



Técnicas encapsulación de microorganismos probióticos con polímeros

L. I. Hinestrosa – Córdoba ^{*}, A. López – Malo

Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas – Puebla. San Andrés Cholula, Pue., México.

Resumen

La encapsulación de microorganismos para uso en productos lácteos puede ser realizada mediante la utilización de técnicas basadas en procedimientos físicos, químicos, fisicoquímicos y fisicomecánicos. En esta revisión se presentan algunas generalidades de las principales técnicas de encapsulación para probióticos utilizando diversos polímeros comestibles (alginato de sodio, gelatina, proteína de suero de leche, almidón y quitosano), así como algunas de sus ventajas, desventajas y el efecto del proceso en la viabilidad de los microorganismos después de haber sido incorporados a un producto alimenticio.

Palabras clave: encapsulación, probióticos, microorganismos.

Abstract

The encapsulation of microorganisms for its use in dairy products can be carried out by means of techniques based on physical, chemical, physico-chemical and physical-mechanical procedure. This review presents general information of the main techniques of encapsulation for probiotics using various edible polymers (sodium alginate, gelatin, milk whey protein, starch and chitosan). Also, some of the advantages, disadvantages and the effect of the process on the viability of microorganisms after having been incorporated into a foodstuff are discussed.

Keywords: encapsulation, probiotics, microorganisms.

Introducción

La microencapsulación puede ser considerada como una forma especial de empacar, en la que un material es cubierto de manera individual para protegerlo del deterioro ocasionado por el ambiente. Está técnica dependiendo de su utilidad en la industria puede ser aplicada en forma de microcápsulas, micropartículas, nanocápsulas

y sustancias activas atrapadas o humedecidas (Pedroza, 2002).

Desde hace algunos años y con el ánimo de mejorar la estabilidad, la vida útil y el valor nutritivo de algunos productos a partir de nuevas tecnologías; la microencapsulación ha sido ampliamente utilizada en la industria alimentaria y medicinal para la protección de enzimas y medicamentos (Baianu *et al.*, 1993).

* Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727 Dirección electrónica: leidyindira@yahoo.es

Los probióticos como parte de los alimentos funcionales (alimentos que además de nutrir generan beneficios adicionales para el organismo humano) han venido ganando fuerza debido a que ayudan al mejoramiento de algunos problemas de salud. Algunos de los microorganismos usados como probióticos son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, y *Lactobacillus reuteri*, entre otros (Ainsley *et al.*, 2005).

A los organismos probióticos se les adjudican muchos beneficios, entre éstos: mayor movimiento intestinal, alivio de la intolerancia a la lactosa, reducen efectos de la diarrea, reducción de niveles de colesterol y reducen la presión arterial. Sin embargo, para que estos microorganismos puedan llegar al sitio donde van a ejercer su acción, es decir al intestino, necesitan de ciertas cualidades o características específicas que no tienen naturalmente, por lo cual, últimamente se han aplicado diversas tecnologías para ayudar a los probióticos a sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal. Entre esas tecnologías se encuentra la encapsulación (Stanton *et al.*, 2003).

El proceso de encapsulación de microorganismos probióticos consiste en recubrir a los microorganismos usando agentes gelificantes que resisten los diferentes valores de pH que se encuentran en el tracto gastrointestinal. Esta tecnología soluciona algunos problemas en el proceso, porque captura el ingrediente principal como núcleo central y se recubre con una capa inerte o protectora que mejora la estabilidad durante el paso por el tracto gastrointestinal (Vasishtha, 2005).

En este artículo se presenta una descripción de diferentes técnicas de encapsulación (para garantizar la sobrevivencia de los probióticos al paso por

el organismo antes de llegar al sitio donde desarrollará su función) para microorganismos probióticos que ayudan al mejoramiento del sistema gastrointestinal del ser humano.

Revisión bibliográfica

Encapsulación

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas células vivas, micro nutrientes, enzimas y otros componentes sensibles se envasan en un recipiente para protegerlo de las reacciones con otros compuestos presentes en el alimento o impedir que sufran oxidación debido a la luz o al oxígeno. Es una técnica que se utiliza para mejorar la supervivencia de las bacterias probióticas en productos lácteos, la retención física de las células en una matriz encapsulante los protege de los factores adversos (Talwalkar *et al.*, 2004; Yañez *et al.*, 2002) (fig. 1).



Fig. 1. Microcápsula de alimento (adaptada de Rodríguez, 2006).

En la industria de alimentos existen numerosas técnicas para la incorporación de microorganismos probióticos a los alimentos, las cuales presentan múltiples beneficios y mantienen la viabilidad de los microorganismos durante un largo periodo, sin modificar sus propiedades nutricionales o su calidad nutricional. A continuación se describen diferentes técnicas de encapsulación de microorganismos prebióticos.

Encapsulación con kappa-carragenina

La carragenina es un polímero natural extraído de las microalgas marinas que es comúnmente usado en la industria de alimentos (como aditivo o agente espesante) y en productos derivados de la leche (yogurt, leche con cholate, etc.). La carragenina es un polímero rico en hierro y compuestos de azufre y ha sido utilizada para encapsular bacterias ácido lácticas como: *Stretotococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Lakkis, 2007).

La encapsulación a través de esta técnica consiste en suspender en una solución (jarabes, solución salina, jugo de frutas, entre otras) las células del microorganismo probiótico, luego se le agrega la kappa-carragenina (es necesario elevar la temperatura a 60 – 80 °C para obtener una concentración del polímero del 2 al 5%) y posteriormente, se le inyecta una solución de cloruro de potasio con lo que se obtiene la cápsula a través de la acción fisicoquímica de la mezcla y finalmente se procede a la introducción al producto que se quiere enriquecer (Mortazavian *et al.*, 2007).

La viabilidad de microorganismos encapsulados con esta técnica, se ha probado en algunos estudios. Por ejemplo, Dinakar y Mistry (1994) reportaron que *Bifidobacterium bifidum* encapsulado con kappa-carragenina e incorporado a queso Cheddar mantuvo la viabilidad de sus células durante 24 semanas sin efectos negativos sobre la textura, apariencia y/o sabor del producto.

Encapsulación con alginato de sodio

El alginato es un biopolímero natural extraído de varias especies de algas, es comúnmente usado en la industria farmacéutica y en la biotecnología como

agente espesante, gelificante y estabilizador coloidal (Lakkis, 2007).

Para llevar la encapsulación por alginato se prepara el cultivo microbiano, luego se lavan y separan las células mediante centrifugación. Posterior a ello, las células microbianas se suspenden en la solución que se desee (jarabes, solución salina, jugo de frutas, entre otras) para mezclar con alginato en una concentración que puede variar de 1 a 3% (algunas veces se adiciona también citrato de sodio), luego se deja caer por goteo sobre una solución de cloruro de calcio para formar las cápsulas. El tamaño de las cápsulas debe presentar un diámetro de 2 a 3 mm de diámetro (Muthukumarasamy *et al.*, 2006).

Esta técnica ha sido aplicada a la encapsulación de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) principalmente para observar su viabilidad en medios ácidos. Las ventajas que presenta este método son las siguientes: fácil formación de gel en las matrices de las células bacterianas, no es tóxica para el ser humano (es segura y biocompatible), es económica y fácil de preparar, es apropiada para células bacterianas con tamaño de 1-3 μ m. Sin embargo se le atribuyen muchos inconvenientes como por ejemplo: susceptible a la acidez del ambiente que la rodea, pérdida de la estabilidad mecánica, y la presencia de iones causa deterioro en el alginato (Mortazavian *et al.*, 2007; Fávaro-Trindade y Groso, 2002).

A nivel de viabilidad del microorganismo después de la encapsulación, Zhou *et al.* (1998) reportaron que la supervivencia de las bacterias encapsuladas en alginato y con suspensión de bajo peso molecular de quitosano fue baja, ya que se redujeron las células en un 40%, contrario a esto, Lee *et al.* (2004) indicaron que la encapsulación con alginato con suspensión en una solución de quitosano de alto peso molecular presentó

una mayor supervivencia para *Lactobacillus bulgaricus* en un jugo gástrico simulado. Igualmente mostraron que con esta encapsulación se obtuvo una mayor estabilidad a 22°C.

De la misma manera, Krasaekoort *et al.* (2003) estudiaron la supervivencia de probióticos encapsulados usando alginato e incorporados en yogurt y encontraron que la supervivencia de las bacterias probióticas encapsuladas fue más alta que la obtenida con las bacterias libres.

Encapsulación con gelatina

La gelatina es una sustancia de origen animal formada por proteínas y es muy usada en la formulación de alimentos. Igualmente ha sido utilizada para la encapsulación de probióticos. La técnica consiste en preparar una solución de gelatina al 2% y mezclarla con una solución de 0.45mol/dm³ de Na₂CO₃, a una temperatura de 35°C, para finalmente se suspenden las células microbianas en la solución de gelatina. La encapsulación se produce al enfriarse la mezcla. Posteriormente se incorpora al producto (Kumar *et al.*, 2007).

Los microorganismos que se han probado con esta técnica incluyen al *Lactobacillus lactis*, y su viabilidad ha sido evaluada en aceite de soya, no se conocen reportes en productos lácteos, pero no se descarta su aplicación (Kumar *et al.*, 2007).

Encapsulación con Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal, que se obtiene mediante la N-acetil-D-glucosamina. La quitina es un polímero β-(1-4)-2-acetamido-2-Deoxi-glucopiranosa, es el más abundante en los materiales orgánicos. Su uso en la encapsulación está ganando importancia en el ámbito alimenticio y farmacéutico, gracias a que es un polímero

cationico que tiene buena biocompatibilidad, no es tóxico, y regularmente se usa para recubrimiento de capsulas de alginato (Mortazavian *et al.*, 2007).

Su uso en esta técnica consiste en realizar un espreado, para lo cual se utiliza una mezcla de alginato de sodio y células microbianas en el interior, con una solución de CaCl₂ – quitosano. Para este procedimiento se usa un atomizador de aire para la formación de las capsulas y finalmente estas son inyectadas al producto (Kumar *et al.*, 2007).

A nivel de viabilidad del microorganismo después de la encapsulación, Krasaekoort (2003) y, Bhandari y Deerh (2004) evaluaron la supervivencia de las bacterias encapsuladas en quitosano y alginato incorporadas a yogurt y leche. Las bacterias utilizadas fueron *L. acidophilus* 547 y *L. casei* 01 y *B. bifidum*, mostrando que la supervivencia de las bacterias encapsuladas fueron más altas que las células libres en aproximadamente más de un ciclo logarítmico.

Encapsulación con almidón

El almidón es un componente que tiene importancia en muchas funciones fisiológicas. Su empleo en las técnicas de encapsulación se dio para asegurar la viabilidad de las poblaciones de probióticos en los alimentos por su paso en el intestino grueso, ofreciendo una superficie ideal para la adherencia de los probióticos al granulo de almidón durante el procesamiento, almacenamiento y el transito a través del tracto gastrointestinal (Kumar *et al.*, 2007; Mortazavian, 2007)

A nivel de viabilidad (Kleessen *et al.*, 1997; Le Blay *et al.*, 1999) utilizaron almidón resistente mostrando que se puede usar para asegurar la supervivencia de

bacterias probióticas en el intestino grueso, de igual manera los gránulos de almidón resistente proporcionan una superficie adecuada de adherencia para los probióticos durante el proceso de encapsulación, almacenaje y paso por el tracto gastrointestinal aportando resistencia de la capsula al estrés ambiental.

Otros investigadores (Mattila- Sandhom *et al.*, 2002) trabajaron sobre la estabilidad de las BAL formulando dos tipos de alimentos fortificados encapsulados, utilizando gránulos de almidón de papa (50-100 μ m), encontrando que las BAL pueden sobrevivir al menos 6 meses a temperatura ambiente en condiciones normales y en congelación por lo menos 18 meses.

Talwalkar y Kailasapthy (2003) utilizaron almidón y alginato mezclados en una solución de cloruro de calcio, las bacterias que se utilizaron para encapsular fueron *L. acidophilus* y *B. lactis*, encontrando que la encapsulación impide la muerte las bacterias probióticas.

Encapsulación con proteínas del suero de leche

La proteína del suero de leche es una colección de proteínas globulares que pueden ser aisladas químicamente del suero de la leche, de productos lácteos como el queso o manufacturados directamente de la leche de vaca. Desde el punto de vista químico es una mezcla de proteínas como la beta-lactoglobulina (~65%), la alfa-lactalbumina (~25%), y la sero-albúmina (~8%). Su uso consiste en preparar una suspensión concentrada de células microbianas, las cuales son centrifugadas, para luego ser suspendidas en una solución salina con lo que finalmente se produce la encapsulación (Ainsley *et al.*, 2005)

En cuanto a la viabilidad se comprobó que las bacterias de *Lactobacillus rhamnous* encapsuladas en una matriz de proteína de suero leche fueron protegidas en comparación con las bacterias no encapsuladas (Ainsley *et al.*, 2005).

Aplicaciones

La encapsulación probiótica es usada en la industria de alimentos en muchas aplicaciones entre las que se encuentra; estabilidad del material para protegerlo de las condiciones del medio ambiente (calor, luz, aire, humedad, etc), controlando las reacciones de oxidación, enmascarando sabor, color o olor, extendiendo la vida útil y protegiendo los componentes contra la perdida nutricional (Rahaman, 1999; Kumar, 2007). Los polímeros como alginato, carragenina, gelatina y quitosano son principalmente aplicada en la encapsulación de microorganismos (tabla I).

Conclusiones

En la actualidad la encapsulación constituye una importante alternativa para la implementación de alimentos funcionales, debido a que este proceso permite que los microorganismos puedan llegar vivos al sitio donde van ejercer su acción contribuyendo a la solución de problemas como intolerancia a la lactosa, inhibición de microorganismos patógenos, y reducción de los niveles de colesterol.

La encapsulación en alginato de sodio es la técnica que más se ha usado en la industria para garantizar la viabilidad de las bacterias probióticas y de ácido láctico que se han incorporado a alimentos funcionales, debido a su bajo costo y sencillez en su proceso de preparación.

Tabla I. Encapsulación de bacterias probióticas con diferentes polímeros.

Bacterias	Polímeros	Tecnología de microencapsulación	Funcionalidad	Referencias
<i>Lactobacillus</i>	Carragenina	Formación de capsulas de gel	Producción de biomasa	Klein y Vorlop, 1985
<i>S. thermophilus</i>	Carragenina	Formación de capsulas de gel	Producción de biomasa	Audet <i>et al.</i> , 1988, 1990, 1991
<i>L. bulgaricus</i>	Carragenina	Formación de capsulas de gel	Producción de biomasa	Ouellette <i>et al.</i> , 1994
<i>B. infantis</i>		Formación de capsulas de gel		Doleyres <i>et al.</i> , 2002a
<i>Bifidobacterium</i>	Carragenina	Formación de capsulas de gel	Producción de biomasa	Doleyres <i>et al.</i> , 2002b y 2004
<i>Bifidobacterium</i>	Alginato/glicerol	Capsula de gel	Producción de biomasa	Chandramouli <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus</i>	Alginato	Capsulas de gel	Ácido estable	Kebary, 1996
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Celulosa de acetatato			Chandramouli <i>et al.</i> , 2004
<i>L. delbrueckii</i>	Alginato de sodio	Capsulas de gel	Producción de biomasa	Sheu <i>et al.</i> , 1993
<i>L. casei</i>	Carragenina	Emulsificación	Ácido estable	Chan and Zhang, 2002
<i>L. lactis</i>	Gelatina/ tolueno 2- 4 diisocianato	Capsulas de gel	Producción de biomasa	Hyndman <i>et al.</i> , 1993
<i>L. acidophilus</i>	Alginato	Compresión directa	Ácido estable durante el	Chan and Zhang, 2002
<i>B. breve</i>	microesfera de alginato	Capsulas de gel	Ácido estable	Hansen <i>et al.</i> , 2002
<i>Bifidobacterium</i>	Alginato/quitosano	Capsulas de gel	Ácido estable	Lee <i>et al.</i> , 2004
<i>Bifidobacterium</i>	Alginato/ pectina, proteína	Capsulas de gel	Ácido estable	Guerin <i>et al.</i> , 2003
<i>Bifidobacterium</i>	Almidon resistente	Capsulas de gel	Ácido estable	Crittenden <i>et al.</i> , 2001
<i>Bifidobacterium</i>	Almidon de maíz	Capsulas de gel	Ácido estable	O'Riordan <i>et al.</i> , 2001

Referencias

- Audet, P., Paquin, C. y Lacroix, C. 1988. Immobilized growing lactic acid bacteria with k-carrageenan-locust bean gum gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29: 11- 18.
- Audet, P., Paquin, C. y Lacroix, C. 1990. Batch fermentations with a mixed culture of lactic acid bacteria immobilized separately in k-carrageenan locust bean gum gel beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32: 662-668.
- Audet, P., Paquin, C. y Lacroix, C. 1991 . Effect of medium and temperature of storage on viability of LAB k-carrageenan-locust bean gum gel beads. *Biotechnology Techniques*. 5: 307- 312.
- Baiyanu, I.C, Lozano P.R 1993 Novel techniques and their applications to agricultural biotechnology, Health Foods and Medical Biotechnolog. University of Illinois at Urbana. Dept. Agricultural and Food Chemistry NMR and NIR Microspectroscopy Facility Goodwin Ave, Urbana, IL. 61801, USA. pp.1-39
- Chan, E. S. y Zhang, Z. 2002. Encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* by direct compression. *Food and Bioproducts Processing*. 80 : 78- 82.
- 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.

- Ainsley, A., Vuillemand, J.C., Britten, M., Arcand, Y., Farnmworrh, 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 Food microencapsulation*. 22(6):603-619.
- Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Matto, J., Saarela, M. y Mattila-Sandholm, T. 2001. Adhesion of Bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3469-3475.
- Dinakar, P. y Mistry V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 77: 2854-2864
- Doleyres, Y., Fliss, I. y Lacroix, C. 2002a. Quantitative determination of the spatial distribution of pure- and mixed-strain immobilized cells in gel beads by immunofluorescence. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 297- 302.
- Doleyres, Y., Fliss, I. y Lacroix, C. 2004. Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. *Biotechnology Progress*, 20: 145- 150.
- Doleyres, Y., Paquin, C., LeRoy, M. y Lacroix, C. 2002b. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 168- 173.
- Guerin, D., Vuillemand, J. C. y Subirade, M. 2003. Protection of Bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. *Journal of Food Protection*. 66: 2076- 2084.
- 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 Microbiology*. 19: 35- 45.
- Kebary, K. M. K. 1996. Viability of *Bifidobacterium bifidum* and its effect on quality of frozen Zabady. *Food Research International*. 29: 431- 437.
- Kleessen, B., Stoof, G., Proll, J., Schmiedl, D., Noack, J. y Blaut, M. 1997. Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short chain fatty acids in rats. *Journal of Animal Science*. 75 : 2453- 2462.
- Klein, J. y Vorlop, D. K. 1985. *Immobilization techniques: cells*. Editorial Oxford, UK: Pergamon Press. pp. 542- 550.
- Krasaekoont, W., Bhandari, B. y Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques for probiotics for yogurt. *International Dairy Journal*. 13: 3-13.
- Krasaekoont, W., Bhandari, B., y Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14: 737- 743.
- Kumar, A. y Harjinder, S. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Food Science y Technology* 18: 240- 251.
- Lakkis, J. M. 2007. *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*. Blackwell Publishing. Iowa, EE.UU.
- Le Blay, G., Michel, C., Blottie`re, H. M. y Cherbut, C. 1999. Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *British Journal of Nutrition*. 82: 419- 426.
- Lee, J.S., Chan, D.S. y Park, H. J. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52: 7300-7305.
- Mattila-Sandholm, T., Myllaen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondevila, R. y Saarela, M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 12: 173- 182.
- Mortazavian, A., Hadi, R. S., Reza, E. M. y Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Journal L of Food Biotechnology*. 5(1): 1-15.
- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., y Holley, R. 2006. Stability of *L. reuteri* in different types of

- microcapsules. *Journal of Food Science*. 71(1):20-24.
- O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K. y Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 1059- 1066.
- Ouellette, V., Chevalier, P. y Lacroix, C. 1994. Continuous fermentation of supplemented milk with immobilized *Bifidobacterium infantis*. *Biotechnology Techniques*. 8: 45- 50.
- Pedroza-Islas, R., 2002. Alimentos Microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuáticas. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuática VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuática. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Rodríguez, J. J. 2006. La encapsulación en alimentos Disponible en <http://www.consumaseguridad.com/ciencia-y-tecnologia/>, adquirido 16/4/2007.
- 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: 1902-1907.
- Stanton, C., Desmond, C., Coakley, M., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Ross, R.P. 2003. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. En “Handbook of Fermented Functional Foods”. Ed. E.R. Farnworth Boca Ratón. Fla. E.U.A. p. 27.
- Talwalkar, A. y Kailasapathy, K. 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. Australian *Journal of Dairy Technology*. 58: 36- 39.
- Talwalkar, Kailasapathy, K. 2004. A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3(3): 117-124.
- Vasishtha, N. 2005. Microencapsulation: Dictionary of Food and Nutrition originally published by Oxford University Press. Disponible <http://www.Eencyclopedia.Com/doc/1O319-microencapsulation.html>, adquirido 1/04/2008.
- Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, C. P. y Neufeld R. J. 1998. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology*. 84(3): 342-348.