

*Revista Electrónica Nova Scientia*

Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* en queso fresco bajo condiciones de acidez “*in vitro*”

Viability of *Saccharomyces boulardii* in fresh cheese under acidic conditions “*in vitro*”

**Rafael Zamora-Vega<sup>1</sup>, Héctor Eduardo Martínez-Flores<sup>1</sup>, José Luis Montañez-Soto<sup>2</sup> y José Octavio Rodiles-López<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, Morelia

<sup>2</sup>Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán. CIIDIR IPN Michoacán. Jiquilpan

---

**México**

Héctor E. Martínez-Flores. E-mail: [hedu65@hotmail.com](mailto:hedu65@hotmail.com)

## Resumen

**Introducción:** Un alimento funcional contiene en su formulación una o más sustancias que generan bienestar a la salud humana como son probióticos, prebióticos y ácidos grasos, entre otros. En los alimentos funcionales los microorganismos probióticos deben permanecer viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal, para garantizar su potencial efecto benéfico en el huésped. En el presente estudio se evaluó la viabilidad de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* tanto de forma libre como encapsulada bajo condiciones de acidez, adaptada a un queso fresco.

**Método:** La levadura fue expuesta en el alimento tanto en forma libre como encapsulada. Los materiales usados para encapsular fueron una mezcla de alginato de sodio, inulina y mucílago de nopal (*Opuntia ficus-indica*). Para la liberación del microorganismo, el estudio se realizó a pH de 2.0 y 6.5, simulándose las condiciones de acidez de estómago y colon respectivamente, a diferentes tiempos de exposición de 0, 60, 120 y 180 min.

**Resultados:** A pH de 2.0 se observó mayor pérdida en la viabilidad del probiótico en forma libre, la cual fue de 23.72, 27.03 y 33.02 % respectivamente, con respecto a la viabilidad inicial; cuando el microorganismo se adicionó al queso en forma encapsulada, su pérdida de viabilidad a los mismos tiempos de exposición fue de 5.74, 14.24 y 18.81%, manteniendo mayor supervivencia. Por otra parte, a pH de 6.5 el probiótico libre en el alimento mostró una pérdida de viabilidad de 2.23, 3.50 y 5.94%, en cambio de forma encapsulada la pérdida de viabilidad fue de 0.95, 2.20 y 3.03%, respectivamente, observándose mayor supervivencia que en estado libre.

**Conclusión:** El queso fresco mantuvo viable el nivel de supervivencia de *Saccharomyces boulardii*, particularmente cuando fue adicionado en forma encapsulada comparado a cuando fue incorporado en estado libre.

**Palabras clave:** probiótico, *Saccharomyces boulardii*, viabilidad, encapsulación, queso fresco

Recepción: 13-06-2015

Aceptación: 17-08-2015

## Abstract

**Introduction:** A functional food contains one or more substances that produce human health wellness, such as probiotics, prebiotics, phenolic compounds, unsaturated fatty acids, and others. In functional foods, probiotics must remain viable and active during their transit from food through the intestinal tract, to ensure its potential beneficial effect on the host. In the present study, the viability of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* added to fresh cheese in both free form and encapsulated with alginate, inulin and mucilage from nopal (*Opuntia ficus-indica*) was evaluated under acidic conditions.

**Method:** The free and encapsulated probiotic yeast food was exposed to pH 2.0 and 6.5 at exposure times of 0, 60, 120 and 180 min, this in order to simulate the acid conditions of the stomach and colon, respectively.

**Results:** Further loss was observed in the viability of the probiotic in free which was 23.72, 27.03 and 33.02%, respectively, with respect to the initial viability; meanwhile, when the microorganism was added to the cheese in encapsulated form, loss of viability to the same exposure time was 5.74, 14.24 and 18.81% maintaining increased survival compared to the previous. Moreover, a pH of 6.5 the free probiotic in food showed a viability of 2.23, 3.50 and 5.94%, in encapsulated form instead of viability was 0.95, 2.20 and 3.03%, respectively, showing more viability when yeast was encapsulated.

**Discussion** Fresh cheese remains viable survival level of *Saccharomyces boulardii*, when was added in the encapsulated form as compared to the free state.

**Keywords:** probiotic, *Saccharomyces boulardii*, viability, encapsulation, fresh cheese

## Introducción

Los probióticos fueron definidos por la FAO/WHO en 2002 como organismos vivos que cuando son consumidos en cantidades adecuadas le proporcionan beneficios a la salud del hospedero. Para que un microorganismo pueda considerarse como probiótico, debe mantenerse a una concentración viable de  $10^6$  -  $10^7$  UFC por gramo de producto al momento de ser consumido (El-Salam y El-Shibiny, 2015), y de esta forma pueda evitar la colonización de patógenos y el desequilibrio de la flora intestinal, así como ejercer ciertos beneficios a la salud como la producción de vitaminas del complejo B, reducir los niveles de colesterol, cáncer de colon, estimulación del sistema inmunológico, entre otras (Parvez *et al.*, 2006). Por lo anterior, es necesario que el microorganismo probiótico soporte condiciones adversas como la acidez durante su trayecto por el tracto gastrointestinal y pueda llegar de manera viable al sitio de acción que es el colon (Ding *et al.*, 2007).

La microencapsulación es un proceso físico en el que pequeñas películas o polímeros recubren pequeñas partículas sólidas, gotas de líquidos o gases. El proceso es capaz de preservar la sustancia o material recubierto y liberarlo en un sitio específico deseado (Salazar-Lopez *et al.*, 2015). Se ha reportado la microencapsulación como un proceso adecuado de protección de probióticos para mantener su viabilidad bajo las condiciones mencionadas. Para el proceso de encapsulación son utilizados diversos polímeros de grado alimenticio, como son: alginatos, quitosano, celulosas, carrageninas, gelatina y pectina, independientemente de la tecnología de encapsulación (Lahtinen *et al.*, 2007).

Córdova *et al.* (2015) indican que el alginato es uno de los polímeros más utilizados como material encapsulante, y que contiene en su estructura lineal dos tipos de ácidos urónicos, el  $\beta$ -D manurónico (M) y el  $\alpha$ -L gulurónico (G), conformando bloques ya sea homopoliméricos o heteropoliméricos, en el que las unidades G forman enlaces cruzados con cationes divalentes como el calcio, para producir geles con el modelo de “caja de huevo”. Se ha reportado que la encapsulación con alginato mejoró la viabilidad de microorganismos encapsulados (Dembczynski y Jankowski, 2000).

También se ha publicado que el uso de microcápsulas a base de alginato de sodio en combinación con otro tipo de hidrocoloides, ayuda a mantener e incrementar la supervivencia y viabilidad de los probióticos bajo condiciones de acidez (Zamora *et al.*, 2012).

Kim *et al.* (2008) determinaron la viabilidad de *L. acidophilus* encapsulado en alginato después de haberse sometido a pruebas de acidez (condiciones gastrointestinales simuladas) así como en altas temperaturas, resultando ser más resistente a estas condiciones, aún después de llevarse a cabo un proceso de almacenamiento.

En base a ello, garantizar la viabilidad de los probióticos en el sitio de acción es fundamental, por ello es necesario aplicar barreras que los protejan y asegurar su llegada de forma viable al colon.

Tanto a nivel de investigación como comercial, los productos que han sido utilizados principalmente como vehículo de agentes probióticos, son los alimentos fermentados obtenidos a partir de productos lácteos como el yogurt y el queso. Se ha observado que en la mayoría de ellos se ha logrado mantener una concentración de probióticos en el rango de  $10^8$ - $10^9$  UFC/mL, encontrándose por arriba de las recomendaciones y sugerencias de la federación internacional de lácteos, que señala por lo menos  $10^7$  UFC/g en el producto hasta la fecha mínima de caducidad (Rokka *et al.*, 2010).

Más allá de estas ventajas, la supervivencia en este tipo de alimentos ha mostrado ser muy variable. En efecto, a pesar de numerosos resultados favorables, se han observado también algunas limitaciones en el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias probióticas, dado que las condiciones ambientales del alimento no son las ideales para el crecimiento y actividad microbiana. Kailasapathy *et al.* (1997), documentaron que este tipo de microorganismos no sobrevive en grandes cantidades a la acidez de los productos lácteos. Ross *et al.* (2002), mencionan que el queso podría ser un mejor vehículo para estos microorganismos que los alimentos lácteos fermentados tradicionalmente usados, por tener una mayor capacidad amortiguadora, mayor exclusión del oxígeno y mayor contenido graso, lo que favorecería la resistencia y supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y el tránsito intestinal. Masuda *et al.* (2005), incorporaron *L. acidophilus* La-5 a un queso fresco, y su viabilidad se mantuvo sobre  $10^7$  UFC/g durante tres semanas. Al parecer, este organismo se adaptó a las condiciones adversas del medio, y pudo incluso desarrollarse a pH menores de 5.0. Heller *et al.* (2003) comentan que es debido fundamentalmente a las características fisicoquímicas y de composición del queso como son: mayor valor de pH, menor acidez, mayor capacidad de almacenamiento, mayor contenido de materia grasa, una mayor disponibilidad de nutrientes y menor contenido de oxígeno, entre otras (Gardiner *et al.*, 1998).

Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se plantean diferentes objetivos. En el primero de ellos se trabajó con la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, la cual es utilizada como agente potencial bioterapéutico en el tratamiento contra microorganismos asociados con diarrea y colitis, así como para ayudar a mantener viable y activa la flora intestinal; sin embargo, no se han realizado estudios de esta levadura adicionada en alimentos debido a problemas de fermentación por lo que a través del proceso de microencapsulación se intenta evitar y proteger al microorganismo durante su recorrido por el tracto gastrointestinal, y así garantizar que llegue al intestino grueso en una cantidad de al menos  $10^6$  UFC/g. Segundo, se seleccionó un producto lácteo como el queso ya que se ha demostrado que ese alimento es un vehículo que permite la inclusión de probióticos, y que es de amplia aceptación en México, ya que al ser consumido puede contribuir a la prevención de algunos disturbios gastrointestinales, y, tercero, mostrar con pruebas *in vitro* que el probiótico es resistente a condiciones de acidez similares a las encontradas en el estómago e intestino.

## Métodos

### Materia prima

La cepa de *S. boulardii* (CDBB-L-1483 ATCC-MYC-797) fue donada por el CINVESTAV-IPN (México, D.F.).

### Encapsulación del microorganismo

La encapsulación de la levadura probiótica fue realizada utilizándose la técnica por emulsión de agua en aceite (W/O), preparando 100 mL de una dispersión (fase acuosa) de la formulación de hidrocoloides, la cual consistió de una mezcla de alginato de sodio al 1%, inulina al 0.05% y mucílago de nopal *Opuntia ficus-indica* al 0.05%, a la que se le adicionó el botón celular que contenía la levadura *S. boulardii* en concentración de  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL. De manera separada se mezclaron 200 mL de aceite de canola (Aceite Capullo, México) con 2.5 gr de Span 85(CEDROSA) en fase oleosa, los cuales se agregaron a la fase acuosa permitiendo la formación de la emulsión W/O. Posteriormente se agregaron 40 mL del mismo aceite, mezclado con ácido acético glacial (0.35 M) para iniciar el proceso de gelificación, añadiéndose  $\text{CaCO}_3$  0.04 M. Este sistema se mantuvo en agitación por 20 min para formar las cápsulas y luego se dejó reposar 30 min. Se decantó y filtró, las cápsulas fueron lavadas con agua destilada y dos veces con solución

buffer de fosfatos (pH = 7.2) para eliminar residuos de aceite. Para observar las cápsulas en microscopio electrónico de barrido, las muestras fueron sumergidas en solución búfer de fosfatos (0.1 M) con glutaraldehído al 5% (v/v), y en seguida en tetróxido de osmio para su fijación. La muestra se deshidrató mediante gradientes de etanol, desde 30% hasta etanol absoluto. En seguida, las muestras fueron transferidas a contenedores microporosos, deshidratadas con CO<sub>2</sub> en un deshidratador semiautomático de punto crítico (Samdri 795, Tousimis, USA) y cubiertas con oro con un equipo Denton vacuum desk III, PAIS. Las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) con Z=12mm y un voltaje de aceleración de 13 y 10 kV.

La textura fue evaluada con un equipo Brookfield LFRA. Los diferentes geles preparados como previamente fue descrito, se colocaron dentro de una funda sintética de celulosa de 20 mm de diámetro y se dejaron en reposo en refrigeración a 4°C hasta su solidificación. Los geles moldeados fueron removidos de la funda y rebanados en cilindros de 20 mm de altura. Las muestras fueron comprimidas hasta 10 mm de la altura original (50%) en un doble ciclo de compresión a una velocidad constante de 1.0 mm/s y un periodo entre compresiones de 3.0 s. El vástago utilizado fue de aluminio con 5 cm de diámetro. El parámetro determinado fue la dureza, que es la fuerza máxima alcanzada durante el primer periodo de compresión.

### **Elaboración del alimento probiótico**

Para la elaboración del queso fresco probiótico, se siguió la técnica de Sangronis *et al.* (2007). La leche pasteurizada a 65 °C durante 30 min y enfriada a 34 °C, se distribuyó en tres cubas de quesería de 10 L de capacidad cada una. Se utilizó CaCl<sub>2</sub> (0.02%) como cuajo, posteriormente fue desuerada y agregado el microorganismo probiótico en tres tratamientos diferentes (encapsulado, libre y control). Al tratamiento 1 (T1) se le agregaron 20g de levadura encapsulada con alginato de sodio, mucílago de nopal e inulina; al tratamiento 2 (T2) se le agregaron 2 g de microorganismo sin encapsular y, finalmente, el tratamiento 3 (T3) fungió como control sin microorganismo probiótico. Se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento. El queso fresco probiótico se mantuvo en refrigeración a 4°C.

### **Estudio de viabilidad *in vitro***

Se retomó la técnica antes utilizada, de acuerdo con Ding *et al.* (2007). Inicialmente, la viabilidad de la levadura fue de aproximadamente  $10^{10}$  UFC/mL, la cual fue inoculada en dos lotes de caldo peptonado cuyo pH fue previamente ajustado para simular tanto las condiciones del estómago (2.0) como las del colon (6.5), respectivamente. De cada lote se tomaron muestras en intervalos de 0, 60, 120 y 180 min para la enumeración. Se determinó la viabilidad por el método de vaciado en placa, colocándose 10 g de queso en 90 ml de diluyente. Para el organismo probiótico encapsulado, las células fueron previamente liberadas de las cápsulas por secuestro de iones calcio utilizando tampón de fosfato a pH 7.0. En paralelo, también se aplicó el tratamiento realizado por Yáñez (2006). En un tubo de ensayo se colocó 1 mL y con el pistilo de un agitador de vidrio estéril, fueron desintegradas las cápsulas. La tolerancia a la acidez se determinó comparando la concentración final de microorganismos (log UFC/mL) después de 3 h de ser expuesta a las condiciones de acidez con el recuento inicial a las cero horas. Todas las pruebas se realizaron en 4 repeticiones para calcular el promedio y el error estándar.

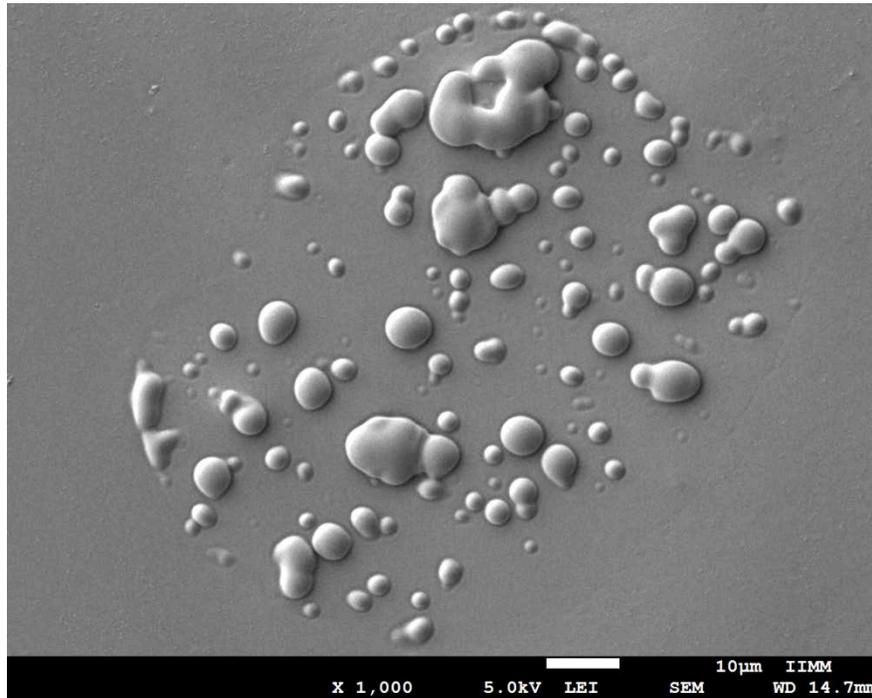
### **Análisis estadístico**

Las medias de los valores fueron comparadas utilizando el programa SAS versión .9.0 (Cary, NC), mediante un análisis de varianza con diseño de bloques al azar. La presencia de diferencias significativas se estableció a un nivel de confianza del 95% ( $\alpha < 0.05$ ).

### **Resultados y Discusión**

En la Figura 1 se muestra la microfotografía de las microcápsulas obtenidas con la formulación utilizada como material encapsulante (alginato-inulina-mucílago de nopal). Las microcápsulas presentaron diámetro variable, predominando la forma esférica, aunque en la imagen se puede observar que se formaron agregados de cápsulas que no alcanzaron a separarse de forma individual. Cuando las microcápsulas se presentaron en forma individual, su tamaño de diámetro promedio fue de 9.2  $\mu\text{m}$ . Ariza *et al.* (2010), elaboraron cápsulas con alginato de sodio, las cuales presentaron una superficie rugosa, con interior sólido no poroso, no permitiendo la liberación constante del microorganismo. Para nuestro estudio, con la adición de dos hidrocoloides, inulina y mucílago de nopal, más alginato de sodio, se vio disminuida la dureza del recubrimiento. Por ello la incorporación de mucílago e inulina al alginato disminuyó la fuerza del gel formando una matriz de gel más cohesiva, menos rígida. La dureza fue de 9.2 N para los geles hechos con

alginato y de 6.17 N para los formados con alginato más mucílago e inulina. La microscopía electrónica de barrido mostró que de las diferentes estructuras que fueron formadas, la de alginato presentó un núcleo sólido. La adición de inulina y mucílago al alginato resultó en una superficie lisa para la liberación de *Saccharomyces boulardii* (Figura 1).



**Figura 1.** Microfotografía de la cápsula formada con alginato de sodio, inulina y mucílago de nopal.

En la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos bajo condiciones de acidez estomacal (pH 2.0), de la viabilidad de *Saccharomyces boulardii* presente en el queso en estado libre y encapsulado, observándose que cuando el microorganismo probiótico se adicionó al queso en estado libre, su viabilidad fue de 76.28, 72.97 y 66.98% a tiempos de exposición de 60, 120 y 180 min, respectivamente; es decir, después de 3 h el microorganismo perdió significativamente ( $p < 0.05$ ) el 33.02 % de la viabilidad, con respecto al valor inicial. Por otra parte, cuando el microorganismo se adicionó al queso en forma encapsulada, su viabilidad a los mismos tiempos de exposición fue de 94.26, 85.76 y 81.19%; es decir, después de 3 h el microorganismo encapsulado tuvo una pérdida significativa ( $p < 0.05$ ) en su supervivencia del 18.81% con respecto a su viabilidad inicial.

**Tabla 1.** Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* en el alimento, en estado libre y encapsulada con alginato de sodio, inulina y mucílago de *Opuntia ficus-indica* a valores de pH de 2.0.

| Cepa                     | Tiempo de exposición (min) |                         |                          |                         |
|--------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                          | 0                          | 60                      | 120                      | 180                     |
| Libre (log UFC/mL)       |                            |                         |                          |                         |
| pH 2.0                   | 9.36±0.06 <sup>aA</sup>    | 7.14±0.13 <sup>bB</sup> | 6.83±0.49 <sup>bBC</sup> | 6.27±0.74 <sup>bC</sup> |
| Encapsulada (log UFC/mL) |                            |                         |                          |                         |
| pH 2.0                   | 9.41±0.06 <sup>aA</sup>    | 8.87±0.09 <sup>aB</sup> | 8.07±0.13 <sup>aC</sup>  | 7.64±0.08 <sup>aD</sup> |

Medias en la misma columna con diferente superíndice con letra minúscula son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Medias en la misma fila con diferente superíndice con letra mayúscula son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Chandramouli *et al.* (2004), reportaron un aumento significativo en cuanto a la viabilidad de *L. acidophilus* a pH 2.0 cuando este fue encapsulado con alginato. Lee *et al.* (2004), observaron mayor supervivencia de bifidobacterias inmovilizados en pH ácido simuladas en fluido gástrico comparado con los microorganismos en estado libre. Mandal *et al.* (2005), reportó la tolerancia de *Lactobacillus casei* especial-298 encapsulado en concentraciones diferentes de alginato (2%, 3% ó 4%), a pH de 1.5, así como la liberación de células encapsuladas en solución acuosa simulando el pH del colon. La supervivencia aumentó proporcionalmente con el aumento de las concentraciones de alginato sin afectar a la liberación de células atrapadas en la solución simulada del pH del colon. Sin embargo, nuestros resultados y los de las investigaciones arriba referidas difieren en comparación con los de otros investigadores (Hansen *et al.*, 2002; Trindade *et al.*, 2000) quienes reportaron que la microencapsulación con alginato en alimentos no protege efectivamente los microorganismos a pH ácido.

Por otra parte, cuando el microorganismo probiótico se adiciona al queso en estado libre, su viabilidad con respecto al tiempo de exposición (Tabla 2) a pH 6.5 fue de: 97.77, 96.50 y 94.06% a tiempos de exposición de 60, 120 y 180 min, respectivamente, comparado contra el tiempo de exposición de 0 min; es decir, después de 3 h de exposición a pH de 6.5 la pérdida en la viabilidad del microorganismo fue del 5.94% con respecto a la viabilidad inicial. La viabilidad cuando el microorganismo se adicionó al queso en forma encapsulada, a los mismos tiempos de

exposición fue de 99.05, 97.80 y 96.97%, es decir, después de 3 h de exposición a pH de 6.5 el microorganismo adicionado al queso en forma encapsulada tuvo una pérdida del 3.3 % con respecto a su viabilidad inicial. Podemos observar que el microorganismo fue más resistente a condiciones de pH cercano a la neutralidad (pH 6.5), que bajo condiciones de alta acidez, como la acidez que prevalece en el estómago (pH 2.0).

**Tabla 2.** Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* en el alimento, en estado libre y encapsulada con alginato de sodio, inulina y mucílago de nopal *Opuntia ficus-indica* a valores de pH de 6.5.

| Cepa                     | Tiempo de exposición (min) |                         |                         |                          |
|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                          | 0                          | 60                      | 120                     | 180                      |
| Libre (log UFC/mL)       |                            |                         |                         |                          |
| pH 6.5                   | 9.43±0.06 <sup>aA</sup>    | 9.22±0.57 <sup>aA</sup> | 9.10±0.39 <sup>aA</sup> | 8.87±0.28 <sup>bAB</sup> |
| Encapsulada (log UFC/mL) |                            |                         |                         |                          |
| pH 6.5                   | 9.57±0.02 <sup>aA</sup>    | 9.48±0.42 <sup>aA</sup> | 9.36±0.19 <sup>aA</sup> | 9.28±0.13 <sup>aA</sup>  |

Medias en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Medias en la misma fila con diferente superíndice con letra mayúscula son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

La mayor viabilidad que conservan los microorganismos cuando se encuentran en el alimento, adicionados en estado libre y encapsulado es atribuible al efecto protector que ejerce la matriz del alimento sobre dichos microorganismos. Es por ello que el queso podría ser un mejor vehículo para estos microorganismos que los alimentos tradicionalmente empleados, por tener una mayor capacidad amortiguadora, mayor exclusión del oxígeno y mayor contenido graso, lo que favorecería la resistencia y supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y el tránsito intestinal. Teniendo en cuenta estas características, el queso ha sido propuesto como un alimento más eficaz que los tradicionales productos lácteos fermentados fluidos para proteger la viabilidad probiótica, no sólo durante la elaboración y almacenamiento del producto durante largos períodos, sino también durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal, tal como lo mencionan Ross *et al.* (2002).

## Conclusiones

Se concluye que las microcápsulas elaboradas con alginato de sodio, inulina y mucílago de nopal, más la composición química del queso fresco, resultan ser un buen vehículo de protección para probióticos como *Saccharomyces boullardi*, manteniéndolo viable tanto en condiciones de acidez cercanas a la neutralidad (pH 6.5) como bajo condiciones de alta acidez (pH 2.0).

## Referencias

- Ariza Ortega, Teresita de Jesús. (2010). Relación entre la textura de geles de alginato de sodio con gelana o kappa-carragenina/algarrobo y viabilidad en la encapsulación de bacterias lácticas. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Ecatepec, Estado de México, México.
- 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. *J Microbiol Meth* (56): 27–35.
- Córdova A. K., Tello F., Bierhalz A. C. K., Garnica Romo M. G. Martínez F. H. E., Grosso C.R.F. (2015). Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. *J Food Engin* (154): 17-24.
- Dembczynski R. y Jankowski T. 2000. Growth of lactic acid bacteria in alginate/ starch capsules. *Food biotechnol* (17): 291-294.
- Ding W. K., Shah P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated bacteria. *J Food Sci* 72(9): 446-450.
- El-Salam M. H. A. y El-Shibiny S. (2015). Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. *Dairy Sci Technol* (95): 393–412
- Hansen L. T., Allan-Wojtas P. M., Jin Y. L. y Paulson A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol* (19): 35–45.
- Heller K. J., Bockelmann W., Schrezenmeir J. y de Vrese M. (2003). Handbook of fermented functional foods; Cap. 8: Cheese and its potential as a probiotic food (Ed.: Farnworth, E. R.). CRC Press, Estados Unidos, pp. 203-225.
- Kailasapathy K. y Rybka S. (1997). *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.—Their therapeutic potential and survival in yoghurt. *Aust J Dairy Technol* (52): 28–35.
- Kim S. J., Cho S. Y., Kim S. H., Song O. J., Shin I. S., Cha D. S. y Park H. J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT – Food Sci Technol* (41): 493-500.

- Lahtinen S. J., Ouwehand A. C., Salminen S. J., Forssell P. y Myllärinen P. (2007). Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Lett Appl Microbiol* (44): 500-505.
- Mandal S., Puniya A. K. y Singh K. (2005). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *Int Dairy J* 16: 1190-1195.
- Masuda T., Yamanari R. y Itoh T. (2005). The Trial for Production of Fresh Cheese incorporated probiotic *Lactobacillus acidophilus* Group Lactic Acid Bacteria. *Milchwissenschaft* 60 (2): 167-171.
- Parvez S., Malik K. A., Ah K. S. y Kim H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* (100): 1171–1185.
- Rokka S. y Rantamaki P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol* (231): 1-12.
- Ross R. P., Fitzgerald G., Collins K. y Stanton C. (2002). Cheese delivering biocultures probiotic cheese. *Aust J Dairy Technol* 57 (2): 71-78.
- Trindade C. S. F. y Grosso C. R. F. (2000). The effect of the immobilization of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Milchwissenschaft* (55): 496–499.
- Yañez J., Salazar J., Chaires L., Jiménez J., Márquez M. y Ramos E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva* (21): 313-318.
- Salazar-López E. I., Jiménez M., Salazar R. y Azuara E. (2015) Incorporation of microcapsules in pineapple intercellular tissue using osmotic dehydration and microencapsulation method. *Food Bioprocess Technol* (8): 1699–1706
- Zamora-Vega R., Montañez-Soto J. L., Martínez-Flores H. E., Ilores-Magallón R., Muñoz-Ruiz C. V., Venegas-González J. y Ariza-Ortega T. De J. (2012). Effect of incorporating prebiotics in coating materials for the microencapsulation of *Sacharomyces boulardii*. *Int J Food Sci Nutr* 63 (8): 930-935.