



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“EMPAQUES BIOACTIVOS DE LIBERACIÓN ESPECÍFICA
EN EL COLON Y SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS LÁCTEOS
FUNCIONALES”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA
OFELIA SANDOVAL CASTILLA**

CoDirección:

**DR. E. JAIME VERNON CARTER
DRA. CONSUELO S. O. LOBATO CALLEROS**

Asesor:

DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO

México, D.F. febrero 2010

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado de **CONACYT** y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el No. de registro 0470-01/Doctorado en Biotecnología

México, D.F. febrero de 2010

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

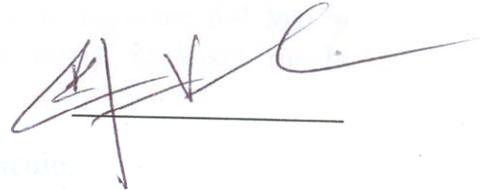
“EMPAQUES BIACTIVOS DE LIBERACIÓN ESPECÍFICA EN EL COLON Y SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS LÁCTEOS FUNCIONALES”

Que presentó

Ofelia Sandoval Castilla

Comité Tutorial:

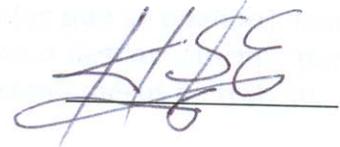
Codirector: Dr. E. Jaime Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



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

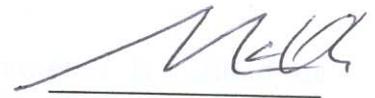
Consuelo S. O. Lobato Calleros

Asesor: Dr. Hugo S. García Galindo
Instituto Tecnológico de Veracruz



Comité Evaluador:

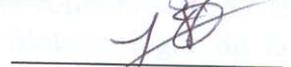
Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa



Secretario: Dra. María Eva Rodríguez Huevo

María Eva Rodríguez Huevo

Vocal: Dr. Juan Orozco Villafuerte



Vocal: Dra. Leticia Buendía González



AGRADECIMIENTOS

A DIOS, mi guía espiritual, por darme la salud, la fortaleza y la perseverancia para culminar este proyecto.

Al Dr. Jaime Vernon Carter, por guiarme en este camino, por su confianza en mí, por su apoyo en la realización de este proyecto y.... porque sé que siempre recibiré su apoyo de antemano, gracias.

A la Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros, porque siempre ha caminado a mi lado en mi formación académica, motivándome; por su preocupación, por estar siempre disponible, por sus consejos y paciencia en la escritura de la tesis y por ser una gran amiga.

A mi Cesarito, porque siempre estás conmigo, porque apoyas mis decisiones y me ayudas en la talacha de los experimentos, soportas la discusión, mi mal humor y me haces reír cuando estoy triste.....Te amo.

A la Biol. Yolanda Hornelas Orozco investigadora del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por su permanente disposición, por su apoyo en el análisis de la microestructura y paciencia en todos los intentos.

Al Dr. Jesús Álvarez Ramírez, por su apoyo en la escritura del artículo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioprocesos (T-166) que a lo largo del desarrollo de mi investigación, (tanto los que ya se fueron como los que se quedan), han sido parte de mi vida cotidiana y que de vez en cuando ayudaron a desconectarme, por su ayuda, por las risas, pero sobre todo, por ser más amigos que compañeros de trabajo.

Al comité evaluador, por su interés en la revisión del documento, valiosas aportaciones y acertadas correcciones en el documento final.

A la Universidad Autónoma Chapingo por facilitarme las instalaciones para el desarrollo de algunos experimentos.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa por mantener la calidad de enseñanza, por la dedicación de su profesorado y abrirme sus puertas.

A CONACYT, por el parcial financiamiento a este proyecto a través del convenio 81157-U y por el apoyo brindado a través de la beca del Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana.

A todos, gracias.

Dedicada en especial a

A la memoria de mi padre, hombre excepcional y admirable

*Como muestra de mi gratitud por los valores que sembró en mí,
por su confianza, apoyo, amor, desvelos y más... a mi madre*

*Con cariño a mis hermanos Lupita, Guillermo, Víctor y Misael
por alentarme*

A ti Cesarito, porque estás en mi corazón y eres mi fortaleza

y a mis grandes amigos por su lealtad.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	01
2. ANTECEDENTES.....	04
2.1. Microorganismos probióticos.....	04
2.1.1. Definición.....	04
2.1.2. Probióticos y la microflora normal del intestino humano.....	05
2.1.3. Beneficios a la salud atribuidos a los probióticos.....	08
2.2. Bacterias probióticas.....	08
2.2.1. Criterios para la selección de microorganismos probióticos.....	08
2.2.2. <i>Lactobacillus casei</i>	10
2.2.3. Adición de probióticos en alimentos y factores que afectan su sobrevivencia.....	12
2.3. Destino del tránsito de los probióticos en el colon.....	15
2.3.1. Fisiología del tracto gastrointestinal y sobrevivencia de probióticos....	15
2.4. Microencapsulación.....	17
2.4.1. Métodos de encapsulación.....	18
2.4.2 Método de extrusión.....	20
2.4.3 Materiales utilizados para encapsulación.....	22
Alginato.....	24
Pectina.....	27
2.4.4 Resistencia de biopolímeros a condiciones gastrointestinales.....	31
2.4.5. Encapsulación de organismos probióticos.....	32

3. JUSTIFICACION.....	35
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. Objetivo General.....	36
4.2. Objetivos Específicos.....	37
5. HIPÓTESIS.....	38
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
6.1. Ubicación del trabajo.....	39
6.2. Materiales utilizados.....	39
6.3. Cultivo de <i>Lb. casei</i> y preparación del concentrado celular.....	40
6.3.1. Crecimiento de <i>Lb. casei</i>	40
6.3.2. Obtención de células de <i>Lb. casei</i> a encapsular.....	41
6.4. Preparación de dispersiones de biopolímeros.....	41
6.5. Encapsulación de <i>Lb. casei</i>	42
6.5.1. Elaboración de cápsulas por el método de extrusión.....	42
6.5.2. Caracterización de cápsulas conteniendo <i>Lb. casei</i>	43
6.5.3. Recuento de <i>Lb. casei</i> encapsulado.....	45
6.5.4. Eficiencia de encapsulación.....	45
6.6. Sobrevivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado en yogur.....	46
6.6.1. Elaboración de yogur bajo en grasa.....	46
6.6.2. Enumeración de <i>Lb. casei</i> encapsulado en yogur.....	46
6.6.3. Tasa de sobrevivencia.....	47
6.7. Sobrevivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas.....	47
6.7.1. Sobrevivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado a jugo gástrico simulado.....	47
6.7.2. Sobrevivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado a jugo gástrico y sales biliares	48
6.8. Análisis estadístico.....	49
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1. Curva de crecimiento de <i>Lb. casei</i>	50
7.2. Morfología, diámetro y rendimiento de las cápsulas.....	51

7.2.1 Morfología.....	51
7.2.2 Diámetro.....	53
7.2.3 Rendimiento.....	54
7.2.4 Microestructura de las cápsulas.....	55
7.3. Propiedades texturales de las cápsulas.....	61
7.4. Eficiencia de encapsulamiento de <i>Lb. casei</i>	62
7.5. Supervivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado en yogur.....	63
7.6. Supervivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas.....	68
7.7. Interrelación entre la supervivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado en yogur y condiciones gastrointestinales simuladas y las propiedades físicas y de las texturales cápsulas.....	70
8. CONCLUSIONES.....	73
9. REFERENCIAS.....	74
10. ANEXOS.....	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lactobacillus casei</i>	11
Figura 2. Método de encapsulación por extrusión.....	20
Figura 3. Estructura química de cadenas de (a) galacturonato y (b) guluronato.....	25
Figura 4. Formación de geles de alginato con sales cálcicas, modelo “egg-box”.....	26
Figura 5. (a) Segmento repetido de la molécula de pectina y sus grupos funcionales: (b) carboxilo; (c) ester y (d) amida.....	28
Figura 6. Modelo de la gelación de las pectinas de bajo metoxilo amidadas mostrando interacciones entre residuos de ácido galacturónico y, enlaces hidrógeno entre residuos de ácido galacturónico amidado	29
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>Lb. casei</i> en caldo MRS no adicionado de ácido ascórbico (—□—) y en caldo MRS adicionado con ácido ascórbico (—○—), a 37°C.	50
Figura 8. Micrografías representativas de las variaciones de cápsulas obtenidas en un microscopio de contraste de fases:.....	52
Figura 9. Micrografía MEB representativa de una cápsula (A _{0.5} P ₀) fracturada, p: pared interna de la cápsula, c: centro de la cápsula. Ampliación 2500 ×.....	57
Figura 10. Micrografía MEB representativa de una cápsula (A _{0.5} P ₁) fracturada, p: pared exterior de la cápsula, c: centro de la cápsula. Ampliación 500 ×.....	58
Figura 11. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A _{0.5} P ₀). Ampliación 5000 ×.....	58
Figura 12. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A ₀ P ₂). Ampliación 5000 ×.....	59
Figura 13. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A _{0.5} P ₁). Ampliación 5000 ×.....	59

Figura 14. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A _{0.5} P ₂). Ampliación 5000 ×.....	60
Figura 15. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A _{0.5} P ₃). Ampliación 5000 ×.....	60
Figura 16. Tasas de sobrevivencia y modelos ajustados para <i>Lb. casei</i> contenido en las cápsulas A _{0.5} P ₀ e incorporado en yogur almacenado durante 20 días a 4 °C.....	65
Figura 17. Tasas de sobrevivencia y modelos ajustados para <i>Lb. casei</i> contenido en las cápsulas A _{0.5} P ₃ e incorporado en yogur almacenado durante 20 días a 4 °C.....	65
Figura 18. Efecto de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares sobre la sobrevivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado en las diferentes variaciones de cápsulas y células libres.....	68
Figura 19. Efecto de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares sobre la viabilidad: inicial (□) y final (▣) de <i>Lb. casei</i> encapsulado y células libres.....	69
Figura 20. Análisis de componentes principales de las propiedades texturales de las cápsulas y sobrevivencia de <i>Lb. casei</i> en el almacenamiento de yogur y en condiciones gástricas simuladas.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Beneficios de los probióticos a la salud del ser humano y probables mecanismos subyacentes.....	07
Tabla 2. Bacterias probióticas reconocidas y comúnmente usadas en la industria alimentaria.	09
Tabla 3. Alimentos suplementados con bacterias probióticas.....	13
Tabla 4. Propiedades de algunos métodos para la encapsulación de probióticos.....	19
Tabla 5. Materiales utilizados para la encapsulación de bacterias probióticas.....	23
Tabla 6. Concentraciones de alginato y pectina presentes en las dispersiones acuosas usadas para la preparación de las cápsulas conteniendo <i>Lb. casei</i>	42
Tabla 7. Valores medios (\pm DE) de las características físicas, rendimiento y eficiencia de encapsulamiento de las cápsulas.....	53
Tabla 8. Valores medios (\pm DE, n=9) de las propiedades texturales de las variaciones de cápsulas.....	61
Tabla 9. Valores medios (\pm DE, n=9) de viabilidad y sobrevivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado, durante el almacenamiento de yogur.....	64
Tabla 10. Parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales para la tasa de sobrevivencia <i>Lb. casei</i> encapsulado en yogurt almacenado 20 días a 4 °C.	66

“EMPAQUES BIOACTIVOS DE LIBERACIÓN ESPECÍFICA EN EL COLON Y SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS LÁCTEOS FUNCIONALES”

RESUMEN

Lactobacillus casei fue atrapado en cápsulas elaboradas con alginato de sodio (A), pectina de bajo metoxilo amidada (P), y mezclas de A-P (relaciones 1:2, 1:4, 1:6), mediante la técnica de extrusión. Se determinaron el diámetro, la esfericidad y las propiedades texturales de las cápsulas, así como la sobrevivencia de *Lb. casei* atrapado durante el almacenamiento de yogur y bajo condiciones gastrointestinales simuladas (CGS). La eficiencia de atrapamiento de *Lb. casei* y el diámetro de las cápsulas aumentaron cuando la proporción de P y la concentración total de biopolímeros se incrementaron. Los resultados del Análisis de Componentes Principales indicaron que la sobrevivencia de *Lb. casei* durante el almacenamiento de yogur, estuvo correlacionada positivamente con el diámetro y las propiedades texturales de las cápsulas; mientras que la sobrevivencia de *Lb. casei* después de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares de manera secuencial, estuvo correlacionada positivamente con la esfericidad de las cápsulas. Las cápsulas elaboradas con las mezclas A-P en relaciones de 1:4 y 1:6, proporcionaron significativamente mejor protección a *Lb. casei* atrapado bajo todas las condiciones estudiadas.

Palabras clave: probióticos; encapsulación; atrapamiento; alginato; pectina de bajo metoxilo amidada; yogur; condiciones gastrointestinales simuladas.

ABSTRACT

Lactobacillus casei was entrapped in beads made with sodium alginate (A), amidated low-methoxyl pectin (P), and blends of A-P (1:2, 1:4, 1:6 ratios) by the extrusion technique. Diameter, sphericity and textural properties of the beads and the survivability of entrapped *Lb. casei* during yoghurt storage and in simulated gastrointestinal conditions (SGC) were determined. Entrapment efficiency of *Lb. casei* and diameter of the beads increased as the proportion of P and the total biopolymers concentration increased. The results of Principal Component Analysis showed that the survivability of *Lb. casei* during yoghurt storage, and in simulated gastric juice, was positively correlated with the diameter and all the textural properties of the beads; while survivability of *Lb. casei* after exposure to simulated gastric juice and bile salts was positively correlated with the sphericity of the beads. The beads made with A-P blends in 1:4 and 1:6 ratios provided a significant better protection to the entrapped *Lb. casei* under all conditions studied.

Keywords: probiotics; encapsulation; entrapped; alginate; amidated low methoxyl pectin; yoghurt; simulated gastrointestinal conditions

1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la población prefiere prevenir que curar enfermedades (Talwalkar y Kailasapathy, 2004). La dieta es una buena estrategia para mantener una salud óptima a través de la vida y prevenir las enfermedades crónico-degenerativas que la población va presentando cuando la edad avanza, tales como desórdenes gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003).

En este sentido, la divulgación de los beneficios a la salud que tiene el consumo de las bacterias probióticas sobre enfermedades cardiovasculares, urogenitales, trastornos digestivos por *Helicobacter pylori*, cáncer, alergias, entre otras (Ouwehand y Vesterlund, 2003), ha impulsado a grandes progresos y el número de alimentos incorporados con probióticos que son puestos a disposición de los consumidores es mayor cada vez (Anal y Singh, 2007).

Los probióticos son considerados como “microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando son administrados en cantidades adecuadas” (Araya, Morelli, Reid, Sanders, Stanton, Pineiro y Ben-Embarek. 2002). Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001, Tannock, 2002).

Tradicionalmente, el yogur es elaborado utilizando *Streptococcus thermophilus* y *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* como cultivos iniciadores; éstos sin embargo, no son habitantes naturales del intestino, por lo que se incorporan cepas probióticas como *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* o ambos (Shah, 2000).

El número de bacterias probióticas disminuye como resultado de la acción del procesamiento y condiciones de almacenamiento del alimento que las contiene, y al ser

ingeridas, debido a la acción ejercida por jugos gástricos y sales biliares., de esta manera se demerita su efecto benéfico al consumidor. Se ha señalado que las bacterias probióticas muestran pobre sobrevivencia en leches fermentadas y yogur, como consecuencia de su baja tolerancia a la exposición de medios muy ácidos y aireados (Muthukumarasamy, Allan y Holley, 2006).

La microencapsulación ha sido reconocida como una alternativa para proteger microorganismos de ambientes de alta acidez durante el almacenamiento de los alimentos que los contienen, así como de las condiciones que enfrentan durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal (Sun y Griffiths, 2000; Anal y Singh, 2007). La microencapsulación es un proceso por el cual las células son retenidas dentro de una matriz encapsulante o membrana.

Entre los materiales encapsulantes ampliamente utilizados, se encuentra el alginato, heteropolisacárido lineal de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico, extraído a partir de diferentes especies de algas, que es barato, de uso simple y biocompatible. Cápsulas de alginato (1-3 μm de diámetro) conteniendo bacterias, pueden ser formadas usando la técnica de extrusión (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2003). No obstante, los geles de alginato son susceptibles a desintegración en presencia de exceso de iones monovalentes, agentes quelantes (Ca^{2+}) y ambientes químicos hostiles (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990).

Algunos autores han informado que los alginatos pueden formar complejos fuertes con otros poli-electrolitos, tales como pectina (también un poliuronato), mediante asociaciones cadena-cadena y la formación de hidrogeles tras la adición de cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}), (Pillay y Fassih, 1999a; Fang, Al-Assaf, Phillips, Nishinary, Funami y Williams, 2008). La formación de tales complejos mejora la estabilidad química y mecánica de las cápsulas de alginato, y consecuentemente también la capacidad de entrapamiento (Pillay y Fassih, 1999b).

Se ha informado que el tamaño de partícula de las cápsulas influye de manera importante sobre la sobrevivencia de los microorganismos probióticos. Sheu, Marshall y Heymann (1993), encontraron que la sobrevivencia de *Lb. bulgaricus* entrampado en cápsulas de alginato adicionadas en postres congelados, fue significativamente mayor en aquellas cápsulas con 30 -102 μm de diámetro, en comparación con la observada en cápsulas con un diámetro de 15 μm .

Estos autores indicaron también que un diámetro medio de las cápsulas de 30 μm fue deseable, debido a que cápsulas más grandes causaron una textura granulosa en el helado; mientras que aquellas más pequeñas no proveyeron suficiente protección a las bacterias encapsuladas. La adición de *Bifidobacterium longum* en cápsulas de κ -carragenina, a yogur en una concentración de 10 % (p/v), causó una respuesta desfavorable hacia su consumo, debido a la textura granulosa resultante (Adhikhari, Mustapha y Grün, 2003).

Por su parte, Hansen, Allan-Wotjas, Jin y Paulson (2002), establecieron que cápsulas de alginato deberían tener un diámetro de al menos 100 μm , para prevenir la reducción en la viabilidad de *Bifidobacterium* bajo la acción de jugos gástricos simulados. Chandramouli, Kailasapathy, Peiris y Jones (2004), encontraron que la viabilidad de las células en las cápsulas de alginato incrementa con un incremento en el tamaño de la cápsula y la concentración de geles.

Con base en lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron: a) Entrampar *Lb. casei* en cápsulas elaboradas con alginato de sodio (A), pectina de bajo metoxilo amidada (P), y mezclas de A-P en relaciones 1:2, 1:4, 1:6, por la técnica de extrusión, y b) Determinar las posibles interrelaciones entre la composición y las propiedades morfológicas y mecánicas (diámetro, esfericidad y propiedades texturales) de las cápsulas; así como las posibles interrelaciones entre las propiedades morfológicas y físicas de las cápsulas con la sobrevivencia de *Lb. casei* entrampado durante el almacenamiento de yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Microorganismos probióticos

2.1.1. Definición

Ferdinand Vergin introdujo en 1954 el término “probiótico”, al comparar, en un escrito titulado “Anti- und Probiotika”, los efectos deletéreos de los antibióticos y otras sustancias antimicrobianas sobre la flora, con los efectos favorables (“Probiotika”) de las bacterias benéficas. Este concepto se fue variando a través de la historia, y si bien se han dado muchas definiciones, la que se emplea en la actualidad es la establecida por la FAO: Los probióticos pueden ser considerados como “microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped” (Araya, Morelli, Reid, Sanders, Stanton, Pineiro y Ben-Embarek, 2002).

En otras palabras, el consumo de probióticos podría impactar positivamente el balance de la microflora intestinal. No hay duda que bajo condiciones normales, un adulto saludable tiene en balance la microflora intestinal, pero la dieta, los antibióticos, el estrés y los desórdenes gastrointestinales pueden causar cambios significativos en el balance natural del adulto, causando un decremento en el número de los beneficios que otorgan las bacterias probióticas (Hoover, 1993). La ingesta de suplementos y/o alimentos con probióticos tiene como objetivo reparar las deficiencias en la microflora intestinal y lograr obtener un efecto protector (Lavermicocca, Valerio, Lonigro, De Angelis, Morelli y Callegari, 2005).

2.1.2. Probióticos y la microflora normal del intestino humano

La microflora normal del tracto digestivo humano constituye un ecosistema altamente complejo, dependiente de la fisiología del hospedero y de las interacciones entre bacterias. Parecería ser que dentro de un organismo vivo, las bacterias se han adaptado a las condiciones de cada segmento del tracto digestivo, recreando y manteniendo allí una atmósfera anaeróbica (Blaut, 2002). Como las condiciones medioambientales evolucionan a lo largo del circuito intestinal, se observan poblaciones bacterianas específicas que difieren de cada segmento a otro del tracto digestivo. El pH es de 6.4 en el colon ascendente, sube en el colon transversal y se hace neutral en el colon descendente.

La variedad de pH dentro del colon es un factor importante que determina la naturaleza de la flora microbiana en el tracto gastrointestinal. Se ha estimado que el tracto gastrointestinal del adulto tiene cerca de 10^{14} bacterias viables de más de 500 especies, aunque cuantitativamente predominan de 10 a 20 géneros; por ejemplo: *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia* y *Veillonella* (Isolauri, Kirjavainen y Salminen, 2002).

La microflora del estómago humano está predominantemente compuesta de bacterias gram positivo, ácido-resistentes y anaerobias, incluyendo estreptococos y lactobacilos y varios fungi. En el individuo sano, el estómago y el duodeno están poco colonizados (entre 10^1 y 10^4 células ml^{-1}), puesto que las condiciones ácidas y variaciones de pH del estómago (pH en el rango de 2.5 a 3.5) son poco favorables (Tannock, 1995, 2002), al igual que el tránsito, que deja poco tiempo para que las bacterias se adhieran.

El intestino delgado conforma una zona de transición entre el estómago y el colon; en esta parte, estreptococos y lactobacilos están presentes en concentraciones de 10^6 - 10^7

células ml⁻¹; la motilidad del intestino y el efecto inhibitorio de las sales biliares son los factores que mayormente previenen el sobre-crecimiento de las bacterias en el intestino delgado. La población bacteriana aumenta en las zonas más alejadas del intestino delgado (entre 10⁴ y 10⁸ células ml⁻¹) (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003).

El colon es la región más colonizada, las bacterias dominantes incluyen anaerobias: *Bacteroides*, *Eubacterim*, *Peptosneprococ* y *Clostridium*, que forman el 99% de la microflora total (cerca de 400 especies), con concentraciones máximas que pueden alcanzar hasta 10¹² células g⁻¹ esencialmente a nivel del ciego, que es un punto de intensa fermentación. Algunas especies subdominantes (10⁶-10⁸ células g⁻¹) incluyen *Eschenchia coli*, *Lactobacilli*, y *Streptococci*.

Otras especies muestran fluctuaciones en la proporción y presencia en la microflora total y aún más a nivel del colon. La complejidad de la población microbiana en el tracto gastrointestinal tiene una influencia significativa sobre la bioquímica, fisiología, inmunología y resistencia a enfermedades del hospedero. Esta microflora del colon obtiene su energía mediante la fermentación de sustancias que no son digeridas por el intestino delgado, tales como di-, tri- u oligo- sacáridos y polisacáridos (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003).

Aunque el papel de la microflora normal no está completamente entendido, es ampliamente aceptado que algunas bacterias del intestino tienen beneficios a la salud; un ejemplo de ello es lo que se ha denominado la "resistencia a la colonización" o "efecto de barrera", en referencia al mecanismo que utilizan las bacterias ya presentes en el intestino para mantener su presencia en ese medio y evitar la colonización de esas mismas zonas intestinales por microorganismos patógenos. Por consiguiente, cabe suponer que la manipulación alimentaría de la microflora intestinal con objeto de aumentar el número relativo de "bacterias probióticas" podría contribuir al bienestar del huésped. (Gibson y Roberfkoid, 1995).

Tabla 1: Beneficios de los probióticos a la salud del ser humano y probables mecanismos subyacentes

Función	Problema de salud sobre el que pueden actuar los probióticos	Mecanismo de acción de los probióticos propuesto
Confort digestivo	Síndrome del colon irritable, estreñimiento, diarrea no patógena, hinchazón, flatulencias, calambres, mal aliento de Intolerancia a la lactosa	Alteración de la población o de la actividad de la microflora intestinal Liberación de β -galactosidasa en el intestino Translocación, efecto barrera
Defensa	Alergia (eczema atópico, alergia a la leche, poliartritis reumatoide) Cariogenecidad Carcinogenicidad, mutagenicidad, tumor Diarreas asociadas a los antibióticos, diarreas por <i>Rotavirus</i> , colitis por <i>C. difficile</i> , diarreas nosocomiales <i>Helicobacter pylori</i>	Modificación de la población, de la actividad de la microflora oral o de su capacidad para adherirse Absorción del mutágeno, estimulación inmunitaria, inhibición de la producción Carcinógena de la microflora intestinal Exclusión competitiva, translocación/efecto barrera, respuesta inmunitaria favorecida Actividad antipatogénica por diversas cepas de <i>Lb. acidophilus</i>
Otras	Inmunomodulación (estado inmunitario, respuesta a las vacunas) Inflamación intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, pouchitis Crecimiento excesivo de las bacterias intestinales Vaginosis, infecciones urinarias Reducción de la colesterolemia Endotoxemia asociada a una cirrosis Hipertensión Cálculos renales	Interacción con las células inmunitarias Ponderación de la respuesta inmunitaria Actividad antimicrobiana, exclusión competitiva Actividad antipatogénica, exclusión competitiva Desconjugación de los ácidos biliares Inhibición de la producción de endotoxinas por la microflora intestinal Componentes celulares o péptidos de la fermentación que actúan como inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina Alteración de la flora digestiva susceptible de influenciar la degradación del oxalato

2.1.3. Beneficios a la salud atribuidos a los probióticos

Los efectos benéficos de los probióticos sobre el ser humano, consisten principalmente en la reducción de uno o varios factores de riesgo de enfermedad o bien en la mejora de sus funciones fisiológicas. Cada especie, e incluso cada cepa, ofrecen un beneficio para la salud más o menos acentuado. Entre los efectos que se han identificado se encuentran los mencionados por Kullcami y Reddy (1994); Gardiner, Bouchier, O'Sullivan, Kelly, Collins, Fitzgerald (2002); Sanders (2003) listados en la Tabla 1.

2.2. Bacterias probióticas

2.2.1. Criterios para la selección de microorganismos probióticos

El impacto que tienen los probióticos adicionados a alimentos depende de la habilidad del cultivo para sobrevivir hasta la fecha límite de consumo y de colonizar y crecer en el intestino del consumidor. Para mejorar los beneficios potenciales de la ingesta de microorganismos probióticos, se ha sugerido que éstos cumplan ciertos criterios:

- Ser habitantes originales del intestino humano
- No ser patógenos, ni generar sustancias tóxicas para el huésped
- Ser capaces de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal
- Ser capaces de adherirse al epitelio intestinal
- Tener la capacidad de ejercer un efecto benéfico en el huésped
- Resistir los ácidos biliares
- Resistir los ácidos estomacales y sus enzimas proteolíticas
- Soportar cambios bruscos de pH (González y Gómez, 2004).

Los grandes retos que se enfrentan son mantener la viabilidad de los probióticos en los alimentos hasta su consumo y mejorar su resistencia a las condiciones del tracto

gastrointestinal antes de llegar al colon; sin embargo, su sensibilidad a condiciones ácidas y aireadas hace difícil su cultivo, sobrevivencia en alimentos y durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal.

La cantidad mínima de probióticos, recomendada por diversos institutos de investigación y asociaciones 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, Gavara y Lagaron, 2006).

Tabla 2. Bacterias probióticas reconocidas y comúnmente usadas en la industria alimentaria.

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>otros</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis, Ent. Faecium, Ent.</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Francium</i>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Streptococcus cremoris, St. salivarius, St.</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>diacetylactis, St. intermedius</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lb. cellobiosus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>B. essensis</i>	<i>Escherichia coli Nissle</i>
<i>Lb. lactis</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		
<i>Lb. brevis</i>		

Los microorganismos encontrados en los diferentes productos comerciales son reconocidos por sus efectos benéficos (Isolauri, Juntunen, Rautanen, Sillanaukee y Koivu., 1991; Gibson y Roberfroid, 1995; Boyle y Tang, 2006), sin embargo al no entregar la

dosis recomendada, no se logra el beneficio al hospedero. En la tabla 2 se listan algunas bacterias consideradas como probióticos de acuerdo a Senok, Ismaeel, y Botta (2005); Parvez, Malik, Kang y Kim (2006) y Shah (2007).

2.2.2. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un microorganismo gram positivo encontrado en el tracto reproductivo e intestinal de los humanos y animales (Kandler y Weiss, 1986). *Lb casei* tiene forma de bacilos cortos y coreniformes con dimensiones de 0.7-1.1×2.0-4.0µm (Figura 1); frecuentemente con tendencia a formar cadenas, pero sin movimiento. *Lb casei* puede ser distinguido por su capacidad de crecer en sustratos de gluconato, malato y pentitoles (Lee, 1999). El crecimiento de estos microorganismos ocurre a una temperatura de 15 °C, pero no a 45 °C, siendo las temperaturas óptimas de 30 a 37 °C. *Lb. casei* es aerotolerante, pero su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaerobias.

Lb. casei es considerada como una bacteria heterofermentativa facultativa, debido a su capacidad para fermentar hexosas por la vía Embden-Meyerhof, hasta ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico, bajo limitantes de glucosa. *Lb. casei* también puede fermentar pentosas hasta ácido láctico y ácido acético por la vía de fosfocetalosa inducible (Axelsson, 1998) y puede utilizar citrato como fuente de energía. *Lactobacillus casei ss. casei*, cepa utilizada en este estudio, presenta un buen crecimiento en caldo MRS (DE MAN, ROGOSA Y SHARPE) y agar MRS, a una temperatura de incubación de 37 °C durante 3 días o bien a 30 °C por 5 días (Merck, 1994).

Lb casei es frecuentemente encontrado en ecosistemas alimenticios, tales como leche, quesos, leches fermentadas, vegetales frescos y fermentados y carne Erdoğan y Erbilir (2006), debido a que además de sus beneficios a la salud del consumidor, su

actividad metabólica genera sabores característicos y ejerce un efecto preservativo sobre los productos fermentados (Gobbetti, 1999).

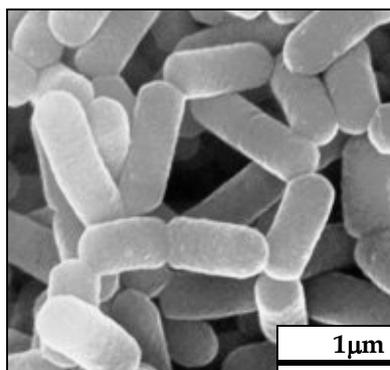


Figura 1. *Lactobacillus casei*

Se han estudiado diferentes cepas de *Lb. casei* con funciones probióticas; y han encontrado que algunas de ellas mostraron capacidad de adherencia y colonización en el duodeno (Minelli, Benini, Marzotto, Sbarbati, Ruzzenente, Ferrario, Hendriks y Dellaglio, 2004); por ejemplo, la cepa Shirota de *Lb. casei* moduló la composición y actividad metabólica de la flora intestinal (Tuohy, Pinart-Gilberga, Jones, Hoyles, McCertney y Gibson, 2006), además mostró eficacia frente a infecciones intestinales en niños producidas por rotavirus (Matsuzaki, 1998); *Lb. casei* ASCC 292 removió el colesterol a través de diferentes mecanismos en la presencia de fructooligosacaridos (FOS) prebióticos y maltodextrina (Loing y Shah , 2005), *Lb. casei* DN-114 001 redujo los episodios de diarrea en niños después de 6 meses de consumo (Pedone, Arnaud, Postaire, Bouley y Reinert, 2000).

Por lo mencionado anteriormente, se hace necesario asegurar que *Lb. casei* sobreviva en los sistemas alimenticios a los que se incorpore y de esta manera ejerza los potenciales beneficios al huésped.

2.2.3. Adición de probióticos en alimentos y factores que afectan su sobrevivencia

A partir del reciente interés en los probióticos, diferentes alimentos han sido propuestos como acarreadores de microorganismos probióticos (Stanton, Gardiner, Lynch, Collins, Fitzgerald y Ross, 1998) para que los consumidores puedan ingerir una alta cantidad de células viables y así poder obtener el efecto terapéutico. Algunos alimentos que han sido utilizados para incorporar probióticos se muestran en la Tabla 3.

La dieta-sustrato es uno de los factores más importantes para regular la colonización de microorganismos en el tracto gastrointestinal, debido a que el alimento actúa como un amortiguador para las bacterias a través del estómago y puede contener otros ingredientes funcionales que pueden interactuar con los probióticos y alterar su funcionalidad.

Existe un obvio potencial efecto sinérgico cuando prebióticos y probióticos son combinados apropiadamente, pues los primeros promueven el crecimiento y la actividad de los segundos. Muchos alimentos contienen prebióticos de forma natural, muchos otros pueden ser fortificados durante la manufactura para incrementar la eficiencia de los efectos benéficos (Dinakar y Mistry, 1994; Kailasapathy y Rybka, 1997; Bomba, Joncova, Koscova, Nemcova, Gancarcicova y Mundronova, 2006).

Originalmente, la ingesta de probióticos está asociada con los alimentos lácteos considerados vehículos ideales para la liberación de bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal (Ross, Fitzgerald, Collins, y Stanton, 2002), no obstante, la fortificación de sistemas alimenticios diferentes a su fuente original y suplementos alimenticios puede llevar a la reducción en la eficiencia funcional debida a la exclusión del potencial sinérgico con los productos lácteos, por lo que, la selección del alimento es un factor importante para fortificar con probióticos (Ranadheera, Baines, Adams, 2009).

Tabla 3. Alimentos suplementados con bacterias probióticas

Alimento/forma en la que se incorporaron las bacterias probióticas	Referencia(s)
leche descremada adicionada con oligosacáridos e inulina/células libres	Shin, Lee, Pestka y Ustunol (2000)
fórmulas lácteas /células libres	Dubey y Mistry (1996)
chocolate oscuro /células libres	Nebesny, Zyzelewicz, Motyl y Libudzisz (2007)
mayonesa/células libres y encapsuladas en alginato	Khalil y Mansour (1998)
queso Pikantne /células libres	Songisepp, Kullisaar, Hütt, Elias, Brilene, Zilmer, y Mikelsaar (2004)
queso Cheddar/células libres	Gómez y Malcata (1998); Gardiner, Stanton, Lynch, Collins, Fitzgerald y Ross (1999), Ong, Henriksson y Shan (2006)
queso Cheddar/células encapsuladas en alginato-pectina	Madziva, Kailasapathy y Phillips (2006)
queso blanco en salmuera/células encapsuladas en	Özer, Kirmaci, Şenel, Atamer y Hayaloğlu (2009)
queso fresco bajo en grasa/células libres	Mahnet, Kirin, Kos, Frece, Suskovic (2004)
queso de suero /células libres	Madureira, Giao, Pintado, Gomes, Freitas y Malcata (2005); Madureira, Pereira, Truszkowska, Gomes, Pintado y Malcata, (2005)
queso blanco/células libres	Kasimoğlu, Göncüoğlu y Akgün (2004),

...continuación. Tabla 3	
queso cottage/células libres	Blanchette y Roy (1995); Blanchete, Roy, Belanger y Gauthier (1996)
queso duros a partir de leche de cabra/células libres	Kalavrouzioti, Hatzikamari, Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis (2005)
queso Crescenza/células libres y entrapadas en geles de alginato	Gobbetti, Corsetti, Smacchi, Zocchetti y Angelis (1998)
queso semi-duro argentino/células libres	Bergamini, Hynes, Quiberoni, Suárez y Zalazar (2005)
queso fresco Minas/células liofilizadas	De Souza, Burity, Behrens y Saad (2007)
queso Canestrato Pugliese /células libres	Corbo, Albenzio, Angelis, Sevi y Gobetti (2001)
bebidas lácteas/células libres	Tripathi y Jha (2004); Oliveira, Sodini, Remeuf, Tissier y Corrieu (2002)
jugos de fruta y leche descremada/células liofilizadas	Saarela, Virkajärvi, Alakomi, Sigvart-Mattila y Mätto (2006)
aderezos/células libres y encapsuladas en alginato	Muthukumarasamy y Holley (2006)
crema cultivada/células libres	Ekinci, Okur, Ertekin y, Guzel-Seydim (2008)
helado/células libres y encapsuladas en alginato	Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei y Corti (2005)
mousse de chocolate/células libres	Aragon-Alegro, Alarcón-Alegro, Cardarelli, Chiu y Saad (2007)
leches fermentadas y yogur/células libres y, en cápsulas de alginato, k-carragenina, proteína de suero, alginato-almidón	Shah y Lankaputhra (1997); Shah, Lankaputhra, Britz, y Kyle, (1995) Dave y Shah (1998); Tandhanskul y Krasaekoopt (2008); Lourens-Hattingh y Vijoen (2001), Lamoureux, Roy y Gauthier (2002); Oliveira, Sodini, Remeuf, Tissier y Corrieu (2002), Schillinger, Guigas y Holzapfel (2005), Calderón, Padilla, Chaves, Villalobos y Arias (2007)
alimentos fermentados tradicionales de África/células en capsulas de gelana-xantana	McMaster, Kokott, Reid y Abratt (2005)

Además Vinderola, Bailo, y Reinheimer (2000), encontraron que 3 % (p/p) de grasa láctea en yogur ejerce un efecto inhibitorio para *B. bifidum* BBI en comparación con yogur descremado (0.2 %); Birollo, Reinheimer y Vinderola (2000) concluyeron que la alta concentración de azúcares en yogur con “dulce de leche”, es un factor inhibitorio para lactobacilos. No solo la composición química, sino también la estructura física de los alimentos es importante en el crecimiento, la sobrevivencia y eficiencia funcional de los probióticos (Kailasapathy, Harmstorf, y Phillips, 2008; Ranadheera, Baines y Adams; 2009).

Las propiedades fisicoquímicas de los alimentos acarreadores usados para la liberación de probióticos, son factores significativos que influyen la sobrevivencia de los probióticos y mejoran su efecto funcional (Kailasapathy y Chin, 2000). Además es importante que estos productos alimenticios sean parte de la dieta diaria normal, y mantengan un nivel mínimo terapéutico (10^7 ufc g^{-1}), para mejor eficiencia en efecto benéfico regulador (Vinderola y Reinheimer, 2003; Gardiner, Bouchier, O’Sullivan, Kelly, Collins y Fitzgerald, 2002).

2.3. Destino del tránsito de los probióticos en el colon.

2.3.1. Fisiología del tracto gastrointestinal y sobrevivencia de probióticos

El tracto gastrointestinal es un tubo digestivo muscular, cuya función es la digestión de alimentos y absorción de nutrientes, electrolitos y fluidos, y previene la absorción de sustancias potencialmente tóxicas. Para llevar a cabo estas funciones, el tracto digestivo está diferenciado en órganos que poseen características únicas (Schneeman, 2002):

Estómago. Su función principal es la digestión de los alimentos proteicos a partir de la secreción de aproximadamente 2.5 l de jugos gástricos cada día en el estómago a un pH entre 1.5 a 3.5 en ayuno y el peristaltismo, por lo que constituye un mecanismo de

defensa sumamente importante. Cuando los probióticos son administrados en individuos sanos, se enfrentan al estrés por alta acidez en el estómago. Los resultados de algunos estudios sobre el efecto del pH gástrico sobre los probióticos han sido informados. Fernández, Boris y Barbés (2003), estudiaron dos cepas humanas *Lb. acidophilus* UO 001 y *Lb. gasseri* UO 002 que presentaron sobrevivencia en condiciones gástricas (pH 2 y presencia de pepsina).

Berrada, Lemeland, Laroche, Thouvenot y Marine Piaia (1991), observaron el comportamiento de dos cepas de bifidobacterias al ser expuestas a ambientes gástricos simulados, una de ellas sobrevivió muy bien (>80%) al ser sometida 90 min a pH 3; mientras que la otra no sobrevivió. Pochart, Marteau, Bouhnik, Goderel, y Rambaud (1992), encontraron pérdida en la viabilidad de bifidobacterias contenidas en leches fermentadas, al ser expuestas a soluciones de pH de 1.0 y 2.0 por 3 h. Carteris, Kelly, Morelli y Collins (1998), concluyeron que mientras la mayoría de las cepas de lactobacilos fueron resistentes a sales biliares, mostraron una pérdida de viabilidad tras la exposición a jugos gástricos (pH 2.).

Intestino delgado. El intestino delgado lleva a cabo la digestión enzimática y absorción. La motilidad intestinal y el efecto inhibitorio de las sales biliares son los factores más importantes para los hospederos en la prevención del sobre-crecimiento en el intestino delgado. Las sales biliares, una compleja solución acuosa de componentes orgánicos e inorgánicos secretados por el hígado del humano, es inhibidor de muchos de los microorganismos que ingerimos.

La resistencia a las sales biliares es considerado como uno de los principales criterios de selección de microorganismos probióticos. Cada especie y entre cepas de bacterias probióticas existe variación en la tolerancia a las sales biliares (Gopal, Prasad, Smart, y Gill, H.S., 2001). Normalmente, los resultados de estudios *in vitro* pueden predecir la situación *in vivo*, donde existen condiciones fisiológicas más complejas; sin embargo, la comparación de resultados a partir de diferentes estudios es difícil por

existir variaciones en los factores tales como medios y preparación de cultivos, condiciones de evaluación, entre otros.

Los probióticos deberían llegar a lo largo del intestino, y específicamente al colon, intactos y viables; sin embargo, cuando los probióticos (*Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium*) son ingeridos, se reduce su actividad y viabilidad, en parte por las condiciones ácidas del estómago y por la bilis (Lankaputhra y Shah, 1995), retardando su colonización. Es necesario proteger a las bacterias probióticas para que sobrevivan en dosis terapéuticas y ejerzan sus efectos benéficos sobre el balance de la microflora intestinal. La protección de probióticos por encapsulación ha sido propuesta para mejorar su viabilidad en productos lácteos y en el tracto gastrointestinal (GI).

2.4. Microencapsulación

La microencapsulación es definida como una tecnología de empaque de materiales sólidos, líquidos o gases, con el objetivo de impedir su pérdida, al protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento, o para impedir que sufran reacciones de oxidación por la luz u oxígeno (Fanger, 1974; Popplewell, Black, Norris y Porzio, 1995).

Las enzimas y las células animales o vegetales también pueden ser encapsuladas, permitiendo que los sustratos y productos entren y salgan de la cápsula. El tamaño de las cápsulas puede variar desde 1 μm a 1 mm, dependiendo de los materiales y métodos usados en su preparación (Anal y Sing, 2007). Las cápsulas obtenidas pueden liberar su contenido a tasas controladas bajo condiciones específicas (Anal y Stevens, 2005; Anal, Stevens y Remuñán-López, 2006; Kailasapathy y Masondole, 2005).

En la actualidad, la encapsulación tiene grandes aplicaciones en el área de las industrias de los aditivos alimentarios, de los productos químicos, agroquímicos,

farmacéuticos y en la acuicultura (Wong, 1998). La encapsulación se utiliza para proteger, estabilizar y liberar específicamente los bioactivos (Champagne y Fustier, 2007), pudiendo obtenerse productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales (Reineccius, 1991 y Popplewell, Black, Norris y Porzio, 1995). Se han preparado microcápsulas de probióticos usando diferentes materiales de pared (Capela, Hay, y Shah, 2006), incluyendo polisacáridos naturales (Wong, 1998) y diferentes métodos.

La encapsulación de diferentes células, incluyendo bacterias probióticas, ha sido una práctica común que extiende la vida de anaquel de los cultivos, los protege de la incidencia de bacteriófagos e incrementa su viabilidad y estabilidad en la producción, almacenamiento (O'Riordan, Buckle y Conway, 2001) y confiere protección adicional en procesos de secado por liofilización y durante la rehidratación (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2003); además de permite un sinfín de aplicaciones biotecnológicas (Kim, Baek, Yoon, Y.H. 1996).

2.4.1. Métodos de encapsulación

La selección del método de encapsulación para una aplicación en particular, considera factores como: tamaño medio de la partícula requerido, propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y de la sustancia a encapsular, aplicaciones para el material encapsulado, mecanismo de liberación deseado y costo. Métodos, tales como secado por aspersión, por congelamiento y por lecho fluidizado, extrusión, coacervación y método electrostático, se utilizan para el encapsulamiento de bacterias probióticas (Tabla 4).

Tabla 4. Propiedades de algunos métodos para la encapsulación de probióticos

Tecnología	Características	Beneficios	Problemas
Partículas geladas	Células atrapadas en una matriz gelada: sistema de base biopolímeros (alginato, pectina)	Pueden ser usadas en la producción de biomasa en fermentación y pueden secarse al aire	Bajo rendimiento en la producción de biomasa, partículas >50 mm., pueden afectar la textura del alimento
	Las partículas geladas pueden ser recubiertas con una doble capa (quitosano). La alta carga celular (>10 ¹¹ ufc/g) en las cápsulas de pectina ó alginato, pero no para otros biopolímeros	Muchas metodologías pueden ser utilizadas. El secado en frío es barato. Las células se liberan en el intestino. El acarreador mantiene las propiedades de los bioactivos	Las partículas deben ser soluble en ambientes que contienen compuestos quelantes (fosfatos, citratos)
Protección coloidal	Cubiertas verdaderas, donde las células en una cubierta en polvo (de base lipídica) es atomizada. Alta carga celular (>10 ¹¹ ufc/g). Es ampliamente utilizada comercialmente	Alta protección a periodos de exposición cortos en ácidos, humedad y oxígeno. Pueden adicionarse capas múltiples para controlar la liberación y ajustar la densidad	Hay separación de fases en bebidas si las coberturas son lipídicas. La liberación de células es lenta a baja temperatura
Secado por aspersión	Es atomizada una suspensión del bioactivo y material protector, creando gotas muy finas que son secadas con aire caliente. Las células son cubiertas de forma individual con los materiales de pared. La carga de células media en el polvo es 10 ¹⁰ -10 ¹¹ ufc/g	Existe variedad de materiales de pared disponibles. Rápida liberación de células en disolución. Hay poco efecto sobre la textura de alimentos y bebidas si las partículas son disueltas.	Son utilizadas altas temperaturas en el proceso que pueden afectar la viabilidad de los probióticos y función de los bioactivos. Cortos periodos de protección hasta la disolución de las partículas.

2.4.2 Método de Extrusión

El método de extrusión consiste en preparar una dispersión de biopolímeros adicionada de los microorganismos a encapsular, la cual es extruida a través de la aguja de una jeringa, para formar gotas que caen libremente a una disolución en la que gelifican y endurecen posteriormente (Figura 2). La disolución contiene cationes de Ca^{2+} , en forma de CaCl_2 .

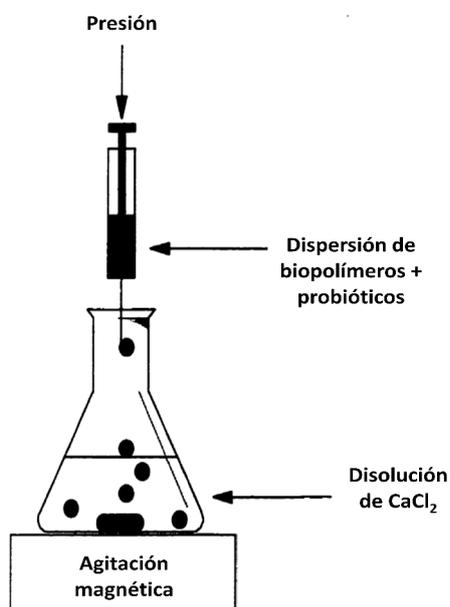


Figura 2. Método de encapsulación por extrusión.

Las gotas gelifican instantáneamente, atrapando las células en una matriz tridimensional. Las concentraciones de biopolímeros y de CaCl_2 pueden variar, para alginato de 0.6 a 2 % (p/p); mientras que para CaCl_2 de 0.05-1.5 M. El tamaño aproximado de las cápsulas es de 2-5 mm de diámetro, pero puede controlarse, dependiendo de la aplicación. El tamaño y la esfericidad de las cápsulas depende de la viscosidad de la dispersión de biopolímeros Smidsrod y Skjak-Braek (1990), del

diámetro del orificio de la aguja y de la distancia entre la jeringa y la disolución de CaCl_2 (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004).

La composición química del alginato también influye en el tamaño de la cápsula; pequeñas cápsulas resultan de alginatos con bajo porcentaje de ácido L-gulurónico (Martinsen, 1989). Este método es el más popular, simple, de bajo costo y asegura la viabilidad de las células. Varios investigadores (Chandramouli, Kailasapathy, Peiris, y Jones, 2004; Lee, Cha, y Park, 2004; Sheu, Marshall, y Heymann, 1993) han estudiado los factores que afectan la preparación de cápsulas por este método tales como concentraciones de alginato y de CaCl_2 , tiempo de endurecimiento de las cápsulas y concentración celular.

Las aplicaciones del método de encapsulación por extrusión han ido incrementándose en la industria de los alimentos, debido a la protección de los materiales encapsulados ante factores como calor y humedad, lo que permite mantener su estabilidad y viabilidad. Aunque la cobertura de los probióticos encapsulados mejora la sobrevivencia, la adición de capas adicionales, puede afectar el tamaño de la cápsula. Cápsulas grandes en alimentos fermentados, tales como yogur, son indeseables, debido a que afectan la textura y la sensación bucal del producto. Cápsulas de menos de $100\ \mu\text{m}$ de diámetro son deseables; mientras que aquellas con diámetros mayores de 0.1mm son detectadas en la boca (Mortazavian, Razavi, Ehsani y Sohrabvandi, 2007).

Hansen, Allan-Wojtas, Jin y Paulson (2002), reportan que cápsulas muy grandes de alginato de calcio ($> 1\text{mm}$) causan una textura granulosa cuando se adicionan a alimenticios; en contraste, cápsulas muy pequeñas, de tamaño menor a $100\ \mu\text{m}$, no confieren protección significativa a las bacterias encapsuladas, en comparación con células libres, al someterlas a fluidos gástricos simulados. Estos estudios indican que las bacterias probióticas deben ser encapsuladas en un rango de tamaño particular.

2.4.3 Materiales utilizados para encapsulación

Existe una amplia variedad de materiales para encapsulación de bacterias probióticas; entre ellos se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones (de maíz, arroz, trigo y papa)(O'Riordan, Buckle y Conway, 2001); alginato de sodio, celulosa, carragenina y goma arábica, quitosano, carboximetilcelulosa (CMC), gelatina y pectina (Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy, 2000; Yáñez, Salazar, Chaires, Jiménez, Márquez y Ramos, 2002; Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004, 2006), (Tabla 5).

El diseño de vehículos de liberación de bioactivos en el colon debe vencer algunos obstáculos que se presentan durante su ingesta; primero, necesitan mantenerse intactos cuando atraviesan el tracto gastrointestinal superior, con el fin de proteger a los bioactivos de la degradación química y enzimática, y segundo, ellos deben ser capaces de liberar al bioactivo al llegar al colon, de forma controlada, manteniendo su efectividad terapéutica (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003; Anal, Bhopatkar, Tokura, Tamura, y Stevens, 2003; Anal y Stevens, 2005; Liu, Fishmany Hicks; 2007).

Para la administración oral de probióticos, las cápsulas tienen que ser transportadas a través de ambientes con diferentes condiciones, frecuentemente: el bajo pH y la presión mecánica constante en el estómago; el ataque por proteasas en el intestino delgado; la microflora de digestión en el colon y la variación del tiempo de residencia en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal (GI).

Las estrategias para la liberación de probióticos en el tracto GI, pueden abordarse con base en el tiempo de tránsito de la boca al colon, variaciones de pH y tipos de enzimas a través del tracto GI. No puede considerarse la liberación de una dosis de probióticos en un tiempo específico, debido a que son ignoradas variaciones en cada individuo. La estrategia más probable consiste en el desarrollo de un sistema de liberación en respuesta a la estimulación del ambiente local, tal como pH y enzimas.

Tabla 5. Materiales utilizados para la encapsulación de bacterias probióticas

Biopolímeros	Bacteria	Método	Aplicación
Carragenina	<i>Lactobacillus</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Carragenina	<i>St. thermophilus</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Carragenina / goma de tragacanto	<i>Lb. bulgaricus</i> <i>B. infantis</i> /	Cápsulas	Producción de biomasa
Carragenina / goma de tragacanto	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Alginato/glicerol	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Alginato	<i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Estabilidad en ácidos
Celulosa	<i>B. pseudolongum</i>	Cápsulas	Estabilidad en ácidos y bilis
Alginato/ laurilsulfato de sodio	<i>Lb. delbrueckii</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Carragenina /goma de tragacanto	<i>Lb. casei</i>	Emulsificación	Estabilidad en ácidos
Gelatina/tolueno-2-4-diisocianato	<i>Lb. lactis</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Alginato	<i>Lactobacillus</i>	Cápsulas	Estabilidad en ácidos
Alginato	<i>Lb. acidophilus</i>	Compresión directa	Estabilidad en ácidos
Alginato	<i>B. breve</i>	Emulsificación	Estabilidad en ácidos
Proteína de suero	<i>B. Longum</i>	Micronización	Estabilidad en ácidos
Alginato/quitosano	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Estabilidad en almacenamiento y ácidos
Alginato/pectina/ proteína de suero de leche	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Estabilidad en almacenamiento y ácidos
Almidón y almidón resistente a la digestión	<i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i>	Cápsulas	Estabilidad en almacenamiento y ácidos
Almidón de maíz ceroso	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas/ emulsificación	Estabilidad en almacenamiento y ácidos
Alginato/almidón	<i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Estabilidad en almacenamiento y ácidos

Fuente: Anal y Singh (2007).

La formulación de matrices recubrientes con polímeros sensibles al cambio de pH, insolubles en ambientes ácidos y solubles en medios con un pH igual o mayor a 6. Tales sistemas se supone preservan los bioactivos dentro de la matriz y los liberan cuando llegan al colon. El pH del tracto GI en cada individuo está sujeto a variaciones internas y externas tales como salud, situaciones físicas y emocionales, dieta, estrés (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003).

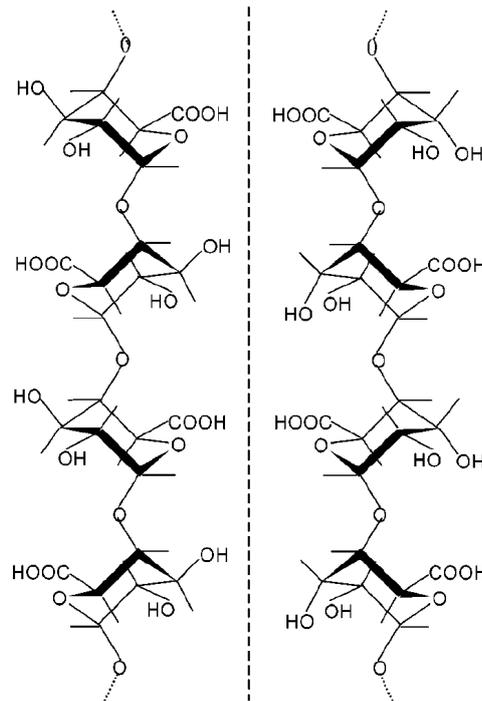
Alginato

El alginato es un biopolímero natural, extraído de algas y está compuesto de dos unidades monoméricas, ácido β -1-4 -D-manurónico (M) y ácido α -1-4 L gulurónico (G) (Figura 3). El alginato es ampliamente usado en la industria por su capacidad para retener agua, para gelificar, así como por sus propiedades viscoelásticas y estabilizantes (Draget, 2000).

Se ha usado como material de pared debido a que no es tóxico, tiene un precio bajo y es seguro al ser usado en los alimentos (Song Cho y Park, 2003). Recientemente los alginatos han sido utilizados como matriz encapsulante de bioactivos, tales como bacterias, con la finalidad de lograr su liberación controlada (Draget, Skjåk-Bræk, y Smidsrød, 1997).

De acuerdo con Braccini y Prez (2001), la gelación es resultado de las interacciones específicas y fuertes entre los iones calcio y los bloques de ácido galacturónico y ácido gulurónico para pectina y alginato respectivamente (Figura 4). La formación del gel es dependiente del origen, la composición y arreglo de bloques de ácido gulurónico (G) en el alginato, debido a los sitios de enlace preferentes para los iones divalentes de Ca^{+2} ; este arreglo determina las propiedades funcionales, tales como la fuerza del gel, la

reactividad al calcio, y la tolerancia al calcio (Hoefer, 2004, Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004).

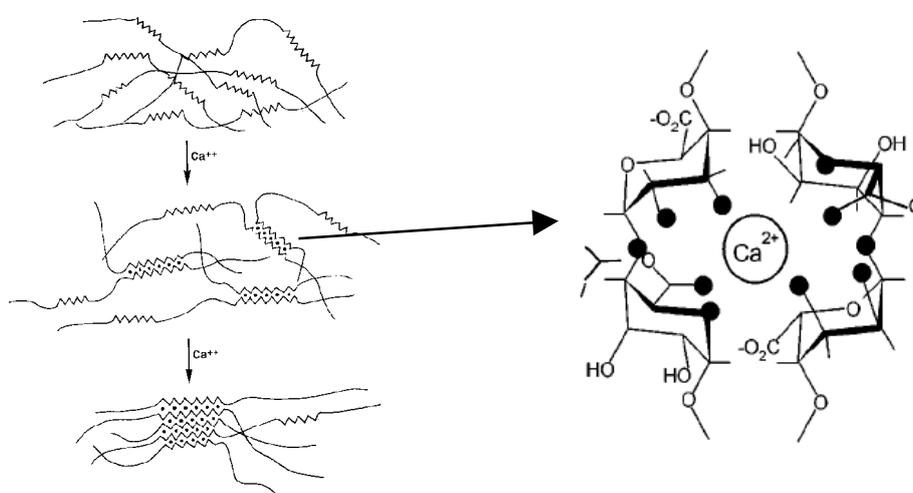


Fuente: Braccini y Prez (2001).

Figura 3. Estructura química de cadenas de (a) galacturonato y (b) guluronato

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ion calcio, formándose una estructura dimérica. El modelo de caja de huevo (“egg-box model”) (Figura 4) es usado para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas (Braccini y Prez, 2001).

Un alginato con alto porcentaje de bloques G produce un gel con mayor fuerza que la mostrada por un gel obtenido a partir de alginato con mayor porcentaje de bloques M, pero se requiere de un control más exacto en la cantidad de calcio añadida al sistema. En contraste, un alginato con alto porcentaje de bloques M es más tolerante a variaciones en la cantidad de calcio presente en el sistema y el gel tiene menos probabilidades de presentar sinéresis (Hoefler, 2004).



Fuente: Braccini y Prez (2001).

Figura 4. Formación de geles de alginato con sales cálcicas, modelo “egg-box” (caja de huevos).

La conformación del ácido gulurónico en el alginato otorga un alto grado de coordinación con el calcio, de este modo forma geles más rígidos que son menos propensos al desgaste y a la erosión. Si se incrementa el contenido de ácido manurónico, los geles son más suaves, más elásticos, pero menos porosos y estos se disuelven fácilmente (Tønnesen y Karlsen, 2002).

La composición química del alginato influye también sobre el tamaño de la cápsula; pequeñas cápsulas son obtenidas a partir de alginatos de bajo contenido de ácido

gulurónico (Martinsen, Skjak-Braek y Smidsrod, 1989). Pillay y Fassihi (1999b) encontraron que la liberación de un fármaco (diclofenaco de sodio) a partir de cápsulas de pectato de calcio, fue más rápida que aquellas observadas en cápsulas preparadas con alginato de calcio y mezcla de alginato-pectato de calcio, posiblemente porque la adición de pectato a alginato convirtió las matrices en más frágiles. A bajo pH, el ácido alginico es formado a partir de alginato y modifica la capa gelada comenzando la erosión de la cápsula.

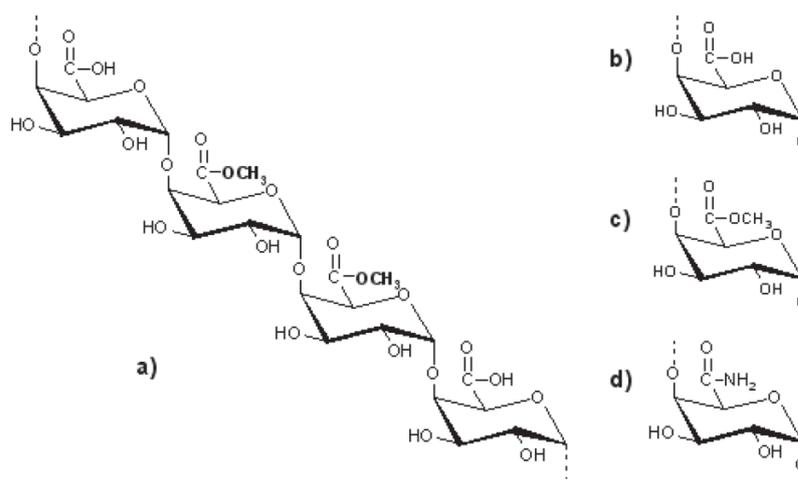
Pectina

La pectina es un polisacárido natural que en recientes años ha ganado importancia. Los beneficios de la pectina son cada vez más apreciados por los investigadores y los consumidores, por ser biodegradable. Debido a sus propiedades gelantes, la pectina es empleada ampliamente en la industria de alimentos. Además, la pectina se ha usado como acarreador de drogas a nivel gastrointestinal, en forma de tabletas, cápsulas geladas o películas (Sriamornsak, 2003). La pectina es comercialmente extraída a partir de la piel de los cítricos y de las pomáceas, bajo condiciones ácidas o alcalinas.

La pectina consiste principalmente en unidades de ácido galacturónico y ésteres de metilo que forman cadenas lineales. Estos ácidos urónicos tienen grupos carboxilo, algunos de los cuales se encuentran naturalmente presentes como metil éster y, otros son tratados con amonio para producir grupos carboxilamida (Figura 5). El grado de esterificación debajo del 50 %, produce una gama de pectinas de bajo metoxilo. La pectina, posee carga eléctrica negativa a pH neutro. (Sriamornsak, 2003).

El valor de pK aparente de la pectina (pH a 50 % de disociación) varía con el grado de esterificación; a 65 % de esterificación el pK es de 3.55, mientras que a 0 % de esterificación el pK aparente de la pectina es de 4.10. Además de los segmentos de ácido

galacturónico, la pectina contiene azúcares neutros, como ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa, al lado de la cadena principal. La distribución global de de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de la molécula de pectina determina su solubilidad (Sriamornsak, 2003).



Fuente: Sriamornsak (2003).

Figura 5. (a) Segmento repetido de la molécula de pectina y sus grupos funcionales: (b) carboxilo; (c) ester y (d) amida.

La propiedad más destacada de las pectinas es su habilidad para formar geles en la presencia de iones Ca^{+2} . La asociación de las cadenas de pectina (bloques de galacturonato) a través de iones Ca^{+2} , conduce a la formación de una red tridimensional de pectato de calcio. La estructura resultante tiene forma similar a la de “caja de huevo” (Figura 4); aunque de acuerdo con Braccini, y Prez (2001), y Sriamornsak, (2003), además de la formación de enlaces iónicos, las pectinas amidadas promueven asociaciones entre dímeros a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas) (Figura 6).

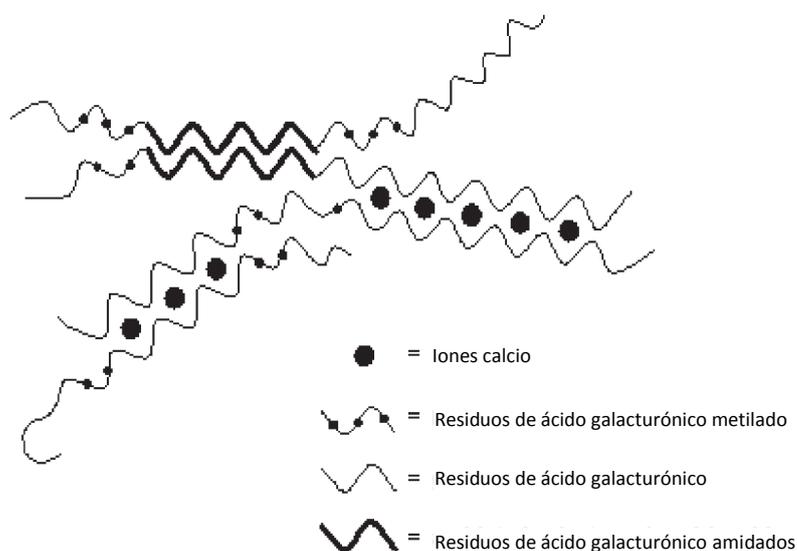


Figura 6. Modelo de la gelación de las pectinas de bajo metoxilo amidadas mostrando interacciones entre residuos de ácido galacturónico y, enlaces hidrógeno entre residuos de ácido galacturónico amidado (Sriamornsak, 2003).

Los factores decisivos para la formación de geles son la concentración de pectina, tipo de pectina, sólidos solubles, rango de pH y la concentración de sales amortiguadoras y de cationes divalentes en la formulación (Draget, 2000). Un balance adecuado entre la concentración de pectina y de calcio, conduce a la formación de geles con textura óptima. El exceso de calcio puede producir un gel menos elástico y quebradizo, con tendencia a la sinéresis o a la precipitación.

Las pectinas amidadas han sido desterificadas con amonio; parte de los grupos éster son reemplazados por grupos amida, modificándose así sus propiedades gelantes, en comparación con las presentadas por las pectinas ácidas. Las pectinas amidadas pueden formar geles en independencia relativa del contenido de sólidos solubles y rango de pH; además con pequeñas concentraciones de calcio, la pectina comienza a formar enlaces y

si la concentración incrementa, puede formarse un gel (Pérez, Mazeau, du Penhoat, 2000).

Debido a sus propiedades gelantes, de formación de películas, propiedades ligantes, bio-compatibilidad y no toxicidad, la pectina es un biopolímero útil para construir vehículos de liberación, en forma de geles, matrices tridimensionales, películas y micro o nano-partículas. Diferentes bioactivos pueden ser incorporados en los sistemas mencionados, con alta eficiencia de entrapamiento y mediante procedimientos simples. Las modificaciones químicas de las pectinas además mejoran su funcionalidad para algunas aplicaciones específicas. Los derivados de pectina poseyendo una densidad de carga alta (grupos amino primarios positivos o grupos carboxilo negativos), son capaces de penetrar a profundidad en tejidos, y así prolongar el tiempo residual para incorporar los activos y mejorar su penetración (Pérez, Mazaeu y du Penhoat, 2000).

Se ha sugerido a las pectinas como materiales para construir acarreadores para la liberación oral de bioactivos a nivel gastrointestinal, debido a que atraviesa intacta el tracto gastrointestinal superior y es degradada por la microflora del colon (Liu, Fishman y Hicks, 2007). La pectina puede competir con otros polisacáridos en sistemas de liberación controlada, como quitosano, alginato, dextrano, inulina y derivados de carboximetilcelulosa o (hidroxipropil)metilcelulosa.

Para sistemas encapsulantes involucrando iones calcio, la liberación de bioactivos es más rápida cuando la matriz está compuesta de pectinas con alto grado de amidación; por ejemplo, un tiempo de 6 h con 24 % de amidación y un tiempo de liberación de 8 h para pectinas con 13 % de amidación. La presencia de iones calcio decrece la liberación de bioactivos cuando las cápsulas están constituidas por pectinas de bajo metoxilo, en contraste, los iones calcio incrementan la liberación de bioactivos cuando las cápsulas están formadas por pectinas de alto metoxilo (Wakerly, Fell, Attwood y Parkins, 1997).

Las moléculas de pectato de calcio (pectina de bajo metoxilo + calcio), son menos hidrofílicas y más grandes que las pectinas de bajo metoxilo sin entrecruzar con calcio, consecuentemente, presentan una liberación de bioactivos más lenta. Otro factor que influye en la liberación de bioactivos es la hidratación de la matriz encapsulante. El pectato de calcio es más sensible a los fenómenos de erosión si la fuerza iónica del gel es baja. Mientras un gel resultante a partir de pectinas de bajo metoxilo entrecruzado con calcio no es erosionado, las pectinas de alto metoxilo, llegan a hidratarse en la presencia de iones calcio y la matriz encapsulante se erosiona, llevando a la liberación prematura de bioactivos (Wakerly, Fell, Attwood y Parkins, 1997).

2.4.4 Resistencia de biopolímeros a condiciones gastrointestinales

En ambientes ácidos, la pectina permanece como agregados macromoleculares; mientras que en soluciones neutras, los agregados de pectina tienen a disociarse y expandirse. La pectina además, es resistente a las proteasas y a las amilasas que se encuentran activas en el tracto gastrointestinal, pero es digerida por un gran número de bacterias que forman parte de la microflora del colon (Sinha y Kumria, 2001; Vandame, Lenourry, Charrueau y Chaumeil, 2002). Debido a las propiedades mencionadas, es muy posible que la pectina pueda cumplir la función de vehículo de bioactivos de origen proteico, de la boca al colon.

Un obstáculo a vencer para la aplicación de pectina en la liberación específica de bioactivos en el colon, es el hecho de que la pectina se hincha (aumenta su volumen) considerablemente en condiciones fisiológicas. Los bioactivos con alta solubilidad en condiciones fisiológicas, pueden exhibir liberación prematura debido a que los poros de la matriz recubriente se expanden. El uso de pectina en combinación con otros biopolímeros para formar estructuras más estables, es una estrategia que pudiera

resolver este problema (Semdé, Amighi, Devleeschouwer y Moës, 2000; Kwabena y Fell, 2001; Turkoglu y Ugurlu, 2002).

2.4.5. Encapsulación de organismos probióticos

Debe existir un millón de organismos probióticos por gramo de producto alimenticio, para que se liberen en cantidad suficiente en el colon y ejerzan los beneficios esperados en el ser humano. Sin embargo, la sobrevivencia de los organismos probióticos tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* es baja en presencia de ácidos y sales biliares (Lankaputhra y Shah, 1995), aunque es esencial que sobrevivan al tránsito en el intestino para que se multipliquen en el colon.

Durante la encapsulación de probióticos para su uso en alimentos, los organismos son cubiertos con un material de pared no tóxico, biopolimérico. Este material protege a los probióticos durante el procesamiento de los alimentos, ante factores como temperaturas extremas, excesiva exposición a luz, bajo pH y exposición al oxígeno, los cuales pueden afectar la viabilidad de los microorganismos. Los geles de alginato de sodio mejoran la viabilidad de los organismos probióticos debido a que permiten la difusión de nutrientes, mientras protegen a las células de factores de estrés (Talwalkar y Kailasapathy, 2003).

La microencapsulación ha mostrado que reduce la muerte de las células causada por la toxicidad al oxígeno (Talwalkar y Kailasapathy, 2003; Talwalkar y Kailasapathy, 2004). Los probióticos se encuentran aglomerados en el centro de las cápsulas creando regiones anaerobias (Beunink, Baumgärtl, Zimelka y Rehm, 1989). Ravula y Shah (2001) encontraron que la sobrevivencia de *Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium* encapsulados en cápsulas alginato de calcio y adicionados en helado de yoghurt, mejoró 3 ciclos log, en

comparación a la mostrada por células libres, además *Lb. acidophilus* mostró mayor tolerancia a pH 2.5.

Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000) investigaron la actividad de *Lb. acidophilus* y *B. infantis* encapsuladas en alginato y evaluaron su sobrevivencia en condiciones gastrointestinales simuladas, sales biliares y pH ácido (2.0, 3.0 y 4.0) a 37 °C por 3 h, sin mostrar incremento en la sobrevivencia debido a la encapsulación; sin embargo, durante el almacenamiento de yogur (8 semanas a 4 °C), las bacterias encapsuladas mostraron mayor sobrevivencia que las células libres.

Existen muchos otros agentes o materiales de pared útiles para encapsular bacterias entre los que se incluyen a las gomas gelana-xantana (Sun y Griffiths, 2000). Cuando los agentes son combinados con cloruro de calcio, una matriz gelada se forma, creando una cubierta apta para proteger a los probióticos (Shah y Ravula, 2000). Los métodos de extrusión y de emulsión son los dos más utilizados para la encapsulación de probióticos; a pesar de que muestran una sobrevivencia 80-95 %, tienen sus limitaciones.

En el caso del método de emulsión, a pesar que produce cápsulas en promedio más pequeñas que las obtenidas por el método de extrusión, el rango en tamaño es amplio y la morfología poco esférica (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004), además por el método de emulsión, en las cápsulas permanece un residuo oleoso que puede ser inconveniente para la aplicación a alimentos bajos en grasa (Kailasapathy, 2002). Estos métodos han sido mejorados mediante la aplicación de capas extra de diferentes materiales, un ejemplo es el Krasaekoopt, Bhandari y Deeth (2004) y Krasaekoopt, Bhandari y Deeth (2006) quienes encontraron una mejora en la sobrevivencia de *Lb. acidophilus* y *Lb. casei* en condiciones ácidas y biliares al utilizar una cubierta extra de quitosano sobre la cápsula de alginato.

Lb. acidophilus entrampado en cápsulas elaboradas a partir de mezclas de soya y goma arábiga, proteína de suero de leche y goma arábiga y proteína de soya con goma

arábiga, mostró resistencia a pH de 1, concentración de bilis de 1-4% y condiciones de almacenamiento de 5°C durante 15 semanas (Mosilhey, 2003). Koo, Cho, Hun, Baek y Park (2001), observaron que *Lb. casei* en cápsulas de alginato, alginato/quitosano almacenadas a 4° C; mostraron similar estabilidad que las células no encapsuladas, no así a 22 °C, donde las cápsulas de doble capa fueron las más estables.

Song, Cho y Park (2003), encapsularon *Lb. casei* utilizando un sistema de emulsión con alginato al 1% p/v, e informaron que las células encapsuladas mantuvieron su viabilidad durante 4 semanas a 4° C, mientras que la viabilidad de las células no encapsuladas decreció 3 ciclos logarítmicos después de 6 semanas de almacenamiento.

Con las bacterias probióticas encapsuladas, pueden diseñarse aplicaciones de liberación controlada como una alternativa para resolver los problemas que enfrentan la industria de alimentos. Los desafíos son la selección apropiada del método de encapsulación y el material encapsulante; lograr entrapar una alta carga celular; mantener la viabilidad de las células, y para aplicaciones en alimentos controlar el tamaño de la cápsula para no afectar negativamente las propiedades sensoriales.

3.- JUSTIFICACION

Estudios realizados en décadas pasadas, revelaron que la ingestión de microorganismos probióticos, confiere un amplio rango de beneficios terapéuticos a los seres humanos. El estilo de vida y alimentación actuales, hace necesario suplementar la dieta humana con dosis adecuadas de microorganismos probióticos para restablecer el balance de la microflora intestinal y ayudar a mantener una buena salud digestiva.

Los alimentos más utilizados como vehículos de probióticos, en una dosis recomendada de $10^6 - 10^7$ ufc g^{-1} , han sido el yogurt y las leches; sin embargo, los probióticos son afectados por las condiciones de procesamiento del alimento, y después de ser ingeridos, también por los cambios de pH originados por el jugo gástrico, así como por la acción de las sales biliares en el tracto digestivo

Considerando la importancia de mantener cuentas altas de probióticos viables, es esencial aplicar métodos para conservar su viabilidad y funcionalidad, tanto en el alimento que los contenga, como a través de su paso por el tracto gastrointestinal (GI). Una alternativa para lograr lo mencionado, la constituye el entrampamiento de los probióticos en cápsulas preparadas a partir de biopolímeros.

La protección física conferida por las cápsulas a los probióticos durante su exposición a factores adversos, depende de las propiedades químicas y físicas de las primeras; no obstante poco se ha estudiado acerca del efecto de la composición química sobre las propiedades físicas de las cápsulas (morfología, tamaño, textura), así como de la posible relación entre estas propiedades físicas y la sobrevivencia de los probióticos a diferentes condiciones adversas.

4.- OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Los objetivos generales de este trabajo fueron: a) Entrampar *Lb. casei* en cápsulas elaboradas con alginato de sodio (A), pectina de bajo metoxilo amidada (P), y mezclas de A-P en relaciones 1:2, 1:4, 1:6, por el método de extrusión, y b) Determinar las posibles interrelaciones entre la composición y las propiedades morfológicas y mecánicas (diámetro, esfericidad y propiedades texturales) de las cápsulas; así como las posibles interrelaciones entre las propiedades morfológicas y físicas de las cápsulas con la sobrevivencia de *Lb. casei* entrampado durante el almacenamiento de yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas.

4.2. Objetivos Específicos

1. Establecer los parámetros experimentales óptimos de naturaleza de material, relación de material de pared/material a encapsular para la elaboración de cápsulas.
2. Entrampar *Lb. casei* en cápsulas utilizando mezclas de biopolímeros alginato (A) y pectina (P) por el método de extrusión y evaluar el rendimiento y la capacidad de inclusión
3. Estudiar la morfología y tamaño de las cápsulas a través de Microscopia de luz y Microscopía Electrónica de Barrido.
4. Determinar las propiedades mecánicas (dureza, cohesividad, elasticidad, resiliencia, masticabilidad) de las cápsulas al modificar la relación A-P.
5. Evaluar la sobrevivencia de *Lb. casei* entrampado, en yogur, durante el almacenamiento (20 días a 4 °C).
6. Evaluar la sobrevivencia de *Lb. casei* entrampado, en condiciones gastrointestinales simuladas.
7. Determinar la posible relación entre diámetro, esfericidad y propiedades texturales de las cápsulas con su composición química y con la sobrevivencia de *Lb. casei* en el almacenamiento de yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas.

5.- HIPÓTESIS

Variaciones en la composición biopolimérica (alginato, pectina) rendirán cápsulas con propiedades físicas distintas; estas últimas a su vez, afectarán el grado de protección que las cápsulas conferirán al probiótico *Lb. casei*, al ser incorporado en yogur y al ser expuesto a condiciones gastrointestinales simuladas.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Ubicación del trabajo

La encapsulación de *Lb. casei* 81LYO, la evaluación de su sobrevivencia durante el almacenamiento de yogur durante 20 d, y a condiciones gástricas simuladas, se realizaron en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. La elaboración del yogur se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Tecnología de Alimentos del Departamento de Preparatoria Agrícola y el análisis de textura de las cápsulas se llevó a cabo en el Laboratorio de Reología de Alimentos del Departamento de Ingeniería Agroindustrial, ambos laboratorios pertenecientes a la Universidad Autónoma de Chapingo. El estudio de microestructura de las cápsulas por Microscopía Electrónica de Barrido 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 utilizados

Cultivo liofilizado de *Lb. casei* 81 LYO y cultivos lácticos de inoculación directa *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MY800) (Danisco, Dange Saint Romain, Francia), medio de cultivo agar MRS para lactobacilos (Merck. 10660) y caldo MRS para lactobacilos (Merck. 10661) (Merck, Darmstadt, Alemania), peptona de caseína (DIBICO S. A. de C. V., México), alginato de sodio (A) de bajo peso molecular FD 175, 60.5 % ácido gulurónico (G) y pectina de bajo metoxilo (P) LM-106 AS-YA, 28 % esterificación y 20 % amidación (CP Kelco, Lille Skensved, Dinamarca); extracto de bilis de porcino (B8631, Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri); ácido ascórbico, cloruro de calcio, cloruro de sodio, etanol absoluto y ácido

clorhídrico, todos grado analítico (Laitz, S. A. de C. V., México). Leche entera y leche descremada en polvo NIDO® (Nestlé, S. A. de C.V., México), glutaraldehído al 2.5 % (v/v); buffer de cacodilatos (0.1 M, pH 7.2-7.3). (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA.).

6.3. Cultivo de *Lb. casei* y preparación del concentrado celular

6.3.1. Crecimiento de *Lb. casei*

La determinación de la curva de crecimiento de *Lb. casei* se realizó por triplicado, utilizando como medio de cultivo caldo MRS estéril (121 °C, 15 min), no adicionado y adicionado con ácido ascórbico (0.1 g L⁻¹) para proveer un ambiente anaerobio (Song, Cho, y Park, 2003). El cultivo liofilizado de *Lb. casei* (0.025 g) se inoculó en 50 mL de medio de cultivo y se colocó en incubación a 37 °C. Se tomaron lecturas en unidades Klett cada 2 h mediante un fotolorímetro (Klett-Summerson, Klett MFG. Co. NY, EUA.). Las unidades Klett posteriormente se convirtieron a unidades de densidad óptica (D. O.= 1 unidad Klett*0.002). Al mismo tiempo el número de células de *Lb. casei* presente en los cultivos se determinó por triplicado por recuento en placa usando agar MRS adicionado con ácido ascórbico (0.5 g L⁻¹). Lo anterior con el fin de relacionar las unidades de D.O. con el número de células de *Lb. casei*. A partir de estos datos, se construyó la curva de crecimiento de *Lb. casei* y con ello se determinaron las fases de crecimiento, y tiempo de cosecha con la finalidad de encapsular células en etapa final de crecimiento logarítmico (Sheu y Marshall, 1993).

6.3.2. Obtención de células de *Lb. casei* a encapsular

Las células de *Lb. casei* a encapsular fueron obtenidas por medio de su cultivo en caldo MRS estéril durante 22 h de incubación a 37°C; este tiempo de incubación permitió que el microorganismo se encontrara en fase logarítmica tardía de crecimiento. El cultivo fue cosechado y centrifugado (1000×g, 20 min) (centrífuga Damon/Iec División IEC PR-], Internacional Equipment Co., EUA) (Shin, Lee, Pestka y Ustunol, 2000); se lavó por duplicado con solución de NaCl (0.9 % p/v) estéril y resuspendió en agua peptonada (0.1 g 100 ml⁻¹) estéril, para obtener un concentrado celular (CC).

La cuenta celular de *Lb. casei* presente en el CC ($9.72 \pm 0.1 \log \text{ UFC ml}^{-1}$) se determinó por triplicado mediante recuento en placa usando agar MRS adicionado con ácido ascórbico (0.5 g L⁻¹). Todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante 72 h, tras lo cual se realizó el conteo de las colonias formadas y registraron como unidades formadoras de colonia (UFC) ml⁻¹ (Hughes y Hoover, 1995; Ravula y Shah, 2001; Corcoran, Stanton, Fitzgerald y Ross, 2005).

6.4. Preparación de dispersiones de biopolímeros

Se llevó a cabo un estudio preliminar para determinar las concentraciones mínimas de A y P en dispersión acuosa, tales que resultaran en cápsulas mecánicamente estables, obteniéndose las siguientes cifras: 0.5 g 100 g⁻¹ para A y 2 g 100 g⁻¹ para P. A partir de esas cifras se prepararon cinco dispersiones de A y/o P (Tabla 6), utilizando agua destilada estéril (121 °C, 15 min) a 25 °C y agitación moderada (600 rpm) mediante un equipo caframo (modelo RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA). Las dispersiones fueron hidratadas 24 h, bajo temperatura de refrigeración (4 °C) para evitar crecimiento microbiano.

6.5. Encapsulación de *Lb casei*

6.5.1. Elaboración de cápsulas por el método de extrusión

Para la elaboración de las variaciones de las cápsulas, se mezcló concentrado celular de *Lb. casei* (CC) con cada una de las dispersiones de biopolímeros (Tabla 6), en una relación volumétrica de 1:9, obteniendo así suspensiones celulares (SC). El número de células de *Lb. casei* contenido en todas las SC fue $8.83 \pm 0.15 \log \text{ ufc ml}^{-1}$, determinado mediante incubación a 37°C por 48 h, placas de agar MRS. Las cápsulas se formaron por el método de extrusión (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2003; Muthukumarasamy, Allan y Holley, 2006), para lo cual se adicionó por goteo una parte de la SC respectiva a diez partes de disolución de CaCl_2 ($\text{pH } 5.61 \pm 0.02$) estéril, usando una jeringa con una capacidad de 5 ml y una aguja 30G $\frac{1}{2}$, 8 mm de longitud

Tabla 6. Concentraciones de alginato y pectina presentes en las dispersiones acuosas usadas para la preparación de las cápsulas conteniendo *Lb. casei*

Código de la dispersión/cápsula ^a	Alginato de sodio (A) g 100 g ⁻¹	Pectina de bajo metoxilo (P) g 100 g ⁻¹
A ₀ P ₂	0.0	2.0
A _{0.5} P ₀	0.5	0.0
A _{0.5} P ₁	0.5	1.0
A _{0.5} P ₂	0.5	2.0
A _{0.5} P ₃	0.5	3.0

^a A_x P_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros.

Las cápsulas obtenidas se dejaron reposar en la disolución de CaCl_2 , durante 12 h (5 ± 1 °C), para su completa solidificación. Las cápsulas se cosecharon por filtración a través de una malla de acero inoxidable de 0.19 mm (Fiicsa, S. A. de C. V., México), se enjuagaron y posteriormente fueron mantenidas en solución peptonada estéril ($0.1 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$) a 4 °C (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004) hasta su caracterización. Las variaciones de cápsulas fueron preparadas por triplicado aplicando un diseño experimental completamente al azar y fueron identificadas con los mismos códigos de las dispersiones de biopolímeros mostrados en la tabla 6.

6.5.2. Caracterización de cápsulas conteniendo *Lb. casei*

Rendimiento. El rendimiento de cápsulas conteniendo *Lb. casei* se registró como la cantidad de cápsulas (g) obtenidas a partir de 100 g de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros.

Tamaño. El diámetro medio de veinte cápsulas de cada variación se determinó después de 1 d de su elaboración, utilizando el analizador de imágenes Imagen-Pro Plus versión 6.0 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, EUA), a partir de las micrografías obtenidas con la cámara digital a 4× (Rasband, 2007).

Morfología. La morfología de las cápsulas fue observada en un microscopio de contraste de fases Olympus BX45 (Olympus Optical Co. LTD, Japón). Micrografías a una magnificación de 4× fueron tomadas a veinte cápsulas seleccionadas de forma aleatoria, con una cámara digital Camedia C-3030 (Olympus Optical Co. LTD, Japón). Las

micrografías fueron analizadas mediante el software de análisis de imágenes ImageJ versión 1.4, para determinar la esfericidad de las cápsulas (Rasband, 2007).

Propiedades texturales. Las diferentes variaciones de cápsulas se sometieron a Análisis de Perfil de Textura Instrumental (Beaulieu, Savoie, Paquin y Subirade, 2002; Pillay y Danckwerts, 2002; Bourne, 2002) utilizando un texturómetro Stable Micro Systems modelo TA-XT2i (Texture Technologies Corp., White Plains, NY, EUA), equipado con una celda de carga de 5 kg. Para garantizar una reproducibilidad buena de la prueba, debido a la naturaleza particulada de las cápsulas, se utilizó una sonda cilíndrica de aluminio con área de contacto relativamente grande (35 mm de diámetro). Cada medición se llevó a cabo a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) sobre 30 g de cada variación de cápsulas; estas últimas colocadas sobre una placa de vidrio debajo de la sonda. La detección automática del contacto de la sonda con las cápsulas, se realizó con una fuerza de contacto de 0.005 N (Artignan, Corrieu y Lacroix, 1997).

En todos los casos, las muestras de las cápsulas se comprimieron 30 % utilizando dos ciclos de compresión a velocidad del cabezal de 0.5 mm s^{-1} . Las propiedades texturales primarias de dureza, cohesividad, elasticidad y resiliencia (relación entre las áreas bajo la curva de compresión y descompresión) (Choonara, Pillay, Singh, Khan y Ndesendo, 2008) fueron obtenidas utilizando el software del equipo Texture Expert para Windows versión 3.2. La determinación de las propiedades texturales de cada variación de cápsulas se realizó por triplicado.

Microestructura. Las cápsulas fueron fijadas en una disolución de glutaraldehído al 2 % v/v en buffer de cacodilatos (0.1 M, pH 7.2) durante 6 h; se deshidrataron en disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (50, 60, 70, 80, 90 y 100 %), permaneciendo 30 min en cada una. Posteriormente, las muestras se secaron a punto crítico en un CPA II Technics Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, EUA). Cada cápsula se fracturó con el objetivo de exponer la estructura interior; luego se montaron en soportes de aluminio y finalmente se cubrieron con una capa fina de oro en un Fine

Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). Las cápsulas fracturadas se observaron en un microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (JEOL Scanning Electron Microscope JMS-035, Jeol Ltd., Akishima, Japón), operado a 20 kV, a una amplificación de $1\ 000 \times$ para examinar la morfología superficial e interna de la capsula y a $10\ 000 \times$ para examinar la ubicación de las bacterias en la cápsula.

6.5.3. Recuento de *Lb. casei* encapsulado

Para el recuento de células viables, fue necesario solubilizar las cápsulas y así liberar las células de *Lb. casei* encapsulado. Una suspensión de 1 g de cápsulas en 9 ml de buffer de fosfatos (0.1M, pH 7.2) (Sheu y Marshall, 1993), se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 min. A partir de esta suspensión se realizaron las diluciones decimales necesarias para hacer el recuento de *Lb. casei*. El número de células viables en la suspensión fue determinado por recuento en placa utilizando agar MRS con incubación a 37 °C por 48 h.

6.5.4. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de entrapamiento se expresa como el porcentaje de células viables atrapadas por la técnica de extrusión. Este parámetro fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de entrapamiento} = A/B \times 100$$

Donde $A = \text{ufc de } Lb. casei \text{ g}^{-1} \text{ de cápsulas} \times \text{g de cápsulas } 100 \text{ g}^{-1} \text{ de SC}$ y $B = \text{ufc de } Lb. casei \text{ } 100 \text{ g}^{-1} \text{ de SC antes del encapsulamiento}$ (Reid, Vuilleumard, Britten, Arcand, Farnworth y Champagne, 2005).

6.6. Supervivencia de *Lb casei* encapsulado en yogur

6.6.1. Elaboración de yogur bajo en grasa

Se preparó yogur de acuerdo al método descrito por Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, Aguirre-Mandujano y Vernon-Carter (2004), a partir de lotes de 1 L de leche rehidratada conteniendo 15 g de grasa L⁻¹ y 120 g de sólidos totales L⁻¹, en cuya formulación se usaron cantidades adecuadas de leches en polvo entera y descremada. La leche se adicionó con 60 g de azúcar L⁻¹; pasteurizó (85 °C, 20 min); enfrió (45 °C); inoculó con un cultivo láctico liofilizado MY800 (0.03 g L⁻¹, conteniendo *Lb delbrueckii* ss. *bulgaricus* y *St. ss. thermophilus* e incubó a 45 °C hasta alcanzar una acidez de 90 °D. El yogur formado se refrigeró a 4 °C durante 24 h, después de lo cual se sometió a agitación moderada, utilizando un equipo CAFRAMO (modelo RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), para romper la estructura de gel y lograr un cuerpo fluido.

6.6.2. Enumeración de *Lb. casei* encapsulado en yogur

Cien gramos de yogur se colocaron por cuatruplicado en botellas de vidrio estériles e incorporaron con 10 g de la variación de cápsulas respectiva, mediante agitación suave. Las muestras se almacenaron a 4 ± 0.5 °C y la viabilidad de *Lb. casei* se determinó durante 20 días, a intervalos de 5 días. Las cápsulas se removieron del yogur por filtración y se lavaron con solución salina estéril. Las células de *Lb. casei* se liberaron de las cápsulas como ya se mencionó y se enumeraron por recuento en placa utilizando agar MRS con incubación a 37°C durante 48 h.

6.6.3. Tasa de sobrevivencia

A partir de los datos del número de células de *Lb. casei* viables (UFC g⁻¹ de cápsulas), se calculó la tasa de sobrevivencia, dividiendo la población viable final entre la población viable inicial. Los datos de tasa de sobrevivencia de las réplicas independientes se consideraron como de una sola réplica y se ajustaron a una cinética de decaimiento de primer orden de la forma:

$$\frac{dC(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_D} (C_{as} - C(t))$$

donde τ_D es la media del tiempo constante de decaimiento, C_{as} es el valor que la tasa de sobrevivencia alcanza asintóticamente (esto es, el valor en el cual la tasa de sobrevivencia se estabiliza). Entre más grandes sean los valores de τ_D and C_{as} , la matriz de entrapamiento es más estable. Estos parámetros fueron estimados por medio de un procedimiento de mínimos cuadrados, con la versión integral de la cinética de decaimiento, denominada: $C(t) = A_1 \exp(-t/\tau_D) + C_{as}$. Aquí A_1 es una constante de integración.

6.7. Sobrevivencia de *Lb casei* encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas

6.7.1. Sobrevivencia de *Lb casei* encapsulado a jugo gástrico simulado

Para determinar la sobrevivencia de *Lb. casei* a jugo gástrico simulado, se colocó 1 g de cada variación de cápsulas, preparadas recientemente, por triplicado, en tubos

conteniendo 9 ml de solución gástrica simulada estéril (pH de 3.0) con ácido clorhídrico 0.1 N. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 h en un baño de agua con agitación (Precision 360 Scientific Orbital, West Cortland St., Chicago, IL, EUA) (Hughes. y Hoover, 1995). Después de este periodo, las cápsulas se filtraron y enjuagaron con solución salina estéril e inmediatamente se determinó el número de células viables de *Lb. casei* por el procedimiento descrito en el punto 6.5.3 (Sheu y Marshall, 1993).

6.7.2. Supervivencia de *Lb casei* encapsulado a jugo gástrico y sales biliares

Para determinar la supervivencia de *Lb. casei* a jugo gástrico simulado y sales biliares, de manera secuencial, se colocó 1 g de cada variación de cápsulas, preparadas recientemente, por triplicado, en tubos conteniendo 9 ml de solución gástrica simulada estéril (pH de 3.0) con ácido clorhídrico 0.1 N. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 h en un baño de agua con agitación (Precision 360 Scientific Orbital, West Cortland St., Chicago, IL., EUA) (Hughes. y Hoover, 1995).

Posteriormente, las cápsulas se filtraron, enjuagaron con solución salina y colocaron en tubos conteniendo 9 ml de extracto de bilis de porcino (B8631, Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) al 1 % p/v (la concentración máxima de sales biliares en el intestino humano es de 2 %), y pH 6.4. Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h con agitación suave (Carteris, Kelly, Morelli y Collins, 1998; Sun y Griffiths, 2000; Madureira, Pereira, Truszkowska, Gomes, Pintado y Malcata, 2005). Al finalizar el periodo de incubación, se determinó el número de células viables de *Lb. casei* por el procedimiento descrito en el punto 6.5.3. (Sheu y Marshall, 1993). Células sin encapsular en la misma concentración, se sometieron a las mismas condiciones gastrointestinales simuladas que las variaciones de capsulas y sirvieron como control (Mosilhey, 2003).

6.8. Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple y cuando fue pertinente a comparación de medias de Tukey. La significancia establecida fue $p \leq 0.05$. Un Análisis de Componentes Principales A (ACP) se llevó a cabo sobre las propiedades de las cápsulas (diámetro, esfericidad y propiedades texturales) y los valores de sobrevivencia de *Lb. casei* e yogur y a condiciones gastrointestinales simuladas. El análisis de datos se realizó mediante el software Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Curva de crecimiento de *Lb. casei*

La curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* (Figura 7) determinada usando caldo MRS sin la adición de ácido ascórbico, mostró que el final de la fase logarítmica de crecimiento ocurrió a las 27.5 h de incubación, seguida comenzó la fase estacionaria. Cuando la determinación de la curva de crecimiento para *Lb. casei* se realizó usando caldo MRS adicionado con ácido ascórbico (0.05 % p/v), el tiempo requerido para alcanzar la finalización de la fase logarítmica se redujo de 27.5 a 24 h (Figura 7). *Lb. casei* es un microorganismo microaerotolerante, que sólo tolera pequeñas concentraciones de O₂, por lo tanto la adición de ácido ascórbico al medio de cultivo, favorece y acelera su crecimiento. Talwalkar y Kailasapathy (2004), mencionaron que el ácido ascórbico mantiene un potencial redox bajo, necesario para la viabilidad de las bacterias probióticas.

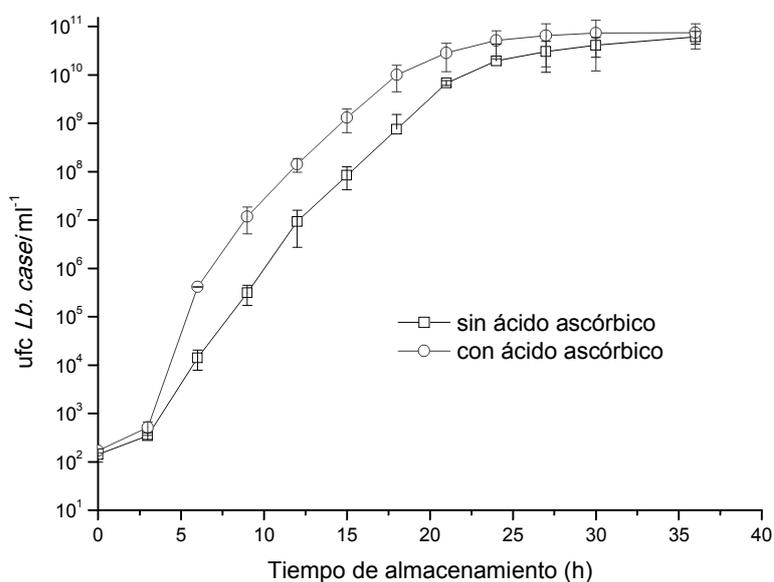


Figura 7. Curva de crecimiento de *Lb. casei* en caldo MRS no adicionado de ácido ascórbico (—□—) y en caldo MRS adicionado con ácido ascórbico (—○—), a 37°C.

El potencial redox del medio de cultivo se mantiene bajo debido a que el ácido ascórbico disminuye el potencial redox del medio de cultivo al secuestrar el oxígeno disuelto en éste. Dave y Shah (1997), informaron que la adición de ácido ascórbico en una concentración de 0.025 % p/v incrementó la sobrevivencia y la viabilidad de *Lb. acidophilus*. En este estudio se decidió cosechar a *Lb. casei* 81 LYO a las 20 h de incubación, momento en el que el microorganismo llegó a la fase logarítmica tardía de crecimiento; en este lapso de incubación se obtuvo una elevada concentración de células, útiles para realizar la microencapsulación.

En diversas investigaciones, se han encapsulado microorganismos cuando éstos han alcanzado las fases logarítmica o estacionaria. Adhikari, Mustapha y Grün (2003), cosecharon *Bifidobacterium longum* B6 en la parte final de la fase logarítmica de crecimiento (24 h de incubación), momento en el cual obtuvieron una población numerosa, así como buenos resultados en la encapsulación. Sheu, Marshall y Heymann (1993), cosecharon *Lb. bulgaricus* L2, al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, después de 15 a 16 h de incubación, a una temperatura de 37 °C. Por su parte, Reid, Champagne, Gardner, Fustier y Vuilleumard (2007), cosecharon *Lb. rhamnosus* R011, cuando este microorganismo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

7.2. Morfología, diámetro y rendimiento de las cápsulas

7.2.1 Morfología

Los valores de esfericidad de las cápsulas variaron entre 0.90 y 0.95 (Tabla 7). Las cápsulas A₀P₂, mostraron significativamente menor esfericidad que las cápsulas A_{0.5}P₀, A_{0.5}P₁, y A_{0.5}P₂, pero una esfericidad comparable a la de las cápsulas de A_{0.5}P₃, a pesar que estas últimas exhibieron un pequeño apéndice vermiforme (Figura 8). Estos resultados indican que el alginato contribuyó en mayor extensión a la esfericidad de las cápsulas que la pectina. Pillay y Fassihi (1999b), informaron que comprimidos (“pellets”) de

alginate de calcio tuvieron forma esencialmente esférica; en contraste, aquellos formados con pectato de calcio y alginate-pectato de calcio tuvieron una geometría parecida a disco, atribuyendo este fenómeno a las diferencias que ocurren en el entrecruzamiento de los biopolímeros durante la formación de los comprimidos.

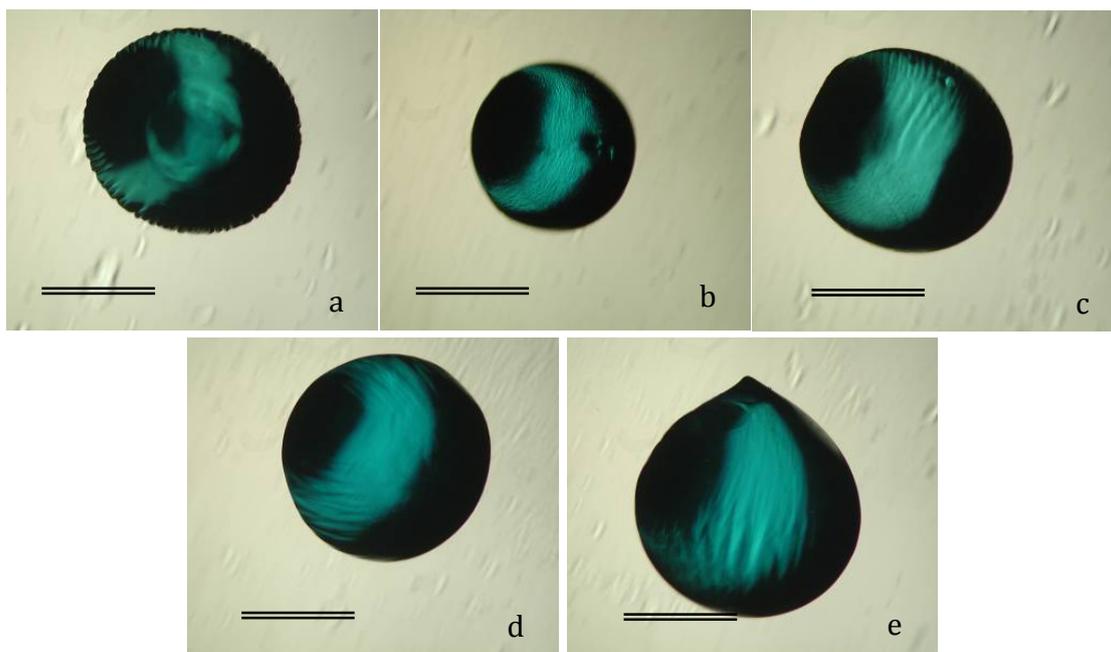


Figura 8. Micrografías representativas de las variaciones de cápsulas, obtenidas en un microscopio de contraste de fases: (a) A_0P_2 ; (b) $A_{0.5}P_0$; (c) $A_{0.5}P_1$; (d) $A_{0.5}P_2$ y (e) $A_{0.5}P_3$. A_xP_y : códigos de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. La barra de escala equivale a 0.5 mm.

Díaz-Rojas, Pacheco-Aguilar, Lizardi, Argüelles-Monal, Valdez, Ribaud y Goucoolea (2004), establecieron que cápsulas de alginate-pectato de calcio pierden esfericidad conforme incrementa la proporción de pectina de linaza en la formulación, como

consecuencia de la estabilidad mecánica débil de la red de pectato de calcio comparada con las obtenidas en las redes de alginato de calcio.

Tabla 7. Valores medios (\pm DE) de las características físicas, rendimiento y eficiencia de encapsulamiento de las cápsulas.

Código de cápsula ^a	Diámetro (mm)	Esfericidad (0-1)	Rendimiento (g de cápsulas·100 g ⁻¹ de SC)	Eficiencia de encapsulamiento (%)
A ₀ P ₂	0.93 \pm 0.06 ^{bc}	0.90 \pm 0.05 ^a	69.5 \pm 2.5 ^b	68.8 \pm 2.5 ^b
A _{0.5} P ₀	0.71 \pm 0.07 ^a	0.94 \pm 0.03 ^b	52.9 \pm 3.6 ^a	54.3 \pm 3.7 ^a
A _{0.5} P ₁	0.88 \pm 0.04 ^b	0.94 \pm 0.03 ^b	64.4 \pm 0.5 ^b	64.1 \pm 0.5 ^b
A _{0.5} P ₂	0.89 \pm 0.08 ^b	0.95 \pm 0.02 ^b	77.3 \pm 2.4 ^c	77.9 \pm 2.4 ^c
A _{0.5} P ₃	0.97 \pm 0.07 ^c	0.93 \pm 0.03 ^{ab}	80.8 \pm 1.1 ^c	79.2 \pm 1.1 ^d

^a A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. ^{a, b, c, d}. Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

7.2.2 Diámetro

El diámetro, de igual manera que la esfericidad, fue afectado por la composición en biopolímeros de las cápsulas. Los valores del diámetro de las cápsulas variaron de 0.71 a 0.97 mm (Tabla 7). Las cápsulas de A_{0.5}P₀ mostraron significativamente menor diámetro

que aquellas formuladas con pectina sola o en combinación con alginato (Tabla 7). Al parecer, todas las variaciones de cápsulas fueron lo suficientemente grandes para lograr encapsular una buena carga celular (Tabla 7) para su protección en contra de factores ambientales detrimentales, pero probablemente no fueron lo suficientemente pequeñas para que su presencia en la boca no fuera detectada.

Anal y Singh (2007) mencionaron que un reto importante a vencer para la encapsulación de probióticos, lo constituye el gran tamaño de las células microbianas (típicamente 1-4 μm). Esta característica limita la carga celular en cápsulas pequeñas o cuando se producen cápsulas grandes, las propiedades texturales y sensoriales de los productos a los que son adicionadas pueden verse afectadas negativamente. Muthukumarasamy, Allan y Holley (2006), encontraron que cápsulas grandes (2-4 mm) elaboradas por la técnica de extrusión, fueron capaces de proteger mejor a *Lactobacillus reuteri*, que aquellas cápsulas más pequeñas (20-1000 μm) obtenidas por la técnica de emulsificación. Chandramouli, Kailasapathy, Peiris y Jones (2004), evaluaron la sobrevivencia de *Lactobacillus* encapsulado en alginato sometido a condiciones gástricas simuladas, y encontraron que la viabilidad incrementó conforme aumentó el tamaño de la cápsula de 200 a 1000 μm .

7.2.3 Rendimiento

El rendimiento de las cápsulas (g cápsulas por 100 g⁻¹ de SC), varió de 50.9 a 80.0, dependiendo de la concentración total de biopolímeros en SC (Tabla 7). A la más alta concentración de biopolímeros correspondió el mayor peso de cápsulas obtenidas.

7.2.4 Microestructura de las cápsulas

La baja firmeza de las cápsulas al deshidratarse a punto crítico, originó matrices muy porosas, débiles y frágiles para manipular en Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), por lo que se observaron algunas cápsulas colapsadas (Figura 9 y 10), algunas más fracturadas asimétricamente y algunos fragmentos a través de los cuales fue posible observar la estructura interna de las matrices poliméricas. Adicionalmente algunas de las cápsulas que se mantuvieron íntegras fueron fracturadas manualmente para poder observar su estructura interna (Figuras 9, 11 a 15). Mediante la técnica MEB fue posible apreciar las modificaciones causadas en el arreglo estructural de las cápsulas, al variar la composición biopolimérica de su pared.

En general, las diferentes variaciones de cápsulas presentaron una matriz de polisacáridos porosa (Figuras 11 a 15), debido a la hidratación de la matriz durante la gelación de los biopolímeros. La pared de todas las variaciones de cápsulas mostró una estructura más densa que el resto de la cápsula, con poros muy pequeños y ausencia de bacterias en su exterior, tal y como puede observarse en las cápsulas A_{0.5}P₁ (Figura 10). La estructura interna de las cápsulas en general, fue abierta y porosa y contuvo una elevada carga celular (Figuras 9 a 15); observaciones similares fueron informadas por Sheu y Marshall (1993), Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000) y Allan-Wojtas, Hansen y Paulson (2008).

La mayor compactación de la pared de las cápsulas puede atribuirse a su contacto directo con la disolución de cloruro de calcio. De acuerdo con Reid, Vuilleumard, Britten, Arcand, Farnworth y Champagne (2005) una estructura más compacta puede ser formada a altas concentraciones de iones calcio; pudiendo así explicarse la apariencia diferente entre la superficie y el centro de las cápsulas. Además, la velocidad de gelación de la superficie de las cápsulas es más rápida, casi instantánea, que en el interior, por la alta concentración de iones calcio; mientras que la gelación en el centro de las cápsulas depende de la tasa de difusión de los iones calcio y su concentración en el gel (Allan-Wojtas, Hansen y Paulson, 2008).

También se observaron diferencias en la apariencia de la matriz interna de las cápsulas, de acuerdo a su composición; así, las cápsulas $A_{0.5}P_0$, elaboradas sólo con A (Figura 11) y las cápsulas A_0P_2 formuladas sólo con P (Figura 12) mostraron matrices internas más porosas que aquellas exhibidas por el resto de las cápsulas $A_{0.5}P_1$, $A_{0.5}P_2$, $A_{0.5}P_3$, elaboradas a partir de mezclas A-P (Figuras 13 a 15). Asimismo, las matrices internas de las cápsulas constituidas por mezclas A-P, fue más densa conforme incrementó la concentración de biopolímeros en la formulación (Tabla 8).

Las observaciones expuestas parecen indicar que aumentos en la concentración de biopolímeros de las cápsulas, mediante la incorporación de mayores concentraciones de P, resultaron en la formación de matrices internas con una estructura más compacta. Una mayor concentración de biopolímero resulta en una estructura capsular más compacta y de menor porosidad; no obstante, existe un límite de concentración máxima de biopolímero a usar, como resultado de las dificultades que implica el manejo de dispersiones con altas viscosidades en el método de extrusión.

La porosidad de la matriz encapsulante es un factor importante, que afecta la viabilidad de las bacterias cuando son sometidas a ambientes adversos, tales como el tracto gastrointestinal; esta propiedad puede ser controlada por las características del biopolímero (peso molecular, contenido y distribución secuencial de ácido gulurónico o galacturónico), cinética de gelación y concentración de iones divalentes, para formar estructuras geladas menos porosas, las cuales pueden proteger mejor a las bacterias (Thu, Bruheim, Espevik, Smidsrød, Soon-Shiong y Skjåk-Bræk, 1996; Allan-Wojtas, Hansen y Paulson, 2008).

En todos los casos, la estructura interna de las cápsulas reveló la presencia de microcavidades o poros distribuidos de forma irregular, en los que se encontró la presencia de células de *Lb. casei* (Figuras 11 a 15). Hansen, Allan-Wojtas, Jin y Paulson (2002) y Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000), observaron que la matriz de alginato de cápsulas conteniendo bacterias fue marcadamente más porosa que aquella de cápsulas ausentes de bacterias. Estos autores explicaron que

posiblemente la presencia de bacterias interrumpió la gelación del biopolímero en su vecindad inmediata, originando cavidades internas en las cápsulas.

El grado de entrecruzamiento es un parámetro que regula varias propiedades de las cápsulas, tales como la dinámica de erosión de la matriz, hinchamiento y liberación de bioactivos a través de los poros generados por entrecruzamiento (Pillay y Danckwerts, 2002). Hansen, Allan-Wojtas, Jin, y Paulson (2002), encontraron que la alta porosidad de la red de alginato en cápsulas que contenían bacterias limitó su efecto protector ante jugos gástricos simulados a pH 2.0 y 3.0, así como durante el almacenamiento de las cápsulas en leche a 4°C durante 16 días.

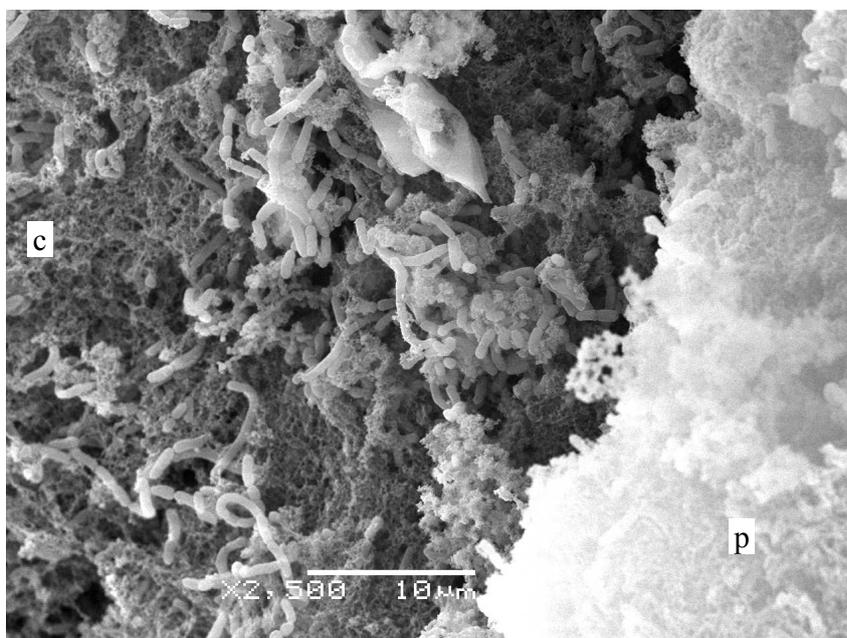


Figura 9. Micrografía MEB representativa de una cápsula ($A_{0.5}P_0$) fracturada, p: pared interna de la cápsula, c: centro de la cápsula. Ampliación 2500 \times .

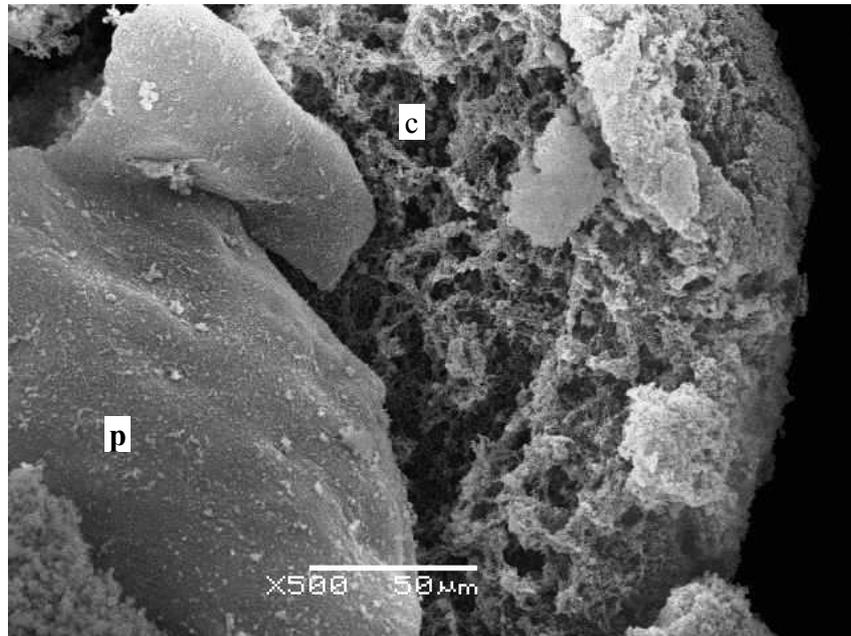


Figura 10. Micrografía MEB representativa de una cápsula ($A_{0.5}P_1$) fracturada, p: pared exterior de la cápsula, c: centro de la cápsula. Ampliación 500 \times .

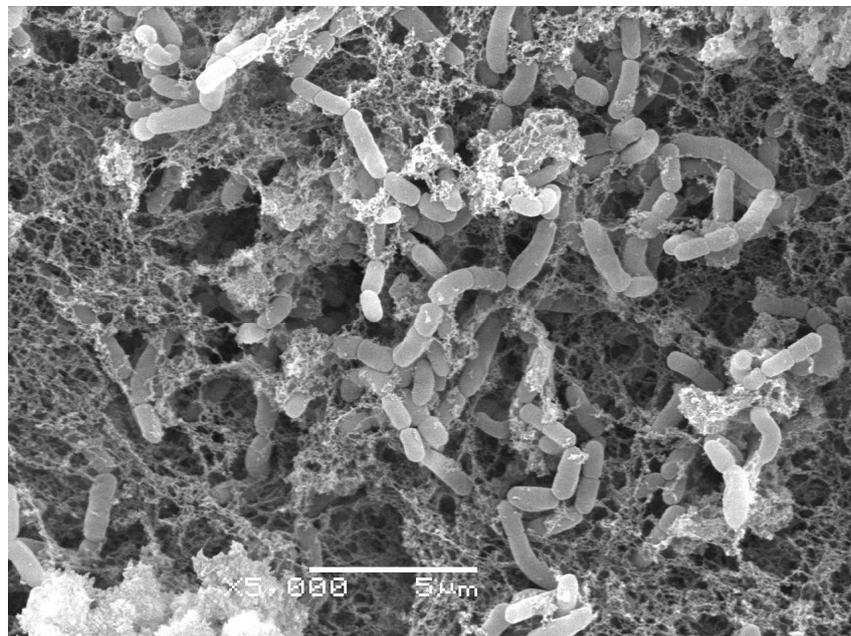


Figura 11. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula ($A_{0.5}P_0$). Ampliación 5000 \times .

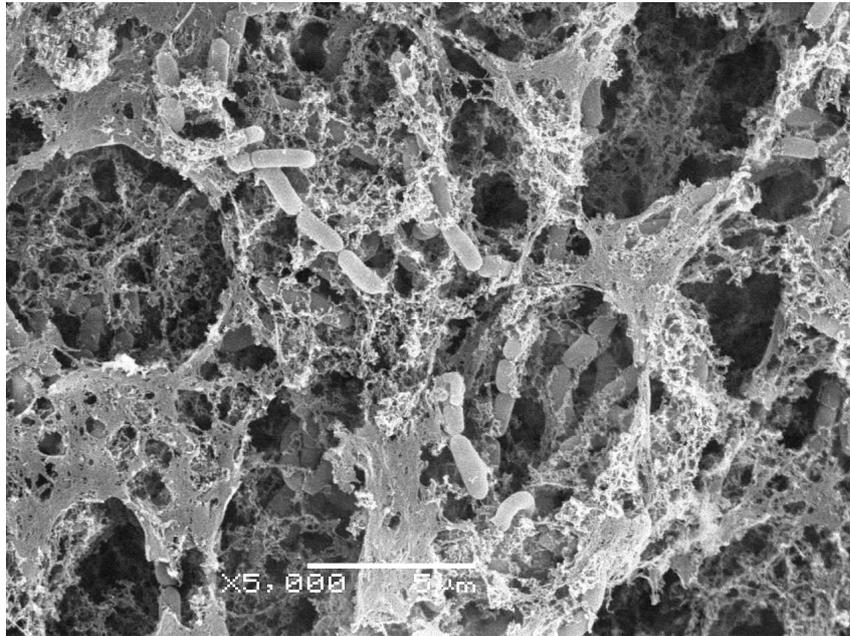


Figura 12. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A_{0.5}P₂). Ampliación 5000 ×.

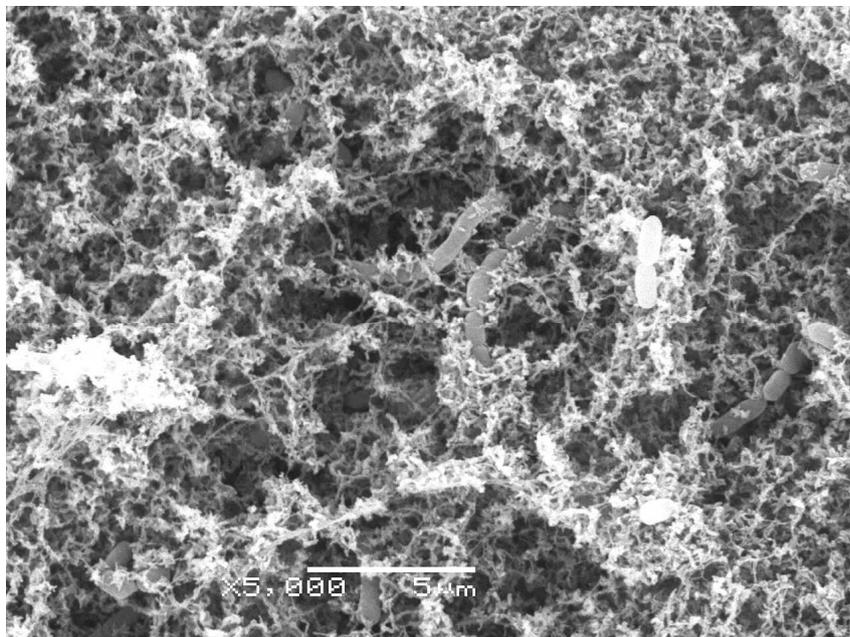


Figura 13. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A_{0.5}P₁). Ampliación 5000 ×.

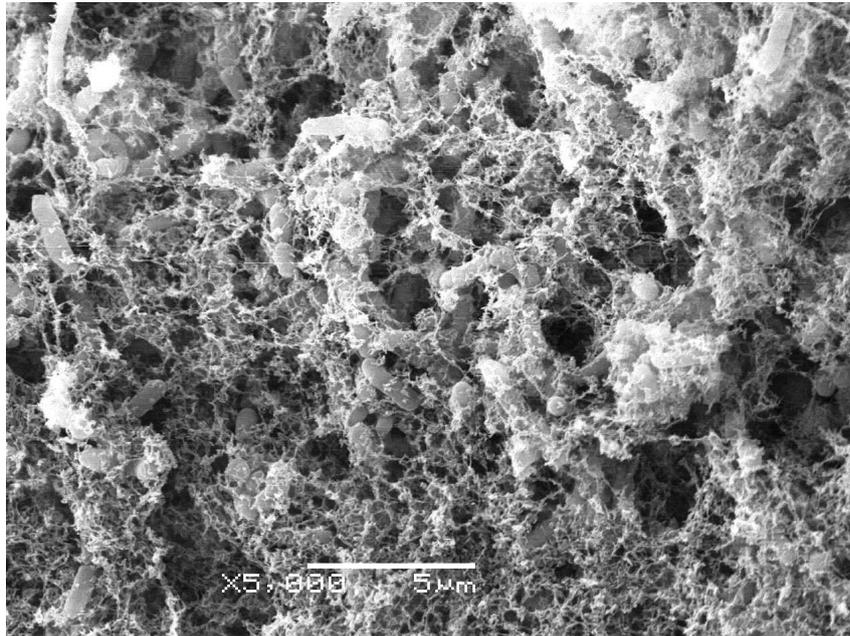


Figura 14. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A_{0.5}P₂). Ampliación 5000 ×.

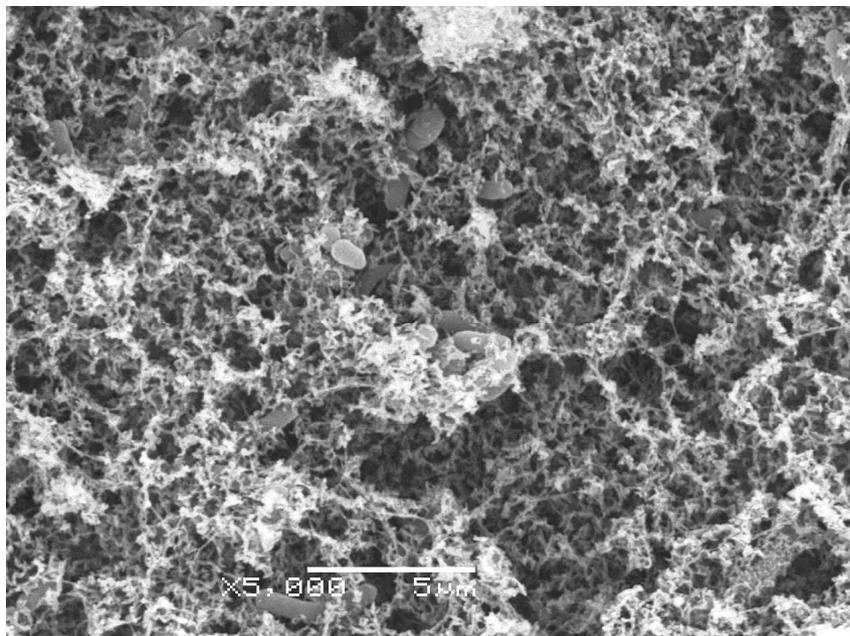


Figura 15. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A_{0.5}P₃). Ampliación 5000 ×.

7.3. Propiedades texturales de las cápsulas

La composición en biopolímeros y su concentración, afectaron las propiedades texturales de las cápsulas. Los resultados obtenidos indican que las cápsulas de alginato ($A_{0.5}P_0$) mostraron valores significativamente menores de dureza, elasticidad, y resiliencia que aquellos mostrados por las cápsulas formuladas con pectina (A_0P_2), pero tuvieron valores comparables ($p > 0.05$) de cohesividad (Tabla 8). Las cápsulas $A_{0.5}P_1$ y $A_{0.5}P_2$ exhibieron valores intermedios en las propiedades texturales de dureza, elasticidad y resiliencia que aquellos mostrados por $A_{0.5}P_0$ y $A_{0.5}P_2$, pero la cohesividad de las cápsulas de $A_{0.5}P_2$ fue considerablemente mayor ($p \leq 0.05$) que aquella de las cápsulas A_0P_2 .

Tabla 8. Valores medios (\pm DE, n=9) de las propiedades texturales de las variaciones de cápsulas

Código de cápsula ^a	Dureza (N)	Cohesividad (Relación)	Elasticidad (Relación)	Resiliencia (Relación)
A_0P_2	1.11 \pm 0.08 ^c	0.84 \pm 0.01 ^a	0.99 \pm 0.01 ^b	0.58 \pm 0.01 ^c
$A_{0.5}P_0$	0.45 \pm 0.01 ^a	0.82 \pm 0.01 ^a	0.89 \pm 0.02 ^a	0.44 \pm 0.01 ^a
$A_{0.5}P_1$	0.68 \pm 0.05 ^b	0.81 \pm 0.02 ^a	0.90 \pm 0.01 ^a	0.46 \pm 0.01 ^a
$A_{0.5}P_2$	0.76 \pm 0.03 ^b	0.87 \pm 0.01 ^b	0.99 \pm 0.03 ^b	0.55 \pm 0.02 ^b
$A_{0.5}P_3$	2.08 \pm 0.20 ^d	0.89 \pm 0.01 ^b	0.99 \pm 0.03 ^b	0.64 \pm 0.02 ^d

^a A_xP_y : código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. ^{a, b, c, d}. Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Las cápsulas $A_{0.5}P_3$ presentaron los valores más altos ($p \leq 0.05$) de dureza y resiliencia. Los resultados expuestos indican que existieron diferencias en las reacciones de entrecruzamiento de las redes poliméricas de alginato de calcio, pectato de calcio y alginato-pectato de calcio; las cuales resultaron en diferentes respuestas mecánicas a la deformación. Adicionalmente, puede inferirse que el diseño de cápsulas con diferentes propiedades texturales puede lograrse a través de variaciones en las relaciones de A y P.

7.4. Eficiencia de encapsulamiento de *Lb. casei*

La eficiencia de encapsulamiento de *Lb. casei* en las variaciones de cápsulas varió entre 54.3 y 79.2 % (Tabla 7). Las cápsulas elaboradas sólo con alginato ($A_{0.5}P_0$) mostraron significativamente menor eficiencia de encapsulamiento que aquellas observadas en el resto de las variaciones de cápsulas (Tabla 7). Las variaciones de cápsulas $A_{0.5}P_2$ y $A_{0.5}P_3$ presentaron las eficiencias de entrapamiento de células más altas y entre ellas no existió diferencia significativa (Tabla 7). A pesar de que en todos los casos la SC tuvo la misma carga celular inicial ($8.83 \pm 0.15 \log \text{ ufc ml}^{-1} \text{ SC}$), la carga celular en las cápsulas $A_{0.5}P_0$ ($8.56 \pm 0.03 \log \text{ ufc g}^{-1}$), fue significativamente menor que aquellas (8.88 ± 0.03 a $8.92 \pm 0.01 \log \text{ ufc g}^{-1}$) obtenidas en el resto de las cápsulas.

Reid, Vuilleumard, Britten, Arcand, Farnworth y Champagne (2005) relacionaron la eficiencia de encapsulamiento con dos factores que afectan las cuentas teóricas de ufc en las cápsulas: (1) La pérdida de células en la disolución de CaCl_2 , y (2) la pérdida de viabilidad de las células en las mismas cápsulas. La eficiencia de encapsulamiento incrementó significativamente conforme la concentración de biopolímeros aumentó, debido a que mayores pesos de cápsulas fueron obtenidos 100 g^{-1} de SC (Tabla 7). Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000), informaron de mejoras en la eficiencia de encapsulación de *Lb. casei* en cápsulas de alginato, conforme la concentración de biopolímeros incrementó por la adición de almidón

resistente Hi-maíz en porcentajes en peso de 0 a 2. Kailasapathy, Perera y Phillips (2006), observaron eficiencias de encapsulación para enzimas de sabor de menos del 60 % en cápsulas de alginato-almidón Hi-maíz. Los valores de eficiencia de encapsulación obtenidos se encontraron entre los informados por Pillay y Fassihi (1999a) para diclofenaco de sodio en comprimidos de alginato-pectato de calcio (84.94 %) y en comprimidos de alginato de calcio puro (49.94 %).

7.5 Supervivencia de *Lb. casei* encapsulado en yogur

La composición y la concentración de biopolímeros en las cápsulas afectó la supervivencia de *Lb. casei* en yogur. La supervivencia de *Lb. casei* encapsulado durante el tiempo de almacenamiento de yogur, fue mayor al 90 % en las variaciones de cápsulas elaboradas con pectina y alginato-pectina; en contraste, la supervivencia de *Lb. casei* disminuyó hasta aproximadamente el 40 % de la carga inicial en las cápsulas A_{0.5}P₀, preparadas sólo con alginato (Tabla 9). Las células de *Lb. casei* contenidas en las cápsulas A₀P₂ preparadas sólo con P, mantuvieron su número durante el tiempo evaluado y mostraron mayor supervivencia que la exhibida por las células contenidas en las cápsulas A_{0.5}P₀, formuladas sólo con A, a cualquier tiempo de almacenamiento (Tabla 9).

Los valores de supervivencia de *Lb. casei* contenido en las cápsulas formadas por alginato-pectina A_{0.5}P₁ y A_{0.5}P₂, fueron ligeramente mayores al 100 % durante el tiempo de almacenamiento del yogur (Tabla 9). Después de 20 días de almacenamiento a 4 °C, el número de células viables de *Lb. casei* se mantuvo en el rango de concentración terapéutica (10⁷ ufc g⁻¹) en el yogur (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2006), independientemente de la composición de las diferentes variaciones de cápsulas.

Tabla 9. Valores medios (\pm DE, n=9) de viabilidad y sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado, durante el almacenamiento de yogur

Días Código ^a de cápsula	Log ufc de <i>Lb. casei</i> g ⁻¹ cápsulas y sobrevivencia (%)				
	0	5	10	15	20
A ₀ P ₂	8.92 \pm 0.01 ^A	8.90 \pm 0.01 ^A (95.8 \pm 2.2) ^{bA}	8.90 \pm 0.02 ^A (96.4 \pm 3.5) ^{aA}	8.86 \pm 0.01 ^A (87.6 \pm 2.7) ^{cA}	8.90 \pm 0.07 ^A (97.3 \pm 5.3) ^{bA}
A _{0.5} P ₀	8.56 \pm 0.03 ^A	8.36 \pm 0.04 ^B (63.9 \pm 6.4) ^{cA}	8.31 \pm 0.09 ^B (58.3 \pm 13.2) ^{bAB}	8.20 \pm 0.04 ^C (43.8 \pm 4.2) ^{dB}	8.15 \pm 0.03 ^C (39.6 \pm 2.5) ^{cB}
A _{0.5} P ₁	8.92 \pm 0.02 ^B	8.93 \pm 0.03 ^B (100.3 \pm 3.4) ^{bA}	8.92 \pm 0.02 ^B (100.0 \pm 4.1) ^{aA}	8.99 \pm 0.04 ^A (116.4 \pm 3.6) ^{aAB}	8.97 \pm 0.04 ^{AB} (111.9 \pm 11.4) ^{abB}
A _{0.5} P ₂	8.89 \pm 0.02 ^C	8.93 \pm 0.03 ^A (111.0 \pm 6.2) ^{aAB}	8.90 \pm 0.02 ^{AB} (102.6 \pm 4.1) ^{aB}	8.91 \pm 0.01 ^{AB} (103.6 \pm 1.9) ^{bB}	8.98 \pm 0.05 ^A (120.1 \pm 4.9) ^{aA}
A _{0.5} P ₃	8.88 \pm 0.03 ^B	8.93 \pm 0.04 ^B (95.76 \pm 2.2) ^{bA}	8.90 \pm 0.02 ^B (96.36 \pm 3.5) ^{aA}	8.92 \pm 0.01 ^B (87.58 \pm 2.7) ^{cA}	8.97 \pm 0.02 ^A (97.27 \pm 5.3) ^{bB}

^a A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A-100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P-g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. a, b, c, d. Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$) entre variaciones de cápsulas. A, B, C, D. Diferentes superíndices en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$) durante el tiempo de almacenamiento.

Los datos experimentales y los datos ajustados de viabilidad y tasa de sobrevivencia de las células de *Lb. casei* encapsuladas e incorporadas a yogur, se muestran en la figura 17 para las cápsulas A_{0.5}P₀ y en la figura 18 para las cápsulas A_{0.5}P₃. El resto de las variaciones de cápsulas mostraron una tendencia similar a aquella exhibida por las cápsulas A_{0.5}P₀ y A_{0.5}P₃.

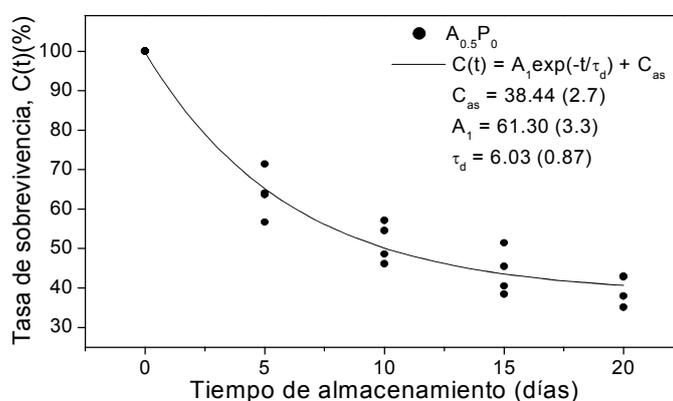


Figura 16. Tasas de sobrevivencia y modelos ajustados para *Lb. casei* contenido en las cápsulas $A_{0.5}P_0$ e incorporado en yogur almacenado durante 20 días a 4 °C.

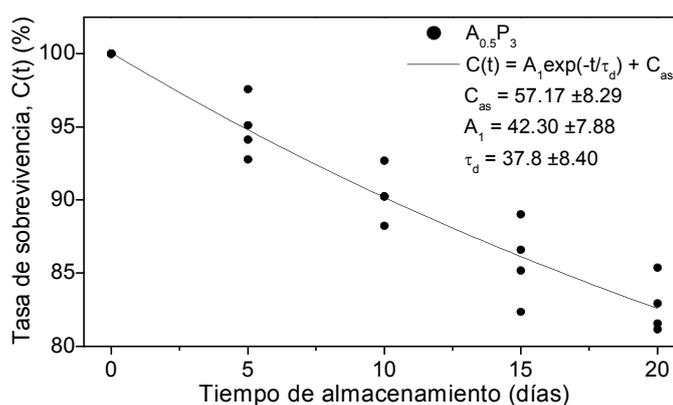


Figura 17. Tasas de sobrevivencia y modelos ajustados para *Lb. casei* contenido en las cápsulas $A_{0.5}P_3$ e incorporado en yogur almacenado durante 20 días a 4 °C.

La correlación de ajuste fue por lo menos de 0.88 para todos los casos cuando se aplicó un modelo cinético de decaimiento de primer orden:

$$\frac{dC(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_D} (C_{as} - C(t)) .$$

Para las diferentes variaciones de cápsulas, los resultados obtenidos para el tiempo de decaimiento medio constante y el valor de estabilización asintótica alcanzado son mostrados en la Tabla 10. La adición de P mejoró la sobrevivencia de las células de *Lb. casei*, incrementándose tanto el tiempo de decaimiento medio constante, como el valor de la estabilización asintótica (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales para la tasa de sobrevivencia *Lb. casei* encapsulado en yogurt almacenado 20 días a 4 °C.

Código de cápsula ^a	A _{0.5} P ₀	A _{0.5} P ₁	A _{0.5} P ₂	A _{0.5} P ₃	A ₀ P ₂
τ_D (días)	6.03±2.7	18.15±3.4	32.15±4.1	37.8±8.4	31.15±7.1
C_{as} (%)	38.44±0.9	48.12±3.9	56.23±5.1	57.17±8.3	51.13±6.2

^a A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. τ_D : Tiempo de decaimiento medio constante. C_{as} : Valor al cual la tasa de sobrevivencia se convierte en asintótica.

Al parecer, el uso de 2 % de P sólo o entre 2 y 3 % combinada con 0.5 % de A, tendió a exhibir cuentas óptimas de *Lb. casei*, las cuales fueron superiores al requerimiento terapéutico de 10⁷ ufc g⁻¹ en yogurt (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2006), después de 20 días de almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, la ausencia de alginato en las variaciones de cápsulas A₀P₂ tuvo un efecto negativo en la capacidad de sobrevivencia de *Lb. casei*, en comparación con la sobrevivencia observada en las cápsulas A_{0.5}P₂ y A_{0.5}P₃. Esto sugiere que ambos, P y A, inducen una especie de efecto sinérgico en la consolidación de la matriz encapsulante.

Las células contenidas en las cápsulas A_{0.5}P₀, mostraron los valores más bajos de tiempo de decaimiento medio constante (τ_D) y de estabilización asintótica (C_{as}), en comparación con el resto de las variaciones de cápsulas (Tabla 10). Se ha informado que el factor principal que influye en la sobrevivencia de las bacterias probióticas es el incremento en el contenido de ácido del yogur después de la fermentación y durante el tiempo de almacenamiento, el cual es denominado “sobreacidificación” o “postacidificación” (Shah y Jelen, 1990).

Los resultados obtenidos indican que las cápsulas de alginato-pectina mejoraron la sobrevivencia de *Lb. casei* en yogur, probablemente debido a la lenta tasa de difusión de los compuestos producidos durante la fermentación de yogur, tales como ácidos y peróxido de hidrógeno, que inhiben su crecimiento (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2006). Los valores de pH de los yogures variaron entre 4.64 ± 0.0 al día 0 y 4.48 ± 0.01 al día 20 y en un día en particular no existieron diferencias significativas entre los valores de pH de los yogures.

Adhikari, Mustapha y Grün (2003), informaron valores y variaciones de pH similares, para yogures conteniendo *Bifidobacterium longum* encapsulado en κ -carragenina, durante 30 días de almacenamiento, y también encontraron que la carga celular no declinó. Investigaciones previas han demostrado el efecto protector ejercido por la encapsulación de bacterias probióticas cuando éstas fueron expuestas a condiciones adversas, encontrando que las bacterias exhibieron una sobrevivencia significativamente mayor que aquellas células no encapsuladas cuando fueron sometidas a bajo pH (Lian, Hsiao y Chou, 2003; Picot y Lacroix, 2004; Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas y Vernon-Carter, 2009).

7.6 Sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas.

La sobrevivencia de las células encapsuladas después de la exposición secuencial a condiciones ácidas y sales biliares, decreció significativamente en todos los casos. Sin embargo, la composición de la matriz encapsulante proporcionó diferentes grados de protección a las células de *Lb. casei*, resultando en valores de sobrevivencia significativamente diferentes (Figura 19).

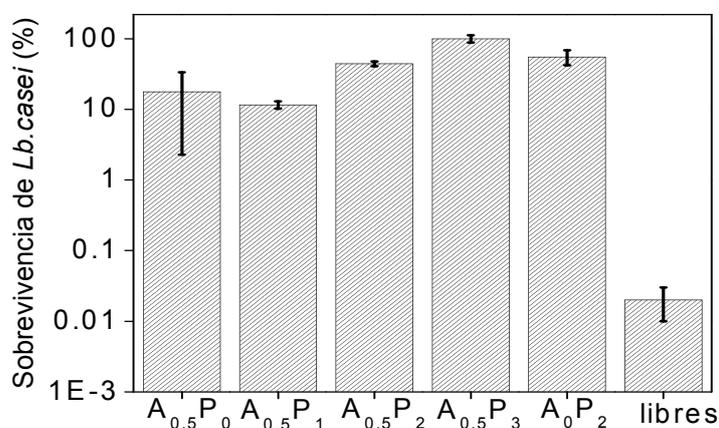


Figura 18. Efecto de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares sobre la sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado en las diferentes variaciones de cápsulas y células libres. A_x P_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias(n=9).

Los resultados indicaron que las matrices binarias alginato-pectato de calcio de las cápsulas, proveyeron una mejor protección contra las sales biliares a *Lb. casei*, que las matrices de las cápsulas constituidas por uno de los biopolímeros. Kim, Jun, Lee, Kim, Lee, Kim y Paik (2006), reportaron que *B. polyfermenticus* en cápsulas de alginato-

metilcelulosa (6:1) mostraron una mayor sobrevivencia a la exposición a jugos gástricos y sales biliares que la mostrada por cápsulas de alginato solo.

La figura 19 muestra el número de células viables de *Lb. casei* contenido en las distintas variaciones de cápsulas después de su exposición secuencial por 6 horas a condiciones ácidas y sales biliares. Puede observarse que al encapsulamiento de *Lb. casei*, resultó en un mayor número de células sobrevivientes, en comparación con el obtenido para el caso de células de *Lb. casei* libres expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas.

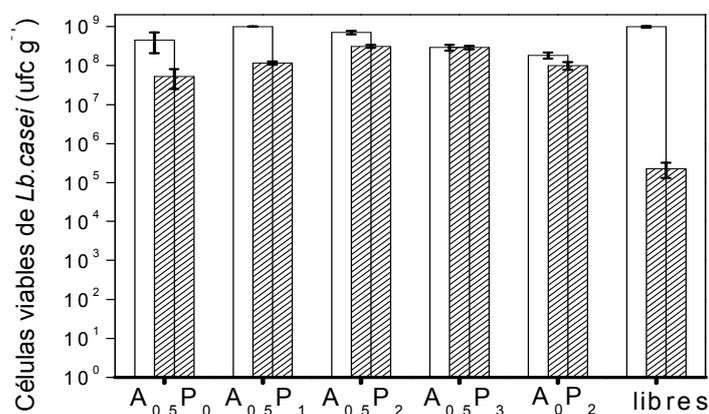


Figura 19. Efecto de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares sobre la viabilidad: inicial (□) y final (▨) de *Lb. casei* encapsulado y células libres. A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias(n=9).

Además, la adición de P tuvo un efecto benéfico adicional en la reducción de la tasa de decaimiento de las células de *Lb. casei* encapsuladas. Es interesante señalar que la

ausencia de A en la formulación de las cápsulas redujo en alguna extensión el efecto protector, sugiriendo que ambos, A y P, conforman una matriz encapsulante más estructurada y más resistente al efecto de ácidos y sales biliares. En la figura 19 puede apreciarse que precisamente la formulación de las cápsulas A_{0.5}P₃ permitió la mayor sobrevivencia de células de *Lb. casei*, y en consecuencia la mayor protección a condiciones gastrointestinales simuladas.

Además las cápsulas A_{0.5}P₃ estuvieron relacionadas con mayor protección a células de *Lb. casei* incorporadas a yogur, durante el tiempo de almacenamiento de este último (Tabla 10). Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000), informaron que la sobrevivencia de células de *Lb. casei* atrapado en cápsulas de alginato-almidón decreció 2 log ufc g⁻¹ después de su incubación en condiciones gastrointestinales simuladas durante 3 h a 37 °C.

7.7. Interrelación entre la sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado en yogur y condiciones gastrointestinales simuladas y las propiedades físicas y texturales de las cápsulas

Se aplicó un Análisis de Componentes Principales (ACP) a la sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado en yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas, la esfericidad, el diámetro y las propiedades texturales de las cápsulas, con el fin de establecer las relaciones principales existentes entre estos parámetros y obtener la distribución de las variaciones de cápsulas en este espacio bidimensional. El primer componente principal explicó el 58.5 % de la varianza total y en éste la sobrevivencia de *Lb. casei* en yogur y en condiciones gástricas simuladas, estuvo correlacionada positivamente con el diámetro y todas las propiedades texturales (dureza, elasticidad, cohesividad y resiliencia) de las cápsulas (Figura 21). El segundo componente principal explicó el 20.2 % de la varianza total y en éste la sobrevivencia de *Lb. casei* después de exposición secuencial a jugo

gástrico simulado y sales biliares, estuvo correlacionada positivamente con la esfericidad de las cápsulas (Figura 21). Los dos componentes principales claramente distinguieron las propiedades de las cápsulas en términos de su composición.

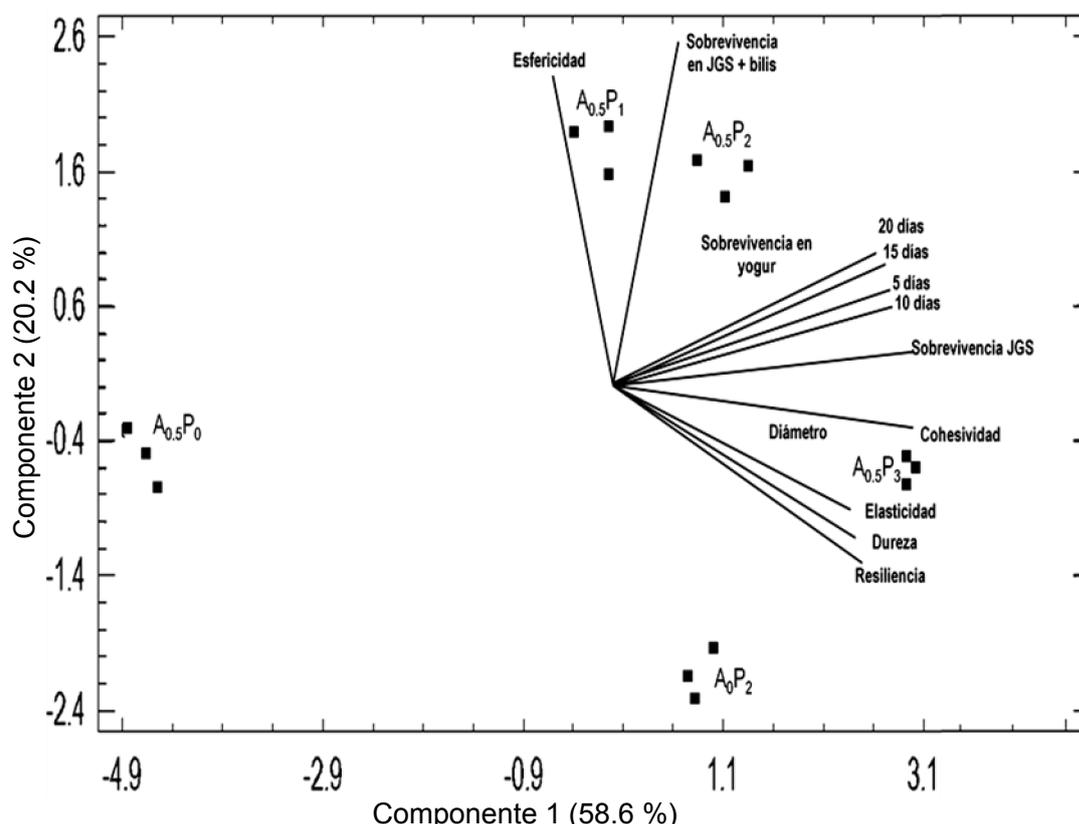


Figura 20. Análisis de componentes principales de las propiedades texturales de las cápsulas y supervivencia de *Lb. casei* en el almacenamiento de yogur y en condiciones gástricas simuladas. A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. Las barras representan la desviación estándar de las medias(n=9).

La posición de las cápsulas elaboradas con alginato ($A_{0.5}P_0$) y pectina (A_0P_2) en el espacio bidimensional, permitió establecer que P contribuyó en mayor extensión a la obtención de cápsulas con tamaños relativamente más grandes y con altos valores de dureza, elasticidad, cohesividad y resiliencia más elevados; mientras que A afectó positivamente la esfericidad de las cápsulas.

A partir de la posición de las cápsulas en el espacio bidimensional (Figura 21), es claro que las cápsulas elaboradas con mezclas binarias de alginato-pectina protegieron las células de *Lb. casei* encapsuladas en una mayor extensión, que aquellas cápsulas preparadas con los biopolímeros solos. Las variaciones de cápsulas $A_{0.5}P_1$ y $A_{0.5}P_2$, tuvieron forma esférica, y propiedades texturales intermedias. Las cápsulas $A_{0.5}P_3$ mostraron las propiedades texturales más altas y la menor esfericidad, y fueron las que proporcionaron mejor protección a *Lb. casei* encapsulado en yogur, durante el tiempo de almacenamiento.

8. CONCLUSIONES

El uso de mezclas de alginato-pectina permitió la obtención de cápsulas que proporcionaron mejor protección a *Lb. casei* encapsulado contra factores ambientales adversos, en comparación con el efecto protector proporcionado por cápsulas elaboradas con alginato o pectina solos.

Las propiedades texturales, las propiedades físicas y la eficiencia de encapsulamiento de las cápsulas alginato-pectina fueron afectadas por la concentración total de biopolímeros y la relación de ambos biopolímeros utilizada. Aumentos en la concentración de biopolímeros resultaron en cápsulas con mayor eficiencia de encapsulamiento. Las relaciones de alginato-pectina 1:2 y 1:4 proporcionaron cápsulas más esféricas, con propiedades texturales intermedias; un incremento en la relación alginato-pectina a 1:6, proporcionó cápsulas con las propiedades texturales más elevadas y menor esfericidad, las cuales protegieron mejor a *Lb. casei* encapsulado contra exposición secuencial a jugo gástrico simulado y sales biliares, y en yogur durante el tiempo de almacenamiento.

La selección de un tipo de cápsula para el encapsulamiento de *Lb. casei* debería realizarse en términos de las propiedades deseadas en las cápsulas, tales como tamaño, esfericidad, sobrevivencia en yogur con el tiempo de almacenamiento y/o sobrevivencia en jugo gástrico y sales biliares.

El tiempo de decaimiento medio y la tasa de sobrevivencia asintótica constante son parámetros importantes para entender la pérdida de viabilidad de las células de *Lb. casei* durante el almacenamiento de yogur. La sobrevivencia a ácido y a sales biliares de *Lb. casei* encapsulado, disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) en todas las variaciones de cápsulas, pero las cápsulas A_{0.5}P₃ proporcionaron la mejor protección.

9. REFERENCIAS

1. Adhikari, K., Mustapha, A. y Grün, I. U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, *68*(1): 275-280.
2. Alamprese, C. Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C. y Corti, S. (2005). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, *58*(4): 200-206.
3. Allan-Wojtas, P., Hansen, L. T., y Paulson, A. T. 2008. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *41*(1): 101-108.
4. Anal, A. K., Bhopatkar, D., Tokura, S., Tamura, H. y Stevens, W. F. (2003). Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *29*(6): 713-724.
5. Anal, A. K., Stevens, W. F. y Remuñán-López, C. (2006). Iontropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, *312*(1-2): 166-173.
6. Anal, A. K. y Stevens, W. F. (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, *290*(1/2): 45-54.
7. Anal, A. y Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(5): 240-251.
8. Aragon-Alegro, L. C., Alarcón-Alegro, J. H., Cardarelli, H. R., Chiu, M. C. y Saad, S. M. I. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *40*(4): 669-675.
9. Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M. y Ben-Embarek, P. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in

- Food, London (Ontario, Canada) April 30 and May 1. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
10. Artignan, J. M., Corrieu, G., y Lacroix, C. (1997). Rheology of pure and mixed kappa-carrageenan gels in lactic acid fermentation conditions. *Journal of Texture Studies*, 28(1): 47-70.
 11. Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* (Salminen, S. y Von Wright, A. Eds), 2ª ed. pp: 1-72. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
 12. 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(2): 239-248.
 13. Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Quiberoni, A., Suárez, V. B. y Zalazar C. A. (2005). Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*, 38(5): 597-604.
 14. Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroche, G., Thouvenot, P, y Marine Piaia, M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science*, 74(2): 409-413.
 15. Beunink, J., Baumgärtl, H., Zimelka, W. y Rehm, H. J. (1989). Determination of oxygen gradients in single Ca-alginate beads by means of oxygen microelectrodes. *Experientia*, 45:1041-1047.
 16. Birollo, G. A., Reinheimer, J. A. y Vinderola, C. G. (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, 33(9): 799-805.
 17. Blanchete, L., Roy, D., Belanger, G. y Gauthier, S. F. (1996). Production of Cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 79(1): 8-15.
 18. Blanchette, L. y Roy, D. (1995). Production of cultured Cottage cheese dressing by Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 78(7): 1421-1429.

19. Blaut, M. (2002). Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, 41(1):11-16
20. Bomba, A., Jonecova, Z., Koscova, J., Nemcova, R., Gancarcikova, S. y Mudronova, D. (2006). The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: A review. *Biologia*, 61(6): 729–734.
21. Bourne, M. C. (2002). *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (2nd ed.). Academic Press. New York.
22. Boyle, R. J. y Tang, M. L. (2006). The role of probiotics in the management of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*, 36(5): 568–576.
23. Braccini, I. y Prez, S. (2001). Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4): 1089-1096.
24. Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L. y Arias, M. L. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Archivos latinoamericanos de Nutrición*, 51(1): 1-6.
25. Capela, P., Hay, T. K. C. y Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2): 203-211.
26. Carteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. y Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotics *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5): 759–768.
27. Champagne C. P y Fustier P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 184–190.
28. Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., y Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1): 27-35.

29. Choonara, Y. E., Pillay, V., Singh, N., y Ndesendo, M. K. (2008). Chemometric, physicochemical and rheological analysis of the sol-gel dynamic and degree of crosslinking of glycosidic polymers. *Biomedical Materials*, 3(2): 1-15.
30. Corbo, M. R., Albenzio, M., Angelis, M. D., Sevi, A. y Gobetti M. (2001). Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(3):551-561.
31. Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. y Ross, R. P. (2005). Survival of probiotic *Lactobacilli* in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6): 3060-3067.
32. Dave, R. I., y Shah, N. P. (1997). Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(6-7): 435-443.
33. Dave, R. I. y Shah, N. P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2804-2816.
34. De Souza, C. H. B., Buriti, F. C. A., Behrens, J. H. y Saad, S. M. I. (2007). Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(5): 871-877.
35. Díaz-Rojas, E. I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., Valdez, M. A., Ribaudó, M., y Goycoolea, F. M. (2004). Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*, 18(2): 293-304.
36. Dinakar, P., y Mistry, V. V. (1994). Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77(10): 2854-2864.
37. Draget, K. I., Skjåk-Bræk, G., y Smidsrød, O. (1997). Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21(1-2): 47-55.
38. Draget, K. I. (2000). Alginates. En *Handbook of Hydrocolloids* (Phillips, G. O., y Williams, P.A. eds).pp. 379-396. Woodhead Publishing., Cambridge, Inglaterra.

39. Dubey, U. K. y Mistry, V. V. (1996). Growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. *Journal of Dairy Science*, *79*(7): 1146-1155.
40. Ekinçi, F. Y., Okur, O. D., Ertekin, B. y Guzel-Seydim, Z. (2008). Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science & Technology*, *110*(3): 1-9.
41. Erdoğan, Ö y Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turk Journal of Biology*, *30*: 39-44.
42. Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinary, K., Funami, T., y Williams, P. A. (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, *72*(2): 334-341.
43. Fanger, G. O. (1974). What good are microcapsules? *Chemical Technology*, *4*: 397-405.
44. Fernández, M. F., Boris, S. y Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(3): 449 – 455.
45. Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (1999). Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, *82*(7): 1379–1387.
46. Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Kevin Collins, J., Fitzgerald, G. (2002). A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*, *12*(9): 749–756.
47. Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota. *Journal of Nutrition*, *125*(6): 1401-1412.
48. Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A. y Angelis, M. (1998). Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, *81*(1): 37-47.
49. Gobbetti, M. (1999). *Lactobacillus casei*. En *Encyclopedia of Microbiology* (Robinson, R., Batt, C. y Patel P. Eds.), 2ª ed. pp: 1157-1164. Academic Press. Ltd.

50. Gómez, A. M. P. y Malcata, F. X. (1998). Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: Response Surface Analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science* 81(6): 1492–1507.
51. González, M. B. y Gómez, T. M. (2004). Contenido e identificación de microorganismos probióticos en alimentos y suplementos. *Revista Salud pública y Nutrición*. Edición especial No. 1.
52. Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J. y Gill, H. S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3): 207–216.
53. Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., y Paulson, A. T. (2002). Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19(1): 35-45.
54. Hoefler, A. C. (2004). *Hydrocolloids: Practical guides for the food industry*. Ed. American Association of Cereal Chemists. U.S.A.
55. Hoover, D. G. (1993). Bifidobacteria: Activity and potential benefits. *Food Technology*, 47(6): 120.
56. Hughes, D. B., y Hoover, D. G. (1995). Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 78(2): 268-276.
57. Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., y Koivula, T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. Strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, 88(1): 90-97.
58. Isolauri, E., Kirjavainen, P. V. y Salminen, S. (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?. *Gut*, 50(3): 54-59.
59. Kailasapathy, K., Harmstorf, I. y Phillips, M. (2008). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 41(7): 1317-1322.

60. Kailasapathy, K., Perera, C., y Phillips, M. (2006). Evaluation of alginate-starch polymers for preparation of enzyme microcapsules. *International Journal of Food Engineering*, 2(2); art. 8.
61. Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3(2): 39-48.
62. Kailasapathy, K. y Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology & Cell Biology*, 78(1); 80-88.
63. Kailasapathy, K. y Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60(3): 252-258.
64. Kailasapathy, K. y Rybka, S. (1997). *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* - their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52(1): 28-35.
65. Kalavrouzioti, I., Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. (2005). Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1): 30-38.
66. Kandler, O. y Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*, En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. Eds.), vol. 2, 9ª ed. pp: 1063-1065. Williams and Wilkins, Baltimore, MA.
67. Kasımoğlu, A., Göncüoğlu, M. y Akgün, S. (2004). Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14(12): 1067-1073.
68. Khalil, A. H. y Mansour, E. H. (1998). Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. *Journal of Food Science* 63(4): 702-705.
69. Kim, C. J., Jun, S. A., Lee, N., Kim, K.T., Lee, S. K., Kim, C. y Paik, H. (2006). Encapsulation of *Bacillus polyfermenticus* SCD with alginate-methylcellulose and evaluation of survival in artificial conditions of large intestine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3) 443-449.

70. Kim, K. I., Baek, Y. J., Yoon, Y. H. (1996). Effects of rehydration media and immobilization in calcium-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. *Korean Journal of Dairy Science*, 18: 193-198.
71. Koo, S. M., Cho, Y. H., Hun, C. S., Baek, Y. J. y Park, J. (2001). Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *Journal Microbiology and Biotechnology* 11(3): 376-383.
72. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1): 3-13
73. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survival of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8): 737-743.
74. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39(2): 177-183.
75. Kullrami, N. y Reddy, B. S. (1994). Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacteria beta-glucuronidase. *Proceedings of Society of Experimental Biologists Medical*, 207: 278-283.
76. Kwabena, O. K. y Fell, J.T. (2001). Biphasic drug release: the permeability of films containing pectin, chitosan and HPMC. *International Journal of Pharmacology*, 226(1-2): 139-145.
77. Lamoureux, L., Roy, D. y Gauthier, S. F. (2002). Production of oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures. *Journal of Dairy Science*, 85(5): 1058-1069.
78. Lankaputhra, W. E. V. y Shah, N. P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal*, 30: 3, 2-7.

79. Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M. L. (2005). Study of adhesion and survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(8): 4233-4240.
80. Lee, J. S., Cha, D. S. y Park, H. J. (2004). Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(24): 7300-7305.
81. Lee, Y.-K.; Nomoto, K.; Salminen, S. y Gorbach, S. L. (1999). Alteration of microecology in human intestine. En *Handbook of probiotics*. (Wiley Interscience Eds.), pp: 182-190. John Wiley & Sons, Inc, New York.
82. Lian, W.C., Hsiao, H.C., y Chou, C.C., (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(3): 293-301.
83. Liu, L., Fishman, M. y Hicks, K. B. (2007). Pectin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose*, *14*(1):15 -24.
84. Liu, L., Fishman, M. L., Kost, J., y Hicks, K. B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, *24*(19): 3333-3343
85. Lopez-Rubio, A., Gavara, R. y Lagaron, M. (2006) Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through materials. *Trends in Food Science & Technology*, *17* (10): 567-575.
86. Lourens-Hattingh, A. y Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, *11*(1-2): 1-17.
87. Madureira, A. R., Gíao, M.S., Pintado, M.E., Gomes, A.M.P, Freitas, C. y Malcata, X. (2005). Incorporation and survival of probiotic bacteria in whey cheese matrices. *Journal of Food Science* *70*(3): 160-165.
88. Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., y Malcata, F. X. (2005). Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, *15*(6-9): 921-927.

89. Madziva, H., Kailasapathy, K. y Phillips M. (2006). Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39(2): 146-151.
90. Mahnet, S., Kirin, S., Kos, B., Frece, J. y Suskovic, J. (2004). Immunomodulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG from low fat fresh cheese "BioAktiv LGG". *Mljekarstvo*, 54(1): 5-18.
91. Martinsen, A., Skjak-Braek, C. y Smidsrod, O. (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(1): 79-89.
92. Matsuzaki, T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2):133-140.
93. McMaster, L. D., Kokott, S. A., Reid, S. J. y Abratt, V. R. (2005). Use of traditional African fermented beverages as delivery vehicles for *Bifidobacterium lactis* DSM 10140. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2): 231- 237.
94. Merck, E. (1994). *Manual de medios de cultivo*. Darmstadt, Alemania. pp 124.
95. Minelli, E. B, Benini, A., Marzotto M, Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario R., Hendriks, H. Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal*, 14(8): 723-736.
96. Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., y Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian journal of Biotechnology*, 5(1): 1-18.
97. Mosilhey, S. H. (2003). Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Tesis. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat. Bonn Alemania.
98. Muthukumarasamy, P., Allan, P. W. y Holley, A. R. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1): 20-24.

99. Muthukumarasamy, P. y Holley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, *111*(2): 164–169.
100. Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I. y Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research Technology*, *225*(1): 33–42.
101. O'Riordan, A. D., Buckle, K. y Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology* *91*(6):1059-1066.
102. Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeuf, F., Tissier, J. P. y Corrieu, G. (2002). Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *Journal of Food Science*, *67*(6): 2336-2341.
103. Ong, L., Henriksson, A. y Shah, N. P. (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal* *16*(5): 446–456
104. Ouwehand, A. y Vesterlund, S. (2003). Health aspects of probiotics. *IDrugs*, *6*:573-580.
105. Özer, B., Kirmaci, H. A., Şenel, E., Atamer M. y Hayaloğlu, A. (2009). Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, *19*(1): 22–29
106. Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A. y Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(6):1171–1185.
107. Pedone, C. A. Arnaud, C. C. Postaire, E. R. Bouley, C. F. y Reinert, P. (2000). Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhea. *International Journal of Clinical Practice*, *54*(9): 568-571.

108. Peniche, C., Howland, I., Carrillo, O., Zaldivar, C. y Arguelles-Monal. (2004). Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. *Food Hydrocolloids*, *18*(6): 865-871.
109. Pérez, S., Mazeau, K. y Du Penhoat, C. H. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, *38*(1/2): 37-55.
110. Picot, A., y Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, *15*(5): 505-515.
111. Pillay, V. y Danckwerts, M. P. 2002. Textural profiling and statistical optimization of crosslinked calcium-alginate-pectinate-cellulose acetophthalate gelisphere matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *91*(12): 2559- 2570
112. Pillay, V. y Fassihi, R. (1999a). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics. *Journal of Controlled Release*, *59*(2): 229-242.
113. Pillay, V. y Fassihi, R. (1999b). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets. *Journal of Controlled Release*, *59*(2): 243-256.
114. 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*(2): 292-297.
115. Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P., Rambaud, J. C. (1992). Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *55*(1): 78-80.
116. Popplewell, I. M., Black, J. M., Norris, I. M. y Porzio, M. (1995). Encapsulation system for flavors and colors. *Food Technology*, *49*(5):76-82.

117. Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., Adams, M.C. (2009). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1): 1-7
118. Rasband, W.S. (2007). ImageJ, Image Processing and Analysis in Java U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007. (Accesado: 2001-06-26).
119. Ravula, R. R. y Shah, N. P. (2001). Freezing conditions frozen out. *Dairy Industries International*, 10: 22-26.
120. Reid, A. A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P. y Vuilleumard, J. C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science*, 72(1): 31-37.
121. Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., y Champagne, C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*, 22(6), 603-619.
122. Reineccius, G. A. (1991). Off-flavors in foods. *Journal of Food Science*, 29(6): 381-402.
123. Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., y Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2): 71-78.
124. Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P. y Mätto, J. (2006). Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal* 16(12): 1477-1482.
125. Sanders, M. E. (2003). Probiotics: Considerations for human health. *Nutrition Reviews*, 61(3): 91-99.
126. Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., y Vernon-Carter, E. J. (2004). Microstructure and texture of yoghurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14(2): 151-159.

127. Schillinger, U., Guigas, C. y Holzapfel, W. H. (2005) .In vitro adherence and other properties of *Lactobacilli* used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal* 15(12): 1289–1297.
128. Schneeman, B. O. 2002. Gastrointestinal physiology and functions. *British Journal of Nutrition* 88(Suppl 2): S159-163.
129. Semdé, R., Amighi, K., Devleeschouwer, M. J. y Moës, A. J. (2000). Studies of pectin HM/Eudragine film coating formulations intended for colon drug delivery. *International Journal of Pharmacology*, 197(1-2): 181 –192.
130. Senok, A. C., Ismaeel, A. Y., y Botta, G. A. (2005). Probiotics: Facts and myths. *Clinical Microbiology & Infection*, 11(12): 958–966.
131. Shah, N., y Jelen, P. 1990. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *Journal of Food Science*, 55(2): 506-509.
132. Shah, N. P., Lankaputhra, W. E. V., Britz, M., y Kyle, W. S. A. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5(5): 515–521.
133. Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal Dairy Science*, 83(4): 894-907.
134. Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11): 1262-1277.
135. Shah, N. P. y Lankaputhra, W. E. V. (1997). Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. in yoghurt. *International Dairy Journal*, 7(5): 349–356.
136. Shah, N. P. y Ravula, R. R. 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3): 139–144.
137. Sheu, T. Y., Marshall, R. T., y Heymann. H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76(7): 1902-1907.

138. Sheu, T. Y. y Marshall, R. T. (1993). Microencapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3): 557-561.
139. Shin, H. S., Lee, J. H., Pestka, J. J. y Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial *Bifidobacterium spp.* in skim milk containing oligosaccharides and inulin, *Journal of Food Science*, 65(5): 884-887.
140. Sinha, V. R. y Kumria, R. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical*, 224(1-2): 19-38.
141. Smidsrod, O. y Skjak-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8(3): 71-78.
142. Song, S. H., Cho, Y. H. y Park, J. (2003). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using a microporous glass membrane emulsification system. *Journal of Food Science*, 68(1): 195-200.
143. Songisepp, E., Kullisaar, T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M. y Mikelsaar, M. (2004). A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*. 87(7): 2017-2023.
144. Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn University International Journal*, 3(1-2): 206-228.
145. Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., y Ross, R. P. (1998). Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8(5-6): 491-496.
146. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. y Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal Food Microbiology*, 62(1-2):47-55.
147. Sun, W. y Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1): 17-25.
148. Talwalkar, A., y Kailasapathy, K. (2003). Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science*, 86(8): 2537-2546.

149. Talwalkar, A., y Kailasapathy, K. (2004). A review of oxygen toxicity in probiotic yoghurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(3): 117-124.
150. Tandhanskul, A. y Krasaekoopt, W. 2008. Sensory and acceptance assessment of yogurt containing probiotic beads in Thailand. *Kasetsart Journal*, 42(99): 106.
151. Tannock, G. W. (1995). Internal renewal: the potential for modification of the normal microflora. En *Normal microflora: An introduction to microbes inhabiting the human body*. pp. 99-107. Chapman and Hall, London, Inglaterra.
152. Tannock, G. W. (2002). The *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* microflora of humans, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 22(3): 231-253.
153. Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P. y Skjåk-Bræk, G. (1996). Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*, 17(10): 1031-1040.
154. Tønnesen, H. H. y Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6): 621-630
155. Tripathi, V. y Jha, Y. K. (2004). Development of whey beverage with antagonistic characteristics and probiotics. *International Journal of Food Properties*, 7(2): 261-272.
156. Tuohy, K. M., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney A. L. y Gibson G.R. (2006). Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1026 - 1032.
157. Turkoglu, M. y Ugurlu, T. (2002). In vitro evaluation of pectin-HPMC compression coated 5-aminosaclicylic acid tablets for colon delivery. *European Journal of Pharmacology and Biopharmacology*, 53(1): 65-73.
158. Vandamme, T. F, Lenourry, A., Charrueau, C. y Chaumeil, J C. (2002). The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, 48(3):219-31.

159. Vinderola, C. G., Bailo, N. y Reinheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinean yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33(2): 97-102.
160. Vinderola, C. G. y Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "In vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10): 895-904.
161. Wakerly, Z., Fell, J. T., Attwood, D. A. y Parkins, D. (1997). Colonic drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(9): 893-913.
162. Wong, V. K. (1998). Microencapsulation of amino acids for prawn feed additives. Tesis doctoral. Department of Chemical Engineering. University of Queensland.
163. Yáñez, F. J., Salazar, M. J. A., Chaires, M. L., Jiménez, H. J., Márquez, R. M. y Ramos, R. E. G. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21: 313-319.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt

O. Sandoval-Castilla^a, C. Lobato-Calleros^b, H.S. García-Galindo^c, J. Alvarez-Ramírez^d, E.J. Vernon-Carter^{d,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, México, D.F. 09340, Mexico

^b Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230 Texcoco, Mexico

^c Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Veracruz, Calzada Miguel Ángel de Quevedo 2779. Col. Formando Hogar, 91860, Veracruz, Mexico

^d Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, México, D.F. 09340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2009

Accepted 7 September 2009

Keywords:

Probiotics

Encapsulation

Alginate

Pectin

Yoghurt

Simulated gastrointestinal conditions

Lactobacillus casei

Entrapment

Alginate–pectin beads

Survival

ABSTRACT

Lactobacillus casei was entrapped in beads made with sodium alginate (A), amidated low-methoxyl pectin (P), and blends of A–P (1:2, 1:4, 1:6 ratios) by the extrusion technique. Diameter, sphericity and textural properties of the beads and the survivability of entrapped *Lb. casei* in yoghurt and in simulated gastrointestinal conditions were determined. Entrapment efficiency of *Lb. casei* and diameter increased as the proportion of P and the total biopolymers concentration increased. Principal Component Analysis showed that the survivability of *Lb. casei* in yoghurt, and in simulated gastric juice, was positively correlated with the diameter and all the textural properties of the beads, while survivability after exposure to simulated gastric juice and bile salts was positively correlated with the sphericity of the beads. The beads made with A–P blends in 1:4 and 1:6 ratios provided a significant better protection to the entrapped *Lb. casei* under all conditions studied.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays people prefer preventative rather than curative approaches toward diseases (Talwalkar & Kailasapathy, 2004). Diet is a good strategy for maintaining optimum health throughout life and preventing early onset of chronic diseases such as gastrointestinal (GI) disorders, cardiovascular disease, cancer, osteoporosis, as well as promoting healthier ageing (Liu, Fishman, Kost, & Hicks, 2003). In this sense the claimed numerous health benefits of probiotic bacteria have led to their incorporation into a wide variety of foods, including dairy products as yoghurt, cheese, ice cream, and dairy desserts (Anal & Singh, 2007). Probiotic can be considered as being “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Araya et al., 2002). This definition has been recently adapted by Health Canada (2009) in their guidelines for foods. The microorganisms mainly incorporated into foods are lactobacilli and bifidobacteria (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). Traditionally, yoghurt is manufactured using *Streptococcus thermophilus* and

Lb. delbrueckii spp. *bulgaricus* as starter cultures. These yoghurt organisms are claimed to offer some health benefits; however, they are not natural inhabitants of the intestine. Therefore for yoghurt to be considered as a probiotic-carrying food, *Lb. casei*, *Lactobacillus acidophilus* or both are incorporated as dietary adjuncts (Shah, 2000). The number of viable bacteria taken orally is decreased due to action of processing and storage conditions of the food containing them, and to the action of gastric juice and bile salts. Probiotic organisms have poor survivability in yoghurt and fermented milk as they do not tolerate exposure to highly acidic and aerated media (Muthukumarasamy, Allan, & Holley, 2006). Microencapsulation has been recognized as an alternative for increasing microorganism resistance to low acid environment during their storage and/or transit through the GI tract (Anal & Singh, 2007; Sun & Griffiths, 2000). It is a process by which cells are retained within an encapsulating matrix or membrane. The most widely used encapsulating material is alginate, a linear heteropolysaccharide of D-mannuronic acid and L-guluronic acid extracted from various species of algae, which is cheap, simple to use and biocompatible. Alginate beads containing bacteria (1–3 µm size) can be formed using the extrusion technique (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003). However,

* Corresponding author. Tel.: +52 5 5 58044648; fax: +52 5 5 58044900.
E-mail address: jvc@xanum.uam.mx (E.J. Vernon-Carter).

alginate gels are susceptible to disintegration in the presence of excess monovalent ions, Ca^{2+} -chelating agents and harsh chemical environments (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990). Some authors have reported that alginates can form strong complexes with other natural polyelectrolytes such as pectin (also a polyuronate) by undergoing chain–chain association and forming hydrogels upon addition of divalent cations (e.g., Ca^{2+}) (Fang et al., 2008; Pillay & Fassihi, 1999a), improving the mechanical and chemical stability of the alginate beads, and consequently improving the effectiveness of encapsulation (Pillay & Fassihi, 1999b).

Bead particle size is an important factor regarding the survivability of probiotics. Sheu, Marshall, and Heymann (1993) found that the survival of entrapped *Lactobacillus bulgaricus* in alginate beads and added to frozen desserts was significantly higher when beads size fell in-between 30 and 102 μm , than when beads had a diameter of 15 μm . These authors indicated that a mean diameter of 30 μm was desirable, because large beads might cause coarseness of texture of ice milk, whereas small beads did not provide sufficient protection of the bacteria. Adhikari, Mustapha, and Grün (2003), reported that when microcapsules were added to yoghurt at 10% (w/v), there was an unfavorable consumer response due to the resultant grainy texture. On the other hand, Hansen, Allan-Wojtas, Jin, and Paulson (2002), reported that alginate capsule should have a diameter of at least 100 μm to prevent a reduction in *Bifidobacterium* viability in simulated gastric juices. Therefore, probiotics should be entrapped within a limited range of bead sizes to for successful incorporation into foods to minimize problems associated with cell viability and food texture.

The objectives of this work were to entrap *Lactobacillus casei* in beads made with sodium alginate (A), amidated low-methoxyl pectin (P), and blends of A–P (1:2, 1:4, 1:6 ratios) by the extrusion technique, and to determine the possible relationships between the diameter, sphericity and textural (hardness, cohesiveness, springiness, and resilience) properties of the beads with the survivability of entrapped *Lb. casei* in yoghurt and in simulated gastrointestinal conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The biopolymers low molecular weight sodium alginate FD 175, 60.5% guluronic acid content (A) and amidated low-methoxyl pectin LM-106 AS–YA, degree of esterification 28%, degree of amidation 20% (P) were purchased from CP Kelco (Lille Skensved, Denmark). Calcium chloride, sodium chloride, hydrochloric acid, and ascorbic acid, which were of analytical grade, were purchased from Quimica Laitz, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Bacto peptone, Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth and agar were obtained from BD DIFCO Becton Dickinson and Company (Detroit, MI). All water used in the experiments was double distilled and deionized.

2.2. Bacteria, culture conditions and preparation of cell concentrate

A lyophilized culture of *Lb. casei* LBC81 LYO (Danisco, Dange Saint Romain, France) was cultured for 22 h at 37 °C in sterile MRS broth added with ascorbic acid (0.1 g 100 ml⁻¹) to provide an anaerobic environment. Cells were harvested at the late log phase by centrifugation (Hermle Z323 k, Hermle Laborstechnik, Germany) at 1000g for 20 min (Shin, Lee, Pestka, & Ustunol, 2000), washed twice with sterile saline solution (0.9 g of NaCl 100 ml⁻¹) and re-suspended in peptone water (0.1 g 100 ml⁻¹), obtaining a cellular concentrate (CC) of 9.72 ± 0.1 log cfu ml⁻¹.

2.3. Bead forming procedure

A preliminary study was carried out in order to formulate and prepare mechanically stable beads with uniform diameter of approximately 100 μm to 1 mm (Hansen et al., 2002) using A, P, and blends of both in different ratios. To this end, the initial attempt was to determine the concentration of A and P alone that would yield gel beads by the extrusion technique used in this work, with the characteristics mentioned above. The minimum biopolymers concentrations that provided beads that were mechanically stable and with the desired diameters were 0.5 g of A and 2 g of P 100 ml⁻¹. Therefore five different beads variations were prepared from aqueous dispersions of A and/or P as follows: A_{0.5}P₀ (0.5 g A 100 ml⁻¹), A₀P₂ (2 g P 100 ml⁻¹), A_{0.5}P₁ (0.5 g A + 1 g P 100 ml⁻¹), A_{0.5}P₂ (0.5 g A + 2 g P 100 ml⁻¹), and A_{0.5}P₃ (0.5 g A + 3 g P 100 ml⁻¹). The samples were hydrated 24 h before being stored until use at 4 °C to minimize bacterial growth. Afterwards the biopolymers dispersions were sterilized at 121 °C for 15 min, cooled to 4 °C, and blended with the CC in a volume ratio of 9:1, obtaining the cell suspensions (CS). The number of cells of *Lb. casei* contained in the all of the CS was 8.83 ± 0.15 log cfu ml⁻¹, determined incubating at 37 °C for 48 h in MRS agar plate.

The beads were formed by dripping one part of the respective CS suspension to ten parts of sterile 0.5 M CaCl₂ solution (pH 5.61 ± 0.02) using a 0.8 mm (30½ G) needle (Muthukumarasamy et al., 2006). The beads were allowed to stand for 12 h at 5 ± 1 °C for hardening in CaCl₂ solution. The capsules were harvested by filtration through a stainless steel mesh of 0.19 mm, and then rinsed and subsequently kept in, sterile peptone solution (0.1 g 100 ml⁻¹) at 4 °C (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2004). Beads variations were prepared by triplicate in a completely randomized experimental design and were identified with the same codes of the biopolymers dispersions from which were prepared.

2.4. Entrapped *Lb. casei* enumeration

For quantitative measurements of cell viability, it was necessary to solubilize the beads to release the encapsulated *Lb. casei* cells. One gram of beads was suspended in 9 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) (Sheu & Marshall, 1993), followed by gentle shaking at room temperature (20 ± 2 °C) for 10 min. Numbers of viable cells in the suspensions were then determined by plate counting using MRS agar with incubation at 37 °C for 48 h. Entrapment efficiency was calculated as described Reid et al. (2005), as follows:

$$\text{Entrapment efficiency} = A/B \times 100$$

where A = cfu of *Lb. casei* g⁻¹ of beads × g of beads 100 ml⁻¹ of CS, and B = cfu of *Lb. casei* 100 ml⁻¹ of CS before entrapment (10⁸ cfu ml⁻¹ in all the cases). Afterwards, all the cfu g⁻¹ data were transformed to log cfu g⁻¹ data for making the manuscript more reader friendly.

2.5. Morphology and diameter of the beads

The morphology of the beads was observed in an Olympus BX45 phase contrast microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Japan). Micrographs, at a magnification of 4×, were taken to beads randomly selected with a digital camera Camedia C-3030 (Olympus Optical Co., Ltd., Japan). Twenty micrographs of each beads variation were analyzed with ImageJ software version 1.4 to determine sphericity (Rasband, 2007). The diameter of each bead variation was measured using the Imagen-Pro Plus version 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA), after 24 h of elaborated (Rasband, 2007).

2.6. Textural properties of the beads

The different beads variations were subjected to Texture Profile Analysis (TPA) (Bourne, 2002) using a Stable Micro Systems Texturimeter model TA-XT2i (Texture Technologies Corp., White Plains, NY, USA) equipped with a 5 kg load cell. In order to guarantee good test reproducibility, due to the particulate nature of the beads, a cylindrical steel probe with a large contact area (35 mm in diameter) was used to overcome this problem. Each measurement was carried out at room temperature on 30 g of each bead variation placed on a fixed bottom glass plate under the probe. The automatic detection of the contact by the probe with the beads was carried out with a contact force of 0.005 N (Artignan, Corrieu, & Lacroix, 1997). In all cases the samples were compressed 30%, using two compression cycles at a constant crosshead velocity of 0.5 mm s⁻¹. The primary textural properties of hardness, cohesiveness, springiness, and resilience (ratio between the areas under the compression and decompression curves) (Choonara, Pillay, Singh, & Ndesendo, 2008) were obtained using the equipment's Texture Expert Software for Windows Version 3.2.

2.7. Survival of entrapped *Lb. casei* in yoghurt

Entrapped *Lb. casei* was added to low-fat yoghurt containing 15 g of milk fat l⁻¹, prepared according to the procedure proposed by Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, Aguirre-Mandujano, and Vernon-Carter (2004). One hundred ml of low-fat yoghurt placed into sterile glass bottles were added with 10 g of each variation of beads, followed by gentle stirring. The samples were stored at 4 °C, and the viability of *Lb. casei* was determined during 20 days, at intervals of 5 days. The beads were removed from yoghurt by filtration and washed with sterile saline solution. *Lb. casei* cells were released from the beads as described above, and enumerated by plate counting using MRS agar with incubation at 37 °C for 48 h.

The experimental viable cell data (cfu g⁻¹) for each beads variations were converted into survival rate by dividing the final viable population with the initial viable population. The converted data from the independent runs were considered as a sole run and fitted by means of a first-order decaying kinetics of the form $\frac{dC(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_D} (C_{as} - C(t))$, where τ_D is the mean decaying time constant and C_{as} is the value that the survival rate achieves asymptotically (i.e., the value at which the survival rate is stabilized). The larger the value of τ_D and C_{as} , the more stable the trapping matrix. These parameters were estimated by means of a least-square procedure with the integral version of the decaying kinetics; namely, $C(t) = A_1 \exp(-t/\tau_D) + C_{as}$. Here, A_1 is integration constant.

2.8. Survival of entrapped *Lb. casei* in simulated gastric juice and bile salts

For determining the survival of *Lb. casei* in simulated gastric juice, 1 g of each freshly prepared bead variations was placed separately in test tubes containing 9 ml of simulated gastric solution

(pH 3.0) with 0.1 N HCl. Samples were incubated at 37 °C for 3 h in a Precision Scientific 360 orbital shaker bath (West Cortland St., Chicago, Illinois). The beads after having been exposed to simulated gastric juice, were filtrated, washed with sterile saline solution and deposited in tubes containing 9 ml of a sterile solution (1 g/100 ml⁻¹) of porcine bile extract (B8631, Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri), and pH 6.4. The beads–bile salt blends were incubated at 37 °C for 3 h with gentle agitation (Madureira et al., 2005). At the end of the incubation period the beads were immediately used for enumeration of viable cells after depolymerization of beads in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2), followed by plating using MRS agar at 37 °C for 48 h (Sheu & Marshall, 1993).

2.9. Statistical analysis

In all of the assays, three independent experiments were carried out for each bead variation and the mean was constituted by three replicates for each sample. The experimental data was subjected to Simple Classification Variance Analysis and whenever it was adequate to Tukey's test. The significance was established at $p \leq 0.05$. Principal Component Analysis (PCA) was performed on the beads properties (diameter, sphericity, and textural properties) and in simulated gastrointestinal conditions. Data analysis was done using Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Morphology, diameter, and yield of the beads

Biopolymer composition influenced both the diameter and the sphericity of the beads. Sphericity values of the beads varied between 0.90 and 0.95 (Table 1), with the A₀P₂ beads showing significant lower sphericity than the A_{0.5}P₀, A_{0.5}P₁, and A_{0.5}P₂, but comparable to that of the A_{0.5}P₃ beads, with the latter exhibiting a small vermiform appendix. These results indicate that alginate contributed to a larger extent to the sphericity of the beads than pectin. Pillay and Fassihi (1999b) reported that calcium-alginate pellets had essentially spherical shape, while calcium-pectinate and calcium-alginate–pectinate pellets were disc-like in geometry, attributing this phenomenon to differences in crosslinking occurring in each case during pellets forming. Diaz-Rojas et al. (2004) reported that pectin–alginate beads lost sphericity as the proportion of linseed pectin in the formulae increased, as a consequence of the weaker mechanical stability of the linseed calcium-pectinate network compared to that from calcium-alginate. Diameter values of the beads varied between 0.71 and 0.97 mm (Table 1). The A_{0.5}P₀ beads showed significantly lower diameter than the beads formulated with P alone or combined with A (Table 1). Thus, our beads seem to be sufficiently large for achieving good cell loading and their protection against detrimental environmental factors, but they are probably not sufficiently small so that their presence in the mouth is not detected. Anal and Singh (2007) stated that an

Table 1
Physical characteristics, yield, and entrapment efficiency of the alginate–pectin beads (means ± SD).

Beads code ^a	Diameter (mm)	Sphericity (0–1)	Yield (g of beads·100 ml ⁻¹ of CS)	Entrapment efficiency (%)
A ₀ P ₂	0.93 ± 0.06 ^{bc}	0.90 ± 0.05 ^a	69.5 ± 2.5 ^b	68.8 ± 2.5 ^b
A _{0.5} P ₀	0.71 ± 0.07 ^a	0.94 ± 0.03 ^b	52.9 ± 3.6 ^a	54.3 ± 3.7 ^a
A _{0.5} P ₁	0.88 ± 0.04 ^b	0.94 ± 0.03 ^b	64.4 ± 0.5 ^b	64.1 ± 0.5 ^b
A _{0.5} P ₂	0.89 ± 0.08 ^b	0.95 ± 0.02 ^b	77.3 ± 2.4 ^c	77.9 ± 2.4 ^c
A _{0.5} P ₃	0.97 ± 0.07 ^c	0.93 ± 0.03 ^{ab}	80.8 ± 1.1 ^c	79.2 ± 1.1 ^c

^{a,b,c,d} Different superscripts within the same column indicate that the means differ significantly ($p \leq 0.05$).

^a A_X P_Y: codes of beads variations, where A: sodium alginate; X subscript: g of A·100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension; P: amidated low-methoxyl pectin; Y subscript: g of P·100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension.

Table 2Textural properties of the beads variations (means \pm SD, $n = 9$).

Beads code ^a	Hardness (N)	Cohesiveness (Ratio)	Springiness (Ratio)	Resilience (Ratio)
A ₀ P ₂	1.11 \pm 0.08 ^c	0.84 \pm 0.01 ^a	0.99 \pm 0.01 ^b	0.58 \pm 0.01 ^c
A _{0.5} P ₀	0.45 \pm 0.01 ^a	0.82 \pm 0.01 ^a	0.89 \pm 0.02 ^a	0.44 \pm 0.01 ^a
A _{0.5} P ₁	0.68 \pm 0.05 ^b	0.81 \pm 0.02 ^a	0.90 \pm 0.01 ^a	0.46 \pm 0.01 ^a
A _{0.5} P ₂	0.76 \pm 0.03 ^b	0.87 \pm 0.01 ^b	0.99 \pm 0.03 ^b	0.55 \pm 0.02 ^b
A _{0.5} P ₃	2.08 \pm 0.20 ^d	0.89 \pm 0.01 ^b	0.99 \pm 0.03 ^b	0.64 \pm 0.02 ^d

^{a,b,c,d} Different superscripts within the same column indicate that the means differ significantly ($p \leq 0.05$).^a A_X P_Y: codes of beads variations, where A: sodium alginate; X subscript: g of A-100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension; P: amidated low-methoxyl pectin; Y subscript: g of P-100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension.

important challenge for cell encapsulation is the large size of microbial cells (typically 1–4 μm). This characteristic limits cell loading for small capsules, or when large capsules are produced, textural and sensorial properties of food products to which they are added can be affected negatively. Muthukumarasamy et al. (2006) found that larger capsules (2–4 mm) made by the extrusion technique were better able to protect *Lactobacillus reuteri* than smaller emulsified capsules (20–1000 μm). Chandramouli, Kailasapathy, Peiris, and Jones (2004) reported that the viability of encapsulated *Lactobacillus* in simulated gastric condition, increased with increased alginate capsule size (200–1000 μm).

The yield of the beads (g beads 100 ml⁻¹ CS) varied from 50.9 to 80.0 depending on total biopolymers concentration in CS (Table 1). The higher the total biopolymer concentration the higher the weight of beads obtained.

3.2. Beads texture

The textural properties of the beads were affected by the biopolymers composition and concentration. Our results indicate that the alginate beads (A_{0.5}P₀) showed significantly lower hardness, springiness, and resilience than those presented by pectin beads (A₀P₂), but had comparable ($p > 0.05$) cohesiveness values (Table 2). The A_{0.5}P₁ and A_{0.5}P₂ beads displayed intermediate textural properties values of hardness, springiness, and resilience than those showed by A_{0.5}P₀ and A_{0.5}P₃, but regarding cohesiveness A_{0.5}P₂ beads showed higher ($p \leq 0.05$) values than the A₀P₂ beads. The A_{0.5}P₃ beads presented the highest values ($p \leq 0.05$) of hardness and resilience. These results indicate that differences existed in the crosslinking reactions between calcium-alginate, calcium-pectinate, and calcium-alginate-pectinate polymeric networks, which resulted in different mechanical responses to deformation. Moreover, it may be inferred that by varying the ratios of A and P the design of beads with different textural properties and physical properties can be achieved.

3.3. Entrapment efficiency of *Lb. casei* in beads

The entrapment efficiency of *Lb. casei* into the beads variations varied between 54.3 and 79.2%. The beads made with only alginate (A_{0.5}P₀) showed significantly lower entrapment efficiency than those achieved in the rest of the beads variations (Table 1). The A_{0.5}P₂ and A_{0.5}P₃ beads variations displayed the highest cell entrapment efficiencies which were non-significantly different between themselves (Table 1). Despite that in all cases the CS had the same initial cell load (8.83 \pm 0.15 log cfu ml⁻¹ CS), the cell load in the A_{0.5}P₀ beads (8.56 \pm 0.03 log cfu g⁻¹) was significantly lower than those (8.88 \pm 0.03 to 8.92 \pm 0.01 log cfu g⁻¹) obtained in the rest of the beads. Reid et al. (2005) linked the efficiency data to two factors affecting the theoretical cfu counts in the beads: (1) cell losses in CaCl₂ solution and (2) viability losses in the beads themselves. Entrapment efficiency increased significantly as the total biopolymers concentration of the beads increased because a higher weight

of beads was obtained 100 ml⁻¹ of CS (Table 1). Sultana et al. (2000) reported improvements in the encapsulation efficiency of *Lb. casei* in alginate beads as the biopolymer concentration was increased by addition of Hi-maize resistant starch in percentages of weight from 0 to 2. Kailasapathy, Perera, and Phillips (2006) reported encapsulation efficiencies of flavourzyme of less than 60% in alginate-Hi maize starch beads. Our entrapment efficiencies fell in-between those found by Pillay and Fassihi (1999a) for diclofenac sodium in calcium-alginate-pectinate pellets (84.94%) and in pure calcium-alginate pellets (49.94%).

3.4. Survival of entrapped *Lb. casei* in yoghurt

The experimental data and the fitted data of the viable and survival rates of entrapped cells incorporated into yoghurt are shown in Fig. 1a for the A_{0.5}P₀ and in Fig. 1b for the A_{0.5}P₃ beads, respectively. All of the rest of the beads variations showed similar trends to those displayed by the A_{0.5}P₀ and A_{0.5}P₃ beads variations. The fitting correlation was of at least 0.88 in all cases when a first-order decaying kinetics model $\frac{dC(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau_D}(C_{as} - C(t))$ was used. For the different beads variations, the results obtained to mean decaying time constant, and the achieved asymptotic stabilization value are shown in Table 3. The addition of amidated low-methoxyl pectin improved the survival of cells of *Lb. casei* by increasing both the mean decaying time constant and the achieved asymptotic stabilization value (Table 3). It is apparent that the use 2% pectin on its own or between 2 and 3% combined with 0.5% alginate, tended to display optimal counts of *Lb. casei*, which were above the therapeutic requirement of 10⁷ cfu g⁻¹ in yoghurt (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2006), after 20 days of storage at 4 °C. However, the absence of alginate in the bead variation (A₀P₂) had a negative effect in the survival capacity of *Lb. casei*, compared to beads variations A_{0.5}P₂ and A_{0.5}P₃. This suggests that both pectin and alginate induce a sort of synergic effect in the consolidation of the trapping matrix. The entrapped cells in the pure alginate bead (A_{0.5}P₀) showed the lowest mean decaying time constant (τ_D) and asymptotic stabilization value (C_{as}) in comparison to the rest of the beads variations. It has been described that the main factor affecting the survival of probiotic bacteria is the increasing acid content of yoghurts after fermentation and during storage, which is called “over-acidification” or “post-production acidification” (Shah & Jelen, 1990). Thus, our results imply that alginate-pectin beads provided and improvement in the survivability of *Lb. casei* probably due to the slow diffusion rate of growth-inhibiting compounds produced during fermentation of yoghurt such as acids and hydrogen peroxide (Krasaekoopt et al., 2006). The pH values of our yoghurts ranged between 4.64 \pm 0.0 at day 0 and 4.48 \pm 0.01 at day 20, and in a given day non-significant pH differences existed between the yoghurts. Adhikari et al. (2003) reported similar pH values and their variation for yoghurt containing encapsulated *Bifidobacterium longum* in κ -carrageenan over a 30 days storage period, and also found that cell enumeration did not decline. Previous researchers have demonstrated the protective effect exerted by encapsulation

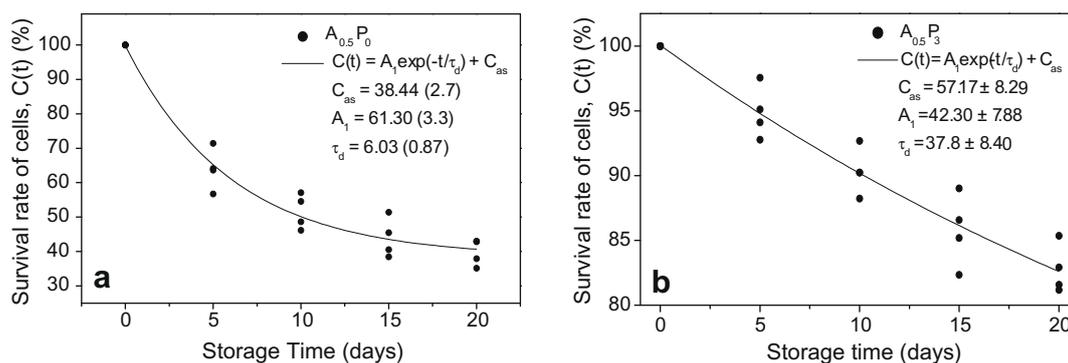


Fig. 1. Survival rates and fitted models for entrapped *Lb. casei* incorporated into yoghurt stored 20 days at 4 °C: (a) in $A_{0.5}P_0$; and (b) in $A_{0.5}P_3$ beads variations, respectively.

Table 3

Parameters resulting from the fitting of experimental data for the survival rate of entrapped *Lb. casei* in yoghurt stored for 20 days at 4 °C.

Beads code ^a	$A_{0.5}P_0$	$A_{0.5}P_1$	$A_{0.5}P_2$	$A_{0.5}P_3$	A_0P_2
τ_D (days)	6.03 ± 2.7	18.15 ± 3.4	32.15 ± 4.1	37.8 ± 8.4	31.15 ± 7.1
C_{as} (%)	38.44 ± 0.9	48.12 ± 3.9	56.23 ± 5.1	57.17 ± 8.3	51.13 ± 6.2

^a $A_X P_Y$: codes of beads variations, where A: sodium alginate; X subscript: g of A 100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension; P: amidated low-methoxyl pectin; Y subscript: g of P 100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension. τ_D : is the mean decaying time constant. C_{as} : is the value at which the survival rate achieves asymptotically.

of probiotic bacteria when they are exposed to adverse conditions and they showed that bacteria exhibited a significantly higher survival than non-entrapped control cells to low pH (Lian, Hsiao, & Chou, 2003; Picot & Lacroix, 2004; Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter, 2009).

3.5. Survival of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions

Entrapped cells survivability in bile salts after exposure to acid conditions significantly decreased in all of the cases. However, beads matrix composition provided different degree of protection to the entrapped cells, resulting in significantly different survivability (Fig. 2b). These results clearly indicate that the binary calcium-alginate-pectinate beads matrices provided a better protection against bile salts to *Lb. casei* than the beads matrices

made with either biopolymer on its own. Fig. 2a shows the number of viable cells and the corresponding standard deviation for the different formulations under sequential acidic and bile salts conditions after 6 h exposure. It can be observed that by providing *Lb. casei* with a covering matrix greater number of surviving cells were achieved. Besides, the addition of pectin has a further beneficial effect by reducing the decaying rate of cells. Interestingly, the lack of alginate in the beads variations reduces to some extent the protective effect, suggesting that both alginate and pectin make-up a more structured trapping matrix that is more resilient to the effects of acids and bile salts. Similar results are also observed in Fig. 2b for the survival rate of cells under the same conditions, indicating that the formulation $A_{0.5}P_3$ offers the best protective conditions. It is interesting to observe that this bead variation was also the best one under storage conditions, suggesting that a protective matrix offering good storage conditions also presents

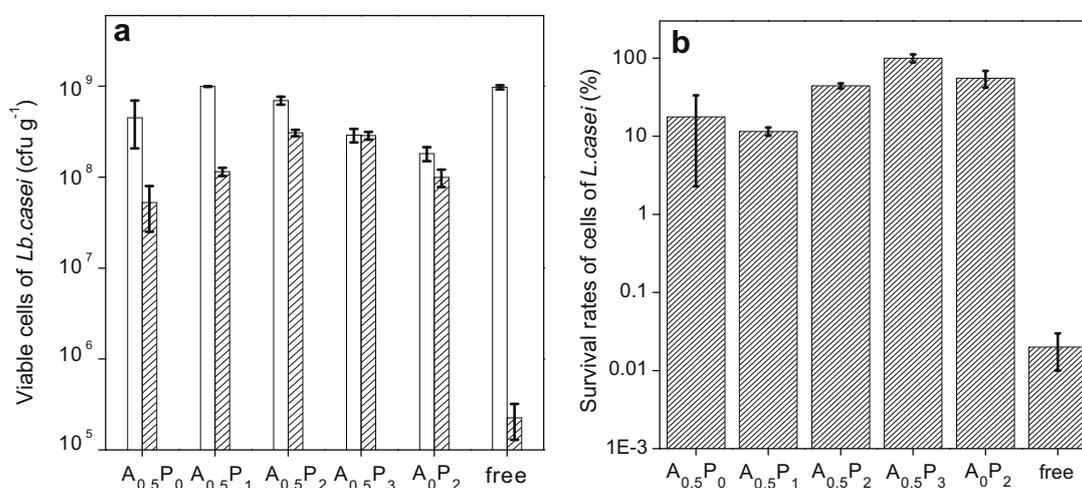


Fig. 2. Effect of the exposure to simulated gastric juice and bile salts conditions on the: (a) initial (□) and final (▨) viability; and (b) survival rates of *Lb. casei* entrapped in the different beads variations. $A_X P_Y$: codes of beads variations, where A: sodium alginate; X subscript: g of A-100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension; P: amidated low-methoxyl pectin and Y subscript: g of P-100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension. The error bars represents standard deviation of the means ($n = 9$).

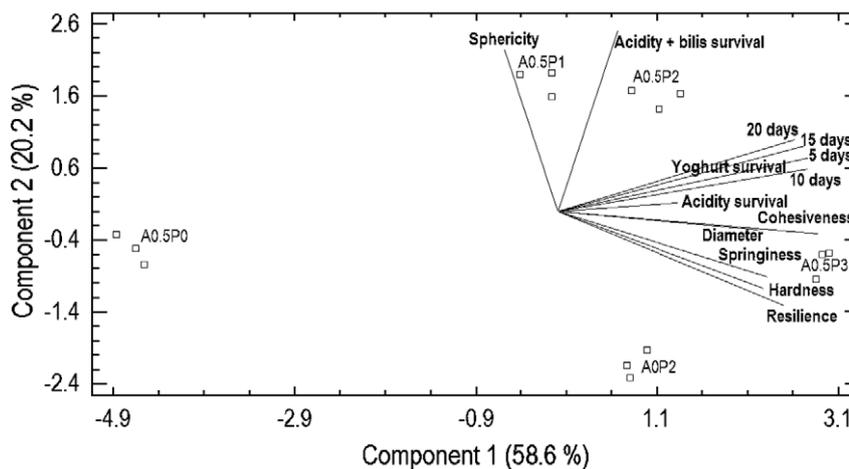


Fig. 3. Principal Component Analysis of the physical and textural properties of the beads, and the *Lb. casei* survivability in yoghurt and in simulated gastrointestinal conditions.

good protective conditions under aggressive simulated gastric juices and bile salts conditions. Sultana et al. (2000) informed that survival cells of *Lb. casei* entrapped in alginate–starch beads decreased $2 \log \text{cfu g}^{-1}$ after their incubation in simulated high acid gastric conditions and high bile during 3 h at 37 °C. The binary blends tested in this work may help in providing additional protection to entrapped *Lb. casei* cells against simulated gastrointestinal conditions.

3.6. Interrelationship between survivability of entrapped *Lb. casei* in yoghurt and simulated gastrointestinal conditions and the physical and textural properties of the beads

Principal Component Analysis (PCA) was applied to the survivability of entrapped *Lb. casei* in yoghurt and simulated gastrointestinal conditions, the sphericity and diameter, and the textural properties of the beads in order to establish the main relationships existing among these parameters and how the beads variations were distributed in this space. The principal first component explained 58.6% of the total variance and in which the survivability of *Lb. casei* in yoghurt, and in simulated gastric juice, was positively correlated with all the textural properties (hardness, springiness, cohesiveness, and resilience) and with the diameter of the beads (Fig. 3). The second principal component explained 20.2% of the total variance and in which the survivability of *Lb. casei* after exposure to sequential incubation in simulated gastric juice and bile salts was positively correlated with the sphericity of the beads (Fig. 3). The two main components clearly distinguished the properties of the beads in terms of their composition (Fig. 3). The position kept by the beads made with alginate ($A_{0.5}P_0$) and pectin (A_0P_2) in the bi-dimensional space allowed us to establish that P contributed to a larger extent to the obtention of relatively larger sized beads with higher values of hardness, springiness, cohesiveness, and resilience, whereas A positively influenced the sphericity of the beads.

From the position kept by the beads in the bi-dimensional space, it is clear that the beads made with binary blends of alginate–pectin protected the entrapped *Lb. casei* cells to a greater extent than those made with only alginate or pectin. The $A_{0.5}P_1$ and $A_{0.5}P_2$ beads variations had spherical shape, and intermediate textural properties. The $A_{0.5}P_3$ bead variation displayed the highest textural properties and lowest sphericity, and was the one that provided the best protection to the entrapped *Lb. casei* in yoghurt during storage time.

4. Conclusions

The use of alginate–pectin binary blends permits the obtention of beads which improve the protection to entrapped *Lb. casei* against adverse environmental factors than those made with alginate or pectin on their own. The textural properties, the physical properties and the entrapment efficiency of the alginate–pectin beads are greatly affected by the total biopolymer concentration and the ratio used between both biopolymers. High total biopolymers concentration yields beads with greater cell entrapment efficiency. Alginate–pectin ratios between 1:2 and 1:4 provided beads that were more spherical, with intermediate textural properties; an increase in the alginate–pectin ratio to 1:6 provided beads with the highest textural properties and lowest sphericity, which protected best the entrapped *Lb. casei* against sequential exposure to gastric juice and bile salts, and in yoghurt during storage time. Thus, the selection for a given type of bead for entrapping *Lb. casei* must be done in terms of the functional properties desired from the beads in terms of initial cell entrapment, survivability in yoghurt with storage time or survivability in gastric juice and bile salts conditions. The mean decaying time and the asymptotic survival rate constants are important parameters for understanding the loss in viability of *Lb. casei* cells during yoghurt storage. Survival to acid and bile conditions of encapsulated *Lb. casei* decreased significantly ($p \leq 0.05$) for all of the treatments, but the $A_{0.5}P_3$ bead variation provided the best protection.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia de Mexico (CONACyT) for the partial financing of this project through Grant 81157-U.

References

- Adhikari, K., Mustapha, A., & Grün, I. U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, 68, 275–280.
- Anal, A., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240–251.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., et al. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London (Ontario, Canada), April 30 and May 1. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

- Artigian, J. M., Corrieu, G., & Lacroix, C. (1997). Rheology of pure and mixed kappa-carrageenan gels in lactic acid fermentation conditions. *Journal of Texture Studies*, 28, 47–70.
- Bourne, M. C. (2002). *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (2nd ed.). New York, NY: Academic Press.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27–35.
- Choonara, Y. E., Pillay, V., Singh, N., & Ndesendo, M. K. (2008). Chemometric, physicochemical and rheological analysis of the sol–gel dynamic and degree of crosslinking of glycosidic polymers. *Biomedical Materials*, 3, 1–15.
- Diaz-Rojas, E. I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., Valdez, M. A., Ribaudó, M., et al. (2004). Linseed pectin: Gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*, 18, 293–304.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinary, K., Funami, T., & Williams, P. A. (2008). Binding behaviour of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, 72, 334–341.
- Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35–45.
- Health Canada (2009). Guidance document. The use of probiotic microorganisms in food. Food directorate – Health products and food branch. 8pp. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/legislation/probiotics_guidance-orientation_probiotiques-eng.pdf> Accessed 20.05.09.
- Kailasapathy, K., Perera, C., & Phillips, M. (2006). Evaluation of alginate–starch polymers for preparation of enzyme microcapsules. *International Journal of Food Engineering*, 2(2) (article 8).
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survival of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 737–743.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39, 177–183.
- Lian, W. C., Hsiao, H. C., & Chou, C. C. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 293–301.
- Liu, L., Fishman, M. L., Kost, J., & Hicks, K. B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 24, 3333–3343.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1–7.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2005). Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15, 921–927.
- Muthukumarasamy, P., Allan, P. W., & Holley, A. R. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1), 20–24.
- Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, 15, 505–515.
- Pillay, V., & Fassihi, R. (1999a). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics. *Journal of Controlled Release*, 59, 229–242.
- Pillay, V., & Fassihi, R. (1999b). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets. *Journal of Controlled Release*, 59, 243–256.
- 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.
- Rasband, W. S. (2007). ImageJ, Image processing and analysis in java U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>> Accessed 26.06.01.
- Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., & Champagne, C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*, 22, 603–619.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microstructure and texture of yoghurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 151–159.
- Shah, N. P. (2000). Symposium: Probiotic bacteria. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Food Science*, 83, 894–907.
- Shah, N., & Jelen, P. (1990). Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *Journal of Food Science*, 55, 506–509.
- Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Micro-encapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 83, 894–907.
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T., & Heymann, H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76, 1902–1907.
- Shin, H. S., Lee, J. H., Pestka, J. J., & Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Science*, 83, 884–887.
- Smidsrod, O., & Skjak-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71–78.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47–55.
- Sun, W., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 17–25.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). A review of oxygen toxicity in probiotic yoghurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 117–124.



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“EMPAQUES BIOACTIVOS DE LIBERACIÓN ESPECÍFICA
EN EL COLON Y SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS LÁCTEOS
FUNCIONALES”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA
OFELIA SANDOVAL CASTILLA**

CoDirección:

**DR. E. JAIME VERNON CARTER
DRA. CONSUELO S. O. LOBATO CALLEROS**

Asesor:

DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO

México, D.F. febrero 2010

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado de **CONACYT** y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el No. de registro 0470-01/Doctorado en Biotecnología

México, D.F. febrero de 2010

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

“EMPAQUES BIACTIVOS DE LIBERACIÓN ESPECÍFICA EN EL COLON Y SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS LÁCTEOS FUNCIONALES”

Que presentó

Ofelia Sandoval Castilla

Comité Tutorial:

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

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

Asesor: Dr. Hugo S. García Galindo
Instituto Tecnológico de Veracruz

Comité Evaluador:

Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa

Secretario: Dra. María Eva Rodríguez Huevo

Vocal: Dr. Juan Orozco Villafuerte

Vocal: Dra. Leticia Buendía González

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, mi guía espiritual, por darme la salud, la fortaleza y la perseverancia para culminar este proyecto.

Al Dr. Jaime Vernon Carter, por guiarme en este camino, por su confianza en mí, por su apoyo en la realización de este proyecto y.... porque sé que siempre recibiré su apoyo de antemano, gracias.

A la Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros, porque siempre ha caminado a mi lado en mi formación académica, motivándome; por su preocupación, por estar siempre disponible, por sus consejos y paciencia en la escritura de la tesis y por ser una gran amiga.

A mi Cesarito, porque siempre estás conmigo, porque apoyas mis decisiones y me ayudas en la talacha de los experimentos, soportas la discusión, mi mal humor y me haces reír cuando estoy triste.....Te amo.

A la Biol. Yolanda Hornelas Orozco investigadora del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por su permanente disposición, por su apoyo en el análisis de la microestructura y paciencia en todos los intentos.

Al Dr. Jesús Álvarez Ramírez, por su apoyo en la escritura del artículo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioprocesos (T-166) que a lo largo del desarrollo de mi investigación, (tanto los que ya se fueron como los que se quedan), han sido parte de mi vida cotidiana y que de vez en cuando ayudaron a desconectarme, por su ayuda, por las risas, pero sobre todo, por ser más amigos que compañeros de trabajo.

Al comité evaluador, por su interés en la revisión del documento, valiosas aportaciones y acertadas correcciones en el documento final.

A la Universidad Autónoma Chapingo por facilitarme las instalaciones para el desarrollo de algunos experimentos.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa por mantener la calidad de enseñanza, por la dedicación de su profesorado y abrirme sus puertas.

A CONACYT, por el parcial financiamiento a este proyecto a través del convenio 81157-U y por el apoyo brindado a través de la beca del Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana.

A todos, gracias.

Dedicada en especial a

A la memoria de mi padre, hombre excepcional y admirable

*Como muestra de mi gratitud por los valores que sembró en mí,
por su confianza, apoyo, amor, desvelos y más... a mi madre*

*Con cariño a mis hermanos Lupita, Guillermo, Víctor y Misael
por alentarme*

A ti Cesarito, porque estás en mi corazón y eres mi fortaleza

y a mis grandes amigos por su lealtad.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	01
2. ANTECEDENTES.....	04
2.1. Microorganismos probióticos.....	04
2.1.1. Definición.....	04
2.1.2. Probióticos y la microflora normal del intestino humano.....	05
2.1.3. Beneficios a la salud atribuidos a los probióticos.....	08
2.2. Bacterias probióticas.....	08
2.2.1. Criterios para la selección de microorganismos probióticos.....	08
2.2.2. <i>Lactobacillus casei</i>	10
2.2.3. Adición de probióticos en alimentos y factores que afectan su sobrevivencia.....	12
2.3. Destino del tránsito de los probióticos en el colon.....	15
2.3.1. Fisiología del tracto gastrointestinal y sobrevivencia de probióticos....	15
2.4. Microencapsulación.....	17
2.4.1. Métodos de encapsulación.....	18
2.4.2 Método de extrusión.....	20
2.4.3 Materiales utilizados para encapsulación.....	22
Alginato.....	24
Pectina.....	27
2.4.4 Resistencia de biopolímeros a condiciones gastrointestinales.....	31
2.4.5. Encapsulación de organismos probióticos.....	32

3. JUSTIFICACION.....	35
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. Objetivo General.....	36
4.2. Objetivos Específicos.....	37
5. HIPÓTESIS.....	38
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
6.1. Ubicación del trabajo.....	39
6.2. Materiales utilizados.....	39
6.3. Cultivo de <i>Lb. casei</i> y preparación del concentrado celular.....	40
6.3.1. Crecimiento de <i>Lb. casei</i>	40
6.3.2. Obtención de células de <i>Lb. casei</i> a encapsular.....	41
6.4. Preparación de dispersiones de biopolímeros.....	41
6.5. Encapsulación de <i>Lb. casei</i>	42
6.5.1. Elaboración de cápsulas por el método de extrusión.....	42
6.5.2. Caracterización de cápsulas conteniendo <i>Lb. casei</i>	43
6.5.3. Recuento de <i>Lb. casei</i> encapsulado.....	45
6.5.4. Eficiencia de encapsulación.....	45
6.6. Sobrevivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado en yogur.....	46
6.6.1. Elaboración de yogur bajo en grasa.....	46
6.6.2. Enumeración de <i>Lb. casei</i> encapsulado en yogur.....	46
6.6.3. Tasa de sobrevivencia.....	47
6.7. Sobrevivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas.....	47
6.7.1. Sobrevivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado a jugo gástrico simulado.....	47
6.7.2. Sobrevivencia de <i>Lb casei</i> encapsulado a jugo gástrico y sales biliares	48
6.8. Análisis estadístico.....	49
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1. Curva de crecimiento de <i>Lb. casei</i>	50
7.2. Morfología, diámetro y rendimiento de las cápsulas.....	51

7.2.1 Morfología.....	51
7.2.2 Diámetro.....	53
7.2.3 Rendimiento.....	54
7.2.4 Microestructura de las cápsulas.....	55
7.3. Propiedades texturales de las cápsulas.....	61
7.4. Eficiencia de encapsulamiento de <i>Lb. casei</i>	62
7.5. Supervivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado en yogur.....	63
7.6. Supervivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas.....	68
7.7. Interrelación entre la supervivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado en yogur y condiciones gastrointestinales simuladas y las propiedades físicas y de las texturales cápsulas.....	70
8. CONCLUSIONES.....	73
9. REFERENCIAS.....	74
10. ANEXOS.....	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lactobacillus casei</i>	11
Figura 2. Método de encapsulación por extrusión.....	20
Figura 3. Estructura química de cadenas de (a) galacturonato y (b) guluronato.....	25
Figura 4. Formación de geles de alginato con sales cálcicas, modelo “egg-box”.....	26
Figura 5. (a) Segmento repetido de la molécula de pectina y sus grupos funcionales: (b) carboxilo; (c) ester y (d) amida.....	28
Figura 6. Modelo de la gelación de las pectinas de bajo metoxilo amidadas mostrando interacciones entre residuos de ácido galacturónico y, enlaces hidrógeno entre residuos de ácido galacturónico amidado	29
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>Lb. casei</i> en caldo MRS no adicionado de ácido ascórbico (—□—) y en caldo MRS adicionado con ácido ascórbico (—○—), a 37°C.	50
Figura 8. Micrografías representativas de las variaciones de cápsulas obtenidas en un microscopio de contraste de fases:.....	52
Figura 9. Micrografía MEB representativa de una cápsula (A _{0.5} P ₀) fracturada, p: pared interna de la cápsula, c: centro de la cápsula. Ampliación 2500 ×.....	57
Figura 10. Micrografía MEB representativa de una cápsula (A _{0.5} P ₁) fracturada, p: pared exterior de la cápsula, c: centro de la cápsula. Ampliación 500 ×.....	58
Figura 11. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A _{0.5} P ₀). Ampliación 5000 ×.....	58
Figura 12. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A ₀ P ₂). Ampliación 5000 ×.....	59
Figura 13. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A _{0.5} P ₁). Ampliación 5000 ×.....	59

Figura 14. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A _{0.5} P ₂). Ampliación 5000 ×.....	60
Figura 15. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A _{0.5} P ₃). Ampliación 5000 ×.....	60
Figura 16. Tasas de sobrevivencia y modelos ajustados para <i>Lb. casei</i> contenido en las cápsulas A _{0.5} P ₀ e incorporado en yogur almacenado durante 20 días a 4 °C.....	65
Figura 17. Tasas de sobrevivencia y modelos ajustados para <i>Lb. casei</i> contenido en las cápsulas A _{0.5} P ₃ e incorporado en yogur almacenado durante 20 días a 4 °C.....	65
Figura 18. Efecto de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares sobre la sobrevivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado en las diferentes variaciones de cápsulas y células libres.....	68
Figura 19. Efecto de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares sobre la viabilidad: inicial (□) y final (▣) de <i>Lb. casei</i> encapsulado y células libres.....	69
Figura 20. Análisis de componentes principales de las propiedades texturales de las cápsulas y sobrevivencia de <i>Lb. casei</i> en el almacenamiento de yogur y en condiciones gástricas simuladas.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Beneficios de los probióticos a la salud del ser humano y probables mecanismos subyacentes.....	07
Tabla 2. Bacterias probióticas reconocidas y comúnmente usadas en la industria alimentaria.	09
Tabla 3. Alimentos suplementados con bacterias probióticas.....	13
Tabla 4. Propiedades de algunos métodos para la encapsulación de probióticos.....	19
Tabla 5. Materiales utilizados para la encapsulación de bacterias probióticas.....	23
Tabla 6. Concentraciones de alginato y pectina presentes en las dispersiones acuosas usadas para la preparación de las cápsulas conteniendo <i>Lb. casei</i>	42
Tabla 7. Valores medios (\pm DE) de las características físicas, rendimiento y eficiencia de encapsulamiento de las cápsulas.....	53
Tabla 8. Valores medios (\pm DE, n=9) de las propiedades texturales de las variaciones de cápsulas.....	61
Tabla 9. Valores medios (\pm DE, n=9) de viabilidad y sobrevivencia de <i>Lb. casei</i> encapsulado, durante el almacenamiento de yogur.....	64
Tabla 10. Parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales para la tasa de sobrevivencia <i>Lb. casei</i> encapsulado en yogurt almacenado 20 días a 4 °C.	66

“EMPAQUES BIOACTIVOS DE LIBERACIÓN ESPECÍFICA EN EL COLON Y SU APLICACIÓN EN PRODUCTOS LÁCTEOS FUNCIONALES”

RESUMEN

Lactobacillus casei fue atrapado en cápsulas elaboradas con alginato de sodio (A), pectina de bajo metoxilo amidada (P), y mezclas de A-P (relaciones 1:2, 1:4, 1:6), mediante la técnica de extrusión. Se determinaron el diámetro, la esfericidad y las propiedades texturales de las cápsulas, así como la sobrevivencia de *Lb. casei* atrapado durante el almacenamiento de yogur y bajo condiciones gastrointestinales simuladas (CGS). La eficiencia de atrapamiento de *Lb. casei* y el diámetro de las cápsulas aumentaron cuando la proporción de P y la concentración total de biopolímeros se incrementaron. Los resultados del Análisis de Componentes Principales indicaron que la sobrevivencia de *Lb. casei* durante el almacenamiento de yogur, estuvo correlacionada positivamente con el diámetro y las propiedades texturales de las cápsulas; mientras que la sobrevivencia de *Lb. casei* después de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares de manera secuencial, estuvo correlacionada positivamente con la esfericidad de las cápsulas. Las cápsulas elaboradas con las mezclas A-P en relaciones de 1:4 y 1:6, proporcionaron significativamente mejor protección a *Lb. casei* atrapado bajo todas las condiciones estudiadas.

Palabras clave: probióticos; encapsulación; atrapamiento; alginato; pectina de bajo metoxilo amidada; yogur; condiciones gastrointestinales simuladas.

ABSTRACT

Lactobacillus casei was entrapped in beads made with sodium alginate (A), amidated low-methoxyl pectin (P), and blends of A-P (1:2, 1:4, 1:6 ratios) by the extrusion technique. Diameter, sphericity and textural properties of the beads and the survivability of entrapped *Lb. casei* during yoghurt storage and in simulated gastrointestinal conditions (SGC) were determined. Entrapment efficiency of *Lb. casei* and diameter of the beads increased as the proportion of P and the total biopolymers concentration increased. The results of Principal Component Analysis showed that the survivability of *Lb. casei* during yoghurt storage, and in simulated gastric juice, was positively correlated with the diameter and all the textural properties of the beads; while survivability of *Lb. casei* after exposure to simulated gastric juice and bile salts was positively correlated with the sphericity of the beads. The beads made with A-P blends in 1:4 and 1:6 ratios provided a significant better protection to the entrapped *Lb. casei* under all conditions studied.

Keywords: probiotics; encapsulation; entrapped; alginate; amidated low methoxyl pectin; yoghurt; simulated gastrointestinal conditions

1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la población prefiere prevenir que curar enfermedades (Talwalkar y Kailasapathy, 2004). La dieta es una buena estrategia para mantener una salud óptima a través de la vida y prevenir las enfermedades crónico-degenerativas que la población va presentando cuando la edad avanza, tales como desórdenes gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003).

En este sentido, la divulgación de los beneficios a la salud que tiene el consumo de las bacterias probióticas sobre enfermedades cardiovasculares, urogenitales, trastornos digestivos por *Helicobacter pylori*, cáncer, alergias, entre otras (Ouwehand y Vesterlund, 2003), ha impulsado a grandes progresos y el número de alimentos incorporados con probióticos que son puestos a disposición de los consumidores es mayor cada vez (Anal y Singh, 2007).

Los probióticos son considerados como “microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando son administrados en cantidades adecuadas” (Araya, Morelli, Reid, Sanders, Stanton, Pineiro y Ben-Embarek. 2002). Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001, Tannock, 2002).

Tradicionalmente, el yogur es elaborado utilizando *Streptococcus thermophilus* y *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* como cultivos iniciadores; éstos sin embargo, no son habitantes naturales del intestino, por lo que se incorporan cepas probióticas como *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* o ambos (Shah, 2000).

El número de bacterias probióticas disminuye como resultado de la acción del procesamiento y condiciones de almacenamiento del alimento que las contiene, y al ser

ingeridas, debido a la acción ejercida por jugos gástricos y sales biliares., de esta manera se demerita su efecto benéfico al consumidor. Se ha señalado que las bacterias probióticas muestran pobre sobrevivencia en leches fermentadas y yogur, como consecuencia de su baja tolerancia a la exposición de medios muy ácidos y aireados (Muthukumarasamy, Allan y Holley, 2006).

La microencapsulación ha sido reconocida como una alternativa para proteger microorganismos de ambientes de alta acidez durante el almacenamiento de los alimentos que los contienen, así como de las condiciones que enfrentan durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal (Sun y Griffiths, 2000; Anal y Singh, 2007). La microencapsulación es un proceso por el cual las células son retenidas dentro de una matriz encapsulante o membrana.

Entre los materiales encapsulantes ampliamente utilizados, se encuentra el alginato, heteropolisacárido lineal de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico, extraído a partir de diferentes especies de algas, que es barato, de uso simple y biocompatible. Cápsulas de alginato (1-3 μm de diámetro) conteniendo bacterias, pueden ser formadas usando la técnica de extrusión (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2003). No obstante, los geles de alginato son susceptibles a desintegración en presencia de exceso de iones monovalentes, agentes quelantes (Ca^{2+}) y ambientes químicos hostiles (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990).

Algunos autores han informado que los alginatos pueden formar complejos fuertes con otros poli-electrolitos, tales como pectina (también un poliuronato), mediante asociaciones cadena-cadena y la formación de hidrogeles tras la adición de cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}), (Pillay y Fassih, 1999a; Fang, Al-Assaf, Phillips, Nishinary, Funami y Williams, 2008). La formación de tales complejos mejora la estabilidad química y mecánica de las cápsulas de alginato, y consecuentemente también la capacidad de entrapamiento (Pillay y Fassih, 1999b).

Se ha informado que el tamaño de partícula de las cápsulas influye de manera importante sobre la sobrevivencia de los microorganismos probióticos. Sheu, Marshall y Heymann (1993), encontraron que la sobrevivencia de *Lb. bulgaricus* entrampado en cápsulas de alginato adicionadas en postres congelados, fue significativamente mayor en aquellas cápsulas con 30 -102 μm de diámetro, en comparación con la observada en cápsulas con un diámetro de 15 μm .

Estos autores indicaron también que un diámetro medio de las cápsulas de 30 μm fue deseable, debido a que cápsulas más grandes causaron una textura granulosa en el helado; mientras que aquellas más pequeñas no proveyeron suficiente protección a las bacterias encapsuladas. La adición de *Bifidobacterium longum* en cápsulas de κ -carragenina, a yogur en una concentración de 10 % (p/v), causó una respuesta desfavorable hacia su consumo, debido a la textura granulosa resultante (Adhikhari, Mustapha y Grün, 2003).

Por su parte, Hansen, Allan-Wotjas, Jin y Paulson (2002), establecieron que cápsulas de alginato deberían tener un diámetro de al menos 100 μm , para prevenir la reducción en la viabilidad de *Bifidobacterium* bajo la acción de jugos gástricos simulados. Chandramouli, Kailasapathy, Peiris y Jones (2004), encontraron que la viabilidad de las células en las cápsulas de alginato incrementa con un incremento en el tamaño de la cápsula y la concentración de geles.

Con base en lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron: a) Entrampar *Lb. casei* en cápsulas elaboradas con alginato de sodio (A), pectina de bajo metoxilo amidada (P), y mezclas de A-P en relaciones 1:2, 1:4, 1:6, por la técnica de extrusión, y b) Determinar las posibles interrelaciones entre la composición y las propiedades morfológicas y mecánicas (diámetro, esfericidad y propiedades texturales) de las cápsulas; así como las posibles interrelaciones entre las propiedades morfológicas y físicas de las cápsulas con la sobrevivencia de *Lb. casei* entrampado durante el almacenamiento de yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Microorganismos probióticos

2.1.1. Definición

Ferdinand Vergin introdujo en 1954 el término “probiótico”, al comparar, en un escrito titulado “Anti- und Probiotika”, los efectos deletéreos de los antibióticos y otras sustancias antimicrobianas sobre la flora, con los efectos favorables (“Probiotika”) de las bacterias benéficas. Este concepto se fue variando a través de la historia, y si bien se han dado muchas definiciones, la que se emplea en la actualidad es la establecida por la FAO: Los probióticos pueden ser considerados como “microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped” (Araya, Morelli, Reid, Sanders, Stanton, Pineiro y Ben-Embarek, 2002).

En otras palabras, el consumo de probióticos podría impactar positivamente el balance de la microflora intestinal. No hay duda que bajo condiciones normales, un adulto saludable tiene en balance la microflora intestinal, pero la dieta, los antibióticos, el estrés y los desórdenes gastrointestinales pueden causar cambios significativos en el balance natural del adulto, causando un decremento en el número de los beneficios que otorgan las bacterias probióticas (Hoover, 1993). La ingesta de suplementos y/o alimentos con probióticos tiene como objetivo reparar las deficiencias en la microflora intestinal y lograr obtener un efecto protector (Lavermicocca, Valerio, Lonigro, De Angelis, Morelli y Callegari, 2005).

2.1.2. Probióticos y la microflora normal del intestino humano

La microflora normal del tracto digestivo humano constituye un ecosistema altamente complejo, dependiente de la fisiología del hospedero y de las interacciones entre bacterias. Parecería ser que dentro de un organismo vivo, las bacterias se han adaptado a las condiciones de cada segmento del tracto digestivo, recreando y manteniendo allí una atmósfera anaeróbica (Blaut, 2002). Como las condiciones medioambientales evolucionan a lo largo del circuito intestinal, se observan poblaciones bacterianas específicas que difieren de cada segmento a otro del tracto digestivo. El pH es de 6.4 en el colon ascendente, sube en el colon transversal y se hace neutral en el colon descendente.

La variedad de pH dentro del colon es un factor importante que determina la naturaleza de la flora microbiana en el tracto gastrointestinal. Se ha estimado que el tracto gastrointestinal del adulto tiene cerca de 10^{14} bacterias viables de más de 500 especies, aunque cuantitativamente predominan de 10 a 20 géneros; por ejemplo: *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia* y *Veillonella* (Isolauri, Kirjavainen y Salminen, 2002).

La microflora del estómago humano está predominantemente compuesta de bacterias gram positivo, ácido-resistentes y anaerobias, incluyendo estreptococos y lactobacilos y varios fungi. En el individuo sano, el estómago y el duodeno están poco colonizados (entre 10^1 y 10^4 células ml^{-1}), puesto que las condiciones ácidas y variaciones de pH del estómago (pH en el rango de 2.5 a 3.5) son poco favorables (Tannock, 1995, 2002), al igual que el tránsito, que deja poco tiempo para que las bacterias se adhieran.

El intestino delgado conforma una zona de transición entre el estómago y el colon; en esta parte, estreptococos y lactobacilos están presentes en concentraciones de 10^6 - 10^7

células ml⁻¹; la motilidad del intestino y el efecto inhibitorio de las sales biliares son los factores que mayormente previenen el sobre-crecimiento de las bacterias en el intestino delgado. La población bacteriana aumenta en las zonas más alejadas del intestino delgado (entre 10⁴ y 10⁸ células ml⁻¹) (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003).

El colon es la región más colonizada, las bacterias dominantes incluyen anaerobias: *Bacteroides*, *Eubacterim*, *Peptosneprococ* y *Clostridium*, que forman el 99% de la microflora total (cerca de 400 especies), con concentraciones máximas que pueden alcanzar hasta 10¹² células g⁻¹ esencialmente a nivel del ciego, que es un punto de intensa fermentación. Algunas especies subdominantes (10⁶-10⁸ células g⁻¹) incluyen *Eschenchia coli*, *Lactobacilli*, y *Streptococci*.

Otras especies muestran fluctuaciones en la proporción y presencia en la microflora total y aún más a nivel del colon. La complejidad de la población microbiana en el tracto gastrointestinal tiene una influencia significativa sobre la bioquímica, fisiología, inmunología y resistencia a enfermedades del hospedero. Esta microflora del colon obtiene su energía mediante la fermentación de sustancias que no son digeridas por el intestino delgado, tales como di-, tri- u oligo- sacáridos y polisacáridos (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003).

Aunque el papel de la microflora normal no está completamente entendido, es ampliamente aceptado que algunas bacterias del intestino tienen beneficios a la salud; un ejemplo de ello es lo que se ha denominado la "resistencia a la colonización" o "efecto de barrera", en referencia al mecanismo que utilizan las bacterias ya presentes en el intestino para mantener su presencia en ese medio y evitar la colonización de esas mismas zonas intestinales por microorganismos patógenos. Por consiguiente, cabe suponer que la manipulación alimentaría de la microflora intestinal con objeto de aumentar el número relativo de "bacterias probióticas" podría contribuir al bienestar del huésped. (Gibson y Roberfkoid, 1995).

Tabla 1: Beneficios de los probióticos a la salud del ser humano y probables mecanismos subyacentes

Función	Problema de salud sobre el que pueden actuar los probióticos	Mecanismo de acción de los probióticos propuesto
Confort digestivo	Síndrome del colon irritable, estreñimiento, diarrea no patógena, hinchazón, flatulencias, calambres, mal aliento de Intolerancia a la lactosa	Alteración de la población o de la actividad de la microflora intestinal Liberación de β -galactosidasa en el intestino Translocación, efecto barrera
Defensa	Alergia (eczema atópico, alergia a la leche, poliartritis reumatoide)	Modificación de la población, de la actividad de la microflora oral o de su capacidad para adherirse
	Cariogenecidad	Absorción del mutágeno, estimulación inmunitaria, inhibición de la producción
	Carcinogenicidad, mutagenicidad, tumor	Carcinógena de la microflora intestinal
	Diarreas asociadas a los antibióticos, diarreas por <i>Rotavirus</i> , colitis por <i>C. difficile</i> , diarreas nosocomiales <i>Helicobacter pylori</i>	Exclusión competitiva, translocación/efecto barrera, respuesta inmunitaria favorecida Actividad antipatogénica por diversas cepas de <i>Lb. acidophilus</i>
Otras	Inmunomodulación (estado inmunitario, respuesta a las vacunas)	Interacción con las células inmunitarias
	Inflamación intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, pouchitis	Ponderación de la respuesta inmunitaria
	Crecimiento excesivo de las bacterias intestinales	Actividad antimicrobiana, exclusión competitiva
	Vaginosis, infecciones urinarias	Actividad antipatogénica, exclusión competitiva
	Reducción de la colesterolemia	Desconjugación de los ácidos biliares
	Endotoxemia asociada a una cirrosis	Inhibición de la producción de endotoxinas por la microflora intestinal
	Hipertensión	Componentes celulares o péptidos de la fermentación que actúan como inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina
	Cálculos renales	Alteración de la flora digestiva susceptible de influenciar la degradación del oxalato

2.1.3. Beneficios a la salud atribuidos a los probióticos

Los efectos benéficos de los probióticos sobre el ser humano, consisten principalmente en la reducción de uno o varios factores de riesgo de enfermedad o bien en la mejora de sus funciones fisiológicas. Cada especie, e incluso cada cepa, ofrecen un beneficio para la salud más o menos acentuado. Entre los efectos que se han identificado se encuentran los mencionados por Kullcami y Reddy (1994); Gardiner, Bouchier, O'Sullivan, Kelly, Collins, Fitzgerald (2002); Sanders (2003) listados en la Tabla 1.

2.2. Bacterias probióticas

2.2.1. Criterios para la selección de microorganismos probióticos

El impacto que tienen los probióticos adicionados a alimentos depende de la habilidad del cultivo para sobrevivir hasta la fecha límite de consumo y de colonizar y crecer en el intestino del consumidor. Para mejorar los beneficios potenciales de la ingesta de microorganismos probióticos, se ha sugerido que éstos cumplan ciertos criterios:

- Ser habitantes originales del intestino humano
- No ser patógenos, ni generar sustancias tóxicas para el huésped
- Ser capaces de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal
- Ser capaces de adherirse al epitelio intestinal
- Tener la capacidad de ejercer un efecto benéfico en el huésped
- Resistir los ácidos biliares
- Resistir los ácidos estomacales y sus enzimas proteolíticas
- Soportar cambios bruscos de pH (González y Gómez, 2004).

Los grandes retos que se enfrentan son mantener la viabilidad de los probióticos en los alimentos hasta su consumo y mejorar su resistencia a las condiciones del tracto

gastrointestinal antes de llegar al colon; sin embargo, su sensibilidad a condiciones ácidas y aireadas hace difícil su cultivo, sobrevivencia en alimentos y durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal.

La cantidad mínima de probióticos, recomendada por diversos institutos de investigación y asociaciones 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, Gavara y Lagaron, 2006).

Tabla 2. Bacterias probióticas reconocidas y comúnmente usadas en la industria alimentaria.

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>otros</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis, Ent. Faecium, Ent.</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Francium</i>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Streptococcus cremoris, St. salivarius, St.</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>diacetylactis, St. intermedius</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lb. cellobiosus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>B. essensis</i>	<i>Escherichia coli Nissle</i>
<i>Lb. lactis</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. reuteri</i>		
<i>Lb. brevis</i>		

Los microorganismos encontrados en los diferentes productos comerciales son reconocidos por sus efectos benéficos (Isolauri, Juntunen, Rautanen, Sillanaukee y Koivu., 1991; Gibson y Roberfroid, 1995; Boyle y Tang, 2006), sin embargo al no entregar la

dosis recomendada, no se logra el beneficio al hospedero. En la tabla 2 se listan algunas bacterias consideradas como probióticos de acuerdo a Senok, Ismaeel, y Botta (2005); Parvez, Malik, Kang y Kim (2006) y Shah (2007).

2.2.2. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un microorganismo gram positivo encontrado en el tracto reproductivo e intestinal de los humanos y animales (Kandler y Weiss, 1986). *Lb casei* tiene forma de bacilos cortos y coreniformes con dimensiones de 0.7-1.1×2.0-4.0µm (Figura 1); frecuentemente con tendencia a formar cadenas, pero sin movimiento. *Lb casei* puede ser distinguido por su capacidad de crecer en sustratos de gluconato, malato y pentitoles (Lee, 1999). El crecimiento de estos microorganismos ocurre a una temperatura de 15 °C, pero no a 45 °C, siendo las temperaturas óptimas de 30 a 37 °C. *Lb. casei* es aerotolerante, pero su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaerobias.

Lb. casei es considerada como una bacteria heterofermentativa facultativa, debido a su capacidad para fermentar hexosas por la vía Embden-Meyerhof, hasta ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico, bajo limitantes de glucosa. *Lb. casei* también puede fermentar pentosas hasta ácido láctico y ácido acético por la vía de fosfoetanolona inducible (Axelsson, 1998) y puede utilizar citrato como fuente de energía. *Lactobacillus casei ss. casei*, cepa utilizada en este estudio, presenta un buen crecimiento en caldo MRS (DE MAN, ROGOSA Y SHARPE) y agar MRS, a una temperatura de incubación de 37 °C durante 3 días o bien a 30 °C por 5 días (Merck, 1994).

Lb casei es frecuentemente encontrado en ecosistemas alimenticios, tales como leche, quesos, leches fermentadas, vegetales frescos y fermentados y carne Erdoğan y Erbilir (2006), debido a que además de sus beneficios a la salud del consumidor, su

actividad metabólica genera sabores característicos y ejerce un efecto preservativo sobre los productos fermentados (Gobbetti, 1999).

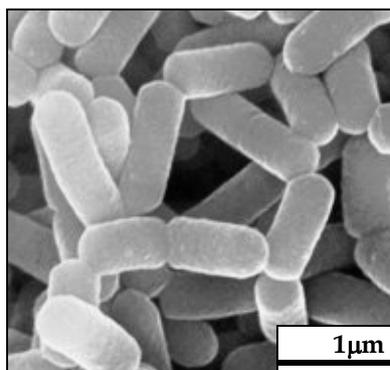


Figura 1. *Lactobacillus casei*

Se han estudiado diferentes cepas de *Lb. casei* con funciones probióticas; y han encontrado que algunas de ellas mostraron capacidad de adherencia y colonización en el duodeno (Minelli, Benini, Marzotto, Sbarbati, Ruzzenente, Ferrario, Hendriks y Dellaglio, 2004); por ejemplo, la cepa Shirota de *Lb. casei* moduló la composición y actividad metabólica de la flora intestinal (Tuohy, Pinart-Gilberga, Jones, Hoyles, McCertney y Gibson, 2006), además mostró eficacia frente a infecciones intestinales en niños producidas por rotavirus (Matsuzaki, 1998); *Lb. casei* ASCC 292 removió el colesterol a través de diferentes mecanismos en la presencia de fructooligosacaridos (FOS) prebióticos y maltodextrina (Loing y Shah , 2005), *Lb. casei* DN-114 001 redujo los episodios de diarrea en niños después de 6 meses de consumo (Pedone, Arnaud, Postaire, Bouley y Reinert, 2000).

Por lo mencionado anteriormente, se hace necesario asegurar que *Lb. casei* sobreviva en los sistemas alimenticios a los que se incorpore y de esta manera ejerza los potenciales beneficios al huésped.

2.2.3. Adición de probióticos en alimentos y factores que afectan su sobrevivencia

A partir del reciente interés en los probióticos, diferentes alimentos han sido propuestos como acarreadores de microorganismos probióticos (Stanton, Gardiner, Lynch, Collins, Fitzgerald y Ross, 1998) para que los consumidores puedan ingerir una alta cantidad de células viables y así poder obtener el efecto terapéutico. Algunos alimentos que han sido utilizados para incorporar probióticos se muestran en la Tabla 3.

La dieta-sustrato es uno de los factores más importantes para regular la colonización de microorganismos en el tracto gastrointestinal, debido a que el alimento actúa como un amortiguador para las bacterias a través del estómago y puede contener otros ingredientes funcionales que pueden interactuar con los probióticos y alterar su funcionalidad.

Existe un obvio potencial efecto sinérgico cuando prebióticos y probióticos son combinados apropiadamente, pues los primeros promueven el crecimiento y la actividad de los segundos. Muchos alimentos contienen prebióticos de forma natural, muchos otros pueden ser fortificados durante la manufactura para incrementar la eficiencia de los efectos benéficos (Dinakar y Mistry, 1994; Kailasapathy y Rybka, 1997; Bomba, Joncova, Koscova, Nemcova, Gancarcicova y Mundronova, 2006).

Originalmente, la ingesta de probióticos está asociada con los alimentos lácteos considerados vehículos ideales para la liberación de bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal (Ross, Fitzgerald, Collins, y Stanton, 2002), no obstante, la fortificación de sistemas alimenticios diferentes a su fuente original y suplementos alimenticios puede llevar a la reducción en la eficiencia funcional debida a la exclusión del potencial sinérgico con los productos lácteos, por lo que, la selección del alimento es un factor importante para fortificar con probióticos (Ranadheera, Baines, Adams, 2009).

Tabla 3. Alimentos suplementados con bacterias probióticas

Alimento/forma en la que se incorporaron las bacterias probióticas	Referencia(s)
leche descremada adicionada con oligosacáridos e inulina/células libres	Shin, Lee, Pestka y Ustunol (2000)
fórmulas lácteas /células libres	Dubey y Mistry (1996)
chocolate oscuro /células libres	Nebesny, Zyzelewicz, Motyl y Libudzisz (2007)
mayonesa/células libres y encapsuladas en alginato	Khalil y Mansour (1998)
queso Pikantne /células libres	Songisepp, Kullisaar, Hütt, Elias, Brilene, Zilmer, y Mikelsaar (2004)
queso Cheddar/células libres	Gómez y Malcata (1998); Gardiner, Stanton, Lynch, Collins, Fitzgerald y Ross (1999), Ong, Henriksson y Shan (2006)
queso Cheddar/células encapsuladas en alginato-pectina	Madziva, Kailasapathy y Phillips (2006)
queso blanco en salmuera/células encapsuladas en	Özer, Kirmaci, Şenel, Atamer y Hayaloğlu (2009)
queso fresco bajo en grasa/células libres	Mahnet, Kirin, Kos, Frece, Suskovic (2004)
queso de suero /células libres	Madureira, Giao, Pintado, Gomes, Freitas y Malcata (2005); Madureira, Pereira, Truszkowska, Gomes, Pintado y Malcata, (2005)
queso blanco/células libres	Kasimoğlu, Göncüoğlu y Akgün (2004),

...continuación. Tabla 3	
queso cottage/células libres	Blanchette y Roy (1995); Blanchete, Roy, Belanger y Gauthier (1996)
queso duros a partir de leche de cabra/células libres	Kalavrouzioti, Hatzikamari, Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis (2005)
queso Crescenza/células libres y entrapadas en geles de alginato	Gobbetti, Corsetti, Smacchi, Zocchetti y Angelis (1998)
queso semi-duro argentino/células libres	Bergamini, Hynes, Quiberoni, Suárez y Zalazar (2005)
queso fresco Minas/células liofilizadas	De Souza, Burity, Behrens y Saad (2007)
queso Canestrato Pugliese /células libres	Corbo, Albenzio, Angelis, Sevi y Gobetti (2001)
bebidas lácteas/células libres	Tripathi y Jha (2004); Oliveira, Sodini, Remeuf, Tissier y Corrieu (2002)
jugos de fruta y leche descremada/células liofilizadas	Saarela, Virkajärvi, Alakomi, Sigvart-Mattila y Mätto (2006)
aderezos/células libres y encapsuladas en alginato	Muthukumarasamy y Holley (2006)
crema cultivada/células libres	Ekinci, Okur, Ertekin y, Guzel-Seydim (2008)
helado/células libres y encapsuladas en alginato	Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei y Corti (2005)
mousse de chocolate/células libres	Aragon-Alegro, Alarcón-Alegro, Cardarelli, Chiu y Saad (2007)
leches fermentadas y yogur/células libres y, en cápsulas de alginato, k-carragenina, proteína de suero, alginato-almidón	Shah y Lankaputhra (1997); Shah, Lankaputhra, Britz, y Kyle, (1995) Dave y Shah (1998); Tandhanskul y Krasaekoopt (2008); Lourens-Hattingh y Vijoen (2001), Lamoureux, Roy y Gauthier (2002); Oliveira, Sodini, Remeuf, Tissier y Corrieu (2002), Schillinger, Guigas y Holzapfel (2005), Calderón, Padilla, Chaves, Villalobos y Arias (2007)
alimentos fermentados tradicionales de África/células en capsulas de gelana-xantana	McMaster, Kokott, Reid y Abratt (2005)

Además Vinderola, Bailo, y Reinheimer (2000), encontraron que 3 % (p/p) de grasa láctea en yogur ejerce un efecto inhibitorio para *B. bifidum* BBI en comparación con yogur descremado (0.2 %); Birollo, Reinheimer y Vinderola (2000) concluyeron que la alta concentración de azúcares en yogur con “dulce de leche”, es un factor inhibitorio para lactobacilos. No solo la composición química, sino también la estructura física de los alimentos es importante en el crecimiento, la sobrevivencia y eficiencia funcional de los probióticos (Kailasapathy, Harmstorf, y Phillips, 2008; Ranadheera, Baines y Adams; 2009).

Las propiedades fisicoquímicas de los alimentos acarreadores usados para la liberación de probióticos, son factores significativos que influyen la sobrevivencia de los probióticos y mejoran su efecto funcional (Kailasapathy y Chin, 2000). Además es importante que estos productos alimenticios sean parte de la dieta diaria normal, y mantengan un nivel mínimo terapéutico (10^7 ufc g^{-1}), para mejor eficiencia en efecto benéfico regulador (Vinderola y Reinheimer, 2003; Gardiner, Bouchier, O’Sullivan, Kelly, Collins y Fitzgerald, 2002).

2.3. Destino del tránsito de los probióticos en el colon.

2.3.1. Fisiología del tracto gastrointestinal y sobrevivencia de probióticos

El tracto gastrointestinal es un tubo digestivo muscular, cuya función es la digestión de alimentos y absorción de nutrientes, electrolitos y fluidos, y previene la absorción de sustancias potencialmente tóxicas. Para llevar a cabo estas funciones, el tracto digestivo está diferenciado en órganos que poseen características únicas (Schneeman, 2002):

Estómago. Su función principal es la digestión de los alimentos proteicos a partir de la secreción de aproximadamente 2.5 l de jugos gástricos cada día en el estómago a un pH entre 1.5 a 3.5 en ayuno y el peristaltismo, por lo que constituye un mecanismo de

defensa sumamente importante. Cuando los probióticos son administrados en individuos sanos, se enfrentan al estrés por alta acidez en el estómago. Los resultados de algunos estudios sobre el efecto del pH gástrico sobre los probióticos han sido informados. Fernández, Boris y Barbés (2003), estudiaron dos cepas humanas *Lb. acidophilus* UO 001 y *Lb. gasseri* UO 002 que presentaron sobrevivencia en condiciones gástricas (pH 2 y presencia de pepsina).

Berrada, Lemeland, Laroche, Thouvenot y Marine Piaia (1991), observaron el comportamiento de dos cepas de bifidobacterias al ser expuestas a ambientes gástricos simulados, una de ellas sobrevivió muy bien (>80%) al ser sometida 90 min a pH 3; mientras que la otra no sobrevivió. Pochart, Marteau, Bouhnik, Goderel, y Rambaud (1992), encontraron pérdida en la viabilidad de bifidobacterias contenidas en leches fermentadas, al ser expuestas a soluciones de pH de 1.0 y 2.0 por 3 h. Carteris, Kelly, Morelli y Collins (1998), concluyeron que mientras la mayoría de las cepas de lactobacilos fueron resistentes a sales biliares, mostraron una pérdida de viabilidad tras la exposición a jugos gástricos (pH 2.).

Intestino delgado. El intestino delgado lleva a cabo la digestión enzimática y absorción. La motilidad intestinal y el efecto inhibitorio de las sales biliares son los factores más importantes para los hospederos en la prevención del sobre-crecimiento en el intestino delgado. Las sales biliares, una compleja solución acuosa de componentes orgánicos e inorgánicos secretados por el hígado del humano, es inhibidor de muchos de los microorganismos que ingerimos.

La resistencia a las sales biliares es considerado como uno de los principales criterios de selección de microorganismos probióticos. Cada especie y entre cepas de bacterias probióticas existe variación en la tolerancia a las sales biliares (Gopal, Prasad, Smart, y Gill, H.S., 2001). Normalmente, los resultados de estudios *in vitro* pueden predecir la situación *in vivo*, donde existen condiciones fisiológicas más complejas; sin embargo, la comparación de resultados a partir de diferentes estudios es difícil por

existir variaciones en los factores tales como medios y preparación de cultivos, condiciones de evaluación, entre otros.

Los probióticos deberían llegar a lo largo del intestino, y específicamente al colon, intactos y viables; sin embargo, cuando los probióticos (*Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium*) son ingeridos, se reduce su actividad y viabilidad, en parte por las condiciones ácidas del estómago y por la bilis (Lankaputhra y Shah, 1995), retardando su colonización. Es necesario proteger a las bacterias probióticas para que sobrevivan en dosis terapéuticas y ejerzan sus efectos benéficos sobre el balance de la microflora intestinal. La protección de probióticos por encapsulación ha sido propuesta para mejorar su viabilidad en productos lácteos y en el tracto gastrointestinal (GI).

2.4. Microencapsulación

La microencapsulación es definida como una tecnología de empaque de materiales sólidos, líquidos o gases, con el objetivo de impedir su pérdida, al protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento, o para impedir que sufran reacciones de oxidación por la luz u oxígeno (Fanger, 1974; Popplewell, Black, Norris y Porzio, 1995).

Las enzimas y las células animales o vegetales también pueden ser encapsuladas, permitiendo que los sustratos y productos entren y salgan de la cápsula. El tamaño de las cápsulas puede variar desde 1 μm a 1 mm, dependiendo de los materiales y métodos usados en su preparación (Anal y Sing, 2007). Las cápsulas obtenidas pueden liberar su contenido a tasas controladas bajo condiciones específicas (Anal y Stevens, 2005; Anal, Stevens y Remuñán-López, 2006; Kailasapathy y Masondole, 2005).

En la actualidad, la encapsulación tiene grandes aplicaciones en el área de las industrias de los aditivos alimentarios, de los productos químicos, agroquímicos,

farmacéuticos y en la acuicultura (Wong, 1998). La encapsulación se utiliza para proteger, estabilizar y liberar específicamente los bioactivos (Champagne y Fustier, 2007), pudiendo obtenerse productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales (Reineccius, 1991 y Popplewell, Black, Norris y Porzio, 1995). Se han preparado microcápsulas de probióticos usando diferentes materiales de pared (Capela, Hay, y Shah, 2006), incluyendo polisacáridos naturales (Wong, 1998) y diferentes métodos.

La encapsulación de diferentes células, incluyendo bacterias probióticas, ha sido una práctica común que extiende la vida de anaquel de los cultivos, los protege de la incidencia de bacteriófagos e incrementa su viabilidad y estabilidad en la producción, almacenamiento (O'Riordan, Buckle y Conway, 2001) y confiere protección adicional en procesos de secado por liofilización y durante la rehidratación (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2003); además de permite un sinfín de aplicaciones biotecnológicas (Kim, Baek, Yoon, Y.H. 1996).

2.4.1. Métodos de encapsulación

La selección del método de encapsulación para una aplicación en particular, considera factores como: tamaño medio de la partícula requerido, propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y de la sustancia a encapsular, aplicaciones para el material encapsulado, mecanismo de liberación deseado y costo. Métodos, tales como secado por aspersión, por congelamiento y por lecho fluidizado, extrusión, coacervación y método electrostático, se utilizan para el encapsulamiento de bacterias probióticas (Tabla 4).

Tabla 4. Propiedades de algunos métodos para la encapsulación de probióticos

Tecnología	Características	Beneficios	Problemas
Partículas geladas	Células atrapadas en una matriz gelada: sistema de base biopolímeros (alginato, pectina)	Pueden ser usadas en la producción de biomasa en fermentación y pueden secarse al aire	Bajo rendimiento en la producción de biomasa, partículas >50 mm., pueden afectar la textura del alimento
	Las partículas geladas pueden ser recubiertas con una doble capa (quitosano). La alta carga celular (>10 ¹¹ ufc/g) en las cápsulas de pectina ó alginato, pero no para otros biopolímeros	Muchas metodologías pueden ser utilizadas. El secado en frío es barato. Las células se liberan en el intestino. El acarreador mantiene las propiedades de los bioactivos	Las partículas deben ser soluble en ambientes que contienen compuestos quelantes (fosfatos, citratos)
Protección coloidal	Cubiertas verdaderas, donde las células en una cubierta en polvo (de base lipídica) es atomizada. Alta carga celular (>10 ¹¹ ufc/g). Es ampliamente utilizada comercialmente	Alta protección a periodos de exposición cortos en ácidos, humedad y oxígeno. Pueden adicionarse capas múltiples para controlar la liberación y ajustar la densidad	Hay separación de fases en bebidas si las coberturas son lipídicas. La liberación de células es lenta a baja temperatura
Secado por aspersión	Es atomizada una suspensión del bioactivo y material protector, creando gotas muy finas que son secadas con aire caliente. Las células son cubiertas de forma individual con los materiales de pared. La carga de células media en el polvo es 10 ¹⁰ -10 ¹¹ ufc/g	Existe variedad de materiales de pared disponibles. Rápida liberación de células en disolución. Hay poco efecto sobre la textura de alimentos y bebidas si las partículas son disueltas.	Son utilizadas altas temperaturas en el proceso que pueden afectar la viabilidad de los probióticos y función de los bioactivos. Cortos periodos de protección hasta la disolución de las partículas.

2.4.2 Método de Extrusión

El método de extrusión consiste en preparar una dispersión de biopolímeros adicionada de los microorganismos a encapsular, la cual es extruida a través de la aguja de una jeringa, para formar gotas que caen libremente a una disolución en la que gelifican y endurecen posteriormente (Figura 2). La disolución contiene cationes de Ca^{2+} , en forma de CaCl_2 .

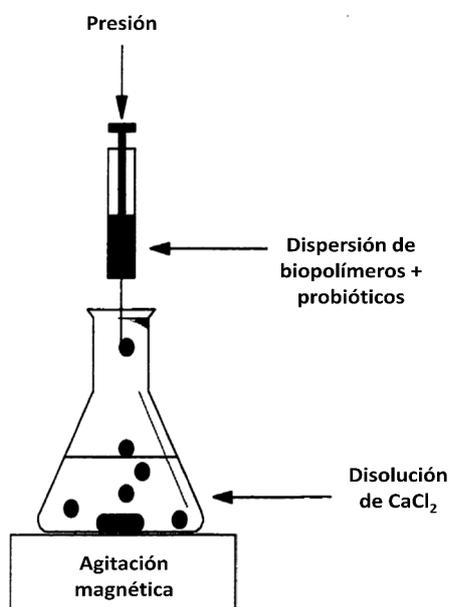


Figura 2. Método de encapsulación por extrusión.

Las gotas gelifican instantáneamente, atrapando las células en una matriz tridimensional. Las concentraciones de biopolímeros y de CaCl_2 pueden variar, para alginato de 0.6 a 2 % (p/p); mientras que para CaCl_2 de 0.05-1.5 M. El tamaño aproximado de las cápsulas es de 2-5 mm de diámetro, pero puede controlarse, dependiendo de la aplicación. El tamaño y la esfericidad de las cápsulas depende de la viscosidad de la dispersión de biopolímeros Smidsrod y Skjak-Braek (1990), del

diámetro del orificio de la aguja y de la distancia entre la jeringa y la disolución de CaCl_2 (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004).

La composición química del alginato también influye en el tamaño de la cápsula; pequeñas cápsulas resultan de alginatos con bajo porcentaje de ácido L-gulurónico (Martinsen, 1989). Este método es el más popular, simple, de bajo costo y asegura la viabilidad de las células. Varios investigadores (Chandramouli, Kailasapathy, Peiris, y Jones, 2004; Lee, Cha, y Park, 2004; Sheu, Marshall, y Heymann, 1993) han estudiado los factores que afectan la preparación de cápsulas por este método tales como concentraciones de alginato y de CaCl_2 , tiempo de endurecimiento de las cápsulas y concentración celular.

Las aplicaciones del método de encapsulación por extrusión han ido incrementándose en la industria de los alimentos, debido a la protección de los materiales encapsulados ante factores como calor y humedad, lo que permite mantener su estabilidad y viabilidad. Aunque la cobertura de los probióticos encapsulados mejora la sobrevivencia, la adición de capas adicionales, puede afectar el tamaño de la cápsula. Cápsulas grandes en alimentos fermentados, tales como yogur, son indeseables, debido a que afectan la textura y la sensación bucal del producto. Cápsulas de menos de $100\ \mu\text{m}$ de diámetro son deseables; mientras que aquellas con diámetros mayores de 0.1mm son detectadas en la boca (Mortazavian, Razavi, Ehsani y Sohrabvandi, 2007).

Hansen, Allan-Wojtas, Jin y Paulson (2002), reportan que cápsulas muy grandes de alginato de calcio ($> 1\text{mm}$) causan una textura granulosa cuando se adicionan a alimenticios; en contraste, cápsulas muy pequeñas, de tamaño menor a $100\ \mu\text{m}$, no confieren protección significativa a las bacterias encapsuladas, en comparación con células libres, al someterlas a fluidos gástricos simulados. Estos estudios indican que las bacterias probióticas deben ser encapsuladas en un rango de tamaño particular.

2.4.3 Materiales utilizados para encapsulación

Existe una amplia variedad de materiales para encapsulación de bacterias probióticas; entre ellos se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones (de maíz, arroz, trigo y papa)(O'Riordan, Buckle y Conway, 2001); alginato de sodio, celulosa, carragenina y goma arábica, quitosano, carboximetilcelulosa (CMC), gelatina y pectina (Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy, 2000; Yáñez, Salazar, Chaires, Jiménez, Márquez y Ramos, 2002; Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004, 2006), (Tabla 5).

El diseño de vehículos de liberación de bioactivos en el colon debe vencer algunos obstáculos que se presentan durante su ingesta; primero, necesitan mantenerse intactos cuando atraviesan el tracto gastrointestinal superior, con el fin de proteger a los bioactivos de la degradación química y enzimática, y segundo, ellos deben ser capaces de liberar al bioactivo al llegar al colon, de forma controlada, manteniendo su efectividad terapéutica (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003; Anal, Bhopatkar, Tokura, Tamura, y Stevens, 2003; Anal y Stevens, 2005; Liu, Fishmany Hicks; 2007).

Para la administración oral de probióticos, las cápsulas tienen que ser transportadas a través de ambientes con diferentes condiciones, frecuentemente: el bajo pH y la presión mecánica constante en el estómago; el ataque por proteasas en el intestino delgado; la microflora de digestión en el colon y la variación del tiempo de residencia en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal (GI).

Las estrategias para la liberación de probióticos en el tracto GI, pueden abordarse con base en el tiempo de tránsito de la boca al colon, variaciones de pH y tipos de enzimas a través del tracto GI. No puede considerarse la liberación de una dosis de probióticos en un tiempo específico, debido a que son ignoradas variaciones en cada individuo. La estrategia más probable consiste en el desarrollo de un sistema de liberación en respuesta a la estimulación del ambiente local, tal como pH y enzimas.

Tabla 5. Materiales utilizados para la encapsulación de bacterias probióticas

Biopolímeros	Bacteria	Método	Aplicación
Carragenina	<i>Lactobacillus</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Carragenina	<i>St. thermophilus</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Carragenina / goma de tragacanto	<i>Lb. bulgaricus</i> <i>B. infantis</i> /	Cápsulas	Producción de biomasa
Carragenina / goma de tragacanto	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Alginato/glicerol	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Alginato	<i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Estabilidad en ácidos
Celulosa	<i>B. pseudolongum</i>	Cápsulas	Estabilidad en ácidos y bilis
Alginato/ laurilsulfato de sodio	<i>Lb. delbrueckii</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Carragenina /goma de tragacanto	<i>Lb. casei</i>	Emulsificación	Estabilidad en ácidos
Gelatina/tolueno-2-4-diisocianato	<i>Lb. lactis</i>	Cápsulas	Producción de biomasa
Alginato	<i>Lactobacillus</i>	Cápsulas	Estabilidad en ácidos
Alginato	<i>Lb. acidophilus</i>	Compresión directa	Estabilidad en ácidos
Alginato	<i>B. breve</i>	Emulsificación	Estabilidad en ácidos
Proteína de suero	<i>B. Longum</i>	Micronización	Estabilidad en ácidos
Alginato/quitosano	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Estabilidad en almacenamiento y ácidos
Alginato/pectina/proteína de suero de leche	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Estabilidad en almacenamiento y ácidos
Almidón y almidón resistente a la digestión	<i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i>	Cápsulas	Estabilidad en almacenamiento y ácidos
Almidón de maíz ceroso	<i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas/emulsificación	Estabilidad en almacenamiento y ácidos
Alginato/almidón	<i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i>	Cápsulas	Estabilidad en almacenamiento y ácidos

Fuente: Anal y Singh (2007).

La formulación de matrices recubrientes con polímeros sensibles al cambio de pH, insolubles en ambientes ácidos y solubles en medios con un pH igual o mayor a 6. Tales sistemas se supone preservan los bioactivos dentro de la matriz y los liberan cuando llegan al colon. El pH del tracto GI en cada individuo está sujeto a variaciones internas y externas tales como salud, situaciones físicas y emocionales, dieta, estrés (Liu, Fishman, Kost y Hicks, 2003).

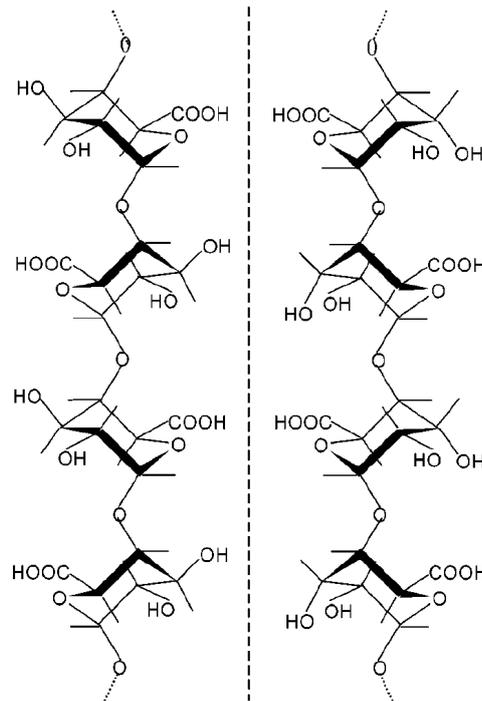
Alginato

El alginato es un biopolímero natural, extraído de algas y está compuesto de dos unidades monoméricas, ácido β -1-4 -D-manurónico (M) y ácido α -1-4 L gulurónico (G) (Figura 3). El alginato es ampliamente usado en la industria por su capacidad para retener agua, para gelificar, así como por sus propiedades viscoelásticas y estabilizantes (Draget, 2000).

Se ha usado como material de pared debido a que no es tóxico, tiene un precio bajo y es seguro al ser usado en los alimentos (Song Cho y Park, 2003). Recientemente los alginatos han sido utilizados como matriz encapsulante de bioactivos, tales como bacterias, con la finalidad de lograr su liberación controlada (Draget, Skjåk-Bræk, y Smidsrød, 1997).

De acuerdo con Braccini y Prez (2001), la gelación es resultado de las interacciones específicas y fuertes entre los iones calcio y los bloques de ácido galacturónico y ácido gulurónico para pectina y alginato respectivamente (Figura 4). La formación del gel es dependiente del origen, la composición y arreglo de bloques de ácido gulurónico (G) en el alginato, debido a los sitios de enlace preferentes para los iones divalentes de Ca^{+2} ; este arreglo determina las propiedades funcionales, tales como la fuerza del gel, la

reactividad al calcio, y la tolerancia al calcio (Hoefler, 2004, Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004).

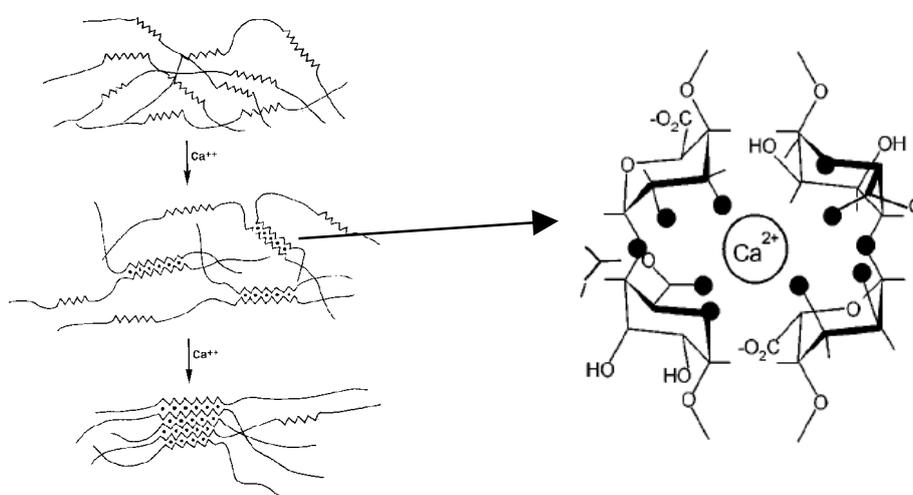


Fuente: Braccini y Prez (2001).

Figura 3. Estructura química de cadenas de (a) galacturonato y (b) guluronato

Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ion calcio, formándose una estructura dimérica. El modelo de caja de huevo (“egg-box model”) (Figura 4) es usado para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas (Braccini y Prez, 2001).

Un alginato con alto porcentaje de bloques G produce un gel con mayor fuerza que la mostrada por un gel obtenido a partir de alginato con mayor porcentaje de bloques M, pero se requiere de un control más exacto en la cantidad de calcio añadida al sistema. En contraste, un alginato con alto porcentaje de bloques M es más tolerante a variaciones en la cantidad de calcio presente en el sistema y el gel tiene menos probabilidades de presentar sinéresis (Hoefler, 2004).



Fuente: Braccini y Prez (2001).

Figura 4. Formación de geles de alginato con sales cálcicas, modelo “egg-box” (caja de huevos).

La conformación del ácido gulurónico en el alginato otorga un alto grado de coordinación con el calcio, de este modo forma geles más rígidos que son menos propensos al desgaste y a la erosión. Si se incrementa el contenido de ácido manurónico, los geles son más suaves, más elásticos, pero menos porosos y estos se disuelven fácilmente (Tønnesen y Karlsen, 2002).

La composición química del alginato influye también sobre el tamaño de la cápsula; pequeñas cápsulas son obtenidas a partir de alginatos de bajo contenido de ácido

gulurónico (Martinsen, Skjak-Braek y Smidsrod, 1989). Pillay y Fassihi (1999b) encontraron que la liberación de un fármaco (diclofenaco de sodio) a partir de cápsulas de pectato de calcio, fue más rápida que aquellas observadas en cápsulas preparadas con alginato de calcio y mezcla de alginato-pectato de calcio, posiblemente porque la adición de pectato a alginato convirtió las matrices en más frágiles. A bajo pH, el ácido alginico es formado a partir de alginato y modifica la capa gelada comenzando la erosión de la cápsula.

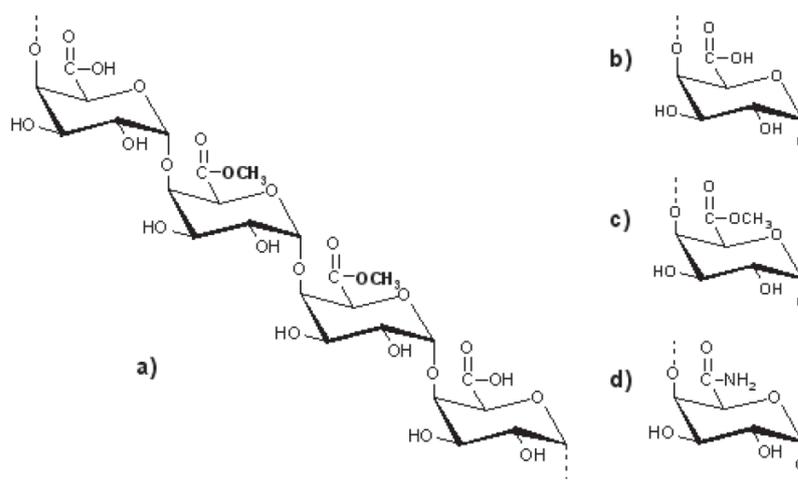
Pectina

La pectina es un polisacárido natural que en recientes años ha ganado importancia. Los beneficios de la pectina son cada vez más apreciados por los investigadores y los consumidores, por ser biodegradable. Debido a sus propiedades gelantes, la pectina es empleada ampliamente en la industria de alimentos. Además, la pectina se ha usado como acarreador de drogas a nivel gastrointestinal, en forma de tabletas, cápsulas geladas o películas (Sriamornsak, 2003). La pectina es comercialmente extraída a partir de la piel de los cítricos y de las pomáceas, bajo condiciones ácidas o alcalinas.

La pectina consiste principalmente en unidades de ácido galacturónico y ésteres de metilo que forman cadenas lineales. Estos ácidos urónicos tienen grupos carboxilo, algunos de los cuales se encuentran naturalmente presentes como metil éster y, otros son tratados con amonio para producir grupos carboxilamida (Figura 5). El grado de esterificación debajo del 50 %, produce una gama de pectinas de bajo metoxilo. La pectina, posee carga eléctrica negativa a pH neutro. (Sriamornsak, 2003).

El valor de pK aparente de la pectina (pH a 50 % de disociación) varía con el grado de esterificación; a 65 % de esterificación el pK es de 3.55, mientras que a 0 % de esterificación el pK aparente de la pectina es de 4.10. Además de los segmentos de ácido

galacturónico, la pectina contiene azúcares neutros, como ramnosa, arabinosa, galactosa y xilosa, al lado de la cadena principal. La distribución global de de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de la molécula de pectina determina su solubilidad (Sriamornsak, 2003).



Fuente: Sriamornsak (2003).

Figura 5. (a) Segmento repetido de la molécula de pectina y sus grupos funcionales: (b) carboxilo; (c) ester y (d) amida.

La propiedad más destacada de las pectinas es su habilidad para formar geles en la presencia de iones Ca^{+2} . La asociación de las cadenas de pectina (bloques de galacturonato) a través de iones Ca^{+2} , conduce a la formación de una red tridimensional de pectato de calcio. La estructura resultante tiene forma similar a la de “caja de huevo” (Figura 4); aunque de acuerdo con Braccini, y Prez (2001), y Sriamornsak, (2003), además de la formación de enlaces iónicos, las pectinas amidadas promueven asociaciones entre dímeros a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas) (Figura 6).

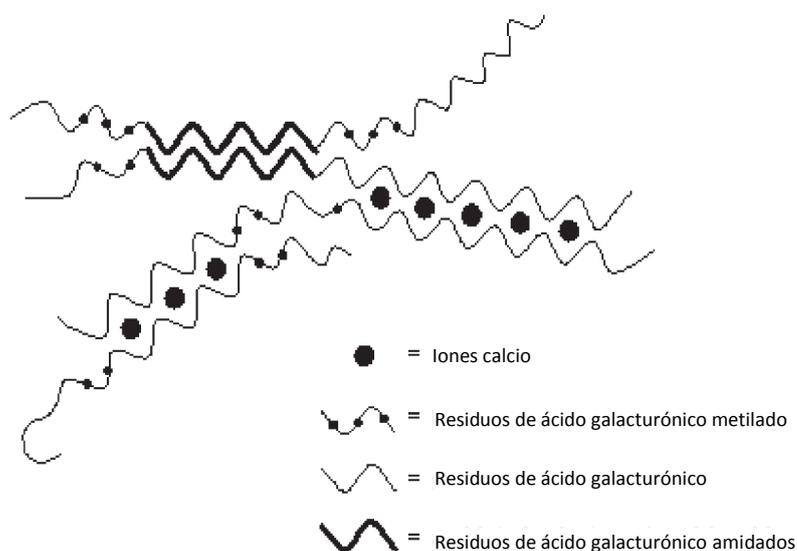


Figura 6. Modelo de la gelación de las pectinas de bajo metoxilo amidadas mostrando interacciones entre residuos de ácido galacturónico y, enlaces hidrógeno entre residuos de ácido galacturónico amidado (Sriamornsak, 2003).

Los factores decisivos para la formación de geles son la concentración de pectina, tipo de pectina, sólidos solubles, rango de pH y la concentración de sales amortiguadoras y de cationes divalentes en la formulación (Draget, 2000). Un balance adecuado entre la concentración de pectina y de calcio, conduce a la formación de geles con textura óptima. El exceso de calcio puede producir un gel menos elástico y quebradizo, con tendencia a la sinéresis o a la precipitación.

Las pectinas amidadas han sido desterificadas con amonio; parte de los grupos éster son reemplazados por grupos amida, modificándose así sus propiedades gelantes, en comparación con las presentadas por las pectinas ácidas. Las pectinas amidadas pueden formar geles en independencia relativa del contenido de sólidos solubles y rango de pH; además con pequeñas concentraciones de calcio, la pectina comienza a formar enlaces y

si la concentración incrementa, puede formarse un gel (Pérez, Mazeau, du Penhoat, 2000).

Debido a sus propiedades gelantes, de formación de películas, propiedades ligantes, bio-compatibilidad y no toxicidad, la pectina es un biopolímero útil para construir vehículos de liberación, en forma de geles, matrices tridimensionales, películas y micro o nano-partículas. Diferentes bioactivos pueden ser incorporados en los sistemas mencionados, con alta eficiencia de entrapamiento y mediante procedimientos simples. Las modificaciones químicas de las pectinas además mejoran su funcionalidad para algunas aplicaciones específicas. Los derivados de pectina poseyendo una densidad de carga alta (grupos amino primarios positivos o grupos carboxilo negativos), son capaces de penetrar a profundidad en tejidos, y así prolongar el tiempo residual para incorporar los activos y mejorar su penetración (Pérez, Mazaueu y du Penhoat, 2000).

Se ha sugerido a las pectinas como materiales para construir acarreadores para la liberación oral de bioactivos a nivel gastrointestinal, debido a que atraviesa intacta el tracto gastrointestinal superior y es degradada por la microflora del colon (Liu, Fishman y Hicks, 2007). La pectina puede competir con otros polisacáridos en sistemas de liberación controlada, como quitosano, alginato, dextrano, inulina y derivados de carboximetilcelulosa o (hidroxipropil)metilcelulosa.

Para sistemas encapsulantes involucrando iones calcio, la liberación de bioactivos es más rápida cuando la matriz está compuesta de pectinas con alto grado de amidación; por ejemplo, un tiempo de 6 h con 24 % de amidación y un tiempo de liberación de 8 h para pectinas con 13 % de amidación. La presencia de iones calcio decrece la liberación de bioactivos cuando las cápsulas están constituidas por pectinas de bajo metoxilo, en contraste, los iones calcio incrementan la liberación de bioactivos cuando las cápsulas están formadas por pectinas de alto metoxilo (Wakerly, Fell, Attwood y Parkins, 1997).

Las moléculas de pectato de calcio (pectina de bajo metoxilo + calcio), son menos hidrofílicas y más grandes que las pectinas de bajo metoxilo sin entrecruzar con calcio, consecuentemente, presentan una liberación de bioactivos más lenta. Otro factor que influye en la liberación de bioactivos es la hidratación de la matriz encapsulante. El pectato de calcio es más sensible a los fenómenos de erosión si la fuerza iónica del gel es baja. Mientras un gel resultante a partir de pectinas de bajo metoxilo entrecruzado con calcio no es erosionado, las pectinas de alto metoxilo, llegan a hidratarse en la presencia de iones calcio y la matriz encapsulante se erosiona, llevando a la liberación prematura de bioactivos (Wakerly, Fell, Attwood y Parkins, 1997).

2.4.4 Resistencia de biopolímeros a condiciones gastrointestinales

En ambientes ácidos, la pectina permanece como agregados macromoleculares; mientras que en soluciones neutras, los agregados de pectina tienen a disociarse y expandirse. La pectina además, es resistente a las proteasas y a las amilasas que se encuentran activas en el tracto gastrointestinal, pero es digerida por un gran número de bacterias que forman parte de la microflora del colon (Sinha y Kumria, 2001; Vandame, Lenourry, Charrueau y Chaumeil, 2002). Debido a las propiedades mencionadas, es muy posible que la pectina pueda cumplir la función de vehículo de bioactivos de origen proteico, de la boca al colon.

Un obstáculo a vencer para la aplicación de pectina en la liberación específica de bioactivos en el colon, es el hecho de que la pectina se hincha (aumenta su volumen) considerablemente en condiciones fisiológicas. Los bioactivos con alta solubilidad en condiciones fisiológicas, pueden exhibir liberación prematura debido a que los poros de la matriz recubriente se expanden. El uso de pectina en combinación con otros biopolímeros para formar estructuras más estables, es una estrategia que pudiera

resolver este problema (Semdé, Amighi, Devleeschouwer y Moës, 2000; Kwabena y Fell, 2001; Turkoglu y Ugurlu, 2002).

2.4.5. Encapsulación de organismos probióticos

Debe existir un millón de organismos probióticos por gramo de producto alimenticio, para que se liberen en cantidad suficiente en el colon y ejerzan los beneficios esperados en el ser humano. Sin embargo, la sobrevivencia de los organismos probióticos tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* es baja en presencia de ácidos y sales biliares (Lankaputhra y Shah, 1995), aunque es esencial que sobrevivan al tránsito en el intestino para que se multipliquen en el colon.

Durante la encapsulación de probióticos para su uso en alimentos, los organismos son cubiertos con un material de pared no tóxico, biopolimérico. Este material protege a los probióticos durante el procesamiento de los alimentos, ante factores como temperaturas extremas, excesiva exposición a luz, bajo pH y exposición al oxígeno, los cuales pueden afectar la viabilidad de los microorganismos. Los geles de alginato de sodio mejoran la viabilidad de los organismos probióticos debido a que permiten la difusión de nutrientes, mientras protegen a las células de factores de estrés (Talwalkar y Kailasapathy, 2003).

La microencapsulación ha mostrado que reduce la muerte de las células causada por la toxicidad al oxígeno (Talwalkar y Kailasapathy, 2003; Talwalkar y Kailasapathy, 2004). Los probióticos se encuentran aglomerados en el centro de las cápsulas creando regiones anaerobias (Beunink, Baumgärtl, Zimelka y Rehm, 1989). Ravula y Shah (2001) encontraron que la sobrevivencia de *Lb. acidophilus* y *Bifidobacterium* encapsulados en cápsulas alginato de calcio y adicionados en helado de yoghurt, mejoró 3 ciclos log, en

comparación a la mostrada por células libres, además *Lb. acidophilus* mostró mayor tolerancia a pH 2.5.

Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000) investigaron la actividad de *Lb. acidophilus* y *B. infantis* encapsuladas en alginato y evaluaron su sobrevivencia en condiciones gastrointestinales simuladas, sales biliares y pH ácido (2.0, 3.0 y 4.0) a 37 °C por 3 h, sin mostrar incremento en la sobrevivencia debido a la encapsulación; sin embargo, durante el almacenamiento de yogur (8 semanas a 4 °C), las bacterias encapsuladas mostraron mayor sobrevivencia que las células libres.

Existen muchos otros agentes o materiales de pared útiles para encapsular bacterias entre los que se incluyen a las gomas gelana-xantana (Sun y Griffiths, 2000). Cuando los agentes son combinados con cloruro de calcio, una matriz gelada se forma, creando una cubierta apta para proteger a los probióticos (Shah y Ravula, 2000). Los métodos de extrusión y de emulsión son los dos más utilizados para la encapsulación de probióticos; a pesar de que muestran una sobrevivencia 80-95 %, tienen sus limitaciones.

En el caso del método de emulsión, a pesar que produce cápsulas en promedio más pequeñas que las obtenidas por el método de extrusión, el rango en tamaño es amplio y la morfología poco esférica (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004), además por el método de emulsión, en las cápsulas permanece un residuo oleoso que puede ser inconveniente para la aplicación a alimentos bajos en grasa (Kailasapathy, 2002). Estos métodos han sido mejorados mediante la aplicación de capas extra de diferentes materiales, un ejemplo es el Krasaekoopt, Bhandari y Deeth (2004) y Krasaekoopt, Bhandari y Deeth (2006) quienes encontraron una mejora en la sobrevivencia de *Lb. acidophilus* y *Lb. casei* en condiciones ácidas y biliares al utilizar una cubierta extra de quitosano sobre la cápsula de alginato.

Lb. acidophilus entrampado en cápsulas elaboradas a partir de mezclas de soya y goma arábiga, proteína de suero de leche y goma arábiga y proteína de soya con goma

arábiga, mostró resistencia a pH de 1, concentración de bilis de 1-4% y condiciones de almacenamiento de 5°C durante 15 semanas (Mosilhey, 2003). Koo, Cho, Hun, Baek y Park (2001), observaron que *Lb. casei* en cápsulas de alginato, alginato/quitosano almacenadas a 4° C; mostraron similar estabilidad que las células no encapsuladas, no así a 22 °C, donde las cápsulas de doble capa fueron las más estables.

Song, Cho y Park (2003), encapsularon *Lb. casei* utilizando un sistema de emulsión con alginato al 1% p/v, e informaron que las células encapsuladas mantuvieron su viabilidad durante 4 semanas a 4° C, mientras que la viabilidad de las células no encapsuladas decreció 3 ciclos logarítmicos después de 6 semanas de almacenamiento.

Con las bacterias probióticas encapsuladas, pueden diseñarse aplicaciones de liberación controlada como una alternativa para resolver los problemas que enfrentan la industria de alimentos. Los desafíos son la selección apropiada del método de encapsulación y el material encapsulante; lograr entrapar una alta carga celular; mantener la viabilidad de las células, y para aplicaciones en alimentos controlar el tamaño de la cápsula para no afectar negativamente las propiedades sensoriales.

3.- JUSTIFICACION

Estudios realizados en décadas pasadas, revelaron que la ingestión de microorganismos probióticos, confiere un amplio rango de beneficios terapéuticos a los seres humanos. El estilo de vida y alimentación actuales, hace necesario suplementar la dieta humana con dosis adecuadas de microorganismos probióticos para restablecer el balance de la microflora intestinal y ayudar a mantener una buena salud digestiva.

Los alimentos más utilizados como vehículos de probióticos, en una dosis recomendada de $10^6 - 10^7$ ufc g^{-1} , han sido el yogurt y las leches; sin embargo, los probióticos son afectados por las condiciones de procesamiento del alimento, y después de ser ingeridos, también por los cambios de pH originados por el jugo gástrico, así como por la acción de las sales biliares en el tracto digestivo

Considerando la importancia de mantener cuentas altas de probióticos viables, es esencial aplicar métodos para conservar su viabilidad y funcionalidad, tanto en el alimento que los contenga, como a través de su paso por el tracto gastrointestinal (GI). Una alternativa para lograr lo mencionado, la constituye el entrampamiento de los probióticos en cápsulas preparadas a partir de biopolímeros.

La protección física conferida por las cápsulas a los probióticos durante su exposición a factores adversos, depende de las propiedades químicas y físicas de las primeras; no obstante poco se ha estudiado acerca del efecto de la composición química sobre las propiedades físicas de las cápsulas (morfología, tamaño, textura), así como de la posible relación entre estas propiedades físicas y la sobrevivencia de los probióticos a diferentes condiciones adversas.

4.- OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Los objetivos generales de este trabajo fueron: a) Entrampar *Lb. casei* en cápsulas elaboradas con alginato de sodio (A), pectina de bajo metoxilo amidada (P), y mezclas de A-P en relaciones 1:2, 1:4, 1:6, por el método de extrusión, y b) Determinar las posibles interrelaciones entre la composición y las propiedades morfológicas y mecánicas (diámetro, esfericidad y propiedades texturales) de las cápsulas; así como las posibles interrelaciones entre las propiedades morfológicas y físicas de las cápsulas con la sobrevivencia de *Lb. casei* entrampado durante el almacenamiento de yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas.

4.2. Objetivos Específicos

1. Establecer los parámetros experimentales óptimos de naturaleza de material, relación de material de pared/material a encapsular para la elaboración de cápsulas.
2. Entrampar *Lb. casei* en cápsulas utilizando mezclas de biopolímeros alginato (A) y pectina (P) por el método de extrusión y evaluar el rendimiento y la capacidad de inclusión
3. Estudiar la morfología y tamaño de las cápsulas a través de Microscopia de luz y Microscopía Electrónica de Barrido.
4. Determinar las propiedades mecánicas (dureza, cohesividad, elasticidad, resiliencia, masticabilidad) de las cápsulas al modificar la relación A-P.
5. Evaluar la sobrevivencia de *Lb. casei* entrampado, en yogur, durante el almacenamiento (20 días a 4 °C).
6. Evaluar la sobrevivencia de *Lb. casei* entrampado, en condiciones gastrointestinales simuladas.
7. Determinar la posible relación entre diámetro, esfericidad y propiedades texturales de las cápsulas con su composición química y con la sobrevivencia de *Lb. casei* en el almacenamiento de yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas.

5.- HIPÓTESIS

Variaciones en la composición biopolimérica (alginato, pectina) rendirán cápsulas con propiedades físicas distintas; estas últimas a su vez, afectarán el grado de protección que las cápsulas conferirán al probiótico *Lb. casei*, al ser incorporado en yogur y al ser expuesto a condiciones gastrointestinales simuladas.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Ubicación del trabajo

La encapsulación de *Lb. casei* 81LYO, la evaluación de su sobrevivencia durante el almacenamiento de yogur durante 20 d, y a condiciones gástricas simuladas, se realizaron en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. La elaboración del yogur se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Tecnología de Alimentos del Departamento de Preparatoria Agrícola y el análisis de textura de las cápsulas se llevó a cabo en el Laboratorio de Reología de Alimentos del Departamento de Ingeniería Agroindustrial, ambos laboratorios pertenecientes a la Universidad Autónoma de Chapingo. El estudio de microestructura de las cápsulas por Microscopía Electrónica de Barrido 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 utilizados

Cultivo liofilizado de *Lb. casei* 81 LYO y cultivos lácticos de inoculación directa *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MY800) (Danisco, Dange Saint Romain, Francia), medio de cultivo agar MRS para lactobacilos (Merck. 10660) y caldo MRS para lactobacilos (Merck. 10661) (Merck, Darmstadt, Alemania), peptona de caseína (DIBICO S. A. de C. V., México), alginato de sodio (A) de bajo peso molecular FD 175, 60.5 % ácido gulurónico (G) y pectina de bajo metoxilo (P) LM-106 AS-YA, 28 % esterificación y 20 % amidación (CP Kelco, Lille Skensved, Dinamarca); extracto de bilis de porcino (B8631, Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri); ácido ascórbico, cloruro de calcio, cloruro de sodio, etanol absoluto y ácido

clorhídrico, todos grado analítico (Laitz, S. A. de C. V., México). Leche entera y leche descremada en polvo NIDO® (Nestlé, S. A. de C.V., México), glutaraldehído al 2.5 % (v/v); buffer de cacodilatos (0.1 M, pH 7.2-7.3). (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA.).

6.3. Cultivo de *Lb. casei* y preparación del concentrado celular

6.3.1. Crecimiento de *Lb. casei*

La determinación de la curva de crecimiento de *Lb. casei* se realizó por triplicado, utilizando como medio de cultivo caldo MRS estéril (121 °C, 15 min), no adicionado y adicionado con ácido ascórbico (0.1 g L⁻¹) para proveer un ambiente anaerobio (Song, Cho, y Park, 2003). El cultivo liofilizado de *Lb. casei* (0.025 g) se inoculó en 50 mL de medio de cultivo y se colocó en incubación a 37 °C. Se tomaron lecturas en unidades Klett cada 2 h mediante un fotocolorímetro (Klett-Summerson, Klett MFG. Co. NY, EUA.). Las unidades Klett posteriormente se convirtieron a unidades de densidad óptica (D. O.= 1 unidad Klett*0.002). Al mismo tiempo el número de células de *Lb. casei* presente en los cultivos se determinó por triplicado por recuento en placa usando agar MRS adicionado con ácido ascórbico (0.5 g L⁻¹). Lo anterior con el fin de relacionar las unidades de D.O. con el número de células de *Lb. casei*. A partir de estos datos, se construyó la curva de crecimiento de *Lb. casei* y con ello se determinaron las fases de crecimiento, y tiempo de cosecha con la finalidad de encapsular células en etapa final de crecimiento logarítmico (Sheu y Marshall, 1993).

6.3.2. Obtención de células de *Lb. casei* a encapsular

Las células de *Lb. casei* a encapsular fueron obtenidas por medio de su cultivo en caldo MRS estéril durante 22 h de incubación a 37°C; este tiempo de incubación permitió que el microorganismo se encontrara en fase logarítmica tardía de crecimiento. El cultivo fue cosechado y centrifugado (1000×g, 20 min) (centrífuga Damon/Iec División IEC PR-], Internacional Equipment Co., EUA) (Shin, Lee, Pestka y Ustunol, 2000); se lavó por duplicado con solución de NaCl (0.9 % p/v) estéril y resuspendió en agua peptonada (0.1 g 100 ml⁻¹) estéril, para obtener un concentrado celular (CC).

La cuenta celular de *Lb. casei* presente en el CC ($9.72 \pm 0.1 \log \text{ UFC ml}^{-1}$) se determinó por triplicado mediante recuento en placa usando agar MRS adicionado con ácido ascórbico (0.5 g L⁻¹). Todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante 72 h, tras lo cual se realizó el conteo de las colonias formadas y registraron como unidades formadoras de colonia (UFC) ml⁻¹ (Hughes y Hoover, 1995; Ravula y Shah, 2001; Corcoran, Stanton, Fitzgerald y Ross, 2005).

6.4. Preparación de dispersiones de biopolímeros

Se llevó a cabo un estudio preliminar para determinar las concentraciones mínimas de A y P en dispersión acuosa, tales que resultaran en cápsulas mecánicamente estables, obteniéndose las siguientes cifras: 0.5 g 100 g⁻¹ para A y 2 g 100 g⁻¹ para P. A partir de esas cifras se prepararon cinco dispersiones de A y/o P (Tabla 6), utilizando agua destilada estéril (121 °C, 15 min) a 25 °C y agitación moderada (600 rpm) mediante un equipo caframo (modelo RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA). Las dispersiones fueron hidratadas 24 h, bajo temperatura de refrigeración (4 °C) para evitar crecimiento microbiano.

6.5. Encapsulación de *Lb casei*

6.5.1. Elaboración de cápsulas por el método de extrusión

Para la elaboración de las variaciones de las cápsulas, se mezcló concentrado celular de *Lb. casei* (CC) con cada una de las dispersiones de biopolímeros (Tabla 6), en una relación volumétrica de 1:9, obteniendo así suspensiones celulares (SC). El número de células de *Lb. casei* contenido en todas las SC fue $8.83 \pm 0.15 \log \text{ ufc ml}^{-1}$, determinado mediante incubación a 37°C por 48 h, placas de agar MRS. Las cápsulas se formaron por el método de extrusión (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2003; Muthukumarasamy, Allan y Holley, 2006), para lo cual se adicionó por goteo una parte de la SC respectiva a diez partes de disolución de CaCl_2 ($\text{pH } 5.61 \pm 0.02$) estéril, usando una jeringa con una capacidad de 5 ml y una aguja 30G $\frac{1}{2}$, 8 mm de longitud

Tabla 6. Concentraciones de alginato y pectina presentes en las dispersiones acuosas usadas para la preparación de las cápsulas conteniendo *Lb. casei*

Código de la dispersión/cápsula ^a	Alginato de sodio (A) g 100 g ⁻¹	Pectina de bajo metoxilo (P) g 100 g ⁻¹
A ₀ P ₂	0.0	2.0
A _{0.5} P ₀	0.5	0.0
A _{0.5} P ₁	0.5	1.0
A _{0.5} P ₂	0.5	2.0
A _{0.5} P ₃	0.5	3.0

^a A_x P_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros.

Las cápsulas obtenidas se dejaron reposar en la disolución de CaCl_2 , durante 12 h (5 ± 1 °C), para su completa solidificación. Las cápsulas se cosecharon por filtración a través de una malla de acero inoxidable de 0.19 mm (Fiicsa, S. A. de C. V., México), se enjuagaron y posteriormente fueron mantenidas en solución peptonada estéril ($0.1 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$) a 4 °C (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2004) hasta su caracterización. Las variaciones de cápsulas fueron preparadas por triplicado aplicando un diseño experimental completamente al azar y fueron identificadas con los mismos códigos de las dispersiones de biopolímeros mostrados en la tabla 6.

6.5.2. Caracterización de cápsulas conteniendo *Lb. casei*

Rendimiento. El rendimiento de cápsulas conteniendo *Lb. casei* se registró como la cantidad de cápsulas (g) obtenidas a partir de 100 g de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros.

Tamaño. El diámetro medio de veinte cápsulas de cada variación se determinó después de 1 d de su elaboración, utilizando el analizador de imágenes Imagen-Pro Plus versión 6.0 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, EUA), a partir de las micrografías obtenidas con la cámara digital a 4× (Rasband, 2007).

Morfología. La morfología de las cápsulas fue observada en un microscopio de contraste de fases Olympus BX45 (Olympus Optical Co. LTD, Japón). Micrografías a una magnificación de 4× fueron tomadas a veinte cápsulas seleccionadas de forma aleatoria, con una cámara digital Camedia C-3030 (Olympus Optical Co. LTD, Japón). Las

micrografías fueron analizadas mediante el software de análisis de imágenes ImageJ versión 1.4, para determinar la esfericidad de las cápsulas (Rasband, 2007).

Propiedades texturales. Las diferentes variaciones de cápsulas se sometieron a Análisis de Perfil de Textura Instrumental (Beaulieu, Savoie, Paquin y Subirade, 2002; Pillay y Danckwerts, 2002; Bourne, 2002) utilizando un texturómetro Stable Micro Systems modelo TA-XT2i (Texture Technologies Corp., White Plains, NY, EUA), equipado con una celda de carga de 5 kg. Para garantizar una reproducibilidad buena de la prueba, debido a la naturaleza particulada de las cápsulas, se utilizó una sonda cilíndrica de aluminio con área de contacto relativamente grande (35 mm de diámetro). Cada medición se llevó a cabo a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) sobre 30 g de cada variación de cápsulas; estas últimas colocadas sobre una placa de vidrio debajo de la sonda. La detección automática del contacto de la sonda con las cápsulas, se realizó con una fuerza de contacto de 0.005 N (Artignan, Corrieu y Lacroix, 1997).

En todos los casos, las muestras de las cápsulas se comprimieron 30 % utilizando dos ciclos de compresión a velocidad del cabezal de 0.5 mm s^{-1} . Las propiedades texturales primarias de dureza, cohesividad, elasticidad y resiliencia (relación entre las áreas bajo la curva de compresión y descompresión) (Choonara, Pillay, Singh, Khan y Ndesendo, 2008) fueron obtenidas utilizando el software del equipo Texture Expert para Windows versión 3.2. La determinación de las propiedades texturales de cada variación de cápsulas se realizó por triplicado.

Microestructura. Las cápsulas fueron fijadas en una disolución de glutaraldehído al 2 % v/v en buffer de cacodilatos (0.1 M, pH 7.2) durante 6 h; se deshidrataron en disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (50, 60, 70, 80, 90 y 100 %), permaneciendo 30 min en cada una. Posteriormente, las muestras se secaron a punto crítico en un CPA II Technics Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, EUA). Cada cápsula se fracturó con el objetivo de exponer la estructura interior; luego se montaron en soportes de aluminio y finalmente se cubrieron con una capa fina de oro en un Fine

Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). Las cápsulas fracturadas se observaron en un microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (JEOL Scanning Electron Microscope JMS-035, Jeol Ltd., Akishima, Japón), operado a 20 kV, a una amplificación de $1\ 000 \times$ para examinar la morfología superficial e interna de la capsula y a $10\ 000 \times$ para examinar la ubicación de las bacterias en la cápsula.

6.5.3. Recuento de *Lb. casei* encapsulado

Para el recuento de células viables, fue necesario solubilizar las cápsulas y así liberar las células de *Lb. casei* encapsulado. Una suspensión de 1 g de cápsulas en 9 ml de buffer de fosfatos (0.1M, pH 7.2) (Sheu y Marshall, 1993), se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 min. A partir de esta suspensión se realizaron las diluciones decimales necesarias para hacer el recuento de *Lb. casei*. El número de células viables en la suspensión fue determinado por recuento en placa utilizando agar MRS con incubación a 37 °C por 48 h.

6.5.4. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de entrapamiento se expresa como el porcentaje de células viables entrapadas por la técnica de extrusión. Este parámetro fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de entrapamiento} = A/B \times 100$$

Donde $A = \text{ufc de } Lb. casei \text{ g}^{-1} \text{ de cápsulas} \times \text{g de cápsulas } 100 \text{ g}^{-1} \text{ de SC}$ y $B = \text{ufc de } Lb. casei \text{ } 100 \text{ g}^{-1} \text{ de SC antes del encapsulamiento}$ (Reid, Vuilleumard, Britten, Arcand, Farnworth y Champagne, 2005).

6.6. Supervivencia de *Lb casei* encapsulado en yogur

6.6.1. Elaboración de yogur bajo en grasa

Se preparó yogur de acuerdo al método descrito por Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, Aguirre-Mandujano y Vernon-Carter (2004), a partir de lotes de 1 L de leche rehidratada conteniendo 15 g de grasa L⁻¹ y 120 g de sólidos totales L⁻¹, en cuya formulación se usaron cantidades adecuadas de leches en polvo entera y descremada. La leche se adicionó con 60 g de azúcar L⁻¹; pasteurizó (85 °C, 20 min); enfrió (45 °C); inoculó con un cultivo láctico liofilizado MY800 (0.03 g L⁻¹, conteniendo *Lb delbrueckii* ss. *bulgaricus* y *St. ss. thermophilus* e incubó a 45 °C hasta alcanzar una acidez de 90 °D. El yogur formado se refrigeró a 4 °C durante 24 h, después de lo cual se sometió a agitación moderada, utilizando un equipo CAFRAMO (modelo RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), para romper la estructura de gel y lograr un cuerpo fluido.

6.6.2. Enumeración de *Lb. casei* encapsulado en yogur

Cien gramos de yogur se colocaron por cuatruplicado en botellas de vidrio estériles e incorporaron con 10 g de la variación de cápsulas respectiva, mediante agitación suave. Las muestras se almacenaron a 4 ± 0.5 °C y la viabilidad de *Lb. casei* se determinó durante 20 días, a intervalos de 5 días. Las cápsulas se removieron del yogur por filtración y se lavaron con solución salina estéril. Las células de *Lb. casei* se liberaron de las cápsulas como ya se mencionó y se enumeraron por recuento en placa utilizando agar MRS con incubación a 37°C durante 48 h.

6.6.3. Tasa de sobrevivencia

A partir de los datos del número de células de *Lb. casei* viables (UFC g⁻¹ de cápsulas), se calculó la tasa de sobrevivencia, dividiendo la población viable final entre la población viable inicial. Los datos de tasa de sobrevivencia de las réplicas independientes se consideraron como de una sola réplica y se ajustaron a una cinética de decaimiento de primer orden de la forma:

$$\frac{dC(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_D} (C_{as} - C(t))$$

donde τ_D es la media del tiempo constante de decaimiento, C_{as} es el valor que la tasa de sobrevivencia alcanza asintóticamente (esto es, el valor en el cual la tasa de sobrevivencia se estabiliza). Entre más grandes sean los valores de τ_D and C_{as} , la matriz de entrapamiento es más estable. Estos parámetros fueron estimados por medio de un procedimiento de mínimos cuadrados, con la versión integral de la cinética de decaimiento, denominada: $C(t) = A_1 \exp(-t/\tau_D) + C_{as}$. Aquí A_1 es una constante de integración.

6.7. Sobrevivencia de *Lb casei* encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas

6.7.1. Sobrevivencia de *Lb casei* encapsulado a jugo gástrico simulado

Para determinar la sobrevivencia de *Lb. casei* a jugo gástrico simulado, se colocó 1 g de cada variación de cápsulas, preparadas recientemente, por triplicado, en tubos

conteniendo 9 ml de solución gástrica simulada estéril (pH de 3.0) con ácido clorhídrico 0.1 N. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 h en un baño de agua con agitación (Precision 360 Scientific Orbital, West Cortland St., Chicago, IL, EUA) (Hughes. y Hoover, 1995). Después de este periodo, las cápsulas se filtraron y enjuagaron con solución salina estéril e inmediatamente se determinó el número de células viables de *Lb. casei* por el procedimiento descrito en el punto 6.5.3 (Sheu y Marshall, 1993).

6.7.2. Sobrevivencia de *Lb casei* encapsulado a jugo gástrico y sales biliares

Para determinar la sobrevivencia de *Lb. casei* a jugo gástrico simulado y sales biliares, de manera secuencial, se colocó 1 g de cada variación de cápsulas, preparadas recientemente, por triplicado, en tubos conteniendo 9 ml de solución gástrica simulada estéril (pH de 3.0) con ácido clorhídrico 0.1 N. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 3 h en un baño de agua con agitación (Precision 360 Scientific Orbital, West Cortland St., Chicago, IL., EUA) (Hughes. y Hoover, 1995).

Posteriormente, las cápsulas se filtraron, enjuagaron con solución salina y colocaron en tubos conteniendo 9 ml de extracto de bilis de porcino (B8631, Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) al 1 % p/v (la concentración máxima de sales biliares en el intestino humano es de 2 %), y pH 6.4. Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h con agitación suave (Carteris, Kelly, Morelli y Collins, 1998; Sun y Griffiths, 2000; Madureira, Pereira, Truszkowska, Gomes, Pintado y Malcata, 2005). Al finalizar el periodo de incubación, se determinó el número de células viables de *Lb. casei* por el procedimiento descrito en el punto 6.5.3. (Sheu y Marshall, 1993). Células sin encapsular en la misma concentración, se sometieron a las mismas condiciones gastrointestinales simuladas que las variaciones de capsulas y sirvieron como control (Mosilhey, 2003).

6.8. Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple y cuando fue pertinente a comparación de medias de Tukey. La significancia establecida fue $p \leq 0.05$. Un Análisis de Componentes Principales A (ACP) se llevó a cabo sobre las propiedades de las cápsulas (diámetro, esfericidad y propiedades texturales) y los valores de sobrevivencia de *Lb. casei* e yogur y a condiciones gastrointestinales simuladas. El análisis de datos se realizó mediante el software Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Curva de crecimiento de *Lb. casei*

La curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* (Figura 7) determinada usando caldo MRS sin la adición de ácido ascórbico, mostró que el final de la fase logarítmica de crecimiento ocurrió a las 27.5 h de incubación, seguida comenzó la fase estacionaria. Cuando la determinación de la curva de crecimiento para *Lb. casei* se realizó usando caldo MRS adicionado con ácido ascórbico (0.05 % p/v), el tiempo requerido para alcanzar la finalización de la fase logarítmica se redujo de 27.5 a 24 h (Figura 7). *Lb. casei* es un microorganismo microaerotolerante, que sólo tolera pequeñas concentraciones de O₂, por lo tanto la adición de ácido ascórbico al medio de cultivo, favorece y acelera su crecimiento. Talwalkar y Kailasapathy (2004), mencionaron que el ácido ascórbico mantiene un potencial redox bajo, necesario para la viabilidad de las bacterias probióticas.

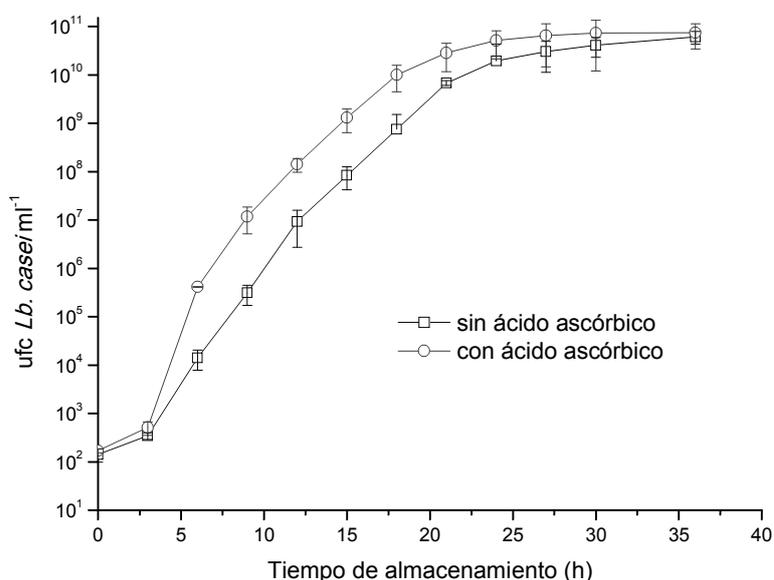


Figura 7. Curva de crecimiento de *Lb. casei* en caldo MRS no adicionado de ácido ascórbico (—□—) y en caldo MRS adicionado con ácido ascórbico (—○—), a 37°C.

El potencial redox del medio de cultivo se mantiene bajo debido a que el ácido ascórbico disminuye el potencial redox del medio de cultivo al secuestrar el oxígeno disuelto en éste. Dave y Shah (1997), informaron que la adición de ácido ascórbico en una concentración de 0.025 % p/v incrementó la sobrevivencia y la viabilidad de *Lb. acidophilus*. En este estudio se decidió cosechar a *Lb. casei* 81 LYO a las 20 h de incubación, momento en el que el microorganismo llegó a la fase logarítmica tardía de crecimiento; en este lapso de incubación se obtuvo una elevada concentración de células, útiles para realizar la microencapsulación.

En diversas investigaciones, se han encapsulado microorganismos cuando éstos han alcanzado las fases logarítmica o estacionaria. Adhikari, Mustapha y Grün (2003), cosecharon *Bifidobacterium longum* B6 en la parte final de la fase logarítmica de crecimiento (24 h de incubación), momento en el cual obtuvieron una población numerosa, así como buenos resultados en la encapsulación. Sheu, Marshall y Heymann (1993), cosecharon *Lb. bulgaricus* L2, al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, después de 15 a 16 h de incubación, a una temperatura de 37 °C. Por su parte, Reid, Champagne, Gardner, Fustier y Vuilleumard (2007), cosecharon *Lb. rhamnosus* R011, cuando este microorganismo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

7.2. Morfología, diámetro y rendimiento de las cápsulas

7.2.1 Morfología

Los valores de esfericidad de las cápsulas variaron entre 0.90 y 0.95 (Tabla 7). Las cápsulas A₀P₂, mostraron significativamente menor esfericidad que las cápsulas A_{0.5}P₀, A_{0.5}P₁, y A_{0.5}P₂, pero una esfericidad comparable a la de las cápsulas de A_{0.5}P₃, a pesar que estas últimas exhibieron un pequeño apéndice vermiforme (Figura 8). Estos resultados indican que el alginato contribuyó en mayor extensión a la esfericidad de las cápsulas que la pectina. Pillay y Fassihi (1999b), informaron que comprimidos (“pellets”) de

alginate de calcio tuvieron forma esencialmente esférica; en contraste, aquellos formados con pectato de calcio y alginate-pectato de calcio tuvieron una geometría parecida a disco, atribuyendo este fenómeno a las diferencias que ocurren en el entrecruzamiento de los biopolímeros durante la formación de los comprimidos.

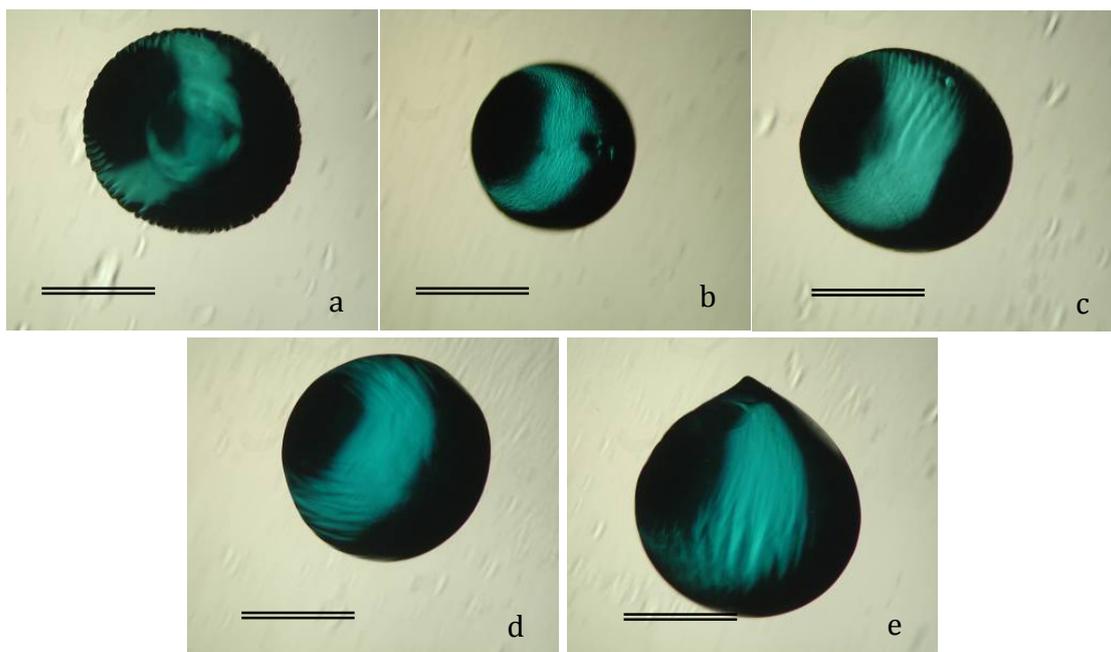


Figura 8. Micrografías representativas de las variaciones de cápsulas, obtenidas en un microscopio de contraste de fases: (a) A_0P_2 ; (b) $A_{0.5}P_0$; (c) $A_{0.5}P_1$; (d) $A_{0.5}P_2$ y (e) $A_{0.5}P_3$. A_xP_y : códigos de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. La barra de escala equivale a 0.5 mm.

Díaz-Rojas, Pacheco-Aguilar, Lizardi, Argüelles-Monal, Valdez, Ribaudó y Goucoolea (2004), establecieron que cápsulas de alginate-pectato de calcio pierden esfericidad conforme incrementa la proporción de pectina de linaza en la formulación, como

consecuencia de la estabilidad mecánica débil de la red de pectato de calcio comparada con las obtenidas en las redes de alginato de calcio.

Tabla 7. Valores medios (\pm DE) de las características físicas, rendimiento y eficiencia de encapsulamiento de las cápsulas.

Código de cápsula ^a	Diámetro (mm)	Esfericidad (0-1)	Rendimiento (g de cápsulas·100 g ⁻¹ de SC)	Eficiencia de encapsulamiento (%)
A ₀ P ₂	0.93 \pm 0.06 ^{bc}	0.90 \pm 0.05 ^a	69.5 \pm 2.5 ^b	68.8 \pm 2.5 ^b
A _{0.5} P ₀	0.71 \pm 0.07 ^a	0.94 \pm 0.03 ^b	52.9 \pm 3.6 ^a	54.3 \pm 3.7 ^a
A _{0.5} P ₁	0.88 \pm 0.04 ^b	0.94 \pm 0.03 ^b	64.4 \pm 0.5 ^b	64.1 \pm 0.5 ^b
A _{0.5} P ₂	0.89 \pm 0.08 ^b	0.95 \pm 0.02 ^b	77.3 \pm 2.4 ^c	77.9 \pm 2.4 ^c
A _{0.5} P ₃	0.97 \pm 0.07 ^c	0.93 \pm 0.03 ^{ab}	80.8 \pm 1.1 ^c	79.2 \pm 1.1 ^d

^a A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. ^{a, b, c, d}. Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

7.2.2 Diámetro

El diámetro, de igual manera que la esfericidad, fue afectado por la composición en biopolímeros de las cápsulas. Los valores del diámetro de las cápsulas variaron de 0.71 a 0.97 mm (Tabla 7). Las cápsulas de A_{0.5}P₀ mostraron significativamente menor diámetro

que aquellas formuladas con pectina sola o en combinación con alginato (Tabla 7). Al parecer, todas las variaciones de cápsulas fueron lo suficientemente grandes para lograr encapsular una buena carga celular (Tabla 7) para su protección en contra de factores ambientales detrimentales, pero probablemente no fueron lo suficientemente pequeñas para que su presencia en la boca no fuera detectada.

Anal y Singh (2007) mencionaron que un reto importante a vencer para la encapsulación de probióticos, lo constituye el gran tamaño de las células microbianas (típicamente 1-4 μm). Esta característica limita la carga celular en cápsulas pequeñas o cuando se producen cápsulas grandes, las propiedades texturales y sensoriales de los productos a los que son adicionadas pueden verse afectadas negativamente. Muthukumarasamy, Allan y Holley (2006), encontraron que cápsulas grandes (2-4 mm) elaboradas por la técnica de extrusión, fueron capaces de proteger mejor a *Lactobacillus reuteri*, que aquellas cápsulas más pequeñas (20-1000 μm) obtenidas por la técnica de emulsificación. Chandramouli, Kailasapathy, Peiris y Jones (2004), evaluaron la sobrevivencia de *Lactobacillus* encapsulado en alginato sometido a condiciones gástricas simuladas, y encontraron que la viabilidad incrementó conforme aumentó el tamaño de la cápsula de 200 a 1000 μm .

7.2.3 Rendimiento

El rendimiento de las cápsulas (g cápsulas por 100 g⁻¹ de SC), varió de 50.9 a 80.0, dependiendo de la concentración total de biopolímeros en SC (Tabla 7). A la más alta concentración de biopolímeros correspondió el mayor peso de cápsulas obtenidas.

7.2.4 Microestructura de las cápsulas

La baja firmeza de las cápsulas al deshidratarse a punto crítico, originó matrices muy porosas, débiles y frágiles para manipular en Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), por lo que se observaron algunas cápsulas colapsadas (Figura 9 y 10), algunas más fracturadas asimétricamente y algunos fragmentos a través de los cuales fue posible observar la estructura interna de las matrices poliméricas. Adicionalmente algunas de las cápsulas que se mantuvieron íntegras fueron fracturadas manualmente para poder observar su estructura interna (Figuras 9, 11 a 15). Mediante la técnica MEB fue posible apreciar las modificaciones causadas en el arreglo estructural de las cápsulas, al variar la composición biopolimérica de su pared.

En general, las diferentes variaciones de cápsulas presentaron una matriz de polisacáridos porosa (Figuras 11 a 15), debido a la hidratación de la matriz durante la gelación de los biopolímeros. La pared de todas las variaciones de cápsulas mostró una estructura más densa que el resto de la cápsula, con poros muy pequeños y ausencia de bacterias en su exterior, tal y como puede observarse en las cápsulas A_{0.5}P₁ (Figura 10). La estructura interna de las cápsulas en general, fue abierta y porosa y contuvo una elevada carga celular (Figuras 9 a 15); observaciones similares fueron informadas por Sheu y Marshall (1993), Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000) y Allan-Wojtas, Hansen y Paulson (2008).

La mayor compactación de la pared de las cápsulas puede atribuirse a su contacto directo con la disolución de cloruro de calcio. De acuerdo con Reid, Vuilleumard, Britten, Arcand, Farnworth y Champagne (2005) una estructura más compacta puede ser formada a altas concentraciones de iones calcio; pudiendo así explicarse la apariencia diferente entre la superficie y el centro de las cápsulas. Además, la velocidad de gelación de la superficie de las cápsulas es más rápida, casi instantánea, que en el interior, por la alta concentración de iones calcio; mientras que la gelación en el centro de las cápsulas depende de la tasa de difusión de los iones calcio y su concentración en el gel (Allan-Wojtas, Hansen y Paulson, 2008).

También se observaron diferencias en la apariencia de la matriz interna de las cápsulas, de acuerdo a su composición; así, las cápsulas $A_{0.5}P_0$, elaboradas sólo con A (Figura 11) y las cápsulas A_0P_2 formuladas sólo con P (Figura 12) mostraron matrices internas más porosas que aquellas exhibidas por el resto de las cápsulas $A_{0.5}P_1$, $A_{0.5}P_2$, $A_{0.5}P_3$, elaboradas a partir de mezclas A-P (Figuras 13 a 15). Asimismo, las matrices internas de las cápsulas constituidas por mezclas A-P, fue más densa conforme incrementó la concentración de biopolímeros en la formulación (Tabla 8).

Las observaciones expuestas parecen indicar que aumentos en la concentración de biopolímeros de las cápsulas, mediante la incorporación de mayores concentraciones de P, resultaron en la formación de matrices internas con una estructura más compacta. Una mayor concentración de biopolímero resulta en una estructura capsular más compacta y de menor porosidad; no obstante, existe un límite de concentración máxima de biopolímero a usar, como resultado de las dificultades que implica el manejo de dispersiones con altas viscosidades en el método de extrusión.

La porosidad de la matriz encapsulante es un factor importante, que afecta la viabilidad de las bacterias cuando son sometidas a ambientes adversos, tales como el tracto gastrointestinal; esta propiedad puede ser controlada por las características del biopolímero (peso molecular, contenido y distribución secuencial de ácido gulurónico o galacturónico), cinética de gelación y concentración de iones divalentes, para formar estructuras geladas menos porosas, las cuales pueden proteger mejor a las bacterias (Thu, Bruheim, Espevik, Smidsrød, Soon-Shiong y Skjåk-Bræk, 1996; Allan-Wojtas, Hansen y Paulson, 2008).

En todos los casos, la estructura interna de las cápsulas reveló la presencia de microcavidades o poros distribuidos de forma irregular, en los que se encontró la presencia de células de *Lb. casei* (Figuras 11 a 15). Hansen, Allan-Wojtas, Jin y Paulson (2002) y Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000), observaron que la matriz de alginato de cápsulas conteniendo bacterias fue marcadamente más porosa que aquella de cápsulas ausentes de bacterias. Estos autores explicaron que

posiblemente la presencia de bacterias interrumpió la gelación del biopolímero en su vecindad inmediata, originando cavidades internas en las cápsulas.

El grado de entrecruzamiento es un parámetro que regula varias propiedades de las cápsulas, tales como la dinámica de erosión de la matriz, hinchamiento y liberación de bioactivos a través de los poros generados por entrecruzamiento (Pillay y Danckwerts, 2002). Hansen, Allan-Wojtas, Jin, y Paulson (2002), encontraron que la alta porosidad de la red de alginato en cápsulas que contenían bacterias limitó su efecto protector ante jugos gástricos simulados a pH 2.0 y 3.0, así como durante el almacenamiento de las cápsulas en leche a 4°C durante 16 días.

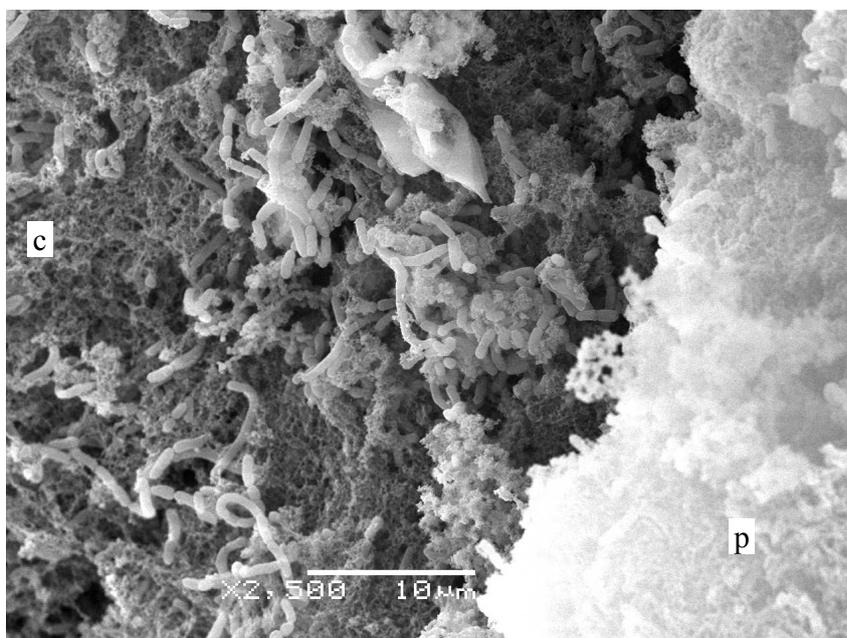


Figura 9. Micrografía MEB representativa de una cápsula ($A_{0.5}P_0$) fracturada, p: pared interna de la cápsula, c: centro de la cápsula. Ampliación 2500 ×.

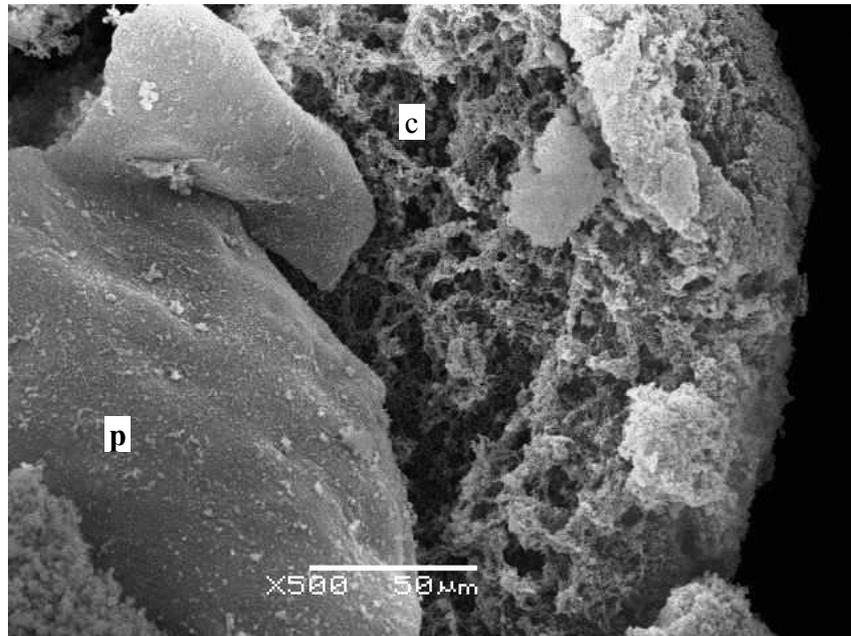


Figura 10. Micrografía MEB representativa de una cápsula ($A_{0.5}P_1$) fracturada, p: pared exterior de la cápsula, c: centro de la cápsula. Ampliación 500 \times .

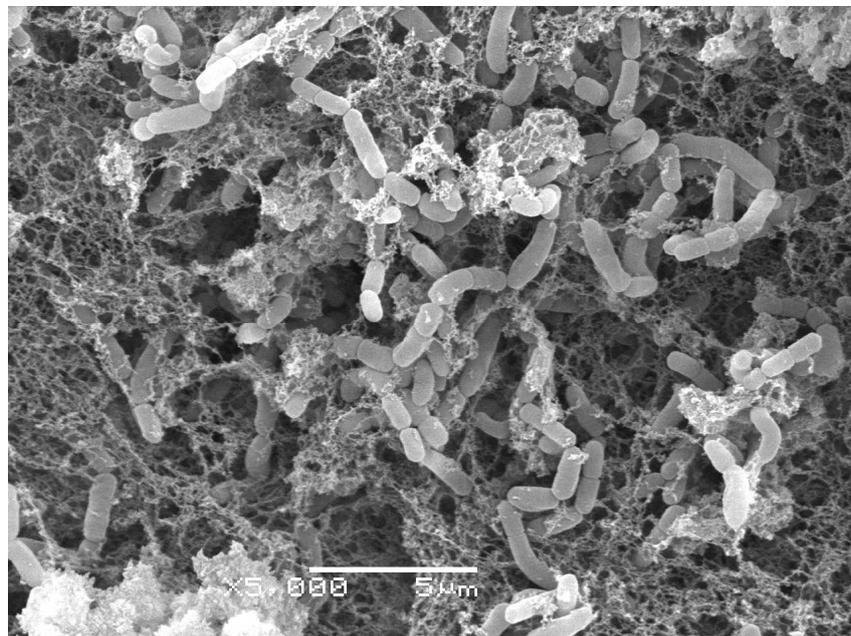


Figura 11. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula ($A_{0.5}P_0$). Ampliación 5000 \times .

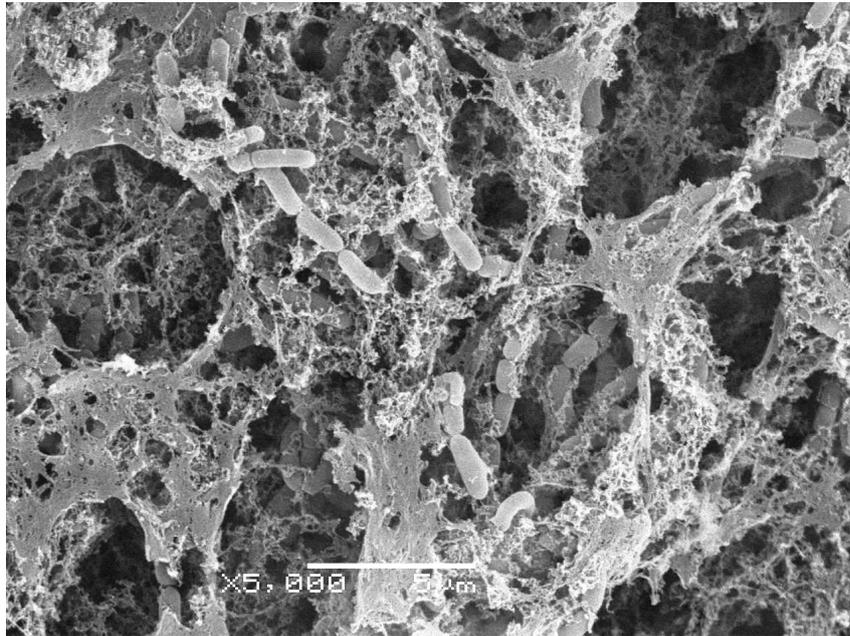


Figura 12. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A_{0.5}P₂). Ampliación 5000 ×.

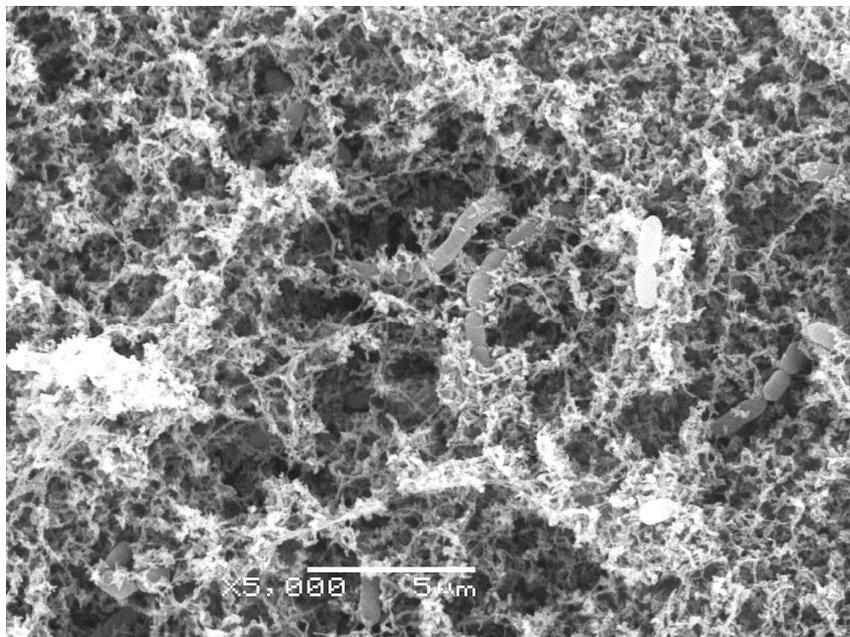


Figura 13. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A_{0.5}P₁). Ampliación 5000 ×.

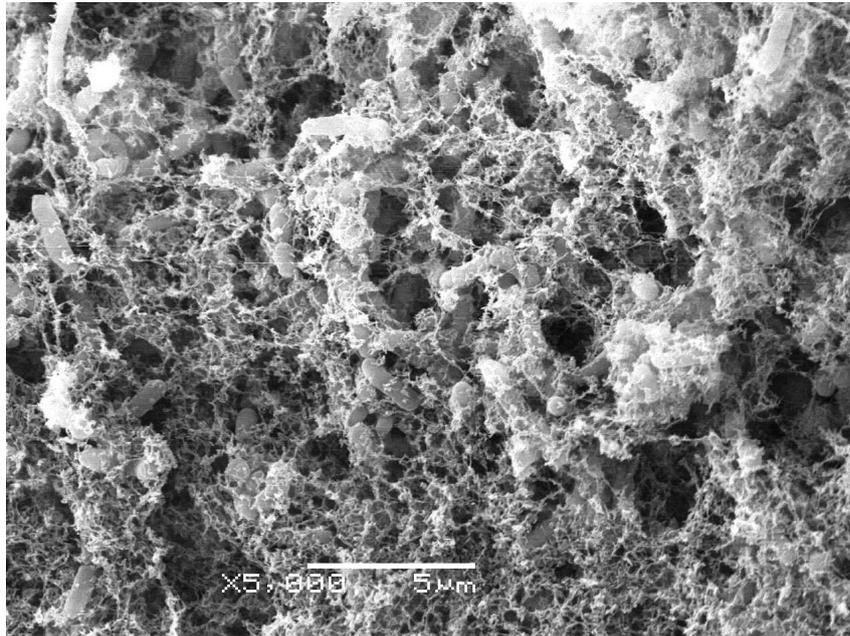


Figura 14. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A_{0.5}P₂). Ampliación 5000 ×.

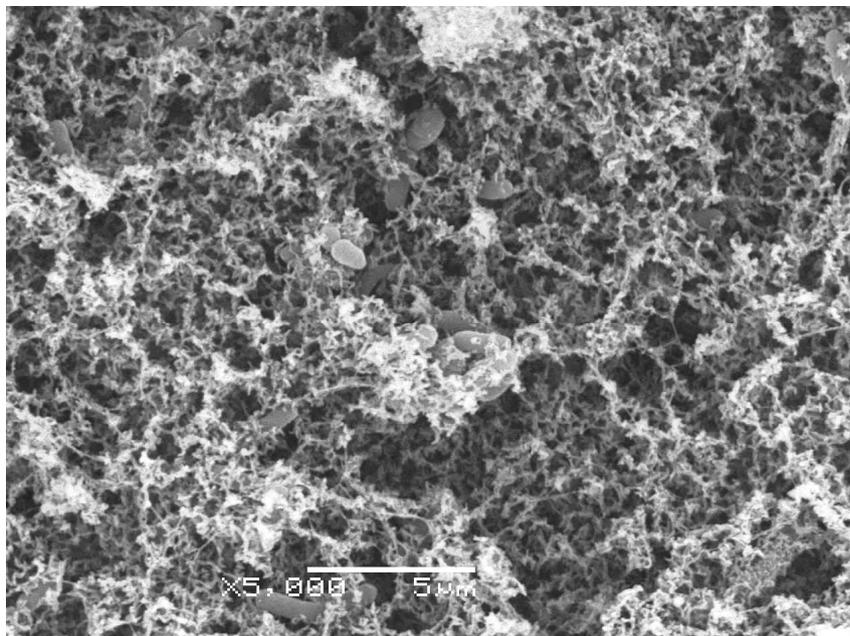


Figura 15. Micrografía MEB representativa de la estructura interna de una cápsula (A_{0.5}P₃). Ampliación 5000 ×.

7.3. Propiedades texturales de las cápsulas

La composición en biopolímeros y su concentración, afectaron las propiedades texturales de las cápsulas. Los resultados obtenidos indican que las cápsulas de alginato ($A_{0.5}P_0$) mostraron valores significativamente menores de dureza, elasticidad, y resiliencia que aquellos mostrados por las cápsulas formuladas con pectina (A_0P_2), pero tuvieron valores comparables ($p > 0.05$) de cohesividad (Tabla 8). Las cápsulas $A_{0.5}P_1$ y $A_{0.5}P_2$ exhibieron valores intermedios en las propiedades texturales de dureza, elasticidad y resiliencia que aquellos mostrados por $A_{0.5}P_0$ y $A_{0.5}P_2$, pero la cohesividad de las cápsulas de $A_{0.5}P_2$ fue considerablemente mayor ($p \leq 0.05$) que aquella de las cápsulas A_0P_2 .

Tabla 8. Valores medios (\pm DE, n=9) de las propiedades texturales de las variaciones de cápsulas

Código de cápsula ^a	Dureza (N)	Cohesividad (Relación)	Elasticidad (Relación)	Resiliencia (Relación)
A_0P_2	1.11 \pm 0.08 ^c	0.84 \pm 0.01 ^a	0.99 \pm 0.01 ^b	0.58 \pm 0.01 ^c
$A_{0.5}P_0$	0.45 \pm 0.01 ^a	0.82 \pm 0.01 ^a	0.89 \pm 0.02 ^a	0.44 \pm 0.01 ^a
$A_{0.5}P_1$	0.68 \pm 0.05 ^b	0.81 \pm 0.02 ^a	0.90 \pm 0.01 ^a	0.46 \pm 0.01 ^a
$A_{0.5}P_2$	0.76 \pm 0.03 ^b	0.87 \pm 0.01 ^b	0.99 \pm 0.03 ^b	0.55 \pm 0.02 ^b
$A_{0.5}P_3$	2.08 \pm 0.20 ^d	0.89 \pm 0.01 ^b	0.99 \pm 0.03 ^b	0.64 \pm 0.02 ^d

^a A_xP_y : código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. ^{a, b, c, d}. Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Las cápsulas A_{0.5}P₃ presentaron los valores más altos ($p \leq 0.05$) de dureza y resiliencia. Los resultados expuestos indican que existieron diferencias en las reacciones de entrecruzamiento de las redes poliméricas de alginato de calcio, pectato de calcio y alginato-pectato de calcio; las cuales resultaron en diferentes respuestas mecánicas a la deformación. Adicionalmente, puede inferirse que el diseño de cápsulas con diferentes propiedades texturales puede lograrse a través de variaciones en las relaciones de A y P.

7.4. Eficiencia de encapsulamiento de *Lb. casei*

La eficiencia de encapsulamiento de *Lb. casei* en las variaciones de cápsulas varió entre 54.3 y 79.2 % (Tabla 7). Las cápsulas elaboradas sólo con alginato (A_{0.5}P₀) mostraron significativamente menor eficiencia de encapsulamiento que aquellas observadas en el resto de las variaciones de cápsulas (Tabla 7). Las variaciones de cápsulas A_{0.5}P₂ y A_{0.5}P₃ presentaron las eficiencias de entrapamiento de células más altas y entre ellas no existió diferencia significativa (Tabla 7). A pesar de que en todos los casos la SC tuvo la misma carga celular inicial ($8.83 \pm 0.15 \log \text{ ufc ml}^{-1} \text{ SC}$), la carga celular en las cápsulas A_{0.5}P₀ ($8.56 \pm 0.03 \log \text{ ufc g}^{-1}$), fue significativamente menor que aquellas (8.88 ± 0.03 a $8.92 \pm 0.01 \log \text{ ufc g}^{-1}$) obtenidas en el resto de las cápsulas.

Reid, Vuilleumard, Britten, Arcand, Farnworth y Champagne (2005) relacionaron la eficiencia de encapsulamiento con dos factores que afectan las cuentas teóricas de ufc en las cápsulas: (1) La pérdida de células en la disolución de CaCl₂, y (2) la pérdida de viabilidad de las células en las mismas cápsulas. La eficiencia de encapsulamiento incrementó significativamente conforme la concentración de biopolímeros aumentó, debido a que mayores pesos de cápsulas fueron obtenidos 100 g^{-1} de SC (Tabla 7). Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000), informaron de mejoras en la eficiencia de encapsulación de *Lb. casei* en cápsulas de alginato, conforme la concentración de biopolímeros incrementó por la adición de almidón

resistente Hi-maíz en porcentajes en peso de 0 a 2. Kailasapathy, Perera y Phillips (2006), observaron eficiencias de encapsulación para enzimas de sabor de menos del 60 % en cápsulas de alginato-almidón Hi-maíz. Los valores de eficiencia de encapsulación obtenidos se encontraron entre los informados por Pillay y Fassihi (1999a) para diclofenaco de sodio en comprimidos de alginato-pectato de calcio (84.94 %) y en comprimidos de alginato de calcio puro (49.94 %).

7.5 Supervivencia de *Lb. casei* encapsulado en yogur

La composición y la concentración de biopolímeros en las cápsulas afectó la supervivencia de *Lb. casei* en yogur. La supervivencia de *Lb. casei* encapsulado durante el tiempo de almacenamiento de yogur, fue mayor al 90 % en las variaciones de cápsulas elaboradas con pectina y alginato-pectina; en contraste, la supervivencia de *Lb. casei* disminuyó hasta aproximadamente el 40 % de la carga inicial en las cápsulas A_{0.5}P₀, preparadas sólo con alginato (Tabla 9). Las células de *Lb. casei* contenidas en las cápsulas A₀P₂ preparadas sólo con P, mantuvieron su número durante el tiempo evaluado y mostraron mayor supervivencia que la exhibida por las células contenidas en las cápsulas A_{0.5}P₀, formuladas sólo con A, a cualquier tiempo de almacenamiento (Tabla 9).

Los valores de supervivencia de *Lb. casei* contenido en las cápsulas formadas por alginato-pectina A_{0.5}P₁ y A_{0.5}P₂, fueron ligeramente mayores al 100 % durante el tiempo de almacenamiento del yogur (Tabla 9). Después de 20 días de almacenamiento a 4 °C, el número de células viables de *Lb. casei* se mantuvo en el rango de concentración terapéutica (10⁷ ufc g⁻¹) en el yogur (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2006), independientemente de la composición de las diferentes variaciones de cápsulas.

Tabla 9. Valores medios (\pm DE, n=9) de viabilidad y sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado, durante el almacenamiento de yogur

Días Código ^a de cápsula	Log ufc de <i>Lb. casei</i> g ⁻¹ cápsulas y sobrevivencia (%)				
	0	5	10	15	20
A ₀ P ₂	8.92 \pm 0.01 ^A	8.90 \pm 0.01 ^A (95.8 \pm 2.2) ^{bA}	8.90 \pm 0.02 ^A (96.4 \pm 3.5) ^{aA}	8.86 \pm 0.01 ^A (87.6 \pm 2.7) ^{cA}	8.90 \pm 0.07 ^A (97.3 \pm 5.3) ^{bA}
A _{0.5} P ₀	8.56 \pm 0.03 ^A	8.36 \pm 0.04 ^B (63.9 \pm 6.4) ^{cA}	8.31 \pm 0.09 ^B (58.3 \pm 13.2) ^{bAB}	8.20 \pm 0.04 ^C (43.8 \pm 4.2) ^{dB}	8.15 \pm 0.03 ^C (39.6 \pm 2.5) ^{cB}
A _{0.5} P ₁	8.92 \pm 0.02 ^B	8.93 \pm 0.03 ^B (100.3 \pm 3.4) ^{bA}	8.92 \pm 0.02 ^B (100.0 \pm 4.1) ^{aA}	8.99 \pm 0.04 ^A (116.4 \pm 3.6) ^{aAB}	8.97 \pm 0.04 ^{AB} (111.9 \pm 11.4) ^{abB}
A _{0.5} P ₂	8.89 \pm 0.02 ^C	8.93 \pm 0.03 ^A (111.0 \pm 6.2) ^{aAB}	8.90 \pm 0.02 ^{AB} (102.6 \pm 4.1) ^{aB}	8.91 \pm 0.01 ^{AB} (103.6 \pm 1.9) ^{bB}	8.98 \pm 0.05 ^A (120.1 \pm 4.9) ^{aA}
A _{0.5} P ₃	8.88 \pm 0.03 ^B	8.93 \pm 0.04 ^B (95.76 \pm 2.2) ^{bA}	8.90 \pm 0.02 ^B (96.36 \pm 3.5) ^{aA}	8.92 \pm 0.01 ^B (87.58 \pm 2.7) ^{cA}	8.97 \pm 0.02 ^A (97.27 \pm 5.3) ^{bB}

^a A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A-100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P-g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. ^{a, b, c, d}. Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$) entre variaciones de cápsulas. ^{A, B, C, D}. Diferentes superíndices en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$) durante el tiempo de almacenamiento.

Los datos experimentales y los datos ajustados de viabilidad y tasa de sobrevivencia de las células de *Lb. casei* encapsuladas e incorporadas a yogur, se muestran en la figura 17 para las cápsulas A_{0.5}P₀ y en la figura 18 para las cápsulas A_{0.5}P₃. El resto de las variaciones de cápsulas mostraron una tendencia similar a aquella exhibida por las cápsulas A_{0.5}P₀ y A_{0.5}P₃.

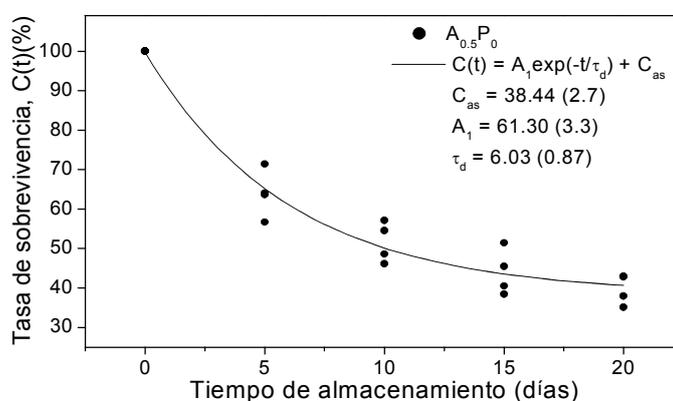


Figura 16. Tasas de sobrevivencia y modelos ajustados para *Lb. casei* contenido en las cápsulas $A_{0.5}P_0$ e incorporado en yogur almacenado durante 20 días a 4 °C.

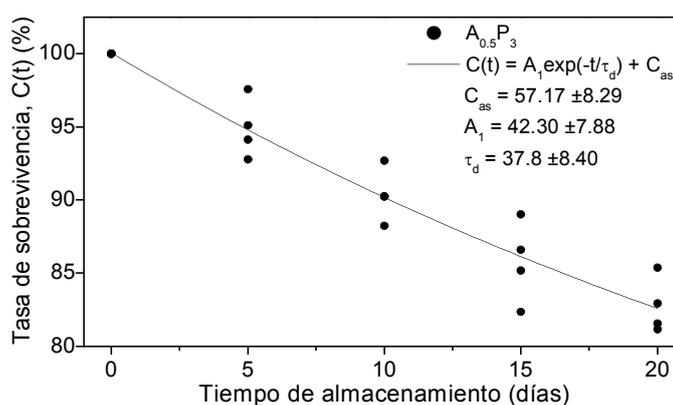


Figura 17. Tasas de sobrevivencia y modelos ajustados para *Lb. casei* contenido en las cápsulas $A_{0.5}P_3$ e incorporado en yogur almacenado durante 20 días a 4 °C.

La correlación de ajuste fue por lo menos de 0.88 para todos los casos cuando se aplicó un modelo cinético de decaimiento de primer orden:

$$\frac{dC(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_D} (C_{as} - C(t)) .$$

Para las diferentes variaciones de cápsulas, los resultados obtenidos para el tiempo de decaimiento medio constante y el valor de estabilización asintótica alcanzado son mostrados en la Tabla 10. La adición de P mejoró la sobrevivencia de las células de *Lb. casei*, incrementándose tanto el tiempo de decaimiento medio constante, como el valor de la estabilización asintótica (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros resultantes del ajuste de los datos experimentales para la tasa de sobrevivencia *Lb. casei* encapsulado en yogurt almacenado 20 días a 4 °C.

Código de cápsula ^a	A _{0.5} P ₀	A _{0.5} P ₁	A _{0.5} P ₂	A _{0.5} P ₃	A ₀ P ₂
τ_D (días)	6.03±2.7	18.15±3.4	32.15±4.1	37.8±8.4	31.15±7.1
C_{as} (%)	38.44±0.9	48.12±3.9	56.23±5.1	57.17±8.3	51.13±6.2

^a A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. τ_D : Tiempo de decaimiento medio constante. C_{as} : Valor al cual la tasa de sobrevivencia se convierte en asintótica.

Al parecer, el uso de 2 % de P sólo o entre 2 y 3 % combinada con 0.5 % de A, tendió a exhibir cuentas óptimas de *Lb. casei*, las cuales fueron superiores al requerimiento terapéutico de 10⁷ ufc g⁻¹ en yogurt (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2006), después de 20 días de almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, la ausencia de alginato en las variaciones de cápsulas A₀P₂ tuvo un efecto negativo en la capacidad de sobrevivencia de *Lb. casei*, en comparación con la sobrevivencia observada en las cápsulas A_{0.5}P₂ y A_{0.5}P₃. Esto sugiere que ambos, P y A, inducen una especie de efecto sinérgico en la consolidación de la matriz encapsulante.

Las células contenidas en las cápsulas A_{0.5}P₀, mostraron los valores más bajos de tiempo de decaimiento medio constante (τ_D) y de estabilización asintótica (C_{as}), en comparación con el resto de las variaciones de cápsulas (Tabla 10). Se ha informado que el factor principal que influye en la sobrevivencia de las bacterias probióticas es el incremento en el contenido de ácido del yogur después de la fermentación y durante el tiempo de almacenamiento, el cual es denominado “sobreacidificación” o “postacidificación” (Shah y Jelen, 1990).

Los resultados obtenidos indican que las cápsulas de alginato-pectina mejoraron la sobrevivencia de *Lb. casei* en yogur, probablemente debido a la lenta tasa de difusión de los compuestos producidos durante la fermentación de yogur, tales como ácidos y peróxido de hidrógeno, que inhiben su crecimiento (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2006). Los valores de pH de los yogures variaron entre 4.64 ± 0.0 al día 0 y 4.48 ± 0.01 al día 20 y en un día en particular no existieron diferencias significativas entre los valores de pH de los yogures.

Adhikari, Mustapha y Grün (2003), informaron valores y variaciones de pH similares, para yogures conteniendo *Bifidobacterium longum* encapsulado en κ -carragenina, durante 30 días de almacenamiento, y también encontraron que la carga celular no declinó. Investigaciones previas han demostrado el efecto protector ejercido por la encapsulación de bacterias probióticas cuando éstas fueron expuestas a condiciones adversas, encontrando que las bacterias exhibieron una sobrevivencia significativamente mayor que aquellas células no encapsuladas cuando fueron sometidas a bajo pH (Lian, Hsiao y Chou, 2003; Picot y Lacroix, 2004; Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas y Vernon-Carter, 2009).

7.6 Sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado a condiciones gastrointestinales simuladas.

La sobrevivencia de las células encapsuladas después de la exposición secuencial a condiciones ácidas y sales biliares, decreció significativamente en todos los casos. Sin embargo, la composición de la matriz encapsulante proporcionó diferentes grados de protección a las células de *Lb. casei*, resultando en valores de sobrevivencia significativamente diferentes (Figura 19).

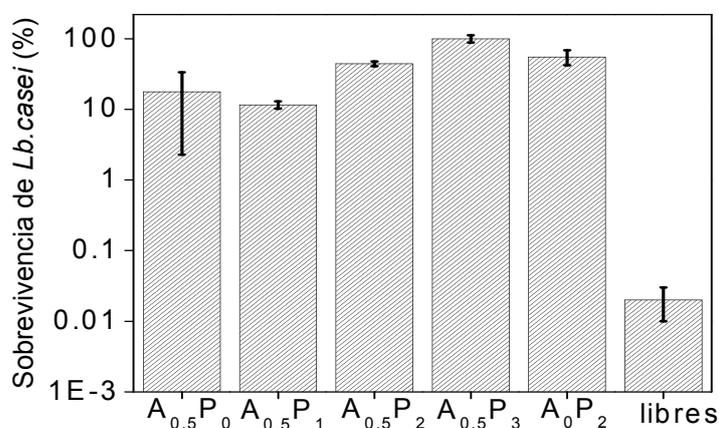


Figura 18. Efecto de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares sobre la sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado en las diferentes variaciones de cápsulas y células libres. A_x P_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias(n=9).

Los resultados indicaron que las matrices binarias alginato-pectato de calcio de las cápsulas, proveyeron una mejor protección contra las sales biliares a *Lb. casei*, que las matrices de las cápsulas constituidas por uno de los biopolímeros. Kim, Jun, Lee, Kim, Lee, Kim y Paik (2006), reportaron que *B. polyfermenticus* en cápsulas de alginato-

metilcelulosa (6:1) mostraron una mayor sobrevivencia a la exposición a jugos gástricos y sales biliares que la mostrada por cápsulas de alginato solo.

La figura 19 muestra el número de células viables de *Lb. casei* contenido en las distintas variaciones de cápsulas después de su exposición secuencial por 6 horas a condiciones ácidas y sales biliares. Puede observarse que al encapsulamiento de *Lb. casei*, resultó en un mayor número de células sobrevivientes, en comparación con el obtenido para el caso de células de *Lb. casei* libres expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas.

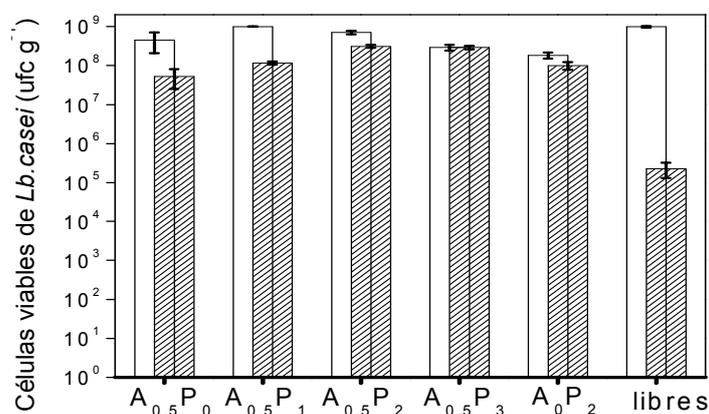


Figura 19. Efecto de la exposición a jugos gástricos simulados y sales biliares sobre la viabilidad: inicial (□) y final (▨) de *Lb. casei* encapsulado y células libres. A_xP_y: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. Las barras de error representan la desviación estándar de las medias(n=9).

Además, la adición de P tuvo un efecto benéfico adicional en la reducción de la tasa de decaimiento de las células de *Lb. casei* encapsuladas. Es interesante señalar que la

ausencia de A en la formulación de las cápsulas redujo en alguna extensión el efecto protector, sugiriendo que ambos, A y P, conforman una matriz encapsulante más estructurada y más resistente al efecto de ácidos y sales biliares. En la figura 19 puede apreciarse que precisamente la formulación de las cápsulas A_{0.5}P₃ permitió la mayor sobrevivencia de células de *Lb. casei*, y en consecuencia la mayor protección a condiciones gastrointestinales simuladas.

Además las cápsulas A_{0.5}P₃ estuvieron relacionadas con mayor protección a células de *Lb. casei* incorporadas a yogur, durante el tiempo de almacenamiento de este último (Tabla 10). Sultana, Godward, Reynolds, Arumugaswamy, Peiris y Kailasapathy (2000), informaron que la sobrevivencia de células de *Lb. casei* atrapado en cápsulas de alginato-almidón decreció 2 log ufc g⁻¹ después de su incubación en condiciones gastrointestinales simuladas durante 3 h a 37 °C.

7.7. Interrelación entre la sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado en yogur y condiciones gastrointestinales simuladas y las propiedades físicas y texturales de las cápsulas

Se aplicó un Análisis de Componentes Principales (ACP) a la sobrevivencia de *Lb. casei* encapsulado en yogur y en condiciones gastrointestinales simuladas, la esfericidad, el diámetro y las propiedades texturales de las cápsulas, con el fin de establecer las relaciones principales existentes entre estos parámetros y obtener la distribución de las variaciones de cápsulas en este espacio bidimensional. El primer componente principal explicó el 58.5 % de la varianza total y en éste la sobrevivencia de *Lb. casei* en yogur y en condiciones gástricas simuladas, estuvo correlacionada positivamente con el diámetro y todas las propiedades texturales (dureza, elasticidad, cohesividad y resiliencia) de las cápsulas (Figura 21). El segundo componente principal explicó el 20.2 % de la varianza total y en éste la sobrevivencia de *Lb. casei* después de exposición secuencial a jugo

gástrico simulado y sales biliares, estuvo correlacionada positivamente con la esfericidad de las cápsulas (Figura 21). Los dos componentes principales claramente distinguieron las propiedades de las cápsulas en términos de su composición.

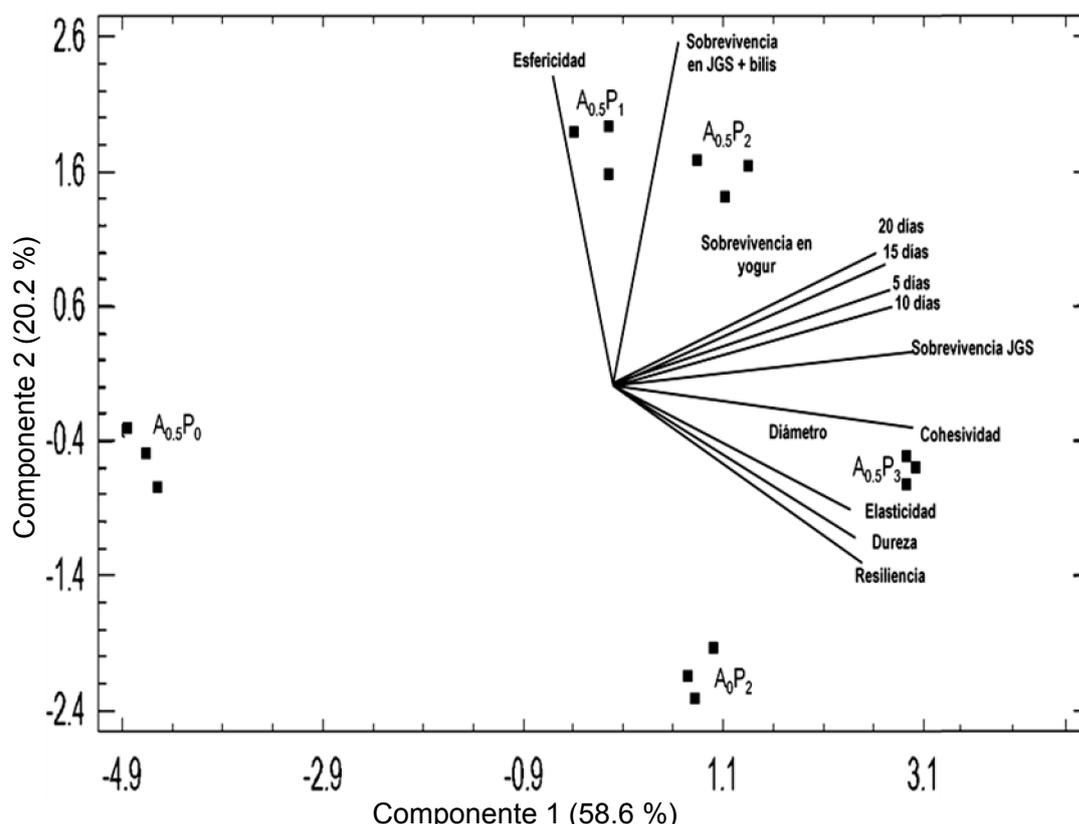


Figura 20. Análisis de componentes principales de las propiedades texturales de las cápsulas y supervivencia de *Lb. casei* en el almacenamiento de yogur y en condiciones gástricas simuladas. $A_x P_y$: código de las variaciones de cápsulas, donde A: alginato de sodio; x subíndice: g de A·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros; P: pectina de bajo metoxilo amidada; y subíndice: g de P·100 g⁻¹ de suspensión celular de *Lb. casei*-dispersión de biopolímeros. Las barras representan la desviación estándar de las medias(n=9).

La posición de las cápsulas elaboradas con alginato ($A_{0.5}P_0$) y pectina (A_0P_2) en el espacio bidimensional, permitió establecer que P contribuyó en mayor extensión a la obtención de cápsulas con tamaños relativamente más grandes y con altos valores de dureza, elasticidad, cohesividad y resiliencia más elevados; mientras que A afectó positivamente la esfericidad de las cápsulas.

A partir de la posición de las cápsulas en el espacio bidimensional (Figura 21), es claro que las cápsulas elaboradas con mezclas binarias de alginato-pectina protegieron las células de *Lb. casei* encapsuladas en una mayor extensión, que aquellas cápsulas preparadas con los biopolímeros solos. Las variaciones de cápsulas $A_{0.5}P_1$ y $A_{0.5}P_2$, tuvieron forma esférica, y propiedades texturales intermedias. Las cápsulas $A_{0.5}P_3$ mostraron las propiedades texturales más altas y la menor esfericidad, y fueron las que proporcionaron mejor protección a *Lb. casei* encapsulado en yogur, durante el tiempo de almacenamiento.

8. CONCLUSIONES

El uso de mezclas de alginato-pectina permitió la obtención de cápsulas que proporcionaron mejor protección a *Lb. casei* encapsulado contra factores ambientales adversos, en comparación con el efecto protector proporcionado por cápsulas elaboradas con alginato o pectina solos.

Las propiedades texturales, las propiedades físicas y la eficiencia de encapsulamiento de las cápsulas alginato-pectina fueron afectadas por la concentración total de biopolímeros y la relación de ambos biopolímeros utilizada. Aumentos en la concentración de biopolímeros resultaron en cápsulas con mayor eficiencia de encapsulamiento. Las relaciones de alginato-pectina 1:2 y 1:4 proporcionaron cápsulas más esféricas, con propiedades texturales intermedias; un incremento en la relación alginato-pectina a 1:6, proporcionó cápsulas con las propiedades texturales más elevadas y menor esfericidad, las cuales protegieron mejor a *Lb. casei* encapsulado contra exposición secuencial a jugo gástrico simulado y sales biliares, y en yogur durante el tiempo de almacenamiento.

La selección de un tipo de cápsula para el encapsulamiento de *Lb. casei* debería realizarse en términos de las propiedades deseadas en las cápsulas, tales como tamaño, esfericidad, sobrevivencia en yogur con el tiempo de almacenamiento y/o sobrevivencia en jugo gástrico y sales biliares.

El tiempo de decaimiento medio y la tasa de sobrevivencia asintótica constante son parámetros importantes para entender la pérdida de viabilidad de las células de *Lb. casei* durante el almacenamiento de yogur. La sobrevivencia a ácido y a sales biliares de *Lb. casei* encapsulado, disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) en todas las variaciones de cápsulas, pero las cápsulas A_{0.5}P₃ proporcionaron la mejor protección.

9. REFERENCIAS

1. Adhikari, K., Mustapha, A. y Grün, I. U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, *68*(1): 275-280.
2. Alamprese, C. Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C. y Corti, S. (2005). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, *58*(4): 200-206.
3. Allan-Wojtas, P., Hansen, L. T., y Paulson, A. T. 2008. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *41*(1): 101-108.
4. Anal, A. K., Bhopatkar, D., Tokura, S., Tamura, H. y Stevens, W. F. (2003). Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *29*(6): 713-724.
5. Anal, A. K., Stevens, W. F. y Remuñán-López, C. (2006). Iontropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, *312*(1-2): 166-173.
6. Anal, A. K. y Stevens, W. F. (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, *290*(1/2): 45-54.
7. Anal, A. y Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(5): 240-251.
8. Aragon-Alegro, L. C., Alarcón-Alegro, J. H., Cardarelli, H. R., Chiu, M. C. y Saad, S. M. I. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *40*(4): 669-675.
9. Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M. y Ben-Embarek, P. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in

- Food, London (Ontario, Canada) April 30 and May 1. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
10. Artignan, J. M., Corrieu, G., y Lacroix, C. (1997). Rheology of pure and mixed kappa-carrageenan gels in lactic acid fermentation conditions. *Journal of Texture Studies*, 28(1): 47-70.
 11. Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* (Salminen, S. y Von Wright, A. Eds), 2ª ed. pp: 1-72. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
 12. 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(2): 239-248.
 13. Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Quiberoni, A., Suárez, V. B. y Zalazar C. A. (2005). Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*, 38(5): 597-604.
 14. Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroche, G., Thouvenot, P, y Marine Piaia, M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science*, 74(2): 409-413.
 15. Beunink, J., Baumgärtl, H., Zimelka, W. y Rehm, H. J. (1989). Determination of oxygen gradients in single Ca-alginate beads by means of oxygen microelectrodes. *Experientia*, 45:1041-1047.
 16. Birollo, G. A., Reinheimer, J. A. y Vinderola, C. G. (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, 33(9): 799-805.
 17. Blanchete, L., Roy, D., Belanger, G. y Gauthier, S. F. (1996). Production of Cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 79(1): 8-15.
 18. Blanchette, L. y Roy, D. (1995). Production of cultured Cottage cheese dressing by Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 78(7): 1421-1429.

19. Blaut, M. (2002). Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, 41(1):11-16
20. Bomba, A., Jonecova, Z., Koscova, J., Nemcova, R., Gancarcikova, S. y Mudronova, D. (2006). The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: A review. *Biologia*, 61(6): 729–734.
21. Bourne, M. C. (2002). *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (2nd ed.). Academic Press. New York.
22. Boyle, R. J. y Tang, M. L. (2006). The role of probiotics in the management of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*, 36(5): 568–576.
23. Braccini, I. y Prez, S. (2001). Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4): 1089-1096.
24. Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L. y Arias, M. L. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Archivos latinoamericanos de Nutrición*, 51(1): 1-6.
25. Capela, P., Hay, T. K. C. y Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2): 203-211.
26. Carteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. y Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotics *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5): 759–768.
27. Champagne C. P y Fustier P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 184–190.
28. Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., y Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1): 27-35.

29. Choonara, Y. E., Pillay, V., Singh, N., y Ndesendo, M. K. (2008). Chemometric, physicochemical and rheological analysis of the sol-gel dynamic and degree of crosslinking of glycosidic polymers. *Biomedical Materials*, 3(2): 1-15.
30. Corbo, M. R., Albenzio, M., Angelis, M. D., Sevi, A. y Gobetti M. (2001). Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(3):551-561.
31. Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. y Ross, R. P. (2005). Survival of probiotic *Lactobacilli* in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6): 3060-3067.
32. Dave, R. I., y Shah, N. P. (1997). Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(6-7): 435-443.
33. Dave, R. I. y Shah, N. P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2804-2816.
34. De Souza, C. H. B., Buriti, F. C. A., Behrens, J. H. y Saad, S. M. I. (2007). Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(5): 871-877.
35. Díaz-Rojas, E. I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., Valdez, M. A., Ribaudó, M., y Goycoolea, F. M. (2004). Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*, 18(2): 293-304.
36. Dinakar, P., y Mistry, V. V. (1994). Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77(10): 2854-2864.
37. Draget, K. I., Skjåk-Bræk, G., y Smidsrød, O. (1997). Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21(1-2): 47-55.
38. Draget, K. I. (2000). Alginates. En *Handbook of Hydrocolloids* (Phillips, G. O., y Williams, P.A. eds).pp. 379-396. Woodhead Publishing., Cambridge, Inglaterra.

39. Dubey, U. K. y Mistry, V. V. (1996). Growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. *Journal of Dairy Science*, *79*(7): 1146-1155.
40. Ekinçi, F. Y., Okur, O. D., Ertekin, B. y Guzel-Seydim, Z. (2008). Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science & Technology*, *110*(3): 1-9.
41. Erdoğan, Ö y Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turk Journal of Biology*, *30*: 39-44.
42. Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinary, K., Funami, T., y Williams, P. A. (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, *72*(2): 334-341.
43. Fanger, G. O. (1974). What good are microcapsules? *Chemical Technology*, *4*: 397-405.
44. Fernández, M. F., Boris, S. y Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(3): 449 – 455.
45. Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (1999). Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, *82*(7): 1379–1387.
46. Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Kevin Collins, J., Fitzgerald, G. (2002). A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*, *12*(9): 749–756.
47. Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota. *Journal of Nutrition*, *125*(6): 1401-1412.
48. Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A. y Angelis, M. (1998). Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, *81*(1): 37.47.
49. Gobbetti, M. (1999). *Lactobacillus casei*. En *Encyclopedia of Microbiology* (Robinson, R., Batt, C. y Patel P. Eds.), 2ª ed. pp: 1157-1164. Academic Press. Ltd.

50. Gómez, A. M. P. y Malcata, F. X. (1998). Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: Response Surface Analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science* 81(6): 1492–1507.
51. González, M. B. y Gómez, T. M. (2004). Contenido e identificación de microorganismos probióticos en alimentos y suplementos. *Revista Salud pública y Nutrición*. Edición especial No. 1.
52. Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J. y Gill, H. S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3): 207–216.
53. Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., y Paulson, A. T. (2002). Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19(1): 35-45.
54. Hoefler, A. C. (2004). *Hydrocolloids: Practical guides for the food industry*. Ed. American Association of Cereal Chemists. U.S.A.
55. Hoover, D. G. (1993). Bifidobacteria: Activity and potential benefits. *Food Technology*, 47(6): 120.
56. Hughes, D. B., y Hoover, D. G. (1995). Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 78(2): 268-276.
57. Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., y Koivula, T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. Strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, 88(1): 90-97.
58. Isolauri, E., Kirjavainen, P. V. y Salminen, S. (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?. *Gut*, 50(3): 54-59.
59. Kailasapathy, K., Harmstorf, I. y Phillips, M. (2008). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 41(7): 1317-1322.

60. Kailasapathy, K., Perera, C., y Phillips, M. (2006). Evaluation of alginate-starch polymers for preparation of enzyme microcapsules. *International Journal of Food Engineering*, 2(2); art. 8.
61. Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3(2): 39-48.
62. Kailasapathy, K. y Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology & Cell Biology*, 78(1); 80-88.
63. Kailasapathy, K. y Masondole, L. (2005). Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60(3): 252-258.
64. Kailasapathy, K. y Rybka, S. (1997). *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* - their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52(1): 28-35.
65. Kalavrouzioti, I., Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. (2005). Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1): 30-38.
66. Kandler, O. y Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*, En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. y Holt, J. G. Eds.), vol. 2, 9ª ed. pp: 1063-1065. Williams and Wilkins, Baltimore, MA.
67. Kasımoğlu, A., Göncüoğlu, M. y Akgün, S. (2004). Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14(12): 1067-1073.
68. Khalil, A. H. y Mansour, E. H. (1998). Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. *Journal of Food Science* 63(4): 702-705.
69. Kim, C. J., Jun, S. A., Lee, N., Kim, K.T., Lee, S. K., Kim, C. y Paik, H. (2006). Encapsulation of *Bacillus polyfermenticus* SCD with alginate-methylcellulose and evaluation of survival in artificial conditions of large intestine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3) 443-449.

70. Kim, K. I., Baek, Y. J., Yoon, Y. H. (1996). Effects of rehydration media and immobilization in calcium-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. *Korean Journal of Dairy Science*, 18: 193-198.
71. Koo, S. M., Cho, Y. H., Hun, C. S., Baek, Y. J. y Park, J. (2001). Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *Journal Microbiology and Biotechnology* 11(3): 376-383.
72. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1): 3-13
73. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survival of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8): 737-743.
74. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39(2): 177-183.
75. Kullrami, N. y Reddy, B. S. (1994). Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacteria beta-glucuronidase. *Proceedings of Society of Experimental Biologists Medical*, 207: 278-283.
76. Kwabena, O. K. y Fell, J.T. (2001). Biphasic drug release: the permeability of films containing pectin, chitosan and HPMC. *International Journal of Pharmacology*, 226(1-2): 139-145.
77. Lamoureux, L., Roy, D. y Gauthier, S. F. (2002). Production of oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures. *Journal of Dairy Science*, 85(5): 1058-1069.
78. Lankaputhra, W. E. V. y Shah, N. P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal*, 30: 3, 2-7.

79. Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M. L. (2005). Study of adhesion and survival of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4233-4240.
80. Lee, J. S., Cha, D. S. y Park, H. J. (2004). Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24): 7300-7305.
81. Lee, Y.-K.; Nomoto, K.; Salminen, S. y Gorbach, S. L. (1999). Alteration of microecology in human intestine. En *Handbook of probiotics*. (Wiley Interscience Eds.), pp: 182-190. John Wiley & Sons, Inc, New York.
82. Lian, W.C., Hsiao, H.C., y Chou, C.C., (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86(3): 293-301.
83. Liu, L., Fishman, M. y Hicks, K. B. (2007). Pectin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose*, 14(1):15 -24.
84. Liu, L., Fishman, M. L., Kost, J., y Hicks, K. B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 24(19): 3333-3343
85. Lopez-Rubio, A., Gavara, R. y Lagaron, M. (2006) Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through materials. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (10): 567-575.
86. Lourens-Hattingh, A. y Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1-2): 1-17.
87. Madureira, A. R., Gíao, M.S., Pintado, M.E., Gomes, A.M.P, Freitas, C. y Malcata, X. (2005). Incorporation and survival of probiotic bacteria in whey cheese matrices. *Journal of Food Science* 70(3): 160-165.
88. Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., y Malcata, F. X. (2005). Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15(6-9): 921-927.

89. Madziva, H., Kailasapathy, K. y Phillips M. (2006). Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39(2): 146-151.
90. Mahnet, S., Kirin, S., Kos, B., Frece, J. y Suskovic, J. (2004). Immunomodulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG from low fat fresh cheese "BioAktiv LGG". *Mljekarstvo*, 54(1): 5-18.
91. Martinsen, A., Skjak-Braek, C. y Smidsrod, O. (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(1): 79-89.
92. Matsuzaki, T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2):133-140.
93. McMaster, L. D., Kokott, S. A., Reid, S. J. y Abratt, V. R. (2005). Use of traditional African fermented beverages as delivery vehicles for *Bifidobacterium lactis* DSM 10140. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2): 231- 237.
94. Merck, E. (1994). *Manual de medios de cultivo*. Darmstadt, Alemania. pp 124.
95. Minelli, E. B, Benini, A., Marzotto M, Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario R., Hendriks, H. Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal*, 14(8): 723-736.
96. Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., y Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian journal of Biotechnology*, 5(1): 1-18.
97. Mosilhey, S. H. (2003). Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Tesis. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat. Bonn Alemania.
98. Muthukumarasamy, P., Allan, P. W. y Holley, A. R. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1): 20-24.

99. Muthukumarasamy, P. y Holley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, *111*(2): 164–169.
100. Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I. y Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research Technology*, *225*(1): 33–42.
101. O'Riordan, A. D., Buckle, K. y Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology* *91*(6):1059-1066.
102. Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeuf, F., Tissier, J. P. y Corrieu, G. (2002). Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *Journal of Food Science*, *67*(6): 2336-2341.
103. Ong, L., Henriksson, A. y Shah, N. P. (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal* *16*(5): 446–456
104. Ouwehand, A. y Vesterlund, S. (2003). Health aspects of probiotics. *IDrugs*, *6*:573-580.
105. Özer, B., Kirmaci, H. A., Şenel, E., Atamer M. y Hayaloğlu, A. (2009). Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, *19*(1): 22–29
106. Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A. y Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(6):1171–1185.
107. Pedone, C. A. Arnaud, C. C. Postaire, E. R. Bouley, C. F. y Reinert, P. (2000). Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhea. *International Journal of Clinical Practice*, *54*(9): 568-571.

108. Peniche, C., Howland, I., Carrillo, O., Zaldivar, C. y Arguelles-Monal. (2004). Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. *Food Hydrocolloids*, *18*(6): 865-871.
109. Pérez, S., Mazeau, K. y Du Penhoat, C. H. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, *38*(1/2): 37-55.
110. Picot, A., y Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, *15*(5): 505-515.
111. Pillay, V. y Danckwerts, M. P. 2002. Textural profiling and statistical optimization of crosslinked calcium-alginate-pectinate-cellulose acetophthalate gelisphere matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *91*(12): 2559- 2570
112. Pillay, V. y Fassihi, R. (1999a). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics. *Journal of Controlled Release*, *59*(2): 229-242.
113. Pillay, V. y Fassihi, R. (1999b). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets. *Journal of Controlled Release*, *59*(2): 243-256.
114. 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*(2): 292-297.
115. Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P., Rambaud, J. C. (1992). Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *55*(1): 78-80.
116. Popplewell, I. M., Black, J. M., Norris, I. M. y Porzio, M. (1995). Encapsulation system for flavors and colors. *Food Technology*, *49*(5):76-82.

117. Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., Adams, M.C. (2009). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1): 1-7
118. Rasband, W.S. (2007). ImageJ, Image Processing and Analysis in Java U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007. (Accesado: 2001-06-26).
119. Ravula, R. R. y Shah, N. P. (2001). Freezing conditions frozen out. *Dairy Industries International*, 10: 22-26.
120. Reid, A. A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P. y Vuilleumard, J. C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science*, 72(1): 31-37.
121. Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., y Champagne, C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*, 22(6), 603-619.
122. Reineccius, G. A. (1991). Off-flavors in foods. *Journal of Food Science*, 29(6): 381-402.
123. Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., y Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2): 71-78.
124. Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P. y Mätto, J. (2006). Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal* 16(12): 1477-1482.
125. Sanders, M. E. (2003). Probiotics: Considerations for human health. *Nutrition Reviews*, 61(3): 91-99.
126. Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., y Vernon-Carter, E. J. (2004). Microstructure and texture of yoghurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14(2): 151-159.

127. Schillinger, U., Guigas, C. y Holzapfel, W. H. (2005) .In vitro adherence and other properties of *Lactobacilli* used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal* 15(12): 1289–1297.
128. Schneeman, B. O. 2002. Gastrointestinal physiology and functions. *British Journal of Nutrition* 88(Suppl 2): S159-163.
129. Semdé, R., Amighi, K., Devleeschouwer, M. J. y Moës, A. J. (2000). Studies of pectin HM/Eudragine film coating formulations intended for colon drug delivery. *International Journal of Pharmacology*, 197(1-2): 181 –192.
130. Senok, A. C., Ismaeel, A. Y., y Botta, G. A. (2005). Probiotics: Facts and myths. *Clinical Microbiology & Infection*, 11(12): 958–966.
131. Shah, N., y Jelen, P. 1990. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *Journal of Food Science*, 55(2): 506-509.
132. Shah, N. P., Lankaputhra, W. E. V., Britz, M., y Kyle, W. S. A. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5(5): 515–521.
133. Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal Dairy Science*, 83(4): 894-907.
134. Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17(11): 1262-1277.
135. Shah, N. P. y Lankaputhra, W. E. V. (1997). Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. in yoghurt. *International Dairy Journal*, 7(5): 349–356.
136. Shah, N. P. y Ravula, R. R. 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3): 139–144.
137. Sheu, T. Y., Marshall, R. T., y Heymann. H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76(7): 1902-1907.

138. Sheu, T. Y. y Marshall, R. T. (1993). Microencapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3): 557-561.
139. Shin, H. S., Lee, J. H., Pestka, J. J. y Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial *Bifidobacterium spp.* in skim milk containing oligosaccharides and inulin, *Journal of Food Science*, 65(5): 884-887.
140. Sinha, V. R. y Kumria, R. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical*, 224(1-2): 19-38.
141. Smidsrod, O. y Skjak-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8(3): 71-78.
142. Song, S. H., Cho, Y. H. y Park, J. (2003). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using a microporous glass membrane emulsification system. *Journal of Food Science*, 68(1): 195-200.
143. Songisepp, E., Kullisaar, T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M. y Mikelsaar, M. (2004). A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*. 87(7): 2017-2023.
144. Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn University International Journal*, 3(1-2): 206-228.
145. Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., y Ross, R. P. (1998). Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8(5-6): 491-496.
146. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. y Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal Food Microbiology*, 62(1-2):47-55.
147. Sun, W. y Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1): 17-25.
148. Talwalkar, A., y Kailasapathy, K. (2003). Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science*, 86(8): 2537-2546.

149. Talwalkar, A., y Kailasapathy, K. (2004). A review of oxygen toxicity in probiotic yoghurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(3): 117-124.
150. Tandhanskul, A. y Krasaekoopt, W. 2008. Sensory and acceptance assessment of yogurt containing probiotic beads in Thailand. *Kasetsart Journal*, 42(99): 106.
151. Tannock, G. W. (1995). Internal renewal: the potential for modification of the normal microflora. En *Normal microflora: An introduction to microbes inhabiting the human body*. pp. 99-107. Chapman and Hall, London, Inglaterra.
152. Tannock, G. W. (2002). The *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* microflora of humans, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 22(3): 231-253.
153. Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P. y Skjåk-Bræk, G. (1996). Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*, 17(10): 1031-1040.
154. Tønnesen, H. H. y Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6): 621-630
155. Tripathi, V. y Jha, Y. K. (2004). Development of whey beverage with antagonistic characteristics and probiotics. *International Journal of Food Properties*, 7(2): 261-272.
156. Tuohy, K. M., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney A. L. y Gibson G.R. (2006). Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1026 - 1032.
157. Turkoglu, M. y Ugurlu, T. (2002). In vitro evaluation of pectin-HPMC compression coated 5-aminosaclicylic acid tablets for colon delivery. *European Journal of Pharmacology and Biopharmacology*, 53(1): 65-73.
158. Vandamme, T. F, Lenourry, A., Charrueau, C. y Chaumeil, J C. (2002). The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*, 48(3):219-31.

159. Vinderola, C. G., Bailo, N. y Reinheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinean yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33(2): 97-102.
160. Vinderola, C. G. y Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "In vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10): 895-904.
161. Wakerly, Z., Fell, J. T., Attwood, D. A. y Parkins, D. (1997). Colonic drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(9): 893-913.
162. Wong, V. K. (1998). Microencapsulation of amino acids for prawn feed additives. Tesis doctoral. Department of Chemical Engineering. University of Queensland.
163. Yáñez, F. J., Salazar, M. J. A., Chaires, M. L., Jiménez, H. J., Márquez, R. M. y Ramos, R. E. G. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21: 313-319.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt

O. Sandoval-Castilla^a, C. Lobato-Calleros^b, H.S. García-Galindo^c, J. Alvarez-Ramírez^d, E.J. Vernon-Carter^{d,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, México, D.F. 09340, Mexico

^b Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230 Texcoco, Mexico

^c Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Veracruz, Calzada Miguel Ángel de Quevedo 2779. Col. Formando Hogar, 91860, Veracruz, Mexico

^d Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, México, D.F. 09340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2009

Accepted 7 September 2009

Keywords:

Probiotics

Encapsulation

Alginate

Pectin

Yoghurt

Simulated gastrointestinal conditions

Lactobacillus casei

Entrapment

Alginate–pectin beads

Survival

ABSTRACT

Lactobacillus casei was entrapped in beads made with sodium alginate (A), amidated low-methoxyl pectin (P), and blends of A–P (1:2, 1:4, 1:6 ratios) by the extrusion technique. Diameter, sphericity and textural properties of the beads and the survivability of entrapped *Lb. casei* in yoghurt and in simulated gastrointestinal conditions were determined. Entrapment efficiency of *Lb. casei* and diameter increased as the proportion of P and the total biopolymers concentration increased. Principal Component Analysis showed that the survivability of *Lb. casei* in yoghurt, and in simulated gastric juice, was positively correlated with the diameter and all the textural properties of the beads, while survivability after exposure to simulated gastric juice and bile salts was positively correlated with the sphericity of the beads. The beads made with A–P blends in 1:4 and 1:6 ratios provided a significant better protection to the entrapped *Lb. casei* under all conditions studied.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays people prefer preventative rather than curative approaches toward diseases (Talwalkar & Kailasapathy, 2004). Diet is a good strategy for maintaining optimum health throughout life and preventing early onset of chronic diseases such as gastrointestinal (GI) disorders, cardiovascular disease, cancer, osteoporosis, as well as promoting healthier ageing (Liu, Fishman, Kost, & Hicks, 2003). In this sense the claimed numerous health benefits of probiotic bacteria have led to their incorporation into a wide variety of foods, including dairy products as yoghurt, cheese, ice cream, and dairy desserts (Anal & Singh, 2007). Probiotic can be considered as being “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Araya et al., 2002). This definition has been recently adapted by Health Canada (2009) in their guidelines for foods. The microorganisms mainly incorporated into foods are lactobacilli and bifidobacteria (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). Traditionally, yoghurt is manufactured using *Streptococcus thermophilus* and

Lb. delbrueckii spp. *bulgaricus* as starter cultures. These yoghurt organisms are claimed to offer some health benefits; however, they are not natural inhabitants of the intestine. Therefore for yoghurt to be considered as a probiotic-carrying food, *Lb. casei*, *Lactobacillus acidophilus* or both are incorporated as dietary adjuncts (Shah, 2000). The number of viable bacteria taken orally is decreased due to action of processing and storage conditions of the food containing them, and to the action of gastric juice and bile salts. Probiotic organisms have poor survivability in yoghurt and fermented milk as they do not tolerate exposure to highly acidic and aerated media (Muthukumarasamy, Allan, & Holley, 2006). Microencapsulation has been recognized as an alternative for increasing microorganism resistance to low acid environment during their storage and/or transit through the GI tract (Anal & Singh, 2007; Sun & Griffiths, 2000). It is a process by which cells are retained within an encapsulating matrix or membrane. The most widely used encapsulating material is alginate, a linear heteropolysaccharide of D-mannuronic acid and L-guluronic acid extracted from various species of algae, which is cheap, simple to use and biocompatible. Alginate beads containing bacteria (1–3 µm size) can be formed using the extrusion technique (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003). However,

* Corresponding author. Tel.: +52 5 5 58044648; fax: +52 5 5 58044900.
E-mail address: jvc@xanum.uam.mx (E.J. Vernon-Carter).

alginate gels are susceptible to disintegration in the presence of excess monovalent ions, Ca^{2+} -chelating agents and harsh chemical environments (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990). Some authors have reported that alginates can form strong complexes with other natural polyelectrolytes such as pectin (also a polyuronate) by undergoing chain–chain association and forming hydrogels upon addition of divalent cations (e.g., Ca^{2+}) (Fang et al., 2008; Pillay & Fassihi, 1999a), improving the mechanical and chemical stability of the alginate beads, and consequently improving the effectiveness of encapsulation (Pillay & Fassihi, 1999b).

Bead particle size is an important factor regarding the survivability of probiotics. Sheu, Marshall, and Heymann (1993) found that the survival of entrapped *Lactobacillus bulgaricus* in alginate beads and added to frozen desserts was significantly higher when beads size fell in-between 30 and 102 μm , than when beads had a diameter of 15 μm . These authors indicated that a mean diameter of 30 μm was desirable, because large beads might cause coarseness of texture of ice milk, whereas small beads did not provide sufficient protection of the bacteria. Adhikari, Mustapha, and Grün (2003), reported that when microcapsules were added to yoghurt at 10% (w/v), there was an unfavorable consumer response due to the resultant grainy texture. On the other hand, Hansen, Allan-Wojtas, Jin, and Paulson (2002), reported that alginate capsule should have a diameter of at least 100 μm to prevent a reduction in *Bifidobacterium* viability in simulated gastric juices. Therefore, probiotics should be entrapped within a limited range of bead sizes to for successful incorporation into foods to minimize problems associated with cell viability and food texture.

The objectives of this work were to entrap *Lactobacillus casei* in beads made with sodium alginate (A), amidated low-methoxyl pectin (P), and blends of A–P (1:2, 1:4, 1:6 ratios) by the extrusion technique, and to determine the possible relationships between the diameter, sphericity and textural (hardness, cohesiveness, springiness, and resilience) properties of the beads with the survivability of entrapped *Lb. casei* in yoghurt and in simulated gastrointestinal conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The biopolymers low molecular weight sodium alginate FD 175, 60.5% guluronic acid content (A) and amidated low-methoxyl pectin LM-106 AS–YA, degree of esterification 28%, degree of amidation 20% (P) were purchased from CP Kelco (Lille Skensved, Denmark). Calcium chloride, sodium chloride, hydrochloric acid, and ascorbic acid, which were of analytical grade, were purchased from Quimica Laitz, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Bacto peptone, Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth and agar were obtained from BD DIFCO Becton Dickinson and Company (Detroit, MI). All water used in the experiments was double distilled and deionized.

2.2. Bacteria, culture conditions and preparation of cell concentrate

A lyophilized culture of *Lb. casei* LBC81 LYO (Danisco, Dange Saint Romain, France) was cultured for 22 h at 37 °C in sterile MRS broth added with ascorbic acid (0.1 g 100 ml⁻¹) to provide an anaerobic environment. Cells were harvested at the late log phase by centrifugation (Hermle Z323 k, Hermle Labor Technik, Germany) at 1000g for 20 min (Shin, Lee, Pestka, & Ustunol, 2000), washed twice with sterile saline solution (0.9 g of NaCl 100 ml⁻¹) and re-suspended in peptone water (0.1 g 100 ml⁻¹), obtaining a cellular concentrate (CC) of 9.72 ± 0.1 log cfu ml⁻¹.

2.3. Bead forming procedure

A preliminary study was carried out in order to formulate and prepare mechanically stable beads with uniform diameter of approximately 100 μm to 1 mm (Hansen et al., 2002) using A, P, and blends of both in different ratios. To this end, the initial attempt was to determine the concentration of A and P alone that would yield gel beads by the extrusion technique used in this work, with the characteristics mentioned above. The minimum biopolymers concentrations that provided beads that were mechanically stable and with the desired diameters were 0.5 g of A and 2 g of P 100 ml⁻¹. Therefore five different beads variations were prepared from aqueous dispersions of A and/or P as follows: A_{0.5}P₀ (0.5 g A 100 ml⁻¹), A₀P₂ (2 g P 100 ml⁻¹), A_{0.5}P₁ (0.5 g A + 1 g P 100 ml⁻¹), A_{0.5}P₂ (0.5 g A + 2 g P 100 ml⁻¹), and A_{0.5}P₃ (0.5 g A + 3 g P 100 ml⁻¹). The samples were hydrated 24 h before being stored until use at 4 °C to minimize bacterial growth. Afterwards the biopolymers dispersions were sterilized at 121 °C for 15 min, cooled to 4 °C, and blended with the CC in a volume ratio of 9:1, obtaining the cell suspensions (CS). The number of cells of *Lb. casei* contained in the all of the CS was 8.83 ± 0.15 log cfu ml⁻¹, determined incubating at 37 °C for 48 h in MRS agar plate.

The beads were formed by dripping one part of the respective CS suspension to ten parts of sterile 0.5 M CaCl₂ solution (pH 5.61 ± 0.02) using a 0.8 mm (30½ G) needle (Muthukumarasamy et al., 2006). The beads were allowed to stand for 12 h at 5 ± 1 °C for hardening in CaCl₂ solution. The capsules were harvested by filtration through a stainless steel mesh of 0.19 mm, and then rinsed and subsequently kept in, sterile peptone solution (0.1 g 100 ml⁻¹) at 4 °C (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2004). Beads variations were prepared by triplicate in a completely randomized experimental design and were identified with the same codes of the biopolymers dispersions from which were prepared.

2.4. Entrapped *Lb. casei* enumeration

For quantitative measurements of cell viability, it was necessary to solubilize the beads to release the encapsulated *Lb. casei* cells. One gram of beads was suspended in 9 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) (Sheu & Marshall, 1993), followed by gentle shaking at room temperature (20 ± 2 °C) for 10 min. Numbers of viable cells in the suspensions were then determined by plate counting using MRS agar with incubation at 37 °C for 48 h. Entrapment efficiency was calculated as described Reid et al. (2005), as follows:

$$\text{Entrapment efficiency} = A/B \times 100$$

where A = cfu of *Lb. casei* g⁻¹ of beads × g of beads 100 ml⁻¹ of CS, and B = cfu of *Lb. casei* 100 ml⁻¹ of CS before entrapment (10⁸ cfu ml⁻¹ in all the cases). Afterwards, all the cfu g⁻¹ data were transformed to log cfu g⁻¹ data for making the manuscript more reader friendly.

2.5. Morphology and diameter of the beads

The morphology of the beads was observed in an Olympus BX45 phase contrast microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Japan). Micrographs, at a magnification of 4×, were taken to beads randomly selected with a digital camera Camedia C-3030 (Olympus Optical Co., Ltd., Japan). Twenty micrographs of each beads variation were analyzed with ImageJ software version 1.4 to determine sphericity (Rasband, 2007). The diameter of each bead variation was measured using the Imagen-Pro Plus version 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA), after 24 h of elaborated (Rasband, 2007).

2.6. Textural properties of the beads

The different beads variations were subjected to Texture Profile Analysis (TPA) (Bourne, 2002) using a Stable Micro Systems Texturimeter model TA-XT2i (Texture Technologies Corp., White Plains, NY, USA) equipped with a 5 kg load cell. In order to guarantee good test reproducibility, due to the particulate nature of the beads, a cylindrical steel probe with a large contact area (35 mm in diameter) was used to overcome this problem. Each measurement was carried out at room temperature on 30 g of each bead variation placed on a fixed bottom glass plate under the probe. The automatic detection of the contact by the probe with the beads was carried out with a contact force of 0.005 N (Artignan, Corrieu, & Lacroix, 1997). In all cases the samples were compressed 30%, using two compression cycles at a constant crosshead velocity of 0.5 mm s⁻¹. The primary textural properties of hardness, cohesiveness, springiness, and resilience (ratio between the areas under the compression and decompression curves) (Choonara, Pillay, Singh, & Ndesendo, 2008) were obtained using the equipment's Texture Expert Software for Windows Version 3.2.

2.7. Survival of entrapped *Lb. casei* in yoghurt

Entrapped *Lb. casei* was added to low-fat yoghurt containing 15 g of milk fat l⁻¹, prepared according to the procedure proposed by Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, Aguirre-Mandujano, and Vernon-Carter (2004). One hundred ml of low-fat yoghurt placed into sterile glass bottles were added with 10 g of each variation of beads, followed by gentle stirring. The samples were stored at 4 °C, and the viability of *Lb. casei* was determined during 20 days, at intervals of 5 days. The beads were removed from yoghurt by filtration and washed with sterile saline solution. *Lb. casei* cells were released from the beads as described above, and enumerated by plate counting using MRS agar with incubation at 37 °C for 48 h.

The experimental viable cell data (cfu g⁻¹) for each beads variations were converted into survival rate by dividing the final viable population with the initial viable population. The converted data from the independent runs were considered as a sole run and fitted by means of a first-order decaying kinetics of the form $\frac{dC(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_D} (C_{as} - C(t))$, where τ_D is the mean decaying time constant and C_{as} is the value that the survival rate achieves asymptotically (i.e., the value at which the survival rate is stabilized). The larger the value of τ_D and C_{as} , the more stable the trapping matrix. These parameters were estimated by means of a least-square procedure with the integral version of the decaying kinetics; namely, $C(t) = A_1 \exp(-t/\tau_D) + C_{as}$. Here, A_1 is integration constant.

2.8. Survival of entrapped *Lb. casei* in simulated gastric juice and bile salts

For determining the survival of *Lb. casei* in simulated gastric juice, 1 g of each freshly prepared bead variations was placed separately in test tubes containing 9 ml of simulated gastric solution

(pH 3.0) with 0.1 N HCl. Samples were incubated at 37 °C for 3 h in a Precision Scientific 360 orbital shaker bath (West Cortland St., Chicago, Illinois). The beads after having been exposed to simulated gastric juice, were filtrated, washed with sterile saline solution and deposited in tubes containing 9 ml of a sterile solution (1 g/100 ml⁻¹) of porcine bile extract (B8631, Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri), and pH 6.4. The beads–bile salt blends were incubated at 37 °C for 3 h with gentle agitation (Madureira et al., 2005). At the end of the incubation period the beads were immediately used for enumeration of viable cells after depolymerization of beads in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2), followed by plating using MRS agar at 37 °C for 48 h (Sheu & Marshall, 1993).

2.9. Statistical analysis

In all of the assays, three independent experiments were carried out for each bead variation and the mean was constituted by three replicates for each sample. The experimental data was subjected to Simple Classification Variance Analysis and whenever it was adequate to Tukey's test. The significance was established at $p \leq 0.05$. Principal Component Analysis (PCA) was performed on the beads properties (diameter, sphericity, and textural properties) and in simulated gastrointestinal conditions. Data analysis was done using Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Morphology, diameter, and yield of the beads

Biopolymer composition influenced both the diameter and the sphericity of the beads. Sphericity values of the beads varied between 0.90 and 0.95 (Table 1), with the A₀P₂ beads showing significant lower sphericity than the A_{0.5}P₀, A_{0.5}P₁, and A_{0.5}P₂, but comparable to that of the A_{0.5}P₃ beads, with the latter exhibiting a small vermiform appendix. These results indicate that alginate contributed to a larger extent to the sphericity of the beads than pectin. Pillay and Fassihi (1999b) reported that calcium-alginate pellets had essentially spherical shape, while calcium-pectinate and calcium-alginate–pectinate pellets were disc-like in geometry, attributing this phenomenon to differences in crosslinking occurring in each case during pellets forming. Diaz-Rojas et al. (2004) reported that pectin–alginate beads lost sphericity as the proportion of linseed pectin in the formulae increased, as a consequence of the weaker mechanical stability of the linseed calcium-pectinate network compared to that from calcium-alginate. Diameter values of the beads varied between 0.71 and 0.97 mm (Table 1). The A_{0.5}P₀ beads showed significantly lower diameter than the beads formulated with P alone or combined with A (Table 1). Thus, our beads seem to be sufficiently large for achieving good cell loading and their protection against detrimental environmental factors, but they are probably not sufficiently small so that their presence in the mouth is not detected. Anal and Singh (2007) stated that an

Table 1
Physical characteristics, yield, and entrapment efficiency of the alginate–pectin beads (means ± SD).

Beads code ^a	Diameter (mm)	Sphericity (0–1)	Yield (g of beads·100 ml ⁻¹ of CS)	Entrapment efficiency (%)
A ₀ P ₂	0.93 ± 0.06 ^{bc}	0.90 ± 0.05 ^a	69.5 ± 2.5 ^b	68.8 ± 2.5 ^b
A _{0.5} P ₀	0.71 ± 0.07 ^a	0.94 ± 0.03 ^b	52.9 ± 3.6 ^a	54.3 ± 3.7 ^a
A _{0.5} P ₁	0.88 ± 0.04 ^b	0.94 ± 0.03 ^b	64.4 ± 0.5 ^b	64.1 ± 0.5 ^b
A _{0.5} P ₂	0.89 ± 0.08 ^b	0.95 ± 0.02 ^b	77.3 ± 2.4 ^c	77.9 ± 2.4 ^c
A _{0.5} P ₃	0.97 ± 0.07 ^c	0.93 ± 0.03 ^{ab}	80.8 ± 1.1 ^c	79.2 ± 1.1 ^c

^{a,b,c,d} Different superscripts within the same column indicate that the means differ significantly ($p \leq 0.05$).

^a A_X P_Y: codes of beads variations, where A: sodium alginate; X subscript: g of A·100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension; P: amidated low-methoxyl pectin; Y subscript: g of P·100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension.

Table 2Textural properties of the beads variations (means \pm SD, $n = 9$).

Beads code ^a	Hardness (N)	Cohesiveness (Ratio)	Springiness (Ratio)	Resilience (Ratio)
A ₀ P ₂	1.11 \pm 0.08 ^c	0.84 \pm 0.01 ^a	0.99 \pm 0.01 ^b	0.58 \pm 0.01 ^c
A _{0.5} P ₀	0.45 \pm 0.01 ^a	0.82 \pm 0.01 ^a	0.89 \pm 0.02 ^a	0.44 \pm 0.01 ^a
A _{0.5} P ₁	0.68 \pm 0.05 ^b	0.81 \pm 0.02 ^a	0.90 \pm 0.01 ^a	0.46 \pm 0.01 ^a
A _{0.5} P ₂	0.76 \pm 0.03 ^b	0.87 \pm 0.01 ^b	0.99 \pm 0.03 ^b	0.55 \pm 0.02 ^b
A _{0.5} P ₃	2.08 \pm 0.20 ^d	0.89 \pm 0.01 ^b	0.99 \pm 0.03 ^b	0.64 \pm 0.02 ^d

^{a,b,c,d} Different superscripts within the same column indicate that the means differ significantly ($p \leq 0.05$).^a A_X P_Y: codes of beads variations, where A: sodium alginate; X subscript: g of A-100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension; P: amidated low-methoxyl pectin; Y subscript: g of P-100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension.

important challenge for cell encapsulation is the large size of microbial cells (typically 1–4 μm). This characteristic limits cell loading for small capsules, or when large capsules are produced, textural and sensorial properties of food products to which they are added can be affected negatively. Muthukumarasamy et al. (2006) found that larger capsules (2–4 mm) made by the extrusion technique were better able to protect *Lactobacillus reuteri* than smaller emulsified capsules (20–1000 μm). Chandramouli, Kailasapathy, Peiris, and Jones (2004) reported that the viability of encapsulated *Lactobacillus* in simulated gastric condition, increased with increased alginate capsule size (200–1000 μm).

The yield of the beads (g beads 100 ml⁻¹ CS) varied from 50.9 to 80.0 depending on total biopolymers concentration in CS (Table 1). The higher the total biopolymer concentration the higher the weight of beads obtained.

3.2. Beads texture

The textural properties of the beads were affected by the biopolymers composition and concentration. Our results indicate that the alginate beads (A_{0.5}P₀) showed significantly lower hardness, springiness, and resilience than those presented by pectin beads (A₀P₂), but had comparable ($p > 0.05$) cohesiveness values (Table 2). The A_{0.5}P₁ and A_{0.5}P₂ beads displayed intermediate textural properties values of hardness, springiness, and resilience than those showed by A_{0.5}P₀ and A_{0.5}P₃, but regarding cohesiveness A_{0.5}P₂ beads showed higher ($p \leq 0.05$) values than the A₀P₂ beads. The A_{0.5}P₃ beads presented the highest values ($p \leq 0.05$) of hardness and resilience. These results indicate that differences existed in the crosslinking reactions between calcium-alginate, calcium-pectinate, and calcium-alginate-pectinate polymeric networks, which resulted in different mechanical responses to deformation. Moreover, it may be inferred that by varying the ratios of A and P the design of beads with different textural properties and physical properties can be achieved.

3.3. Entrapment efficiency of *Lb. casei* in beads

The entrapment efficiency of *Lb. casei* into the beads variations varied between 54.3 and 79.2%. The beads made with only alginate (A_{0.5}P₀) showed significantly lower entrapment efficiency than those achieved in the rest of the beads variations (Table 1). The A_{0.5}P₂ and A_{0.5}P₃ beads variations displayed the highest cell entrapment efficiencies which were non-significantly different between themselves (Table 1). Despite that in all cases the CS had the same initial cell load (8.83 \pm 0.15 log cfu ml⁻¹ CS), the cell load in the A_{0.5}P₀ beads (8.56 \pm 0.03 log cfu g⁻¹) was significantly lower than those (8.88 \pm 0.03 to 8.92 \pm 0.01 log cfu g⁻¹) obtained in the rest of the beads. Reid et al. (2005) linked the efficiency data to two factors affecting the theoretical cfu counts in the beads: (1) cell losses in CaCl₂ solution and (2) viability losses in the beads themselves. Entrapment efficiency increased significantly as the total biopolymers concentration of the beads increased because a higher weight

of beads was obtained 100 ml⁻¹ of CS (Table 1). Sultana et al. (2000) reported improvements in the encapsulation efficiency of *Lb. casei* in alginate beads as the biopolymer concentration was increased by addition of Hi-maize resistant starch in percentages of weight from 0 to 2. Kailasapathy, Perera, and Phillips (2006) reported encapsulation efficiencies of flavourzyme of less than 60% in alginate-Hi maize starch beads. Our entrapment efficiencies fell in-between those found by Pillay and Fassihi (1999a) for diclofenac sodium in calcium-alginate-pectinate pellets (84.94%) and in pure calcium-alginate pellets (49.94%).

3.4. Survival of entrapped *Lb. casei* in yoghurt

The experimental data and the fitted data of the viable and survival rates of entrapped cells incorporated into yoghurt are shown in Fig. 1a for the A_{0.5}P₀ and in Fig. 1b for the A_{0.5}P₃ beads, respectively. All of the rest of the beads variations showed similar trends to those displayed by the A_{0.5}P₀ and A_{0.5}P₃ beads variations. The fitting correlation was of at least 0.88 in all cases when a first-order decaying kinetics model $\frac{dC(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau_D}(C_{as} - C(t))$ was used. For the different beads variations, the results obtained to mean decaying time constant, and the achieved asymptotic stabilization value are shown in Table 3. The addition of amidated low-methoxyl pectin improved the survival of cells of *Lb. casei* by increasing both the mean decaying time constant and the achieved asymptotic stabilization value (Table 3). It is apparent that the use 2% pectin on its own or between 2 and 3% combined with 0.5% alginate, tended to display optimal counts of *Lb. casei*, which were above the therapeutic requirement of 10⁷ cfu g⁻¹ in yoghurt (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2006), after 20 days of storage at 4 °C. However, the absence of alginate in the bead variation (A₀P₂) had a negative effect in the survival capacity of *Lb. casei*, compared to beads variations A_{0.5}P₂ and A_{0.5}P₃. This suggests that both pectin and alginate induce a sort of synergic effect in the consolidation of the trapping matrix. The entrapped cells in the pure alginate bead (A_{0.5}P₀) showed the lowest mean decaying time constant (τ_D) and asymptotic stabilization value (C_{as}) in comparison to the rest of the beads variations. It has been described that the main factor affecting the survival of probiotic bacteria is the increasing acid content of yoghurts after fermentation and during storage, which is called “over-acidification” or “post-production acidification” (Shah & Jelen, 1990). Thus, our results imply that alginate-pectin beads provided and improvement in the survivability of *Lb. casei* probably due to the slow diffusion rate of growth-inhibiting compounds produced during fermentation of yoghurt such as acids and hydrogen peroxide (Krasaekoopt et al., 2006). The pH values of our yoghurts ranged between 4.64 \pm 0.0 at day 0 and 4.48 \pm 0.01 at day 20, and in a given day non-significant pH differences existed between the yoghurts. Adhikari et al. (2003) reported similar pH values and their variation for yoghurt containing encapsulated *Bifidobacterium longum* in κ -carrageenan over a 30 days storage period, and also found that cell enumeration did not decline. Previous researchers have demonstrated the protective effect exerted by encapsulation

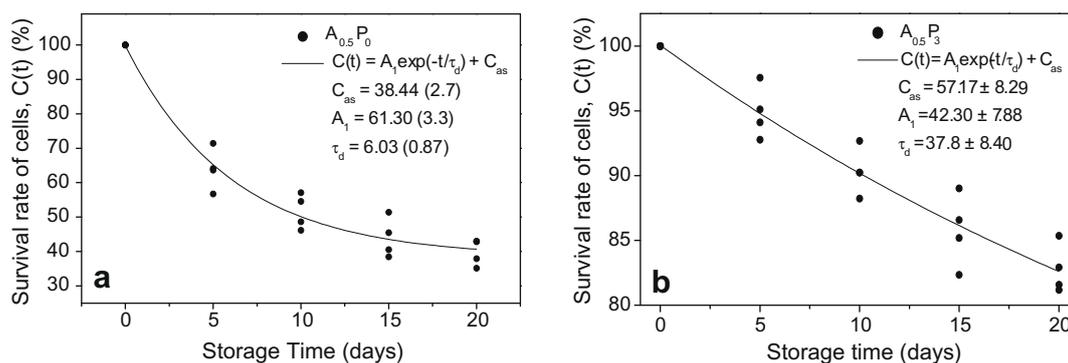


Fig. 1. Survival rates and fitted models for entrapped *Lb. casei* incorporated into yoghurt stored 20 days at 4 °C: (a) in $A_{0.5}P_0$; and (b) in $A_{0.5}P_3$ beads variations, respectively.

Table 3

Parameters resulting from the fitting of experimental data for the survival rate of entrapped *Lb. casei* in yoghurt stored for 20 days at 4 °C.

Beads code ^a	$A_{0.5}P_0$	$A_{0.5}P_1$	$A_{0.5}P_2$	$A_{0.5}P_3$	A_0P_2
τ_D (days)	6.03 ± 2.7	18.15 ± 3.4	32.15 ± 4.1	37.8 ± 8.4	31.15 ± 7.1
C_{as} (%)	38.44 ± 0.9	48.12 ± 3.9	56.23 ± 5.1	57.17 ± 8.3	51.13 ± 6.2

^a $A_X P_Y$: codes of beads variations, where A: sodium alginate; X subscript: g of A 100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension; P: amidated low-methoxyl pectin; Y subscript: g of P 100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension. τ_D : is the mean decaying time constant. C_{as} : is the value at which the survival rate achieves asymptotically.

of probiotic bacteria when they are exposed to adverse conditions and they showed that bacteria exhibited a significantly higher survival than non-entrapped control cells to low pH (Lian, Hsiao, & Chou, 2003; Picot & Lacroix, 2004; Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter, 2009).

3.5. Survival of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions

Entrapped cells survivability in bile salts after exposure to acid conditions significantly decreased in all of the cases. However, beads matrix composition provided different degree of protection to the entrapped cells, resulting in significantly different survivability (Fig. 2b). These results clearly indicate that the binary calcium-alginate-pectinate beads matrices provided a better protection against bile salts to *Lb. casei* than the beads matrices

made with either biopolymer on its own. Fig. 2a shows the number of viable cells and the corresponding standard deviation for the different formulations under sequential acidic and bile salts conditions after 6 h exposure. It can be observed that by providing *Lb. casei* with a covering matrix greater number of surviving cells were achieved. Besides, the addition of pectin has a further beneficial effect by reducing the decaying rate of cells. Interestingly, the lack of alginate in the beads variations reduces to some extent the protective effect, suggesting that both alginate and pectin make-up a more structured trapping matrix that is more resilient to the effects of acids and bile salts. Similar results are also observed in Fig. 2b for the survival rate of cells under the same conditions, indicating that the formulation $A_{0.5}P_3$ offers the best protective conditions. It is interesting to observe that this bead variation was also the best one under storage conditions, suggesting that a protective matrix offering good storage conditions also presents

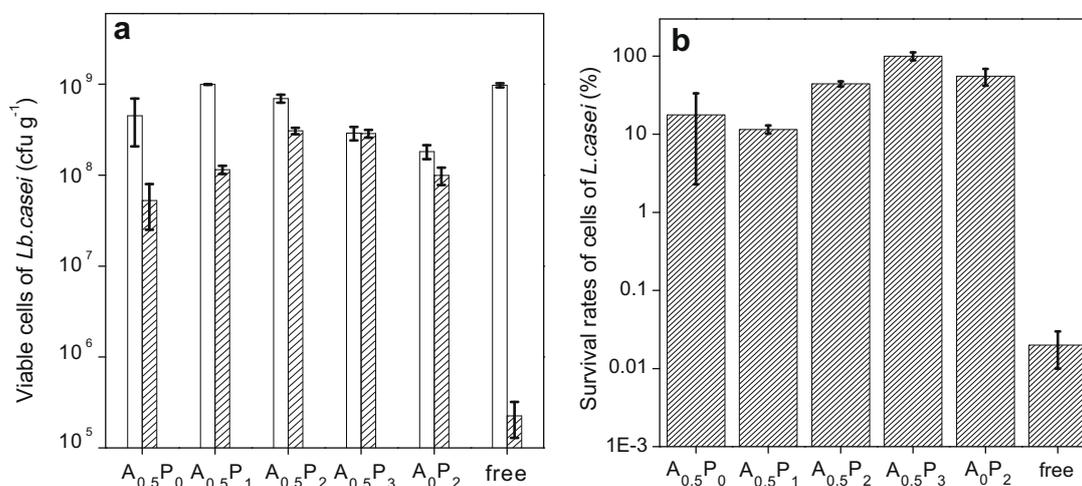


Fig. 2. Effect of the exposure to simulated gastric juice and bile salts conditions on the: (a) initial (□) and final (▨) viability; and (b) survival rates of *Lb. casei* entrapped in the different beads variations. $A_X P_Y$: codes of beads variations, where A: sodium alginate; X subscript: g of A-100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension; P: amidated low-methoxyl pectin and Y subscript: g of P-100 ml⁻¹ of *Lb. casei*-biopolymer suspension. The error bars represents standard deviation of the means (n = 9).

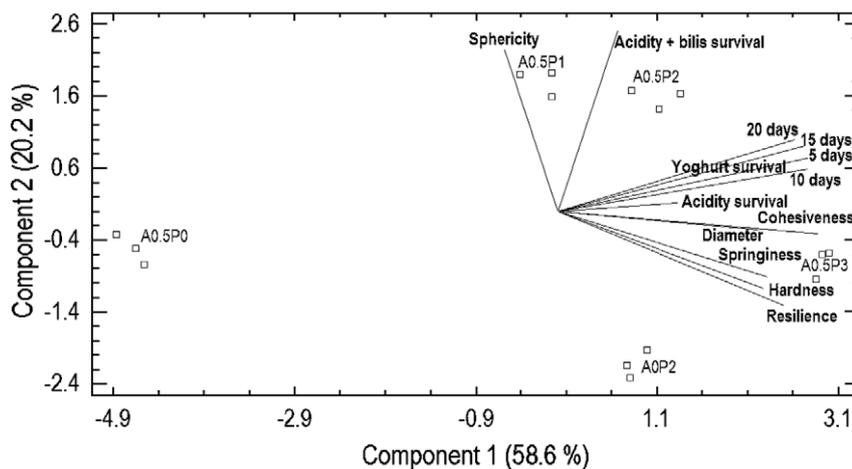


Fig. 3. Principal Component Analysis of the physical and textural properties of the beads, and the *Lb. casei* survivability in yoghurt and in simulated gastrointestinal conditions.

good protective conditions under aggressive simulated gastric juices and bile salts conditions. Sultana et al. (2000) informed that survival cells of *Lb. casei* entrapped in alginate–starch beads decreased $2 \log \text{cfu g}^{-1}$ after their incubation in simulated high acid gastric conditions and high bile during 3 h at 37 °C. The binary blends tested in this work may help in providing additional protection to entrapped *Lb. casei* cells against simulated gastrointestinal conditions.

3.6. Interrelationship between survivability of entrapped *Lb. casei* in yoghurt and simulated gastrointestinal conditions and the physical and textural properties of the beads

Principal Component Analysis (PCA) was applied to the survivability of entrapped *Lb. casei* in yoghurt and simulated gastrointestinal conditions, the sphericity and diameter, and the textural properties of the beads in order to establish the main relationships existing among these parameters and how the beads variations were distributed in this space. The principal first component explained 58.6% of the total variance and in which the survivability of *Lb. casei* in yoghurt, and in simulated gastric juice, was positively correlated with all the textural properties (hardness, springiness, cohesiveness, and resilience) and with the diameter of the beads (Fig. 3). The second principal component explained 20.2% of the total variance and in which the survivability of *Lb. casei* after exposure to sequential incubation in simulated gastric juice and bile salts was positively correlated with the sphericity of the beads (Fig. 3). The two main components clearly distinguished the properties of the beads in terms of their composition (Fig. 3). The position kept by the beads made with alginate ($A_{0.5}P_0$) and pectin (A_0P_2) in the bi-dimensional space allowed us to establish that P contributed to a larger extent to the obtention of relatively larger sized beads with higher values of hardness, springiness, cohesiveness, and resilience, whereas A positively influenced the sphericity of the beads.

From the position kept by the beads in the bi-dimensional space, it is clear that the beads made with binary blends of alginate–pectin protected the entrapped *Lb. casei* cells to a greater extent than those made with only alginate or pectin. The $A_{0.5}P_1$ and $A_{0.5}P_2$ beads variations had spherical shape, and intermediate textural properties. The $A_{0.5}P_3$ bead variation displayed the highest textural properties and lowest sphericity, and was the one that provided the best protection to the entrapped *Lb. casei* in yoghurt during storage time.

4. Conclusions

The use of alginate–pectin binary blends permits the obtention of beads which improve the protection to entrapped *Lb. casei* against adverse environmental factors than those made with alginate or pectin on their own. The textural properties, the physical properties and the entrapment efficiency of the alginate–pectin beads are greatly affected by the total biopolymer concentration and the ratio used between both biopolymers. High total biopolymers concentration yields beads with greater cell entrapment efficiency. Alginate–pectin ratios between 1:2 and 1:4 provided beads that were more spherical, with intermediate textural properties; an increase in the alginate–pectin ratio to 1:6 provided beads with the highest textural properties and lowest sphericity, which protected best the entrapped *Lb. casei* against sequential exposure to gastric juice and bile salts, and in yoghurt during storage time. Thus, the selection for a given type of bead for entrapping *Lb. casei* must be done in terms of the functional properties desired from the beads in terms of initial cell entrapment, survivability in yoghurt with storage time or survivability in gastric juice and bile salts conditions. The mean decaying time and the asymptotic survival rate constants are important parameters for understanding the loss in viability of *Lb. casei* cells during yoghurt storage. Survival to acid and bile conditions of encapsulated *Lb. casei* decreased significantly ($p \leq 0.05$) for all of the treatments, but the $A_{0.5}P_3$ bead variation provided the best protection.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia de Mexico (CONACyT) for the partial financing of this project through Grant 81157-U.

References

- Adhikari, K., Mustapha, A., & Grün, I. U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, 68, 275–280.
- Anal, A., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240–251.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., et al. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London (Ontario, Canada), April 30 and May 1. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

- Artigian, J. M., Corrieu, G., & Lacroix, C. (1997). Rheology of pure and mixed kappa-carrageenan gels in lactic acid fermentation conditions. *Journal of Texture Studies*, 28, 47–70.
- Bourne, M. C. (2002). *Food texture and viscosity: Concept and measurement* (2nd ed.). New York, NY: Academic Press.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27–35.
- Choonara, Y. E., Pillay, V., Singh, N., & Ndesendo, M. K. (2008). Chemometric, physicochemical and rheological analysis of the sol–gel dynamic and degree of crosslinking of glycosidic polymers. *Biomedical Materials*, 3, 1–15.
- Diaz-Rojas, E. I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., Valdez, M. A., Ribaldo, M., et al. (2004). Linseed pectin: Gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*, 18, 293–304.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinary, K., Funami, T., & Williams, P. A. (2008). Binding behaviour of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, 72, 334–341.
- Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35–45.
- Health Canada (2009). Guidance document. The use of probiotic microorganisms in food. Food directorate – Health products and food branch. 8pp. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/legislation/probiotics_guidance-orientation_probiotiques-eng.pdf> Accessed 20.05.09.
- Kailasapathy, K., Perera, C., & Phillips, M. (2006). Evaluation of alginate–starch polymers for preparation of enzyme microcapsules. *International Journal of Food Engineering*, 2(2) (article 8).
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survival of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 737–743.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39, 177–183.
- Lian, W. C., Hsiao, H. C., & Chou, C. C. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 293–301.
- Liu, L., Fishman, M. L., Kost, J., & Hicks, K. B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 24, 3333–3343.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1–7.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2005). Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15, 921–927.
- Muthukumarasamy, P., Allan, P. W., & Holley, A. R. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1), 20–24.
- Picot, A., & Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, 15, 505–515.
- Pillay, V., & Fassihi, R. (1999a). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics. *Journal of Controlled Release*, 59, 229–242.
- Pillay, V., & Fassihi, R. (1999b). In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets. *Journal of Controlled Release*, 59, 243–256.
- 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.
- Rasband, W. S. (2007). ImageJ, Image processing and analysis in java U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>> Accessed 26.06.01.
- Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., & Champagne, C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*, 22, 603–619.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microstructure and texture of yoghurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 151–159.
- Shah, N. P. (2000). Symposium: Probiotic bacteria. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Food Science*, 83, 894–907.
- Shah, N., & Jelen, P. (1990). Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *Journal of Food Science*, 55, 506–509.
- Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Micro-encapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 83, 894–907.
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T., & Heymann, H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76, 1902–1907.
- Shin, H. S., Lee, J. H., Pestka, J. J., & Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Science*, 83, 884–887.
- Smidsrod, O., & Skjak-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71–78.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47–55.
- Sun, W., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 17–25.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). A review of oxygen toxicity in probiotic yoghurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 117–124.