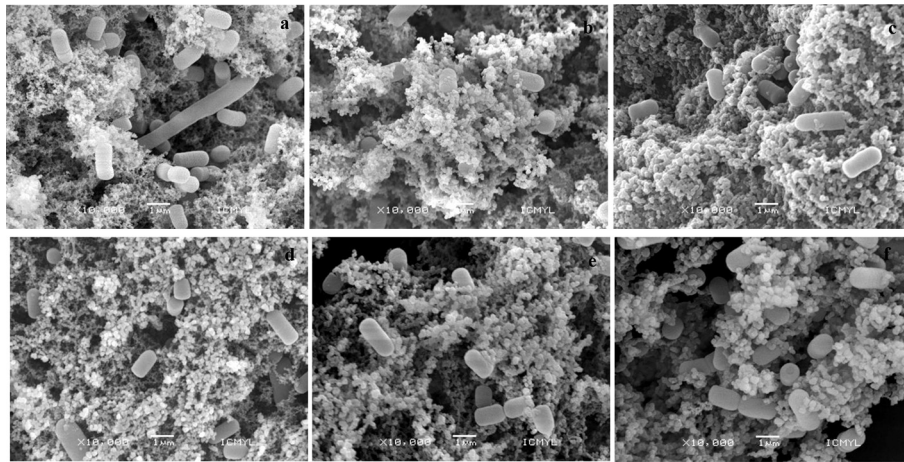


**Fig. 6.** (a). Storage modulus ( $G'$ )-strain % dependence of the whey protein isolate (W)-*Lactobacillus plantarum*- $\kappa$ -carrageenan (K) complex coacervates made with different W:K weight ratios (■) 3.3:1; (●) 10:1; (▲) 16.7:1; (□) 3.3:1; (○) 10:1; and (△) 16.7:1 at pH of 4.0 (filled symbols) and pH of 4.5 (empty symbols). (b). Loss modulus ( $G''$ )-strain % dependence of the whey protein isolate (W)-*Lactobacillus plantarum*- $\kappa$ -carrageenan (K) complex coacervates made with different W:K weight ratios (■) 3.3:1; (●) 10:1; (▲) 16.7:1; (□) 3.3:1; (○) 10:1; and (△) 16.7:1 at pH of 4.0 (filled symbols) and pH of 4.5 (empty symbols).

more highly structured coacervates. Thus, in general terms, the larger the number of interactions taking place between W and K, the greater the number of junctions within the network and the greater the elasticity of the CC<sub>y/z</sub>.

### 3.8. Microstructure and particle size of complex coacervates

The surface morphologies of the CC<sub>y/z</sub> are shown in Fig. 7. All of the scanning electron micrographs shown have a magnification of 10,000 $\times$  to ease the comparison between the structural features shown by CC<sub>y/z</sub>. All of the CC<sub>y/z</sub> formed homogeneous networks independently of the W:K weight ratio and pH, indicating that under the conditions studied the formation of the complexes took place. In all the cases, it was observed that the biopolymers complexes formed microparticles spherical in shape with a smooth surface, forming an interconnected matrix with *L. plantarum* bound to it. As the W:K weight ratio increased, larger and more spherical



**Fig. 7.** SEM micrographs of the whey protein isolate (W)-*Lactobacillus plantarum*- $\kappa$ -carrageenan (K) complex coacervates obtained at: (a) W:K weight ratio of 3.3:1, pH 4.0; (b) W:K weight ratio of 10:1, pH 4.0; (c) W:K weight ratio of 16.7:1, pH 4.0; (d) W:K weight ratio of 3.3:1, pH 4.5; (e) W:K weight ratio of 10:1, pH 4.5; and (f) W:K weight ratio of 16.7:1, pH 4.5.

particles, grouped into larger clusters, which was more noticeable at pH 4.5 than at pH 4.0 for a given W:K ratio. Thus stronger interconnected networks occurred as follows (Fig. 7f > Fig. 7e > Fig. 7c > Fig. 7d > Fig. 7b > Fig. 7a). These structural features of the  $CC_{y/z}$  were reflected in the rheological properties.  $CC_{y/z}$  with smaller  $d_V$  tended to show a lower degree of connectivity, which resulted in lower  $G'$  and  $G''$  values, whereas  $CC_{y/z}$  with bigger  $d_V$  tended to exhibit higher connectivity and network strength (Table 3).

### 3.9. Protective role provided to *L. plantarum* by complex coacervates

The initial counts for the free and entrapped cells were non-significantly different among themselves (Table 4). The number of viable free cells respect to the initial count decreased 0.27 log cycles (from 9.78 log cfu  $g^{-1}$  to 9.51 log cfu  $g^{-1}$ , survivability of 54.77%) when exposed to low pH, and a decrease of 3.85 log cycles when exposed sequentially to bile salts (down to 5.93 log cfu  $g^{-1}$ , 0.01% survivability). The viability of the entrapped cells was significantly higher than for the free cells when exposed to low pH, suffering decrements ranging between 0.18 and 0.03 log cycles depending on the  $CC_{y/z}$  matrix in which they were entrapped. The survivability percentages for the entrapped cells in low pH ranged from 65.32 ( $CC_{3.3:1/4.0}$ ) to 92.37% ( $CC_{16.7:1/4.5}$ ). In general terms, the free and entrapped cells were more sensitive to bile salts than to low pH. Survivability % was higher the higher was the W:K ratio, independently of the pH at which the  $CC_{x/y}$  were obtained. The survivability

percentages for the entrapped cells in bile salts ranged from 0.03 to 75.78%. Non-significant differences in survivability percentages were found between  $CC_{16.7:1/4.0}$  (75.78%) and  $CC_{16.7:1/4.5}$  (70.7%).

These results seem to indicate that the better protection provided to the entrapped cells when exposed to low pH than when exposed to bile salts was closely related to the microstructure of the  $CC_{y/z}$ . The integrity of the coacervates was greater at pH values below the pI of W, because under these conditions W molecules possess positive charges and are capable of holding more tightly bound both the *L. plantarum* cells and interacting with the K molecules. Under bile salts conditions, pH of the system shifts towards pH values above the pI of W, so that dissociation between W and L and W and K occurred, so that the microstructure of the coacervates tended to disintegrate. Also, coacervates with higher W content offered better protection to cells, because a greater number of sites for bonding were available. The above explanations are in agreement with the rheological data, in that higher rheological moduli were displayed by coacervates displaying a greater microstructural integrity, thus providing higher degree of protection to cells.

## 4. Conclusions

The complex coacervates obtained from the interaction between whey protein isolate and  $\kappa$ -carrageenan in a 16.7:1 weight ratio had a significant higher capability than the 10.0:1 and 3.3:1 biopolymer

**Table 3**  
Mean volume diameter ( $d_V$ ) of the complex coacervates.

$CC_{y/z}$	$d_V$ (nm)
$CC_{3.3:1/4.0}$	$141.0 \pm 2.0^a$
$CC_{10:1/4.0}$	$160.7 \pm 0.6^b$
$CC_{16.7:1/4.0}$	$220.3 \pm 6.7^d$
$CC_{3.3:1/4.5}$	$159.7 \pm 0.6^b$
$CC_{10:1/4.5}$	$179.3 \pm 0.6^c$
$CC_{16.7:1/4.5}$	$231.7 \pm 1.5^e$

$CC_{y,z}$ : complex coacervate, where y stands for the weight ratios between whey protein isolate and  $\kappa$ -carrageenan, and z for the pH value. Different letters in the same column indicate significant difference between means ( $p \leq 0.05$ ).

**Table 4**  
Viability of entrapped *Lactobacillus plantarum* in the different complex coacervates after exposure to simulated gastric juice and bile salts conditions.

$CC_{y/z}$	Initial cells load (log cfu $g^{-1}$ )	Cells after exposure to gastric juice (log cfu $g^{-1}$ )	Cells after exposure to gastric and bile salts (log cfu $g^{-1}$ )
Free cells	$9.78 \pm 0.03^a$	$9.51 \pm 0.03^a$	$5.93 \pm 0.02^a$
$CC_{3.3:1/4.0}$	$9.67 \pm 0.01^a$	$9.49 \pm 0.04^a$	$6.16 \pm 0.01^b$
$CC_{10:1/4.0}$	$9.75 \pm 0.01^a$	$9.66 \pm 0.04^b$	$8.54 \pm 0.06^c$
$CC_{16.7:1/4.0}$	$9.77 \pm 0.00^a$	$9.72 \pm 0.02^{bc}$	$9.62 \pm 0.02^d$
$CC_{3.3:1/4.5}$	$9.76 \pm 0.01^a$	$9.67 \pm 0.03^{bc}$	$6.13 \pm 0.01^b$
$CC_{10:1/4.5}$	$9.77 \pm 0.01^a$	$9.72 \pm 0.02^{bc}$	$8.63 \pm 0.08^c$
$CC_{16.7:1/4.5}$	$9.78 \pm 0.00^a$	$9.75 \pm 0.01^c$	$9.66 \pm 0.01^d$

$CC_{y,z}$ : complex coacervate, where y stands for the weight ratios between whey protein isolate and  $\kappa$ -carrageenan, and z for the pH value. Different letters in the same column indicate significant difference between means ( $p \leq 0.05$ ).

ratios for providing *L. plantarum* cells an adequate protection against simulated gastrointestinal conditions, particularly at pH values of 4.0 and 4.5, compared to that shown by free cells. Under these conditions, the complex coacervates displayed higher viscoelastic properties that could be associated to a more compact and mechanically resistant microstructure network. In conclusion, the complex coacervates made with a 16.7:1 whey protein isolate- $\kappa$ -carrageenan weight ratio at pH values of 4.0 and 4.5 could be used as structural elements and probiotic carriers in functional foods, such as creams, yogurts, fermented lactic beverages, and certain type of cheeses such as Petit Suisse.

## Acknowledgments

The authors thank Biol. Yolanda Hornelas-Urbe of the Instituto de Ciencias del Mar y Limnología of the Universidad Nacional Autónoma de México for the expertise provided for obtaining the SEM micrographs.

## References

- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 240–251.
- AOAC. (1995). *Association of official analytical chemists* (16th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- Beaulieu, L., Savoie, L., Paquin, P., & Subirade, M. (2002). Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol. *Biomacromolecules*, 3, 239–248.
- Chien, C. H., Kuo, W. S., & Lai, L. S. (2009). Rheological and physical characterization of film-forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsoa leaf gum. *Food Hydrocolloids*, 23, 2132–2140.
- Conn, E. E., & Stumpf, P. K. (1980). *Bioquímica fundamental* (3th ed.). México, D. F.: Editorial Limusa, S. A.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 159–184.
- Doherty, S. B., Auty, M. A., Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Brodtkorb, A. (2012). Survival of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit. *International Dairy Journal*, 22, 31–43.
- Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Brodtkorb, 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, 231–241.
- Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Brodtkorb, A. (2011). Development and characterization of whey protein micro-beds as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*, 25, 1604–1617.
- Egan, T., Jacquier, J. C., Rosenberg, Y., & Rosenberg, M. (2013). Cold-set whey protein microgels for the stable immobilization of lipids. *Food Hydrocolloids*, 31, 317–324.
- Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum arabic-chitosan interactions by Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79, 541–546.
- Global Industry Analysts Inc.. (2012). *Functional food industry: Market research reports, statistics and analysis*. <http://www.reportlinker.com/ci02036/Functional-Food.html> Accessed 15.06.12.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions. A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577–585.
- Hébrard, G., Blanquet, S., Beyssac, E., Remondetto, G., Subirade, M., & Alric, M. (2006). Use of whey protein beads as a new carrier system for recombinant yeasts in human digestive tract. *Journal of Biotechnology*, 127, 151–160.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23, 1670–1677.
- Jones, O. G., Handschin, S., Adamcik, J., Harnau, L., Bolisetty, S., & Mezzenga, R. (2011). Complexation of  $\beta$ -lactoglobulin fibrils and sulfated polysaccharides. *Biomacromolecules*, 12, 3056–3065.
- Kłodzińska, E., Szumski, M., Dziubakiewicz, E., Hryniewicz, K., Skwarek, E., Janusz, W., et al. (2010). Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. *Electrophoresis*, 31, 1590–1596.
- Lobato-Calleros, C., Martínez-Torrijos, O., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Orozco, J. P., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Flow and creep compliance properties of reduced-fat yogurts containing protein-based fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 777–782.
- Lobato-Calleros, C., Ramos-Solís, L., Santos-Moreno, A., & Rodríguez-Huezo, M. E. (2006). Microstructure and texture of Panela type cheese-like products: use of low methoxyl pectin and canola oil as milk-fat substitutes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 5, 71–79.
- Madigan, M. (2012). *Brock biology of microorganisms* (13th ed.). Upper Saddle River, NJ: Pearson Education.
- Marco Trade News. (2012). *Market for probiotics*. [http://www.google.com.mx/search?sourceid=navclient&hl=es&ie=UTF-8&rlz=1T4ADSA\\_esMX374&q=probiotic+functional+foods+and+drinks+world+market](http://www.google.com.mx/search?sourceid=navclient&hl=es&ie=UTF-8&rlz=1T4ADSA_esMX374&q=probiotic+functional+foods+and+drinks+world+market) Accessed 15.06.12.
- Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Férez, A., & Vernon-Carter, E. J. (2011). Designing W<sub>1</sub>O/W<sub>2</sub> double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 5, 577–585.
- Naruszewicz, M., Johansson, M. L., Zapolska-Downar, D., & Bukowska, H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1249–1255.
- Pasika, W. M. (1977). Polysaccharide polyelectrolytes. In P. A. Sandford (Ed.), *ACS Symposium Series: Vol. 45. Extracellular microbial polysaccharides* (pp. 128–143). Washington, DC: American Chemical Society.
- Pelletier, Ch., Bouley, Ch., Cayuela, Ch., Bouttier, S., Bourlioux, P., & Bellon, N. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1725–1731.
- Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42, 292–297.
- Prakash, S., & Martoni, C. (2006). Towards a new generation of therapeutics: artificial cell targeted delivery of live cells for therapy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128, 1–22.
- Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science & Technology*, 92, 383–398.
- Rao, M. A. (1999). *Rheology of fluid and semisolid foods*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43, 111–117.
- Schär-Zammaretti, P., & Ubbink, J. (2003). The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*, 85, 4076–4092.
- Thonart, Ph., Custinne, M., & Paquot, M. (1982). Zeta potential of yeast cells: application in cell immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 191–194.
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G. W., & de Kruif, C. G. (2004). Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3550–3555.
- Xiao, J., Yu, H., & Yang, J. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125, 1267–1272.