

Formación de Microcápsulas de Tamaño Controlado por Gelación Iónica Utilizando Mezclas Biopoliméricas Binarias

Rafael E. González, Arnulfo Tarón, Lena B. Morón

Universidad de Cartagena, Piedra de Bolívar - Av Del Consulado, Calle 30 N° 48-157., Cartagena-Colombia. (e-mail: rgonzalezc1@unicartagena.edu.co)

Recibido Mar. 18, 2015; Aceptado May. 28, 2015; Versión final Jun. 25, 2015, Publicado Dic. 2015

Resumen

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una metodología para la obtención de microcápsulas de tamaño controlado por medio de gelación iónica utilizando mezclas biopoliméricas binarias. Controlar el diámetro de microcápsulas es un parámetro crucial en el éxito de su incorporación en aplicaciones alimentarias. El diámetro de las microcápsulas al igual que la eficiencia en la microencapsulación de *Lactobacillus casei* fue estudiado en función de la velocidad de agitación (300-900 rpm) y la concentración de surfactante (0.0-0.6 % v/v). Los resultados indican que es posible desarrollar un proceso de microencapsulación de *L. casei* obteniendo diámetros promedios ideales para aplicaciones alimentarias (85 µm) con una eficiencia de microencapsulación del 80 % utilizando velocidades de agitación de 300 rpm y con la adición de surfactante al 0.6% (v/v).

Palabras clave: biopolímeros; microcápsulas; surfactante; velocidad de agitación

Sized-Controlled Microcapsules Formation by Ionic Gelation Using Binary Biopolymer Mixtures

Abstract

The aim of this study was to develop a methodology for obtaining controlled size microcapsules by ionic gelation using binary biopolymer mixtures. Controlling the diameter of microcapsules is a critical parameter in the successful of its integration in food applications. The diameter of the microcapsules and the microencapsulation efficiency of *Lactobacillus casei* were studied as a function of stirring speeds (300-900 rpm) and of the surfactant concentration (0.0- 0.6 % v/v). The results indicate that it is possible to develop a process of microencapsulation of *L. casei* obtaining ideal mean diameters for food applications (85 µm) with an efficiency of 80% using agitation velocity of 300 rpm and surfactant addition of 0.6 % (v/v).

Keywords: biopolymers; microcapsules; surfactant; agitation velocity

INTRODUCCIÓN

Los procesos de microencapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de grenetina como agente encapsulante. La microencapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas son retenidas dentro de una matriz o sistema pared con el propósito de protegerlos frente a condiciones ambientales deletéreas (González et al., 2014). Una microcápsula consiste de una membrana fuerte, semipermeable y esférica que rodea un núcleo sólido o líquido con un diámetro que varía de unas micras a 1 mm.

Algunas de los inconvenientes que se tienen en la producción de microcápsulas son los diámetros se obtienen durante su elaboración (Adikhari et al., 2003). El diámetro promedio de las microcápsulas es un factor importante para las aplicaciones alimentarias; es decir, microcápsulas de gran tamaño, generalmente ofrecen mayor protección a bacterias probióticas frente a condiciones gástricas que microcápsulas de menor diámetro, pero presentan una pobre dispersión cuando son aplicadas en matrices alimentarias sólidas (González, 2011). Por consiguiente, se debe disponer de un diámetro de microcápsulas óptimo (80 μm), no sólo para tener una buena protección del principio activo, sino para una buena distribución de las microcápsulas en el producto alimentario (Zhao et al., 2008).

Para preparar las microcápsulas existen numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos; en la literatura (Brazel, 1999) existen muchas técnicas que permiten llevar a cabo la microencapsulación de diversos compuestos y microorganismos, dentro de los cuales se pueden citar, el secado por aspersión, extrusión, lecho fluidizado, coacervación simple o compleja, liposomas, inclusión en complejos, recubrimiento por aspersión, polimerización interfacial, y la gelación iónica (Yañez et al., 2002; Gouin, 2004), siendo este último, un proceso desarrollado principalmente para inmovilizar células bacterianas debido a que no requiere el uso de elevadas temperaturas ni de solventes orgánicos (Patil et al., 2010). La gelación iónica utiliza biopolímeros aniónicos como material pared, que en combinación con iones divalentes como el calcio inducen la formación del gel, que finalmente origina la microcápsula (González et al., 2014).

Los materiales que mayoritariamente han sido utilizados en la gelación iónica son los biopolímeros, y dentro de este grupo se destacan el alginato (AS) y la goma gelana bajo acilo (GBA), (Rosas et al., 2013; González et al., 2014). Los alginatos son copolímeros lineales aniónicos compuestos de β -D ácido manurónico (M), y α -L ácido gulurónico (G) unidos por enlace β 1-4 y es estructurado por bloques que pueden ser homopoliméricos (M o G) o heteropoliméricos (MG), (Lee y Mooney, 2012). La goma gelana consiste de unidades de repetición de un tetrasacárido (1-3 β D glucosa, 1,4 β D ácido glucurónico, 1,4 β D glucosa, α -L ramnosa). La gelana nativa se conoce como gelana de alto acilo (GAA) porque presenta grupos acetato y glicerato en su residuo de glucosa. Cuando la GAA es expuesta a un fuerte tratamiento con álcali a elevadas temperaturas, los grupos acilo son hidrolizados y la gelana de bajo acilo (GBA) es obtenida. La GBA se caracteriza por formar geles fuertes y quebradizos (González et al., 2012) y al igual que los alginatos, por su naturaleza aniónica puede formar geles en presencia de cationes. Algunos autores han observado que cuando se utilizan mezclas binarias de gelana y alginato se logra incrementar la eficiencia en la microencapsulación de bacterias ácido lácticas (González et al., 2013).

Aunque la microencapsulación es un método eficiente para proteger principios activos de interés industrial, aún requiere mejoras en su proceso (Martín et al., 2015) esto particularmente se ve reflejado en la falta de uniformidad reportada en las condiciones y protocolos de obtención de microcápsulas (Lee y Heo, 2000; Shah, 2000; Moslemy, et al., 2002; Truelstrup et al., 2002; Yuan et al., 2009). Esta falta de uniformidad ha llevado a obtener diversas conclusiones con respecto a la utilidad de la microencapsulación de células bacterianas (Sultana et al., 2000; Cai et al., 2014). Además información sobre la formación de microcápsulas de tamaño controlado con mezclas biopoliméricas binarias conteniendo bacterias de interés industrial como *Lactobacillus spp* es escasa. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue establecer una metodología para la formación de microcápsulas de tamaño controlado utilizando mezclas biopoliméricas binarias de AS y GBA conteniendo una bacteria probiótica de interés industrial como *Lactobacillus casei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

El *Lactobacillus casei* usado como principio activo para las microcápsulas fue suministrado por CHR HANSEN (Dinamarca). Los agentes encapsulantes AS, GBA y la gluconolactona todos grado alimenticio fueron suministrados por Modernist pantry (EE.UU). El carbonato de calcio por Merck (Colombia), el surfactante (Span 80) por Sigma Aldrich (St Louis EE.UU), el agar MRS por Oxoid (UK).

Preparación de las dispersiones

Para la preparación de las dispersiones biopoliméricas se utilizó un diseño de mezclas simple donde la serie consistió de GBA, AS y sus mezclas 25GBA/75AS, 50GBA/50AS, 75GBA/25AS a concentraciones de 0.5% (p/p). Subsecuentemente se adicionó CaCO₃ en una concentración de calcio final de 30 mM y luego se llevó a cabo la dispersión con agitación constante en una plancha de calentamiento (Thermolyne nuova II) a una temperatura de 90°C durante 10 minutos. Finalmente las dispersiones se dejaron enfriar y se agregó una concentración de *L. casei* de 8 log₁₀ UFC/mL.

Formación de las Microcápsulas

A partir de las dispersiones biopoliméricas obtenidas en el paso anterior, se llevó a cabo la formación de microcápsulas empleando un diseño ortogonal L9 3^{**2}, donde los factores fueron la concentración del surfactante (0.0, 0.4 y 0.6% v/v) y la velocidad de agitación (300, 600 y 900 rpm). Las emulsiones se formaron por la adición de agua (dispersiones) en aceite vegetal a una relación (1:2), pasados 15 minutos, se incorporó δ-gluconolactona al sistema hasta alcanzar un pH final de 4.2 (medido utilizando pH – metro Thompson Bante Instrument) con el fin obtener las microcápsulas por gelificación de los biopolímeros. Finalmente, el aceite es retirado por adsorción utilizando una pipeta pasteur de plástico previa separación de las fases. Las microcápsulas contenidas en la fase acuosa son centrifugadas a 6000 rpm/10 min varias veces con disolución salina (0.85 p/v) hasta eliminar los restos de aceite vegetal sobrante por adsorción previa separación de los líquidos inmiscibles.

Examen físico de las microcápsulas

Una gota de cada preparación anterior (microcápsulas) fue utilizada para determinar el diámetro de las microcápsulas. Las muestras se colocaron en un portaobjetos para su análisis en un microscopio óptico (Leica DX 500). Posteriormente las micrografías fueron tomadas con ayuda de una cámara fotográfica externa. Las micrografías obtenidas fueron procesadas con el programa de cómputo Image Pro-Plus ver. 5.1 con el fin de establecer el diámetro promedio de las mismas. Los experimentos fueron repetidos para 50 microcápsulas en cada tratamiento para obtener datos estadísticamente relevantes.

Eficiencia de la microencapsulación

La suspensión de microcápsulas fue centrifugada a 5000 rpm/15 min para separar las células microencapsuladas de las libres. Luego se determinó la concentración bacteriana en el sobrenadante y la eficiencia de encapsulación fue calculada (%EE) con la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = (A-B)/A \times 100 \quad (1)$$

Donde A es la concentración bacteriana total en la suspensión y B es la concentración de la bacteria sin microencapsular encontrada en el sobrenadante.

Análisis de Datos

Las diferencias entre los valores promedio del tamaño de las microcápsulas y la eficiencia en la microencapsulación fueron determinados mediante ANOVA (un factor) utilizando la prueba tukey a un nivel de confianza de (P<0.05), por medio del programa de computo SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 17.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de microcápsulas

La formación de microcápsulas por el método de gelación iónica consiste en la formación de una emulsión de dos fases, una hidrofóbica y otra hidrófila, esta última fase está compuesta por el biopolímero aniónico; en donde por agitación, se origina una gran cantidad de gotas, que son gelificadas por acidificación con δ-gluconolactona; liberando gradualmente el calcio contenido en la sal utilizada (CaCO₃) por reacción de sustitución. En el presente trabajo fue posible obtener microcápsulas con todas las proporciones de las mezclas biopoliméricas utilizadas, estos resultados son opuestos a los reportados por González et al., (2013) quienes no pudieron obtener microcápsulas cuando utilizaron GAA en proporciones superiores al 50 % (p/v) en mezclas con GBA, ese comportamiento se debe principalmente a la formación de un sistema tipo gel cuando se alcanzan temperaturas superiores a 70 °C, (Matsukawa y Watanabe, 2007); lo cual impide la

formación de la emulsión y correcta homogeneización del principio activo en la dispersión de GAA (González et al., 2012), imposibilitando así el proceso de microencapsulación por gelación iónica.

Distribución de los diámetros de las microcápsulas

Las aplicaciones de la microencapsulación han ido incrementándose en la industria de los alimentos, debido a la protección que se confiere a los materiales microencapsulados de factores adversos como calor, humedad, acidez, etc. De esta manera se consigue mantener la estabilidad y viabilidad de diversos microorganismos. Las microcápsulas obtenidas en éste estudio mostraron un comportamiento homogéneo respecto al tamaño, lo cual se puede apreciar por los bajos valores de las desviaciones estándar obtenidos (tabla 1); esto se puede explicar por la lenta liberación de los iones calcio provenientes del carbonato de calcio por el rompimiento de la δ -gluconolactona (Peláez y Karel, 1981), los iones de calcio logran posicionarse en los grupos carboxilos de las hélices de GBA, iniciando el proceso de gelificación (Tang et al., 1997), teniendo el tiempo suficiente para obtener los tamaños observados en las microcápsulas finales.

El efecto de la velocidad de agitación (rpm) y la concentración del surfactante (% v/v) se presentan en la tabla 1, donde se observa que los mayores diámetros (214 - 224 μm) se presentaron en las microcápsulas obtenidas a menores velocidades de agitación (300 rpm) y sin la presencia de surfactante, mientras que los menores diámetros (<5 μm) se obtuvieron con las mayores concentraciones de surfactante (0.6%) a velocidades de agitación de 900 (rpm). Es importante mencionar que cuando se utiliza surfactante a 0.6 % (v/v) a velocidades de agitación de 300 (rpm) sin importar las proporciones de AS y GBA, se consiguen diámetros promedios de 85.04 μm que son similares a los tamaños de microcápsulas reportados por Kim et al., (2008) quienes obtuvieron diámetros de 75 μm en microcápsulas elaboradas con alginato de sodio. Es de resaltar que diámetros similares a los sugeridos por Kim et al., (2008) también se pueden obtener sin la adición de surfactante cuando se emplean velocidades de agitación de 900 rpm sin importar la relación de AS y GBA utilizada. Cabe destacar que microcápsulas de diámetros de 80 μm son deseadas a nivel industrial, ya que no afectan las propiedades sensoriales de los productos alimenticios donde pueden ser empleadas. Las microcápsulas grandes pueden ser percibidas por los consumidores cuando son incorporadas en un alimento líquido como el yogurt o pueden causar un exceso de fermentación manifestada por una coloración amarillo intenso focalizado cuando se utilizan en una matriz sólida como los quesos fermentados. Diámetros entre 80 y 85 μm son ideales para las aplicaciones alimentarias, debido a que diámetros menores resultan en la disminución de la protección celular cuando se microencapsulan bacterias probióticas, y diámetros mayores pueden originar defectos texturales en el producto alimenticio en el que se utilicen (Lacroix et al., 2005). Por ejemplo, microcápsulas con diámetros menores a 80 μm no protegen bifidobacterias cuando son expuestas a jugo gástrico simulado a pH 2 (Truelstrup et al., 2002), mientras que microcápsulas de diámetros mayores (1-3 mm) protegen adecuadamente las células microencapsuladas (Lee y Heo, 2000). Sin embargo, estos diámetros son demasiado grandes para su incorporación en productos alimenticios porque terminarían afectando la textura del producto alimenticio (Champagne y Fustier, 2007). Diámetros entre 80 - 85 μm son los preferidos para la mayoría de las aplicaciones.

Tabla 1: Distribución de los diámetros promedios de las microcápsulas (μm) obtenidas con mezclas de polisacáridos a diferentes velocidades de agitación y concentraciones de surfactante. Filas sin ninguna letra en común presentaron diferencias estadísticas con un $P < 0.05$

Biopolímeros		Velocidades de agitación (rpm) a 0.0 % (v/v) de surfactante			Velocidades de agitación (rpm) a 0.4 % (v/v) de surfactante			Velocidades de agitación (rpm) a 0.6 % (v/v) de surfactante		
GBA (%)	AS (%)	300	600	900	300	600	900	300	600	900
0	100	224.6 \pm 1. 8 ^a	153.2 \pm 1. 4 ^b	78.3 \pm 1. 2 ^c	133.1 \pm 0.7 d	54.8 \pm 0.2 e	13.2 \pm 0. 1 ^f	85.3 \pm 0.2 g	35.1 \pm 0. 1 ^h	<5 ⁱ
25	75	221.3 \pm 1. 7 ^a	153.1 \pm 1. 6 ^b	77.2 \pm 1. 3 ^c	132.1 \pm 0.6 d	55.2 \pm 0.2 e	12.8 \pm 0. 1 ^f	85.6 \pm 0.1 g	34.5 \pm 0. 2 ^h	<5 ⁱ
50	50	217.8 \pm 1. 5 ^a	155.0 \pm 1. 5 ^b	79.2 \pm 1. 5 ^c	133.2 \pm 0.5 d	55.3 \pm 0.2 e	13.2 \pm 0. 1 ^f	85.2 \pm 0.2 g	35.2 \pm 0. 2 ^h	<5 ⁱ
75	25	214.0 \pm 1. 7 ^a	154.7 \pm 1. 3 ^b	77.7 \pm 1. 6 ^c	131.2 \pm 0.4 d	55.4 \pm 0.2 e	12.4 \pm 0. 2 ^f	85.3 \pm 0.1 g	34.8 \pm 0. 0 ^h	<5 ⁱ
100	0	220.2 \pm 1. 4 ^a	153.2 \pm 1. 8 ^b	76.2 \pm 1. 9 ^c	132.2 \pm 0.4 d	55.2 \pm 0.3 e	12.5 \pm 0. 1 ^f	83.8 \pm 0.2 g	34.6 \pm 0. 1 ^h	<5 ⁱ

La velocidad de agitación y la concentración de surfactante son funciones descendentes del tamaño de las microcápsulas, ya que se observó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.05$) del diámetro de las microcápsulas biopoliméricas con el incremento de la concentración del surfactante y velocidad de agitación (Hsieh et al., 2006). El diámetro promedio (12.8 μm) de las microcápsulas obtenidas a 900 rpm con la adición de surfactante a 0.4% (v/v) es similar al reportado por Homayouni et al., (2008); estos autores reportaron que microcápsulas con diámetros de 17.89 μm aumentan la supervivencia en un 30% de *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis* en helado de crema. De forma general, se puede apreciar que las diferentes proporciones de GBA, AS utilizadas en la formación de microcápsulas no afectan el diámetro de las mismas. Únicamente se apreciaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en el diámetro promedio de las microcápsulas cuando variaron las concentraciones de surfactante (0.0 - 0.6 %) y la velocidad de agitación (300 – 900 rpm). Esto se debe a la disminución de la tensión superficial que conlleva a una mejor estabilidad de la emulsión, esto aunado al aumento de la velocidad de agitación, facilita la disrupción de las gotas (Moslemy et al., 2004) ocasionando microcápsulas de tamaño homogéneo.

El tamaño de todas las microcápsulas obtenidas en el presente trabajo son menores a los publicados por Jankowski et al., (1997), quienes elaboraron microcápsulas con diámetros entre 5.2 y 5.7 mm utilizando la técnica de coacervación empleando alginato de sodio y almidón de papa como material de cobertura, estos diámetros tan grandes probablemente se deben a la técnica de formación de microcápsulas utilizada. Por su parte Groboillot et al., (1993) también reportaron grandes tamaños de microcápsulas compuestas por quitosan conteniendo *Lactococcus lactis* obteniendo un incremento en el diámetro de las microcápsulas de 220 a 629 μm aumentando la concentración de quitosan de 1 a 4%.

Existen diversos criterios para evaluar el tamaño apropiado de las microcápsulas para aplicaciones alimentarias, por ejemplo, Robitaille et al., (1999) establecen que diámetros de microcápsulas inferiores a 350 μm son adecuadas para microencapsular bacterias probióticas debido al tamaño de las bacterias lácteas (0.6-0.9 μm x 1.5 μm) bajo este punto de vista, se podrían utilizar todas las microcápsulas obtenidas en la presente investigación, sin importar la velocidad de agitación o la concentración de surfactante utilizada. Sin embargo, es importante aclarar que Robitaille et al., (1999) no tienen en cuenta los defectos que puedan originar las microcápsulas desde una lupa textural.

Eficiencia en la microencapsulación

Las diferentes proporciones de los biopolímeros utilizadas en la microencapsulación de *L. casei* no afectaron la eficiencia de microencapsulación, esto puede ser ocasionado porque ambos biopolímeros, presentan mecanismos de gelificación similares en cuanto a requerimientos de cationes, necesarios para unir las cadenas poliméricas para formar la estructura de gel que finalmente de origen a las microcápsulas. En la tabla 2 se muestra que la eficiencia de microencapsulación, presentó disminuciones estadísticas significativas ($P < 0.05$) al aumentar la velocidad de agitación y la concentración de surfactante.

Tabla 2: Porcentajes promedio de la eficiencia de microencapsulación de *Lactobacillus casei* obtenidas con mezclas binarias de GBA y AS a diferentes velocidades de agitación y concentraciones de surfactante. Filas sin ninguna letra en común presentaron diferencias estadísticas con un $P < 0.05$.

Biopolímeros		Velocidades de agitación (rpm) a 0.0 % (v/v) de surfactante			Velocidades de agitación (rpm) a 0.4 % (v/v) de surfactante			Velocidades de agitación (rpm) a 0.6 % (v/v) de surfactante		
GBA (%)	AS (%)	300	600	900	300	600	900	300	600	900
0	100	88.3 \pm 2.1 ^a	86.4 \pm 1.1 ^b	83.4 \pm 0.3 ^c	84.4 \pm 1.0 ^d	82.1 \pm 1.1 ^e	79.7 \pm 0.9 ^f	81.3 \pm 0.3 ^g	77.0 \pm 0.2 ^h	73.4 \pm 0.3 ⁱ
25	75	88.2 \pm 1.3 ^a	86.2 \pm 1.1 ^b	83.3 \pm 1.2 ^c	84.6 \pm 1.1 ^d	82.6 \pm 1.4 ^e	78.7 \pm 0.7 ^f	80.1 \pm 0.2 ^g	76.5 \pm 0.1 ^e	74.1 \pm 0.3 ⁱ
50	50	87.7 \pm 2.2 ^a	85.2 \pm 1.3 ^b	83.7 \pm 0.0 ^b	84.5 \pm 1.1 ^d	82.5 \pm 1.3 ^e	78.2 \pm 0.6 ^f	81.2 \pm 0.3 ^g	77.3 \pm 0.2 ^h	73.7 \pm 0.2 ⁱ
75	25	88.2 \pm 1.8 ^a	86.7 \pm 1.2 ^b	83.2 \pm 1.2 ^c	85.4 \pm 1.1 ^d	82.3 \pm 1.3 ^e	80.0 \pm 0.5 ^f	81.1 \pm 0.3 ^g	76.4 \pm 0.0 ^h	74.3 \pm 0.1 ⁱ
100	0	88.0 \pm 2.2 ^a	86.1 \pm 2.2 ^b	83.7 \pm 2.4 ^c	84.5 \pm 1.0 ^d	82.1 \pm 1.1 ^e	78.3 \pm 0.8 ^f	80.7 \pm 0.2 ^g	76.3 \pm 0.1 ^h	73.1 \pm 0.2 ⁱ

La mayor eficiencia promedio de microencapsulación (88.0 %) se obtuvo cuando las microcápsulas fueron elaboradas a velocidades de agitación de 300 rpm sin la adición de surfactante, mientras que la menor eficiencia promedio (73.7 %) fue encontrada cuando mayores velocidades (900 rpm) y concentraciones de surfactante (0.6 % v/v) fueron utilizadas. Ambos porcentajes de microencapsulación son menores a los reportados por González et al., (2013) quienes microencapsularon *Lactococcus lactis* utilizando la relación 25GAA / 75GBA (p/p) como material de cobertura, obteniendo porcentajes de microencapsulación promedio cercanos al 92.5 %.

Esta disminución en la eficiencia de microencapsulación, puede ser consecuencia del atrapamiento de algunos microorganismos en la fase oleosa al momento de preparar las microcápsulas. Igualmente, algunos microorganismos pueden ser expulsados del interior de la microcápsula como resultado de la fuerza centrífuga que se genera con el aumento de las rpm.

CONCLUSIONES

El tamaño de las microcápsulas puede controlarse realizando variaciones en la velocidad de agitación y en la concentración de surfactante. En tal sentido, es posible desarrollar un proceso de microencapsulación de *Lactobacillus casei* por gelación iónica obteniendo diámetros promedios ideales para aplicaciones alimentarias (85 µm) con una eficiencia de microencapsulación del 80 % utilizando velocidades de agitación de 300 rpm y con la adición de surfactante al 0.6 % (v/v).

REFERENCIAS

- Adikhari, K. y otros dos autores, Survival and metabolic activity of microencapsulated Bifidobacterium in stirred Yoghurt, J Food Sci, 68, 275-280 (2003)
- Brazel, C. Microencapsulation: offering solutions for the foods industry, Cer Foods World, 44,388-393 (1999)
- Cai, S. y otros cinco autores, Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calcium sources, Food Hydrocol, 39, 295-300 (2014)
- Champagne, C. y P. Fustier, Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, Cur Op Biotechnol, 18, 184–190 (2007)
- González, R. Efecto de la concentración de gelana de alto y bajo acilo en la microencapsulación del cultivo iniciador *Lactococcus lactis* en la obtención de quesos tipo Manchego, Tesis de Doctorado, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV, México D.F., México, (2011)
- González, R. y otros tres autores, Rheological characterization and activation energy values of binary mixtures of gellan, Eur Food Res Technol, 234, 305–313 (2012)
- González y otros dos autores, Obtaining size-controlled microcapsules by ionic gelation with high and low acyl gellans containing *Lactococcus lactis*, Rev, Colomb. Biotecnol. 15(2), 70-80 (2013)
- González, R. y otros dos autores, Efecto de la microencapsulación sobre las propiedades reológicas y fisicoquímicas del yogurt blando, Inf. Tecnol, 25 (6), 45-56 (2014)
- Gouin, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends Food Sci Technol, 15, 330-347 (2004)
- Groboillot, A. y otros tres autores, Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for encapsulation of *Lactococcus lactis*, Biotechnol Bioeng, 42, 1157-1163 (1993)
- Homayouni, A. y otros cuatro autores, Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream, Food Chem, 111, 50-55 (2008)
- Hsieh, C. y otros dos autores, Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments, Col Surf Bioint, 53, 209–214(2006)
- Jankowski, T. y otros dos autores, Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules, Biotechnol Techn, 11, 31-34 (1997)

- Kim, S. y otros siete autores, Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *WLT-Food Sci Technol*, 41, 493-500 (2008)
- Lacroix, C. y otros tres autores, Immobilised cell technologies for the dairy industry, *Appl Cell Imm Biotechnol*, 8B, 295-319 (2005)
- Lee, K. y T. Heo, Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in simulated gastric juices and bile salt solution, *Appl Environ Microbiol* 66, 869–873 (2000)
- Lee, K. y D. Mooney, Alginate: Properties and biomedical applications. *Progr Pol Sci*, 37(1), 106–126 (2012)
- Martín, M. y otros dos autores, Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects, *Inn Food Sci Em Technol*, 27, 15–25. (2015)
- Matsukawa, S. y T. Watanabe, Gelation mechanism and network structure of mixed solution of low-and high-acyl gellan studied by dynamic viscoelasticity, CD and NMR measurement. *Food Hydrocol*, 21, 1355-1361. (2007)
- Moslemy, P. y otros dos autores, Production of size controlled gellan gum microbead encapsulating gasoline-degrading bacteria, *Enz Microb Technol*, 30, 10-18 (2002)
- Moslemy, P. y otros dos autores, Activated sludge encapsulation in gellan gum microbeads for gasoline biodegradation, *Biosys Eng* 26, 197-204 (2004)
- Patil, J. y otros tres autores, Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. *Dig J Nanomat Biost*, 5, 241–248 (2010)
- Peláez, C. y M. Karel, Improved method for preparation of fruit-simulating alginate gels, *J Food Process Preserv*, 5, 63-81 (1981)
- Rosas, W. y otros dos autores, Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum, *Carb Poly*, 98 1011–1017 (2013)
- Shah, N., Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods, *J. Dairy Sci*, 83, 894–907. (2000)
- Sultana, K. y otros cinco autores, Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastro-intestinal conditions and in yoghurt, *Int. J. Food Microbiol*, 62, 47–55 (2000)
- Robitaille, R. y otros dos autores, Studies on small (<350 µm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules, *J Bio Mat Res*, 44, 116-120 (1999)
- Tang, J. y otros dos autores, Gelling properties of gellan solutions containing monovalent and divalent cations, *J Food Sci*, 62, 688-692 (1997)
- Truelstrup, L. y otros tres autores, Survival of Ca alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions, *Food Microbiol*, 19, 35–45 (2002)
- Yañez, J. y otros cinco autores, Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación, *Avan y Persp*, 21, 313-319 (2002)
- Yuan, y otros dos autores, Surfactant selection for accurate size control of microcapsules using membrane Emulsification, *Col Surf A: Phys Eng Asp*, 347, 97–103 (2009)
- Zhao, R. y otros cuatro autores, Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure, *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 1349-1354 (2008)

