



Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia y Nutrición

**MICROENCAPSULATION OF PROBIOTICS IN  
SOYBEAN PROTEIN PARTICLES OBTAINED  
FROM A FOOD BY-PRODUCT**

---

**MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS  
EN PARTÍCULAS DE PROTEÍNAS DE SOJA  
OBTENIDAS A PARTIR DE UN  
SUBPRODUCTO ALIMENTARIO**

**TESIS DOCTORAL**

Carolina González Ferrero

Pamplona, 2019









# Universidad de Navarra

## Facultad de Farmacia y Nutrición

Memoria presentada por Dña. Carolina González Ferrero para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

Fdo. Carolina González Ferrero

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el **Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria – CNTA** y el **Departamento de Tecnología y Química Farmacéuticas** de la Facultad de Farmacia y Nutrición de la Universidad de Navarra y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

V.º B.º Director

Juan Manuel Irache Garreta

V.º B.º Co-Director

Carlos Javier González Navarro



Esta tesis doctoral ha contado con el apoyo de CNTA – Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria para el acceso a equipamiento de laboratorio y la ayuda para la capacitación técnica dentro de su programa formativo.

Las investigaciones realizadas en el presente trabajo han recibido financiación de Fundación Obra Social La Caixa (Proyecto “Desarrollo de tecnologías para la incorporación eficiente de probióticos en alimentos – BIPRO”) en los años 2017 y 2018.





*A mis padres, Olga y Carlos; y a mi hermano, Carlos.*

*A Pablo.*



*La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Pero...¿qué importa! Debemos perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo.*

*No puedes esperar construir un mundo mejor sin mejorar a las personas. Con ese fin, cada uno de nosotros debe trabajar en su propia mejora.*

Marie Skłodowska-Curie



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a CNTA la ayuda recibida para la realización de este trabajo. Gracias a toda la Dirección por fomentar la formación continua, el desarrollo profesional y personal de sus trabajadores. Gracias a la Universidad de Navarra y, en especial, al Departamento de Tecnología y Química Farmacéuticas por darme la posibilidad de desempeñar este trabajo. Gracias a Fundación Obra Social La Caixa por la financiación recibida para la ejecución de parte del proyecto.

A mis directores de tesis, Juan Manuel Irache y Carlos Javier González Navarro, por todo lo que me habéis enseñado sobre microencapsulación, tecnología de los alimentos y nutrición. Gracias por hacerme ver el vaso medio lleno cuando lo veía vacío por completo, por tener grandes ideas con las que continuar en la investigación cuando parecía estar en un punto sin retorno, por decirme siempre: “venga, que ya no te queda nada” y hacer que saliera de cada reunión con vosotros decidida a continuar. Carlos, gracias en especial, por darme la oportunidad de embarcarme en este proyecto y por seguir en él hasta el final.

Gracias a Cristina Natal por ayudarme con el difícil lenguaje de las patentes. A María Zabala, por descubrirme el mundo de la microfluídica. A Ana Brotons, por ayudarme en la recta final con buenos consejos sobre formato y edición. A Beatriz, Leticia, Patricia, María y Yolanda, por enseñarme todo lo que sé sobre experimentación en microbiología y ayudarme en el laboratorio cuando me faltaban tiempo y manos para continuar. A Kizkitza, por tu buena disposición y por tus palabras, que incluso desde la distancia, han continuado resonando en mi cabeza: “Cárol, pase lo que pase, no lo dejes”. A Ana, M<sup>a</sup> José, David, Isabel, Yolanda, Leyre, Sergio, Patricia, Vanesa, Cristina M., Eva, Laura, Nerea, Oihana, Cristina G., Ángel y tantos otros compañeros y amigos de CNTA, que de alguna u otra forma me habéis apoyado y os habéis interesado en mis avances a lo largo de estos años. A Raquel, por estar siempre dispuesta a ayudarme en éste y en todos mis proyectos de investigación, no solo desde el punto de vista técnico sino también para lograr algo de “paz espiritual” y devolverme siempre la motivación. A Inés, por facilitarme poder dar el gran impulso final con mucho ánimo. A Ana y Anabel, por estar ahí siempre, más allá del “cubo gris”, en los momentos buenos y en los menos buenos. Espero que ni el tiempo ni la distancia nos impidan seguir como hasta ahora.

A Sonia, por decirme siempre que no tenías ninguna duda de que lo conseguiría. A Emma, por enseñarme el camino al “centro” y ayudarme a recuperar el equilibrio. Por retomar las cosas donde las dejamos cada vez que nos vemos. Por todo ello:

*namasté*. A Elena, por ser un ejemplo de lucha constante y no dejar nunca de perseguir tus sueños. Por esos abrazos fuertes que me das cada vez que vas o vuelves de tus misiones. A Estela y Umberto, por hacerme desconectar de la rutina (la buena música siempre alegra el corazón y despeja la mente).

A mis padres, Olga y Carlos, por estar a mi lado, apoyándome en mis sueños y decisiones. Gracias por enseñarme lo que es el esfuerzo y la constancia. Por creer en mí y por darme las herramientas para crecer fuerte e independiente, pero sensible a lo que me rodea. A mi hermano, Carlos, eres un ejemplo de fortaleza y de reinención de uno mismo. Gracias por transmitir todo ese amor que tienes a Ángela, a Simón y al resto de la familia.

A Pablo, por tu bondad y generosidad, por tu comprensión y apoyo incondicionales. Gracias por hacerme feliz cada día que pasamos juntos. La vida contigo a mi lado es, sin duda, el mejor lugar donde estar.







## TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1	25
INTRODUCCIÓN GENERAL	
CAPÍTULO 2	113
OBJETIVOS	
CAPÍTULO 3	117
<i>Soybean protein-based microparticles for oral delivery of probiotics with improved stability during storage and gut resistance</i>	
CAPÍTULO 4	149
<i>Encapsulation of probiotics in soybean protein-based microparticles preserves viable cell concentration in foods all along the production and storage processes</i>	
CAPÍTULO 5	181
DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS	
CAPÍTULO 6	199
CONCLUSIONES	
ANEXO	203
<i>Microparticles for encapsulating probiotics, obtaining said microparticles and uses thereof</i>	



## ABREVIACIONES

AA	Almacenamiento del alimento
AAFCO	<i>Association of American Feed Control Officials</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AP	Almacenamiento del probiótico
ARN	Ácido Ribonucleico
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BIOHAZ	<i>Panel on Biological Hazards from EFSA</i>
BPW	<i>Buffered Peptone Water</i>
CBER	<i>FDA's Center for Biologics Evaluation and Research</i>
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DBPC	<i>Double-Blind Placebo-Control</i>
DE	<i>Dextrose Equivalent</i>
DSHEA	<i>Dietary Supplement and Health Education Act</i>
DWPI	<i>Denatured Whey Protein Isolate</i>
EDA	<i>European Dairy Associations</i>
EE. UU.	Estados Unidos
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EHPM	<i>European Federation of Health Products Manufacturers Associations</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Fructooligosacáridos
FOSHU	<i>Food for Specified Health Uses</i>
FP	<i>Food Processing</i>
FS	<i>Food Storage</i>
G	Ácido $\alpha$ -L-gulurónico
GC-FID	<i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detector</i>
GI	Gastro-Intestinal - <i>Gastro-Intestinal</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
GRAS	<i>Generally Recognised As Safe</i>
HHP	<i>High Hydrostatic Pressure</i> – alta presión hidrostática
HMP	<i>High Methoxy Pectin</i>
HPLC-RI	<i>High Performance Liquid Chromatography-Refractive Index</i>
HR	Humedad Relativa
IPA	<i>International Probiotics Association</i>
LAB	<i>Lactic-Acid Bacteria</i>
M	Ácido $\beta$ -D-manurónico
MD	<i>Maltodextrin</i> - maltodextrina
MP	<i>Microparticles</i> – Micropartículas
N	<i>Total nitrogen content</i>
N <sub>0</sub>	<i>Total viable bacteria at the beginning of storage (in CFU/g)</i>
NHP	<i>Natural Health Products</i>

$N_t$	<i>Total viable bacteria at a particular storage period (in CFU/g)</i>
o/w	<i>oil-in-water</i>
OEI	<i>Oligofructose-Enriched Inulin</i> – inulina enriquecida con oligofructosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Procesado del alimento
PP	<i>Probiotic Processing</i>
PP	Procesado del probiótico
PS	<i>Probiotic Storage</i>
QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
RH	<i>Relative Humidity</i>
Sc	<i>L. casei-loaded soybean protein microparticles</i>
SCFAs	<i>Short-Chain Fatty Acids</i>
SG	Simulante Gástrico
SGF	<i>Simulated Gastric Fluid</i>
SGI	Simulante Gastrointestinal
SIF	<i>Simulated Intestinal Fluid</i>
Sp	<i>L. plantarum-loaded soybean protein microparticles</i>
SPC	<i>Soybean Protein Concentrate</i> – concentrado de proteínas de soja
SPI	<i>Soybean Protein Isolate</i> – aislado de proteínas de soja
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
UE	Unión Europea
USD	Dólar de EE. UU.

w/o *water-in-oil*

w/o/w *water-in-oil-in-water*

WHO *World Health Organization*

WPI *Whey Protein Isolate*







## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---



## ÍNDICE

1. PROBIÓTICOS.....	29
1.1. DEFINICIÓN E HISTORIA.....	29
1.2. EFECTOS BENEFICIOSOS SOBRE LA SALUD HUMANA.....	31
1.3. OTRAS APLICACIONES: GANADERÍA Y AGRICULTURA.....	35
1.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA VIABILIDAD DE LOS PROBIÓTICOS. LIMITACIONES DE SU USO A NIVEL INDUSTRIAL .....	36
1.4.1. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN .....	40
1.4.2. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN .....	41
1.4.3. DESHIDRATACIÓN.....	42
1.4.4. ALMACENAMIENTO .....	49
1.4.5. REHIDRATACIÓN O RECONSTITUCIÓN.....	50
1.5. ESTADO REGULATORIO .....	51
1.5.1. FAO/OMS.....	51
1.5.2. UE .....	52
1.5.3. EE. UU. ....	56
1.5.4. JAPÓN .....	57
1.5.5. CANADÁ .....	58
2. MICROENCAPSULACIÓN COMO ALTERNATIVA A LA ESTABILIZACIÓN DE LOS PROBIÓTICOS.....	59
2.1. MATERIALES DE ENCAPSULACIÓN.....	61
2.1.1. HIDROGELES IÓNICOS .....	62
2.1.2. HIDROGELES TÉRMICOS .....	63
2.1.3. PROTEÍNAS LÁCTEAS.....	65
2.1.4. FTALATO ACETATO DE CELULOSA .....	65
2.2. TECNOLOGÍAS DE ENCAPSULACIÓN.....	65
2.2.1. EXTRUSIÓN.....	66
2.2.2. EMULSIÓN.....	68
2.2.3. SECADO POR ATOMIZACIÓN O <i>SPRAY-DRYING</i> .....	69
2.2.4. LECHO FLUIDO .....	72
2.2.5. LIOFILIZACIÓN .....	74
2.2.6. COACERVACIÓN.....	74
2.2.7. SISTEMA DE HIBRIDACIÓN O PROCESO DE REFORMADO DE SUPERFICIE EN SECO .....	76
2.2.8. ELECTROSPINNING .....	76
2.2.9. TECNOLOGÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	77

3. PREBIÓTICOS COMO ESTRATEGIA PARA FAVORECER EL CRECIMIENTO DE LOS PROBIÓTICOS A NIVEL INTESTINAL .....	78
3.1. INULINA .....	79
3.2. FOS .....	79
3.3. PECTINA .....	80
3.4. ALMIDÓN RESISTENTE .....	80
4. VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA. USO DE LAS PROTEÍNAS DE SOJA COMO AGENTES DE RECUBRIMIENTO .....	81
BIBLIOGRAFÍA .....	85

## 1. PROBIÓTICOS

### 1.1. DEFINICIÓN E HISTORIA

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) acepta el término probiótico, definido por Guarner y Schaafsma en 1998 (1), como “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables” (2).

La mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (3). Otras especies como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, así como algunas levaduras (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* (4, 5)) han sido utilizadas como probióticos en la formulación tanto de complementos alimenticios como de alimentos funcionales definidos como “alimentos formulados con ingredientes cuya composición confiere un efecto saludable más allá de satisfacer los requerimientos nutricionales” (6, 7).

Ilya Ilyich Mechnikov, biólogo ruso-ucraniano y premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1908 junto con Paul Ehrlich, por sus trabajos relativos al estudio del sistema inmunitario, fue el primer científico en apreciar los efectos beneficiosos del uso de algunos microorganismos (8). Durante sus viajes a finales del siglo XIX por las estepas de Astrakan y Stavropol, en el este de Europa, observó que sus pobladores presentaban una longevidad inusual, lo que atribuyó a su hábito de beber leche fermentada. Mechnikov retomó esta idea a principios del siglo XX cuando comenzó a estudiar la microbiota intestinal humana y desarrolló la teoría de que el envejecimiento se debe a una intoxicación del cuerpo, y que ésta se produce por las toxinas excretadas por algunas bacterias intestinales (9).

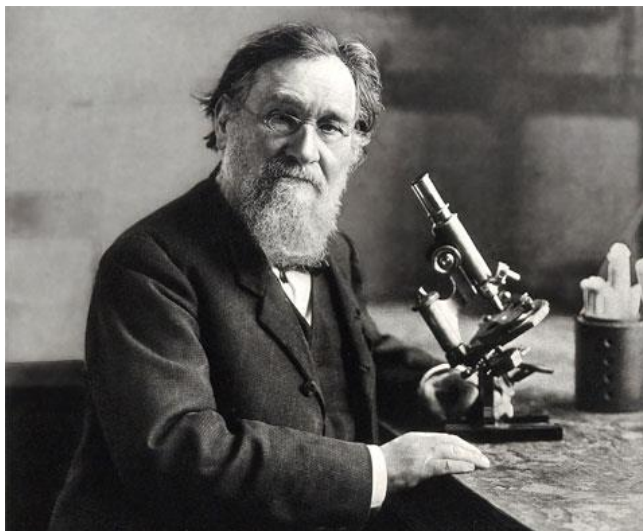


Figura 1. Ilya Ilyich Mechnikov (10).

En 1907, Mechnikov afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” (2, 11). Así, para evitar la multiplicación de la microbiota bacteriana perjudicial, recomendó una dieta rica en leche fermentada por lactobacilos que fue muy popular durante un tiempo (8).

En la misma época, el pediatra francés Henry Tissier, observó que los niños con diarrea mostraban en sus heces un reducido número de bacterias con forma de “Y” que, sin embargo, eran muy abundantes en las de niños sanos (2). Por ello, propuso administrar este tipo de bacterias “bífidas” a pacientes con diarrea para restablecer la microbiota intestinal sana.

Durante el primer tercio del siglo XX, las hipótesis de Mechnikov y Tissier fueron abandonadas. Con la excepción de algunos estudios en la Unión Soviética y Japón, no existen apenas evidencias de que se siguiera trabajando sobre las ideas de ambos (12). Sin embargo, en 1935 apareció en Japón el primer producto comercial desarrollado con probióticos, Yakult®. Yakult® es una leche fermentada que contiene *Lactobacillus casei Shirota*, una bacteria productora de ácido láctico de origen intestinal, aislada y cultivada en 1930 por el Dr. Minoru Shirota, y cuya comercialización continúa hasta nuestros días.

El término griego probiótico, que significa literalmente “a favor de la vida”, no se utilizó hasta 1965, aunque en otro contexto, para denominar las sustancias secretadas por un organismo que estimulaban el crecimiento de otros (7).

A finales del siglo XX se retomaron con fuerza las teorías de Mechnikov y Tissier y un número creciente de publicaciones científicas mostraron efectos beneficiosos sobre la salud humana derivados del consumo de probióticos en alimentos (13). Estos estudios mostraban el efecto positivo de determinados microorganismos sobre las funciones inmunitaria, digestiva y respiratoria y una mejora significativa de la salud de niños y otras poblaciones de riesgo que padecían enfermedades infecciosas.

La creciente popularidad del uso de probióticos entre los profesionales de la salud, unida a la falta de consenso a nivel internacional sobre este tipo de terapias, llevó a la FAO a realizar una consulta en 2001 junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) acerca de las propiedades nutricionales y saludables de las leches en polvo suplementadas con bacterias lácticas vivas. En 2006, un Comité Conjunto de Expertos FAO/OMS publicó las Directrices para la Evaluación de los Probióticos en los Alimentos (13) con el fin de establecer un modelo práctico para dicha evaluación por parte de la industria alimentaria. En este documento se trataron tres cuestiones fundamentales:

1. Propiedades de las cepas probióticas y su evaluación.
2. Especificaciones, garantía de la calidad y cuestiones de reglamentación relativas a los productos probióticos.
3. Inocuidad y efectos beneficiosos sobre la salud humana.

### **1.2. EFECTOS BENEFICIOSOS SOBRE LA SALUD HUMANA**

La microbiota humana está constituida por más de  $10^{14}$  microorganismos vivos y hoy en día es considerada, especialmente la microbiota intestinal, como un “órgano esencial” (14), que contiene aproximadamente 150 veces más genes que el propio genoma humano (15). En el aparato digestivo existen aproximadamente 1000 especies bacterianas (16), además de otros microorganismos como arqueas, virus, y células eucariotas (17) como mohos y levaduras (18). Más de la mitad del peso de la materia que se encuentra en el colon corresponde a células bacterianas, cuyo número es diez veces superior al de las células humanas (16).

La microbiota humana comienza a colonizar el intestino a partir del momento del nacimiento ya que durante el embarazo el feto permanece en un medio estéril (13, 19). Durante la infancia sufre múltiples variaciones y su composición comienza a parecerse a la microbiota de un adulto a partir de la edad de un año, normalmente tras

la introducción de alimentos sólidos en la dieta (20). La microbiota intestinal es distintiva de cada individuo y depende de las condiciones fisicoquímicas del huésped (valor de pH, potencial redox, nutrientes, motilidad intestinal y secreciones como ácido gástrico, sales biliares, enzimas digestivas y mucus), entre otros factores. Además, otros múltiples factores como la ingesta de antibióticos, las condiciones ambientales, el estrés, la edad, las enfermedades, la alimentación y el estilo de vida, afectan igualmente a su composición (21).

La Figura 2 muestra un esquema que resume algunos de los factores que afectan a la composición de la microbiota intestinal y, por tanto, a su equilibrio.



Figura 2. Principales factores que afectan a la composición de la microbiota intestinal.

La microbiota intestinal desempeña un importante papel en la homeostasis de lípidos, carbohidratos y proteínas, así como en la síntesis y transporte de vitaminas esenciales como folatos, vitamina K, biotina y vitaminas del grupo B (riboflavina [B<sub>2</sub>] y cobalamina [B<sub>12</sub>]) (22, 23). La microbiota intestinal produce entre 50-150 mmol/l (concentraciones determinadas en el contenido colónico y material fecal) por día de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, *Short-Chain Fatty Acids*, como ácido acético, propiónico y butírico) y sirve como fuente de energía para el epitelio intestinal del huésped (24). Los SCFAs intervienen en diversos procesos como el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y la motilidad intestinal, entre otros (25, 26). Además, las señales y los metabolitos producidos por los microorganismos presentes en el intestino, estimulan el sistema inmunitario (17, 27).



El desequilibrio microbiológico de la microbiota se denomina disbiosis y ha sido definido como una alteración producida por cambios cualitativos o cuantitativos de la composición de los microorganismos, cambios funcionales en las actividades metabólicas o cambios en su distribución (28). En general, este desequilibrio o disbiosis se clasifica en tres tipos: (i) pérdida de microorganismos beneficiosos, (ii) crecimiento excesivo de microorganismos potencialmente dañinos, y (iii) pérdida de la diversidad de la población microbiana.

En los últimos años, numerosos estudios relacionan la pérdida de la homeostasis de la microbiota intestinal con enfermedades no transmisibles como obesidad (29, 30), hipertensión (31), síndrome del intestino irritable (32), artritis (33), asma (34, 35), enfermedades cardiovasculares (36), cáncer (37-39), diabetes (40) e incluso trastornos neurológicos como depresión (32, 41), ansiedad (42, 43), síndrome del espectro autista (32, 44), demencia (45), enfermedad de Alzheimer (46, 47) o enfermedad de Parkinson (28, 32, 48-51). Pese a los numerosos esfuerzos realizados en los últimos años en este campo, todavía se desconoce la relación entre la microbiota, el huésped y el ambiente, y si enfermedades como p. ej., el síndrome del intestino irritable, son causa o efecto de la disbiosis (28). La Figura 3 resume algunos de los efectos saludables asociados a los probióticos y sus mecanismos de acción.

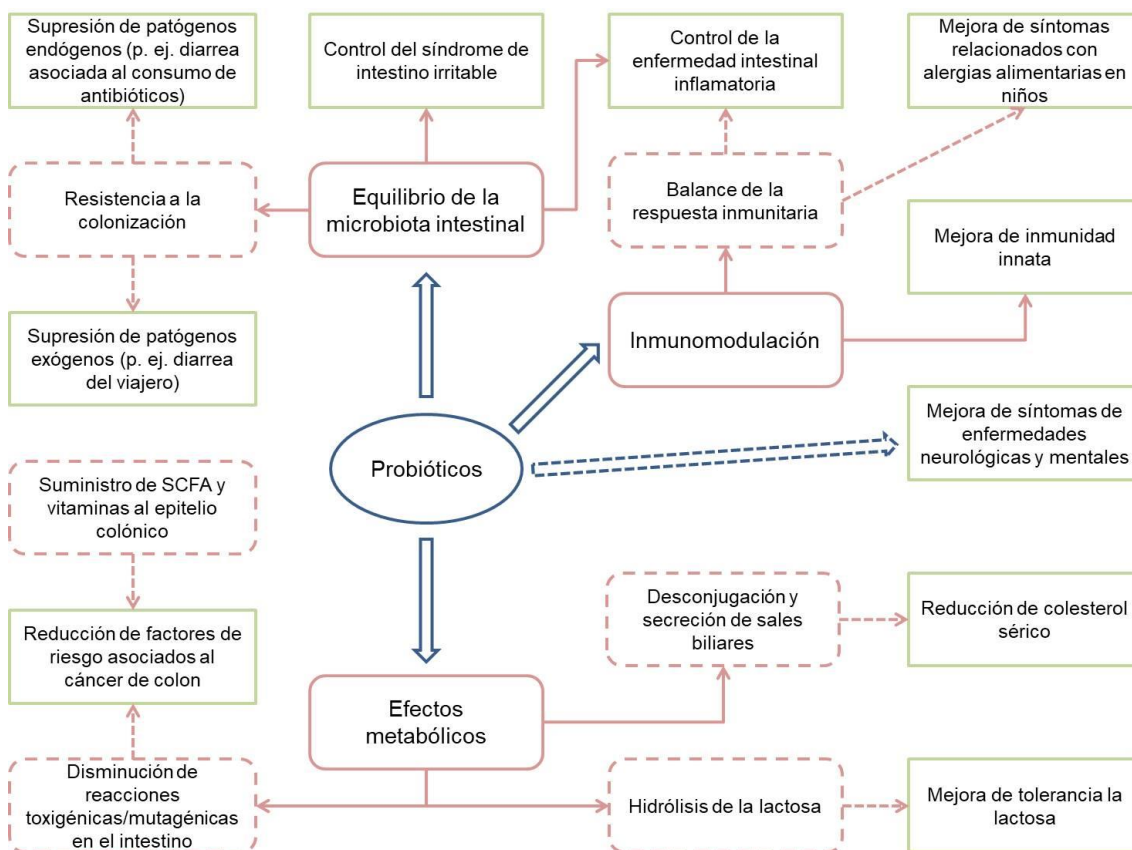


Figura 3. Varios efectos saludables de los probióticos y sus mecanismos de acción (adaptado de Sarao y Arora (2017) (7), Parvez *et al.* (2006) (52) y Ding *et al.* (2019) (53)).

Como consecuencia de estos avances, la inclusión de microorganismos probióticos en la dieta o administrados como medicamentos o complementos nutricionales, se contempla en la actualidad tanto como para prevenir como para restablecer el desequilibrio de la microbiota intestinal, tal y como ya propuso Mechnikov a finales del siglo XIX. Existen algunos estudios en los que se han reportado efectos positivos sobre la respuesta inmunitaria derivados de la presencia de algunos probióticos no viables o de sus metabolitos (54). Sin embargo, tanto la definición de probióticos de la OMS como la legislación de los países en los que se regula el uso de los mismos exigen el aseguramiento de la viabilidad celular en el momento de su consumo, siendo ésta indispensable para cualquier declaración de propiedades saludables relativa a los probióticos.

Por lo tanto, es imprescindible asegurar la viabilidad de los probióticos durante su producción, el procesado del alimento, el almacenamiento y después de su

consumo, con el fin de garantizar la potencial actividad biológica de los microorganismos frente a las autoridades que regulan la aprobación de su uso.

En el apartado 1.4 de la Introducción General se profundiza en los factores que afectan a la estabilidad de los probióticos y en el apartado 1.5 en el estado regulatorio de los probióticos en el ámbito de algunos países.

### **1.3. OTRAS APLICACIONES: GANADERÍA Y AGRICULTURA**

La aplicación de probióticos se ha extendido al sector de la ganadería con el objetivo de mejorar la salud y el bienestar animal. En este ámbito, se definen como probióticos los microorganismos vivos, que administrados como suplementos, contribuyen al mantenimiento del equilibrio de la microbiota intestinal de los animales. Los probióticos se utilizan para mantener la salud animal y, por consiguiente, la seguridad alimentaria en avicultura, ganadería de rumiantes o cerdos y en acuicultura (55).

Los microorganismos probióticos pueden adherirse a la pared intestinal, regular la respuesta inmunitaria (56) y competir con los microorganismos patógenos por la adhesión al moco intestinal (57, 58). También estimulan la síntesis de vitaminas del grupo B y sintetizan compuestos como peróxido de hidrógeno y ácidos grasos volátiles, que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (58, 59). Además, los probióticos podrían suponer una alternativa al uso de determinados antibióticos en la producción de aves de corral, mejorando la calidad y la seguridad de los productos derivados (55). Así, se han observado efectos positivos relacionados con el consumo de probióticos sobre la calidad de los huevos (60), la leche y la ganancia de peso (61, 62). Con respecto a su aplicación en acuicultura, los probióticos compiten con los patógenos a nivel intestinal, previniendo el desarrollo de enfermedades de origen bacteriano (57, 63).

En relación a su aplicación en agricultura, los probióticos pueden actuar como biofertilizantes y biopesticidas (64). Su uso presenta una serie de ventajas en comparación con los fertilizantes y plaguicidas químicos destacando: (i) mayor seguridad tanto para el medio ambiente como para el ser humano, (ii) mayor efectividad a menores dosis, (iii) mayor especificidad, (iv) regulación por la propia planta (tal y como se regulan las poblaciones microbianas endógenas), (v) mayor velocidad de degradación y por tanto, menor plazo de seguridad, (vi) menor resistencia de la planta frente a los tratamientos, y (vii) posibilidad de aplicación tanto en sistemas de cultivo tradicional como integrados (64). La estimulación del crecimiento a través

del uso de los probióticos puede llegar a darse mediante la interacción directa entre los microorganismos y la planta o de forma indirecta mediante su actividad frente a patógenos (55). Además, los probióticos pueden proporcionar macro y micronutrientes a la planta, como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y otros componentes, mediante la metabolización de exudados de las raíces (65).

### **1.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA VIABILIDAD DE LOS PROBIÓTICOS. LIMITACIONES DE SU USO A NIVEL INDUSTRIAL**

Los microorganismos probióticos se encuentran disponibles a nivel industrial como cultivos concentrados en formatos deshidratados para ser añadidos a los alimentos (productos fermentados y no fermentados) o como complementos alimenticios en polvo, cápsulas o comprimidos (66).

La demanda de alimentos funcionales y en concreto, de los alimentos formulados con probióticos (“alimentos probióticos” en adelante), se ha visto incrementada en los últimos años debido a la mayor concienciación de la población acerca de la importancia de la alimentación para el mantenimiento de un estado saludable. El mercado global de alimentos y bebidas funcionales alcanzó casi los 300 mil millones USD (dólar de Estados Unidos, EE. UU.) en 2017, y la previsión de ventas para 2021 es de casi 442 mil millones USD, un 50% más (67). Se estima, que alrededor del 60-70% del total de los alimentos funcionales corresponden a alimentos probióticos (68) y, de hecho, en las dos últimas décadas, más de 500 alimentos probióticos han sido lanzados al mercado en todo el mundo (66).

En un primer momento, la elaboración de alimentos probióticos se centró, fundamentalmente, en el desarrollo de productos lácteos como leche fermentada, helado, queso y leche en polvo (69). Sin embargo, en los últimos años, la incorporación de probióticos en otras matrices alimentarias no lácteas como zumos de frutas y vegetales (70), carnes (68), productos a base de cereales (71, 72), productos a base de soja (73) o alimentos infantiles (74) ha aumentado considerablemente. El principal motivo de esta tendencia es proporcionar alternativas a los lácteos a la población con hipolactasia (déficit de lactasa) e intolerancia a la lactosa (personas que presentan síntomas tras la ingesta de lactosa, por encima de la dosis tolerable, como consecuencia de tener hipolactasia). La prevalencia más alta de hipolactasia (90-100%) se ha detectado en los indios americanos y en los asiáticos, pudiendo llegar a alcanzar el 80% en los negros, árabes y latinos, mientras que la más baja se localiza en el noroeste de Europa (75). En el caso de España, aproximadamente el 30-35% de

los adultos presentan hipolactasia y en otros países del sur de Europa puede alcanzar hasta el 70% como en algunas zonas de Italia (76).

Los alimentos formulados con microorganismos probióticos deben cumplir una serie de requisitos de seguridad (p. ej., no ser patogénicos, tóxicos o presentar actividad metabólica intrínseca con efectos perjudiciales sobre la salud del huésped) y presentar un efecto beneficioso sobre la salud demostrado. Además, deben reunir unas condiciones tecnológicas como pertenecer a cepas genéticamente estables (66), presentar una vida útil aceptable en unas determinadas condiciones de almacenamiento (77) y, ser resistentes al tránsito gastrointestinal (GI) (78, 79). Es decir, se debe garantizar la viabilidad de los microorganismos durante el procesado, el almacenamiento y el consumo, para asegurar la concentración necesaria en la que aportan un efecto beneficioso para la salud del consumidor (79).

Por lo tanto, los microorganismos probióticos deben poder producirse a escala industrial, tanto desde un punto de vista técnico como económico, manteniendo su viabilidad y funcionalidad durante su producción y durante su almacenamiento en congelación o en medios de cultivo deshidratados, siendo el proceso de conservación más habitual la liofilización (66). Los medios de cultivo congelados presentan normalmente una concentración de microorganismos superior a  $10^{10}$  UFC/g mientras que los microorganismos liofilizados se encuentran por lo general en concentraciones del orden de  $10^{11}$  UFC/g, un ciclo superior como consecuencia del proceso de concentración o eliminación del agua del medio de cultivo (66). En ambos casos, superando la concentración probiótica (no consensuada internacionalmente, pero comúnmente referenciada en la literatura científica) de  $10^7$  UFC/g (80).

Otro de los aspectos necesarios a considerar a la hora de seleccionar un probiótico para su uso a nivel industrial está relacionado con las características sensoriales que pueden conferir a un alimento. Las bacterias ácido lácticas (BAL), como las pertenecientes al género *Lactobacillus*, liberan ácido láctico como producto de su metabolismo, mientras que las correspondientes al género *Bifidobacterium* producen ácido acético. Estos compuestos pueden liberarse durante la fermentación o durante el almacenamiento, lo que podría provocar un efecto no deseado sobre las características organolépticas de los alimentos probióticos (81).

La Figura 4 representa gráficamente un resumen de los aspectos cualitativos más significativos que deben reunir los alimentos probióticos.

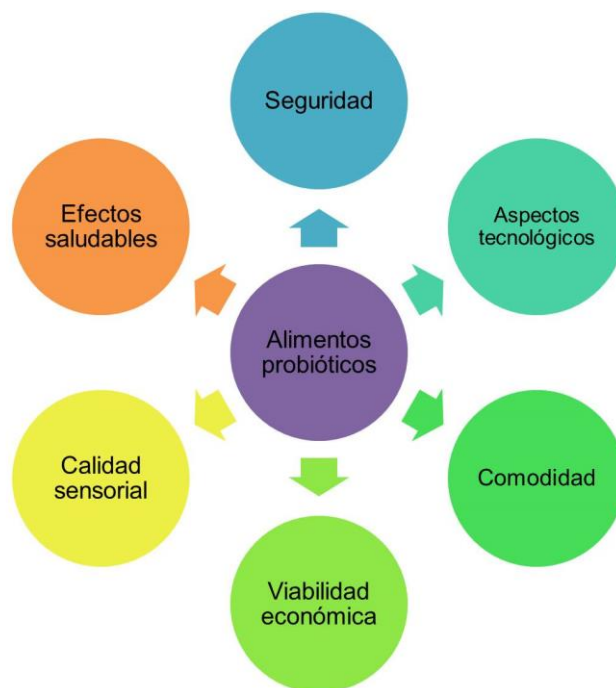


Figura 4. Requisitos cualitativos que deben reunir los probióticos para su aplicación en alimentación (adaptado de Tripathi y Giri (2014) (66)).

La supervivencia de las bacterias frente a factores de estrés durante el procesamiento de los alimentos depende de la especie y de la cepa de uso. Los *Lactobacilli* se encuentran de forma natural en algunos alimentos fermentados tradicionales, y por lo general, son más resistentes en condiciones de pH bajo que las *Bifidobacteria*, por lo que existe un número mayor de especies de *Lactobacilli* que de *Bifidobacteria* comerciales y aptas para su uso en alimentación (66) (Tabla 1).

Tabla 1. Géneros y especies de probióticos comúnmente utilizados con fines comerciales (adaptado de Tripathi y Giri (2014) (66)).

Género	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
Especie	<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
	<i>L. delbruekii</i> <i>bulgaricus</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>

<b>Género</b>	<b><i>Lactobacillus</i></b> <b>sp.</b>	<b><i>Bifidobacterium</i></b> <b>sp.</b>	<b><i>Enterococcus</i></b> <b>sp.</b>	<b><i>Streptococcus</i></b> <b>sp.</b>
	<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
	<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
	<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
	<i>L. lactis</i>			
	<i>L. plantarum</i>			
	<i>L. reuteri</i>			
	<i>L. brevis</i>			

La estabilidad de los microorganismos probióticos en la producción de los alimentos que los contienen depende, principalmente, de los siguientes factores:

1. Formulación del propio alimento: pH, acidez titulable, oxígeno molecular, actividad de agua, concentración de azúcar, concentración de sal, presencia de bacteriocinas, presencia de aditivos como colorantes y aromas artificiales.
2. Parámetros de procesado: temperatura de procesos, tiempo del tratamiento, velocidad de enfriamiento, materiales de envasado, tipo de almacenamiento, escala de producción.
3. Parámetros microbiológicos: tipo de cepa, concentración del inóculo (66).

La Figura 5 muestra un esquema de los principales factores que afectan a la viabilidad de los probióticos en los alimentos desde el momento de la producción de los microorganismos hasta la puesta en el mercado del producto probiótico final.

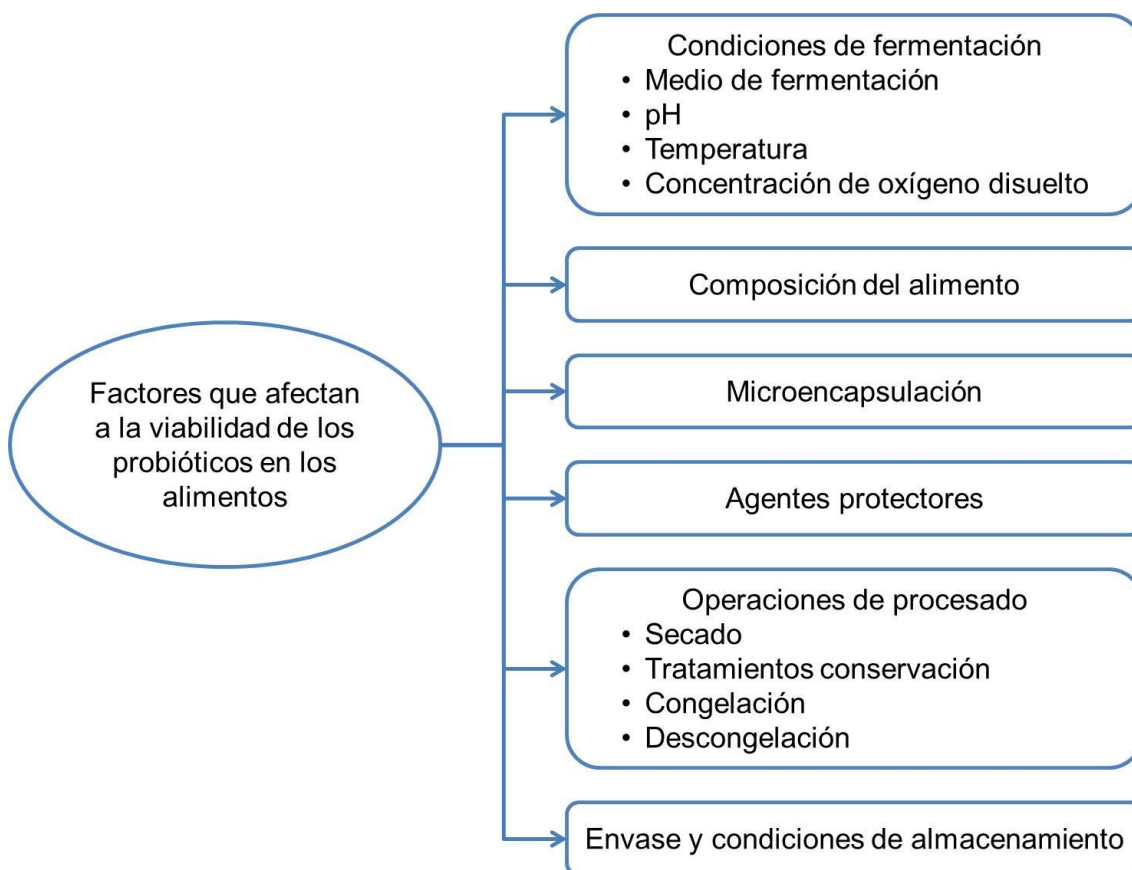


Figura 5. Principales factores que afectan a la viabilidad de los probióticos en los alimentos (adaptado de Tripathi y Giri (2014) (66)).

#### 1.4.1. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

Entre los parámetros que afectan a la viabilidad de los probióticos durante la fermentación, destacan la temperatura y la concentración de oxígeno. La mayoría de los probióticos presentan una temperatura de crecimiento óptima entre 37 °C y 43 °C (82). El tiempo de exposición a temperaturas superiores debe ser mínimo, por lo que se recomienda la adición de probióticos durante el proceso de enfriamiento en el caso de la producción de alimentos que implican tratamientos térmicos como calentamiento, cocción o pasteurización. Existen estudios que avalan que un pre-tratamiento térmico moderado de los probióticos puede incrementar su resistencia y, por tanto, su viabilidad frente a posteriores tratamientos térmicos más intensos (83-85). Es decir, puede contribuir a la adaptación de los microorganismos a temperaturas mayores que la temperatura límite de supervivencia.

Otro de los principales factores de estrés derivados del proceso de fermentación es la concentración de oxígeno, fundamentalmente en el caso de microorganismos anaerobios (86). Para disminuir la concentración de oxígeno durante



la fermentación, ésta suele llevarse a cabo en condiciones de vacío (87). De igual modo, la presencia de oxígeno durante el posterior procesado y almacenamiento, en función de la permeabilidad del envase, puede afectar a la viabilidad de los probióticos (88). Debido a este hecho, se han dedicado esfuerzos a encontrar cepas más resistentes a la presencia de oxígeno. Así, Ahn *et al.* (2001) fueron capaces de desarrollar una cepa oxígeno-tolerante de *Bifidobacterium longum* mediante el crecimiento de las células en medios de cultivo expuestos a atmósferas microaeróbicas. Estas exposiciones permitieron la adaptación de los microorganismos al oxígeno (89), aplicando una estrategia similar a la llevada a cabo por otros investigadores en relación a la adaptación térmica.

#### **1.4.2. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN**

Los probióticos pueden ser viables congelados durante largos periodos de tiempo, manteniendo su metabolismo reducido o incluso interrumpido (90). No obstante, el mantenimiento de la congelación durante la vida útil de los productos incrementa su coste y dificulta su transporte. Durante el proceso de congelación, la formación de cristales de hielo, tanto extracelular como intracelular, puede llegar a producir daños irreversibles en las membranas, causando la muerte celular. Por tanto, la velocidad y la temperatura de congelación afectan a la supervivencia de las células ya que cuanto más rápida es, los cristales de hielo formados son de menor tamaño, lo que disminuye el daño celular (91). Además, a medida que el agua se va cristalizando, los solutos que permanecen en la fracción aún sin congelar se van concentrando, provocando también un daño celular derivado del choque osmótico durante el proceso de congelación (92). A velocidades bajas de congelación, el agua difunde desde el interior de las células hacia el exterior para mantener el equilibrio osmótico, congelándose en el exterior de las células. Así, se evitaría la formación de cristales intracelulares, pero se produciría un choque osmótico intenso. Si por el contrario, la velocidad de congelación es demasiado rápida, el agua no llegaría a difundir hacia el exterior de las células, manteniéndose el equilibrio osmótico, pero formándose cristales de hielo intracelulares. Por lo tanto, es importante conseguir una velocidad de congelación equilibrada (93).

La muerte celular también se produce durante la descongelación, ya que los microorganismos se exponen a un choque osmótico intenso y a una exposición repentina a compuestos que afectan negativamente a su viabilidad, como son los iones de hidrógeno, los ácidos orgánicos, el oxígeno y otros componentes (66).

### 1.4.3. DESHIDRATACIÓN

La deshidratación de los probióticos puede incrementar en ocasiones su estabilidad a temperatura ambiente, lo que permite eliminar la cadena de frío durante su conservación. El secado, además, puede favorecer la manipulación de los microorganismos durante el procesado de los alimentos, su transporte y consumo. Sin embargo, los probióticos son sensibles a los procesos de deshidratación, especialmente a aquellos en los que se aplica calor, observándose pérdidas de viabilidad altamente significativas (66, 92), ya que la eliminación de agua de las células puede provocar la pérdida de estructura y de funcionalidad de las proteínas superficiales de la membrana y de la pared celular. Además, durante la deshidratación, la peroxidación lipídica puede afectar negativamente a la fracción lipídica de la membrana celular. Adicionalmente, las estructuras secundarias de ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) se desestabilizan, perdiendo su capacidad para la replicación y la transcripción y traducción, respectivamente (94).

La siguiente tabla resume las principales características de las diferentes tecnologías de deshidratación en la industria alimentaria.

Tabla 2. Resumen de las principales características de las tecnologías de secado o deshidratación (adaptado de Broeckx *et al.* (2016) (92)).

	<b>Secado por atomización o <i>spray-drying</i></b>	<b>Liofilización</b>	<b>Secado a vacío</b>	<b>Lecho fluido</b>
Tipo de proceso	Continuo	Discontinuo	Discontinuo	Continuo/Discontinuo
Costes (%)*				
a) Fijos	12	100	52,2	8,8
b) Fabricación	20	100	50,6	17,9
Control de las características de las partículas	Sí	No	No	Limitado
Conocimiento/Experiencia	En aumento	Sí	Limitado	Limitado
Procesos adicionales necesarios para conseguir partículas sueltas en polvo	No	Micronización	Micronización	Granulación

	<b>Secado por atomización o <i>spray-drying</i></b>	<b>Liofilización</b>	<b>Secado a vacío</b>	<b>Lecho fluido</b>
Parámetros de proceso				
a) Tiempo	Minutos	Horas-días	Horas-días	Horas
b) Temperatura	Altas (hasta 200 °C)	Bajas (<0 °C)	Medias	Medias
c) Presión**	Limitada	Alto vacío (≤10 mbar)	Bajo vacío (≥10 mbar)	Limitada

\* En relación a los costes de producción mediante liofilización (considerados como del 100%)

\*\* Vacío puro = 0 mbar

A pesar de la pérdida de viabilidad asociada a los procesos de deshidratación, existen diferentes estrategias comunes, con independencia de la tecnología de secado aplicada, que permiten mejorar la tasa de supervivencia de las células. Estas estrategias son: (i) adición de agentes protectores, (ii) control de los parámetros de proceso, (iii) acondicionamiento previo de los probióticos, (iv) control de las condiciones de almacenamiento, y (v) control en la rehidratación de los microorganismos (66, 92).

Las técnicas de deshidratación más comunes utilizadas para el secado de los probióticos son la liofilización y el secado por pulverización o atomización (*spray-drying*) (92).

#### **1.4.3.1. Liofilización**

La liofilización consta de una etapa de congelación previa y una aplicación de vacío posterior, que provoca en una primera fase la sublimación del agua congelada y en una segunda, la desorción del agua sin congelar (95). Esta técnica de deshidratación suele presentar tasas de supervivencia más elevadas que otras técnicas que implican la aplicación de altas temperaturas. Cuanto más pequeñas son las células, menor es la superficie de la membrana celular que queda expuesta a los cristales de hielo extracelulares y, por tanto, menor es el daño celular (96). Durante la congelación del agua, los solutos se concentran en la fracción de agua todavía sin congelar y provocan también estrés y daño celular como consecuencia del choque osmótico, tal y como se ha mencionado en el apartado 1.4.2.

Los principales inconvenientes asociados a la liofilización son el elevado coste energético y de tiempo, ya que se trata de un proceso discontinuo; y la necesidad de una segunda fase de molidura para transformar la torta liofilizada en un polvo micronizado suelto (97).

Pese a los inconvenientes asociados a la liofilización, se trata de una tecnología bien conocida y ampliamente utilizada en la deshidratación de probióticos. Para incrementar la viabilidad celular durante este proceso, se utilizan diferentes estrategias como la adición de agentes protectores. La adición de crioprotectores como inulina, almidón, fructooligosacáridos (FOS) (98), manosa, glucosa, sacarosa, entre otros (99, 100), inhibe el crecimiento de los cristales de hielo en la etapa de congelación, evitando así el daño celular y, por tanto, mejorando la supervivencia de los microorganismos. Los lioprotectores, entre los que se encuentran también algunos tipos de azúcares, mejoran la viabilidad celular durante la etapa de deshidratación debido a su efecto protector sobre las membranas celulares y las proteínas. Existen varias hipótesis que explican diferentes mecanismos de acción por los cuales los lioprotectores ejercen dicho efecto protector. Entre ellas destacan la teoría de la vitrificación, la sustitución de las moléculas de agua por otros grupos polares presentes en los azúcares y la teoría de las fuerzas de hidratación o exclusión (92).

La membrana celular en condiciones fisiológicas normales está constituida por una bicapa lipídica en la cual las estructuras hidrofóbicas de los ácidos grasos (cadenas o colas) permanecen en el interior de la doble capa, mientras que las cabezas de los ácidos grasos, de naturaleza polar, están alineadas con las moléculas de agua intracelulares y extracelulares (101). Durante la deshidratación, las colas se van compactando y los grupos polares se aproximan entre sí, lo que puede provocar la pérdida de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas que estabilizan la estructura de la membrana, produciendo daños irreversibles durante el proceso de rehidratación, como consecuencia de la pérdida de componentes intracelulares, provocando la muerte celular (102). Los azúcares añadidos al medio, a medida que se deshidrata la suspensión celular, se concentran, favoreciéndose su conformación cristalina frente al estado amorfo (103). El estado cristalino se caracteriza por presentar una alta viscosidad ( $>10^{14}$  Pa.s), lo que disminuye la movilidad y la difusión de los componentes (104). Esta teoría de la vitrificación explicaría por qué los probióticos embebidos en una matriz cristalina presentan una mayor estabilidad física y química (92).

Otra de las hipótesis que se plantean en la literatura está relacionada con la sustitución de las interacciones de la célula con las moléculas de agua. Cuando las

células se encuentran hidratadas, las proteínas y las membranas que las conforman se encuentran estabilizadas por las interacciones que sus grupos polares establecen con las moléculas de agua, principalmente mediante puentes de hidrógeno (105). Durante y después de la deshidratación, estas interacciones con las moléculas de agua podrían ser sustituidas por interacciones con los grupos polares de los azúcares (grupos OH-). Dado que los grupos polares de los lípidos que constituyen las membranas tendrían suficiente espacio durante el estado de deshidratación, se mantendría la integridad celular hasta que tuviera lugar la rehidratación (101, 102, 105). De acuerdo a las investigaciones de Andersen *et al.* (2011), esta hipótesis sería compatible para concentraciones bajas de azúcares (< 0,2 M). Sin embargo, para concentraciones superiores, las moléculas de azúcar en lugar de interactuar con las membranas, serían expelidas hacia el exterior de su superficie. Estas fuerzas de repulsión, contrarrestarían la contracción de las membranas (106).

Estos mecanismos son compatibles entre sí, por lo que podría ser plausible que todos ellos contribuyan a la estabilización de las células durante la deshidratación (92).

Por otro lado, el cultivo de microorganismos en condiciones suaves de estrés osmótico mediante la incorporación de azúcares como lactosa, sacarosa y trehalosa al medio de cultivo, favorece la adaptación de las células al estrés osmótico más severo sufrido durante la liofilización, tanto en la etapa de congelación como de deshidratación (107).

Los parámetros del proceso también afectan a la viabilidad celular. Tal y como se ha mencionado anteriormente (apartado 1.4.2), la velocidad de congelación es clave para evitar el daño celular derivado del estrés mecánico de los cristales de hielo y del estrés osmótico provocado por los solutos. Tsvetkov y Brankova (2000) mostraron que la mayor pérdida de viabilidad celular durante la liofilización se produce durante la congelación (108). Así, To y Etzel (1997) observaron que el 60-70% de los microorganismos que sobreviven a la etapa de congelación también sobreviven a la deshidratación (109). No obstante, dado que la velocidad óptima de congelación parece ser dependiente de la especie, resulta difícil establecer unos criterios estándar para la liofilización de los probióticos (110).

Aunque la liofilización ha sido utilizada en la fabricación de probióticos en polvo durante décadas, la combinación de esta tecnología con el concepto de encapsulación es relativamente nueva (3), y se profundizará sobre este tema en el apartado 2.2.5.

### 1.4.3.2. *Secado por atomización o spray drying*

El secado por atomización o *spray-drying* es una tecnología de secado rápida y económica en la que una dispersión o disolución es pulverizada en continuo en una cámara sometida a altas temperaturas, produciéndose la evaporación del medio dispersante y la recogida del producto seco resultante en pequeñas partículas esféricas (111).

La Figura 6 muestra un esquema de un equipo de atomización. El proceso de secado mediante *spray-drying* puede dividirse en cuatro etapas. En una primera, la dispersión o disolución es atomizada en forma de *spray* en pequeñas gotas (Figura 6, ③). En una segunda etapa, el *spray* entra en contacto con una corriente de gas (aire o nitrógeno) caliente en el cilindro de pulverización (Figura 6, ④). El flujo del gas puede ser co-corriente, contracorriente o mixto. En el caso del secado de probióticos es recomendable que el flujo del gas sea co-corriente ya que las gotas con mayor contenido de humedad entran en contacto con la zona de la cámara de secado de mayor temperatura mientras que las zonas con menor contenido de humedad lo hace con las de menor temperatura, evitándose un mayor gradiente térmico y, por tanto, evitando un estrés térmico mayor en las células. Por el contrario, si el flujo de aire fuera en el sentido contrario al flujo de alimentación (contracorriente), las partículas que se secaran en el cilindro de pulverización (Figura 6, ④) con menor contenido de humedad, podrían ser empujadas de nuevo hacia la parte superior de éste, donde se alcanzan las mayores temperaturas ya que el sistema calefactor (Figura 6, ②) se encuentra más próximo, sufriendo un estrés térmico mayor (112). En una tercera etapa, se consolida el secado de las gotas y la formación de las partículas sólidas (Figura 6, ④). Por último, en la cuarta etapa, las partículas se separan de la corriente de gas en un ciclón (Figura 6, ⑤) depositándose en un recipiente de recogida (Figura 6, ⑥) (92).

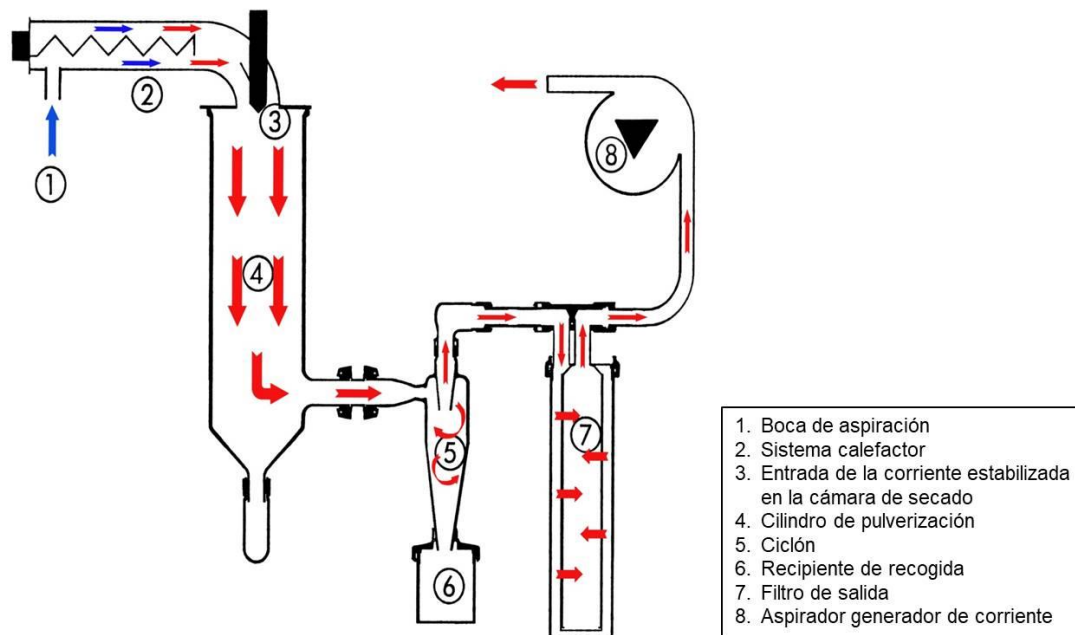


Figura 6. Esquema de un equipo de atomización o *spray-dryer* Büchi B-290 Mini Spray-Dryer (Büchi Switzerland, Flawil, Suiza) utilizado en el secado de las micropartículas desarrolladas en el presente trabajo (adaptado del manual de instrucciones del equipo (113)).

Durante la atomización, los microorganismos soportan temperaturas elevadas de hasta 200 °C durante periodos cortos de tiempo, lo que puede afectar a su supervivencia como consecuencia de ese estrés térmico sufrido. Adicionalmente, las células se ven negativamente afectadas por la pérdida de agua y el choque osmótico, al igual que en la liofilización o en cualquier otro proceso de deshidratación, lo que afecta a la estructura y la funcionalidad de las células, reduciéndose la actividad metabólica. En el caso del secado por atomización, esta pérdida afecta en mayor medida a la membrana citoplasmática, la membrana celular, la pared celular, el ADN y el ARN. La gruesa pared celular de las bacterias Gram-positivas, constituida por 40 o más capas de peptidoglicanos, confiere, por lo general, mayor protección frente a la atomización en comparación a las bacterias Gram-negativas cuya pared celular es mucho más fina (1-5 capas) (114, 115). El daño celular producido en las membranas puede llegar a inducir incluso la pérdida de componentes intracelulares (116).

Kim y Bhowmilk (1990) (117) y Gardiner *et al.* (2000) (84) observaron en diferentes especies bacterianas, que la tasa de supervivencia en el secado era mayor

cuanto menor era la temperatura de entrada o de salida del *spray-dryer*. Sin embargo, es necesario considerar además, la cantidad de humedad del producto final para asegurar una buena viabilidad durante el almacenamiento (118).

Además del estrés térmico, osmótico y de deshidratación, las células pueden verse también afectadas por la presión de atomización (119, 120), recomendándose el uso de presiones bajas (92).

Otro de los factores que afecta especialmente a los microorganismos anaerobios estrictos como las *Bifidobacteria* es el daño oxidativo ocasionado por el oxígeno que circula en el interior del atomizador y el que se encuentra disuelto en la dispersión líquida a secar (121). El oxígeno interacciona con los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos, provocando la desnaturalización de los ácidos nucleicos y las proteínas y la oxidación lipídica, lo que provoca daños en la membrana celular y la muerte de los microorganismos (122). Para evitar este daño, se puede sustituir el aire por nitrógeno, si bien esta sustitución encarece el proceso de secado (121).

Es necesario considerar que, por lo general, los probióticos deshidratados mediante *spray-drying* resultan más sensibles a determinadas condiciones de estrés como p. ej., la presencia de NaCl (92).

Con el fin de mejorar la viabilidad celular de los microorganismos no solo durante la atomización sino también durante el almacenamiento tras el proceso de secado, se utilizan dos tipos de estrategias: (i) la adición de agentes protectores, y (ii) la adaptación a los parámetros de procesado, sometiendo a los microorganismos a condiciones de pre-estrés.

Entre los agentes protectores más comúnmente utilizados se encuentran (i) los azúcares, especialmente los disacáridos como la sacarosa o la trehalosa (123, 124); (ii) los polisacáridos como la inulina (125) o los FOS (126); (iii) los antioxidantes como ácido ascórbico (121); y (iv) ciertas proteínas (proteínas del suero lácteo) (127).

Con respecto al pre-acondicionamiento de los microorganismos al proceso de atomización, destacan los pre-tratamientos en condiciones suaves de temperatura (128), pH (129), presión (130) o concentración salina (131), aunque su eficacia parece depender de la cepa ya que no siempre mejoran la tasa de supervivencia (132).

Al igual que en el caso de la liofilización, la atomización no solo es una tecnología de secado sino además una tecnología de encapsulación. Por ello, se profundizará más en su aplicación con este fin en el apartado 2.2.3.



#### 1.4.4. ALMACENAMIENTO

La viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento depende de numerosos factores destacando: (i) la temperatura, (ii) el contenido de humedad, (iii) la actividad de agua, (iv) la humedad relativa, (v) el contenido de oxígeno, y (vi) la presencia de luz (92, 116). Por ello, las condiciones de envasado y de almacenamiento, así como la composición del producto final, influyen significativamente en la vida útil de los probióticos (116).

Cuanto menor es la temperatura de almacenamiento, mayor es la viabilidad de los probióticos a lo largo del tiempo (92, 116, 124). Normalmente, la temperatura de almacenamiento de este tipo de productos es de 4-5 °C (133), aunque la temperatura óptima de almacenamiento puede variar según cepas. Mortazavian *et al.* (2007) observaron una mayor viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 en yogur almacenado a 2 °C (20 días) mientras que para *Bifidobacterium lactis* Bb-12 la temperatura que ofreció mayor viabilidad fue 8 °C (133). Sin embargo, para periodos superiores de almacenamiento, se recomienda temperaturas de congelación de -18 °C (134), lo que supone un encarecimiento del producto. El almacenamiento a temperaturas superiores reduce significativamente la viabilidad de los microorganismos, reduciendo la vida útil de los productos probióticos (135).

De la misma forma, a mayor contenido de humedad residual en el producto, actividad de agua y/o humedad relativa durante el almacenamiento, menor es la viabilidad de los probióticos. Cuanto mayor es la humedad y la actividad de agua, menor es la temperatura de transición vítrea de los azúcares contenidos en los productos deshidratados (136, 137). De esta forma, se produce una transición del estado cristalino a un estado amorfo, lo que favorece la movilidad de las moléculas y las reacciones químicas, como p. ej., la oxidación de los lípidos de las membranas, cuyos productos provocan a su vez daños en el ADN (138), lo que deriva en una pérdida de la estabilidad y la funcionalidad y por lo tanto, en la muerte de las células (139-141). Sin embargo, un exceso de deshidratación (0% de humedad) puede resultar también en una pérdida de viabilidad durante el almacenamiento, por lo que se recomienda que el producto presente un contenido mínimo de humedad (3-8%), cuyo valor óptimo dependerá de la cepa (118).

Dependiendo de la composición del producto deshidratado (agentes protectores utilizados durante la deshidratación), la vida útil del probiótico puede verse igualmente afectada (142-145). Existen diferentes hipótesis con respecto al mecanismo de acción de los agentes protectores utilizados en el secado durante el

almacenamiento. Rajam *et al.* (2015) proponen que algunos polisacáridos como los FOS tienen la capacidad de retención de humedad suficiente como para evitar un exceso de deshidratación en los probióticos (146). Yoo y Lee (1993) propusieron que el uso de sorbitol podría evitar el daño de la membrana celular mediante las interacciones hidrofóbicas establecidas entre ésta y el agente protector (147). En el caso de la incorporación de los probióticos como ingredientes en un alimento, su interacción con otros ingredientes o aditivos alimentarios puede ser positiva, neutra o negativa (148), por lo que es necesario estudiar también la estabilidad del probiótico en el alimento durante su vida útil.

La ausencia de oxígeno (vacío o atmósfera inerte) en el envase (149, 150) o la presencia de antioxidantes como ascorbato sódico (150) o tocoferol (151) son algunas de las estrategias utilizadas para la prevención del daño oxidativo con el objetivo de prolongar la vida útil de los probióticos.

### **1.4.5. REHIDRATACIÓN O RECONSTITUCIÓN**

El proceso de rehidratación de los probióticos deshidratados es muy importante para asegurar su viabilidad, con independencia del proceso de deshidratación que hayan sufrido durante su procesado. La recuperación de los microorganismos vivos depende tanto del medio en el que son reconstituidos (pH, osmolaridad, contenido en nutrientes) como las condiciones en las que son reconstituidos (temperatura, volumen de reconstitución, tiempo o velocidad de rehidratación) (66, 92, 100). El proceso de hidratación óptimo, que garantice una máxima viabilidad celular, depende de la cepa a reconstituir, así como del medio en el que se haya deshidratado (152, 153). El uso de agentes protectores durante el secado confiere un efecto protector no sólo durante esta etapa y durante el almacenamiento sino también durante el proceso de rehidratación evitando un choque osmótico (85, 154-156).

En general, los cultivos termófilos presentan mejores viabilidades cuando son recuperados a temperaturas comprendidas entre los 30 °C y 37 °C mientras que las bacterias mesófilas presentan un rango de temperatura óptimo de recuperación de 22-30 °C (157).

Con respecto al volumen del líquido reconstituyente, numerosos estudios han reportado una recuperación mayor de células viables en el caso de relaciones líquido:microorganismos deshidratados bajas (154, 158).

## 1.5. ESTADO REGULATORIO

### 1.5.1. FAO/OMS

Según las recomendaciones del Comité Conjunto de Expertos FAO/OMS, los probióticos deben ser identificados mediante técnicas moleculares a nivel de género, especie y cepa; así como ser depositados en una colección de cultivos internacional (13). En una primera fase, debe asegurarse la inocuidad de la cepa mediante ensayos *in vitro* y/o ensayos en animales, para posteriormente evaluar su seguridad en seres humanos. Paralelamente, la cepa deberá ser caracterizada a nivel funcional mediante estudios *in vitro* y estudios en animales. Algunos de los principales ensayos *in vitro* actualmente utilizados para el estudio de cepas probióticas son:

1. Resistencia a la acidez gástrica.
2. Resistencia a los ácidos biliares.
3. Adherencia a mucosas y/o células epiteliales humanas y líneas celulares.
4. Actividad antimicrobiana contra potenciales bacterias patógenas.
5. Capacidad para reducir la adhesión de agentes patógenos a superficies.
6. Actividad hidrolasa de sales biliares.
7. Resistencia a espermicidas (aplicable sólo a probióticos para uso vaginal).

Una vez garantizada la seguridad de los probióticos, se deberán realizar ensayos de Fase 2 en seres humanos. Estos ensayos tendrán un diseño aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo (DBPC, en inglés: *Double-Blind Placebo-Control*) u otro con tamaño de muestra y resultado primario válidos para determinar si la cepa o el producto es eficaz según dichas recomendaciones (13). Preferiblemente, se recomienda realizar un segundo ensayo DBPC para confirmar los resultados. Posteriormente, es aconsejable llevar a cabo un estudio de Fase 3 en el que se compare la eficacia del tratamiento probiótico con el tratamiento estándar para una condición específica. Una vez superadas la Fase 2 y la Fase 3, en caso de que ésta se realice, se desarrollará el alimento probiótico, que deberá ser correctamente etiquetado, indicando las siguientes especificaciones técnicas:

1. Contenido del probiótico, indicando género, especie y cepa.
2. Número de bacterias viables garantizadas hasta el final de su vida útil.
3. Condiciones adecuadas para su almacenamiento.
4. Datos de contacto de la empresa para información al consumidor.

Históricamente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han sido géneros considerados seguros debido a su presencia natural en la microbiota intestinal de los mamíferos y a su uso en alimentos a lo largo de la historia a nivel mundial. Sin embargo, algunos probióticos podrían ser potencialmente responsables de algunos efectos adversos en el huésped (159). Entre estos efectos se encuentran infecciones sistémicas (160, 161), actividades metabólicas perjudiciales (162), excesiva estimulación de respuesta inmunitaria en individuos susceptibles (163), y transferencia de genes a otros microorganismos (p. ej., genes de resistencia a antibióticos) (13, 164, 165).

Por ello, con el fin de garantizar la inocuidad de los probióticos, es importante llevar a cabo en todas las cepas, incluso en aquellas pertenecientes a especies consideradas como seguras (GRAS, *Generally Recognized As Safe* en la terminología de la Administración de Alimentos y Medicamentos estadounidense, FDA (166)), los siguientes estudios (13):

1. Patrones de resistencia a los antibióticos.
2. Estudio de actividades metabólicas (como producción de D-lactato y desconjugación de sales biliares).
3. Producción de toxinas.
4. Infectividad en animales inmunocomprometidos.
5. Actividad hemolítica.
6. Efectos colaterales genéticos y patológicos durante ensayos en seres humanos.
7. Supervisión epidemiológica de efectos adversos tras la comercialización.

Aunque no existe un consenso internacional sobre la concentración considerada como probiótica, de acuerdo a las recomendaciones de la FAO, debería ser necesario enumerar con precisión las bacterias probióticas presentes en los alimentos en el momento de su consumo con el fin de incluir dicha concentración en el etiquetado. La concentración viable de cada probiótico en la etiqueta debería ser aquella presente al final del periodo de su conservación (13).

### 1.5.2. UE

Actualmente, en la Unión Europea (UE), no está permitido el uso del término “probiótico” para el etiquetado en alimentos y no existe una regulación específica para tal fin. La legislación sobre estos productos es diferente según el país de la UE en el

que se comercialicen. Así, en España, Alemania, Francia e Italia, los microorganismos probióticos comercializados en formato polvo, cápsulas o comprimidos se rigen por la legislación de productos farmacéuticos. Sin embargo, en países como Dinamarca, Finlandia, Países Bajos y Suecia, algunos probióticos se encuentran regulados como alimentos o complementos alimenticios (164).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (*European Food Safety Authority*) evalúa la inocuidad de los microorganismos que se adicionan intencionadamente a los alimentos según la taxonomía, el conocimiento científico de la especie, la ausencia de patogenicidad y el uso final del microorganismo (Figura 7). Si se ha demostrado que el uso de un grupo taxonómico de microorganismos es seguro o se han identificado las especies que entrañan un peligro y pueden ser eliminadas, el grupo entra a formar parte del estatus de Presunción Cualificada de Seguridad (*Qualified Presumption of Safety, QPS*). Esta herramienta, donde se recogen los microorganismos seguros, es similar al GRAS de FDA, pero adaptada a la legislación de la UE. En Diciembre de 2019, el Panel de Riesgos Biológicos (BIOHAZ) de EFSA adoptará una opinión científica relativa al mantenimiento de los agentes biológicos con estatus QPS (167). En el caso de que un microorganismo no forme parte del estatus QPS, se deberá realizar una evaluación de su seguridad completa.

La Tabla 3 muestra las diferencias entre el sistema QPS de EFSA (UE) y las Guías GRAS de FDA de EE. UU.

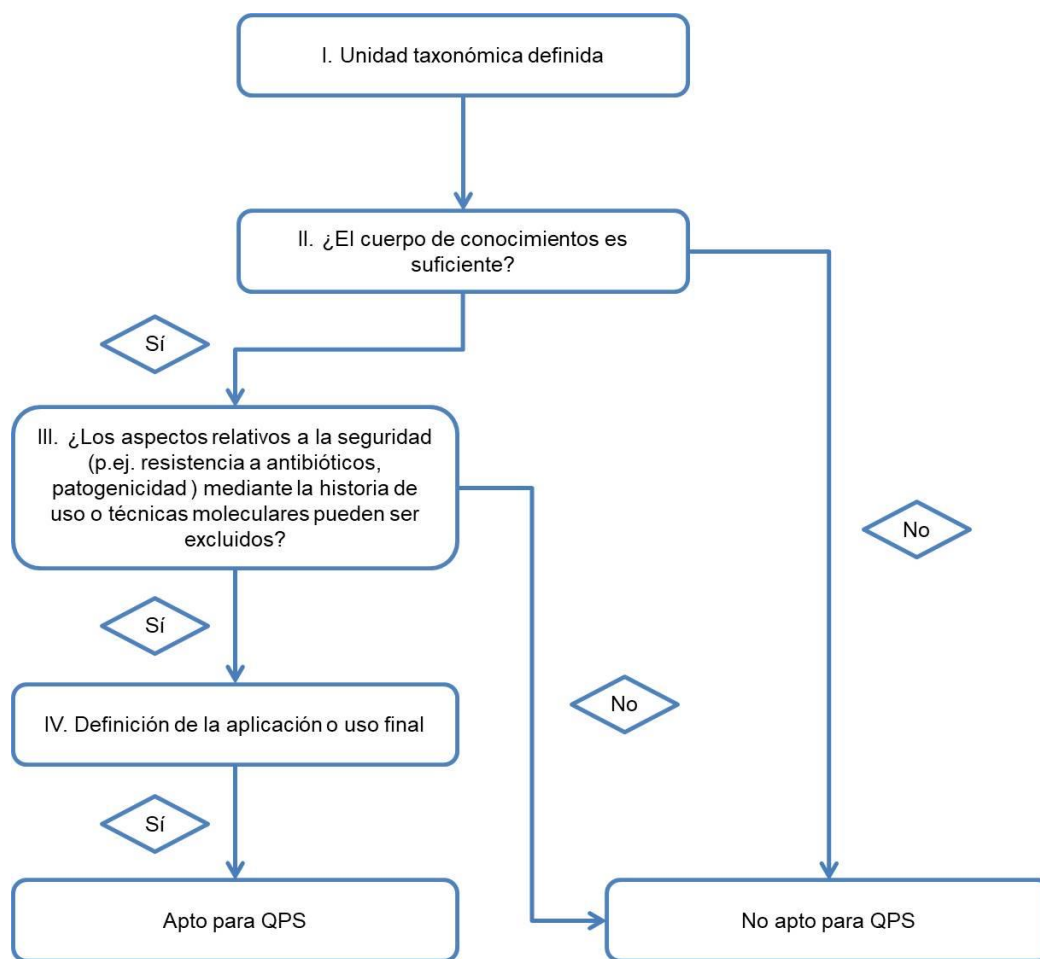


Figura 7. Diagrama simplificado del flujo de trabajo que describe la evaluación de un microorganismo para ser cualificado como QPS de acuerdo a los requerimientos de EFSA para su uso en alimentación (168, 169).

Tabla 3. Diferencias entre el sistema QPS (EFSA, UE) y las guías GRAS (FDA, EE. UU.) (adaptado de Wassenaar y Klein (2008) (170) y Ricci *et al.* (2017) (169)).

Sistema QPS	Guías GRAS
Aplica solo a microorganismos	Aplica a todos los aditivos alimentarios incluidos los microorganismos
De cumplimiento para los microorganismos utilizados para el etiquetado “fuente de/contiene” en productos destinados a su comercialización en la UE	De cumplimiento después de una notificación GRAS específica a FDA

<b>Sistema QPS</b>	<b>Guías GRAS</b>
Resolución de estado QPS por EFSA	Resolución de estado GRAS por FDA y/o expertos externos
Restringido a los microorganismos destinados a alimentación humana y animal	Abierto a todo tipo de aditivos alimentarios
Lista positiva	Lista abierta
Basado en la historia de uso y en los efectos adversos	Basado en el uso común
Describe la unidad taxonómica (p. ej., género, especie, cepa)	Describe la sustancia o el microorganismo específico
Evaluación genérica	Evaluación caso por caso

El Reglamento (UE) nº 2015/2283 relativo a nuevos alimentos, regula la puesta en el mercado de microorganismos en calidad de alimentos o de ingredientes alimentarios, cuyo consumo no haya sido significativo con fecha anterior al 15 de Mayo de 1997 en la Unión (171). Además, los nuevos alimentos e ingredientes alimentarios están sujetos a los requisitos generales de etiquetado establecidos en el Reglamento (CE) nº 1169/2011, y en caso de realizar cualquier declaración nutricional y/o de propiedades saludables en la etiqueta, deberá realizarse de conformidad con los requisitos del Reglamento (CE) nº 1924/2006 (172, 173).

Por otro lado, aunque el Reglamento (CE) nº 1169/2011, relativo a la información facilitada al consumidor, no hace mención al término “probiótico”, el Reglamento (CE) nº 1924/2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, no excluye a los probióticos en su aplicación. Sin embargo, este último reglamento no deja claro si los microorganismos deben someterse a los procedimientos de autorización de las declaraciones nutricionales o a las declaraciones funcionales, siendo por tanto ambigua su aplicación en este ámbito.

Con el fin de ayudar a la industria alimentaria con la interpretación de este reglamento, en Diciembre de 2007, la Comisión para la Salud y la Protección del Consumidor publicó una guía en la que se indicaba que el etiquetado de un producto

con la frase “contiene probióticos” debía ser considerado como una declaración de propiedades saludables y no nutricional (174). Sin embargo, desde entonces hasta el momento, se han rechazado más de 300 solicitudes de declaraciones de propiedades saludables presentadas ante EFSA y referidas a probióticos, la mayoría de ellas por no estar suficientemente sustentadas científicamente (175).

Algunos Estados miembros (Bélgica, República Checa, Dinamarca, Italia y Eslovenia) han hecho llegar a la Comisión una solicitud para el uso del término “probiótico”, así como cierta orientación sobre las condiciones que serían necesarias para su uso (176). Estos países plantean dos posibilidades:

1. Modificar el Reglamento (CE) nº 1169/2011 incluyendo los probióticos como categoría legal dentro del Anexo III en el que se citan los alimentos en cuyo etiquetado deben figurar una o más menciones adicionales y poder así indicar en el etiquetado de un alimento: “contiene probióticos”.
2. Modificar la Guía publicada por la Comisión para la Salud y la Protección del Consumidor en 2007 de tal forma que la mención “contiene probióticos” no sea considerada como una declaración de propiedades saludables sino una declaración nutricional.

En Noviembre de 2017, la Asociación Internacional de Probióticos (*International Probiotics Association*, IPA) en Europa, la Federación Europea de Asociaciones de Fabricantes de Productos para la Salud (*European Federation of Health Products Manufacturers Associations*, EHPM) y la Asociación Europea de Productos Lácteos (*European Dairy Association*, EDA) se sumaron a la instancia realizada por estos Estados miembros (177).

### **1.5.3. EE. UU.**

Los probióticos en EE. UU. pueden estar regulados como complementos alimenticios, alimentos o medicamentos en función de la intención de uso. Otros factores que pueden afectar a su clasificación incluyen aspectos tales como (i) si el producto contiene un “ingrediente dietético”, (ii) si constituye un alimento convencional o un sustitutivo de comida, o (iii) si los probióticos son utilizados como ingredientes en la formulación de un alimento convencional siempre que el ingrediente esté reconocido como GRAS para su uso (178).

Si los probióticos son utilizados para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, son regulados como un medicamento



y/o un producto biológico por el CBER (*FDA's Center for Biologics Evaluation and Research*).

Sin embargo, la mayoría de los probióticos en EE. UU. están regulados como complementos alimenticios y, por tanto, deben cumplir con lo establecido por el DSHEA (*Dietary Supplement and Health Education Act*). Conforme a esta regulación, estos microorganismos pueden tener una declaración funcional o estructural, siendo el fabricante el responsable de la seguridad de los productos, así como de que las declaraciones estén adecuadamente sustentadas en evidencias científicas y el etiquetado no sea falso ni lleve a la mala interpretación por parte del consumidor. En ningún caso éste puede hacer referencia a su aplicación para el “diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad” ya que sólo los medicamentos pueden ser etiquetados con este tipo de declaraciones (164).

#### **1.5.4. JAPÓN**

Japón es el único país del mundo que ha definido y regulado los alimentos funcionales, incluyendo los probióticos, a través de un sistema de certificación de Alimentos para Usos Específicos de Salud (FOSHU, *Food for Specified Health Uses*) según una legislación específica, regulada por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar (179).

Los requerimientos exigidos para conseguir la aprobación FOSHU son los siguientes:

1. Eficacia en seres humanos claramente probada.
2. Seguridad (ensayos de toxicidad en animales, ausencia de efectos negativos en caso de ingesta excesiva).
3. Formulación nutricionalmente apropiada (p. ej., sin exceso de sal).
4. Garantía de compatibilidad con las especificaciones del producto durante su consumo.
5. Establecimiento de métodos de control de calidad tales como especificaciones de ingredientes y productos, procesos y métodos de análisis.



Figura 8. Sello de certificación FOSHU para alimentos funcionales en Japón.

Además del certificado FOSHU “ordinario”, existen otras modalidades de certificación FOSHU:

1. Calificado: para alimentos con una función sobre la salud no sustentada en las evidencias científicas exigidas para el certificado “ordinario” o alimentos con cierta eficacia pero que no han establecido el mecanismo de acción.
2. Estandarizado: para aquellos alimentos que cumplen con ciertas normas y especificaciones establecidas y cuentan con evidencia científica.
3. Reducción del riesgo de enfermedad: esta declaración está permitida para ingredientes cuyo efecto sobre la reducción del riesgo de enfermedad está clínicamente probada.

En Japón, existen diversas declaraciones de salud relacionadas con probióticos:

1. Colonización del intestino.
2. Incremento de las bacterias intestinales beneficiosas.
3. Inhibición de las bacterias dañinas.
4. Mantenimiento del equilibrio de la microbiota intestinal.
5. Mantenimiento de la salud del intestino.
6. Promoción del mantenimiento de un buen medio intestinal (164).

### 1.5.5. CANADÁ

Al igual que en EE. UU., en Canadá los probióticos pueden estar regulados como tres tipos de productos diferentes: (i) productos naturales para la salud (NHP, *Natural Health Products*), (ii) alimentos, o (iii) medicamentos. En función de la

clasificación de cada probiótico, las declaraciones asociadas a cada uno de ellos son diferentes. Tanto los NHP, considerados como un subgrupo dentro de los medicamentos, como los medicamentos, están destinados a:

1. Diagnóstico, tratamiento, mitigación o prevención de una enfermedad, desorden, o estado fisiológico anormal, o sus síntomas en seres humanos.
2. Restablecimiento o corrección de las funciones orgánicas en seres humanos.
3. Modificación de las funciones orgánicas de los seres humanos, como modificación de aquellas funciones que contribuyan o promuevan la salud.

Estos productos deben cumplir con lo establecido en la legislación sobre alimentos y medicamentos (*Food and Drugs Act*), demostrando su seguridad y eficacia según las recomendaciones de uso. Además, su producción debe realizarse en condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, *Good Manufacturing Practices*).

En el caso particular de los alimentos, existe una Guía que ayuda a clarificar diversos aspectos como el uso de las declaraciones de propiedades saludables relativas a los probióticos (que pueden tener carácter estructural y/o funcional), los requisitos respecto a su seguridad, calidad (estabilidad) y eficacia las cuestiones relativas a su etiquetado y publicidad. Los estudios de toxicidad, estabilidad y eficacia deben presentar evidencias científicas (164, 180). La solicitud de la declaración de propiedades saludables es evaluada por la Dirección de Alimentación.

Si los fabricantes de alimentos están interesados en el uso de nuevas tecnologías para mejorar la viabilidad de los microorganismos, como p. ej., la microencapsulación, deben informar a la Dirección de Alimentación previamente a su comercialización, para evaluar si la aplicación de la tecnología debe incluirse en la definición de nuevo alimento (*novel food*) (180).

## **2. MICROENCAPSULACIÓN COMO ALTERNATIVA A LA ESTABILIZACIÓN DE LOS PROBIÓTICOS**

La microencapsulación comprende una serie de procesos o tecnologías, que permiten aislar total o parcialmente sólidos, líquidos o gases, mediante su recubrimiento con diferentes tipos de materiales formando partículas de tamaño micrométrico (1 - 1000  $\mu\text{m}$ ) (181).

En función de cómo se distribuye la sustancia encapsulada en los microencapsulados, se distinguen distintos tipos de sistemas de encapsulación: (i) mononuclear, si la sustancia encapsulada se encuentra localizada en el interior del microencapsulado, rodeada del material de recubrimiento o cubierta; (ii) polinuclear, si la sustancia encapsulada se encuentra en diferentes núcleos distribuidos de una forma más o menos irregular en la matriz del material encapsulante; y (iii) matricial, si la sustancia se distribuye uniformemente en el seno del agente de recubrimiento (Figura 9).

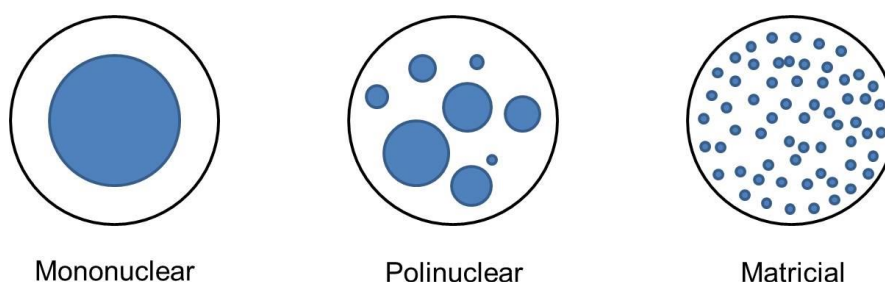


Figura 9. Tipos de microencapsulados en función de la distribución de la sustancia encapsulada en relación al material encapsulante.

Los microencapsulados de tipo mononuclear son también conocidos como microcápsulas, mientras que los de tipo polinuclear y matricial se denominan microesferas. De forma genérica, todos ellos, se denominan micropartículas (182), las cuales pueden presentar diferentes formas y estructuras. Las micropartículas pueden, además, estar recubiertas por una o varias capas adicionales de otros materiales encapsulantes. Estos sistemas de encapsulación se denominan multicapa.

La microencapsulación, considerada al mismo tiempo un arte y una ciencia, comprende una serie de tecnologías versátiles utilizadas en varias industrias. Su uso se extiende a diferentes sectores como p. ej., farmacéutico, químico, alimentario y cosmético.

Las razones por las cuales se aplica la microencapsulación en el sector alimentario son diversas: (i) conferir protección a los ingredientes, frente a factores externos que pueden facilitar su degradación, como p. ej., humedad, oxígeno, calor y luz, para aumentar su estabilidad o vida útil; (ii) enmascarar el color, aroma o sabor desagradable del ingrediente; (iii) mejorar su manipulación, p. ej., convirtiendo un líquido en sólido; (iv) prevenir la interacción entre el ingrediente a proteger y el resto de

ingredientes constituyentes de un alimento, incluyendo los aditivos; (v) prevenir la volatilización de ingredientes como p. ej., los aromas, y finalmente; (vi) controlar la liberación o el transporte del ingrediente.

El diseño de la micropartícula, es decir, la selección del material de cubierta y de la tecnología de encapsulación, depende del objetivo por el cual se lleva a cabo la microencapsulación. Para ello, es necesario conocer el mecanismo de liberación más apropiado para cumplir con dicho objetivo. En el caso de la aplicación de la microencapsulación en alimentación, los mecanismos de liberación pueden ser: (i) térmicos (calor o frío), (ii) mediante la interacción con la humedad o la liberación mediante disolución, (iii) mecánicos como p. ej., la aplicación de presión, agitación o la masticación, (iv) pH, y (v) enzimáticos. La liberación controlada puede ser incluso selectiva, de tal forma que el ingrediente se libere en un punto específico del proceso de fabricación, del almacenamiento, del consumo, o del tracto GI tras su ingesta (183).

Los probióticos deben ser estables durante su procesado, almacenamiento, reconstitución y consumo. Una vez ingeridos, los microorganismos se enfrentan a otras condiciones adversas como son el pH ácido del estómago, la presencia de sales biliares en el duodeno y la competencia de la microbiota endógena presente en el íleon y el colon, fundamentalmente.

Dependiendo de la cepa de interés, un proceso de deshidratación utilizando las estrategias para incrementar la viabilidad celular descritas anteriormente, no es suficiente para preservar la estabilidad del probiótico. Por ello, con el objetivo de conferir una mayor protección a los microorganismos, la microencapsulación se presenta como una de las soluciones más eficientes, siendo objeto de especial consideración e investigación en el campo de los probióticos en los últimos años.

## **2.1. MATERIALES DE ENCAPSULACIÓN**

La selección de un material para la encapsulación de probióticos no sólo depende de sus propiedades físico-químicas, las cuales determinarán la selección de una tecnología de encapsulación u otra, sino, además, también de su capacidad para proteger al microorganismo frente a las condiciones externas al mismo tiempo que favorece su liberación a nivel intestinal y por tanto, su biodisponibilidad. Además, su efectividad dependerá de su precio, disponibilidad en el mercado, y por supuesto, deberá ser biocompatible (184).

Entre los materiales utilizados para la encapsulación de probióticos destacan los polisacáridos con propiedades gelificantes (como almidón (185), derivados de

celulosa (3), alginato (186), pectina (187, 188), carragenano (189) y quitosano (190)), ciertas proteínas (soja (191), suero lácteo (192, 193), caseína (194), gelatina (195) y  $\beta$ -lactoglobulina (193)), y las grasas (fundamentalmente, ceras (196)).

Los materiales más utilizados para la encapsulación de *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* han sido los polisacáridos iónicos como alginato y quitosano, los exopolisacáridos de origen microbiano como goma xantana y goma gellan y las proteínas lácteas (196, 197).

### 2.1.1. HIDROGELES IÓNICOS

#### 2.1.1.1. *Alginato*

Los alginatos son las sales del ácido algínico, un polisacárido presente en varias especies de algas y en algunas bacterias. Es un copolímero binario lineal constituido por monómeros de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) unidos entre sí mediante enlaces 1-4 glucosídicos. En el alginato se pueden encontrar tres tipos de bloques: homopoliméricos (G-G) y (M-M) y heteropoliméricos (M-G) que se alternan secuencialmente (198). La composición y la estructura dependen del origen del polisacárido (7). En el caso de que el alginato contenga la suficiente cantidad de monómeros de G, puede interactuar con iones divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ , produciéndose un cambio conformacional en el alginato, formándose una estructura comúnmente denominada “caja de huevos” (196). La relación entre la concentración del alginato y el calcio y la fuerza iónica del medio influyen en las propiedades viscoelásticas del alginato gelificado (199). El alginato es un material no tóxico, biocompatible, barato, disponible y que permite la encapsulación de los probióticos de una forma simple (200). Es un polímero hidrofílico, que posee grupos funcionales que establecen puentes de hidrógeno con las superficies de la mucosa (201). Estas interacciones permiten la adhesión del alginato a la mucosa (muco-adhesividad), lo que favorece la liberación de los probióticos a lo largo del tracto GI (202, 203). Sin embargo, presenta una serie de desventajas, entre las que destacan su baja resistencia frente a los medios ácidos (204), lo que le hace ser un material sensible al pH estomacal; y su alta porosidad, lo que no permite proteger al probiótico frente al medio externo completamente. Además, a pesar de que la formación de microesferas de alginato cálcico es un proceso simple, resulta a día de hoy difícilmente escalable (205).

Para disminuir su permeabilidad y su solubilidad en pH ácidos, se ha utilizado en combinación con otros polímeros como p. ej., almidón (200, 206), quitosano (190,

207), goma gellan (208, 209), goma xantana (210) y proteínas de suero lácteo (211, 212).

#### **2.1.1.2. Quitosano**

El quitosano es un polímero lineal catiónico constituido por unidades de glucosamina y N-acetil-glucosamina, obtenido a partir de la quitina, un componente del exoesqueleto de los crustáceos, moluscos, insectos y hongos (198). En presencia de aniones y polianiones como, p. ej., el alginato, tiene la capacidad de polimerizar a través de enlaces cruzados, disminuyendo la porosidad del alginato y, por lo tanto, mejorando su efecto protector. Así, se han conseguido mejoras en la estabilidad bajo condiciones GI de *Lactobacillus casei* (213), *Bifidobacterium breve* (214), *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* (207). Al igual que el alginato, se trata de un material hidrofílico, por lo que se trata de un polímero con propiedades muco-adhesivas (201). Sin embargo, algunos estudios han demostrado un efecto inhibitorio frente a algunas cepas de BAL (215) y en la microbiota intestinal (216).

#### **2.1.1.3. Goma xantana**

La goma xantana es un heteropolisacárido producido por la fermentación de la bacteria *Xanthomonas campestris*. Está constituido por la repetición de unidades formadas por dos moléculas de glucosa, dos de manosa y una de ácido glucurónico. Presenta la ventaja de ser soluble en agua fría y aunque por sí solo no presenta propiedades gelificantes, en combinación con la goma gellan forma polímeros mediante la adición de iones  $Ca^{2+}$ . Las microcápsulas constituidas por goma xantana y goma gellan permitieron encapsular y proteger con éxito diferentes cepas de *Bifidobacteria* frente a medios ácidos (208).

### **2.1.2. HIDROGELES TÉRMICOS**

#### **2.1.2.1. Carragenano**

Los carragenanos son un grupo de polisacáridos extraídos a partir de diferentes especies de algas rojas. Concretamente, el k-carragenano es un aditivo ampliamente utilizado en la industria alimentaria como texturizante debido a sus propiedades gelificantes y espesantes (198). Requiere temperaturas elevadas para su solubilización, comprendidas entre 40-50 °C para su aplicación como material de recubrimiento para la encapsulación de probióticos. Una vez disuelto el polímero, se

adicionan los probióticos a esta temperatura y la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente para que tenga lugar la gelificación termorreversible del  $\kappa$ -carragenano (200). La adición de iones potasio puede estabilizar la formación de las micropartículas durante el enfriamiento. Aunque la encapsulación con este material permite mantener la viabilidad de los probióticos, la consistencia de los geles resultantes es frágil (198).

### **2.1.2.2. Goma gellan**

La goma gellan es un polisacárido de origen bacteriano, producido por *Pseudomonas elodea*. Está constituido por la repetición de la secuencia de cuatro monómeros: glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa (198). El principal inconveniente que presenta la goma gellan a altas concentraciones es que es soluble a elevadas temperaturas (80-90 °C durante 1 h), por lo que no es apta para la encapsulación de probióticos especialmente sensibles al calor, como las *Bifidobacteria*. Sun *et al.* (2000) (208), utilizaron concentraciones más bajas del polímero (0,5% (p/v)), con el fin de disminuir la temperatura de solubilización. Sin embargo, las micropartículas que obtuvieron resultaron ser irregulares y frágiles. Para solventar este problema, adicionaron goma xantana. La mezcla de ambos polímeros no gelificó a temperatura ambiente, por lo que los probióticos pudieron adicionarse a esta temperatura y la gelificación se indujo mediante la adición de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la mezcla.

### **2.1.2.3. Gelatina**

La gelatina es una proteína derivada de la hidrólisis parcial del colágeno. Forma una solución altamente viscosa en agua caliente, capaz de gelificar de forma reversible durante el enfriamiento. Se trata de una molécula anfótera, lo que permite su solubilización con polímeros aniónicos como p. ej., la goma gellan o la goma arábica, a pH superiores al punto isoeléctrico de la gelatina (pH 6) ya que ambas moléculas presentan cargas negativas. Una vez solubilizadas ambas moléculas, una acidificación del medio por debajo de pH 6, provoca que la gelatina presente una carga neta positiva, lo que permite establecer fuertes interacciones con las cargas negativas de los polímeros aniónicos (200, 217). La mezcla de gelatina y diisocianato de tolueno se utilizó para la encapsulación de *Lactococcus lactis* mediante polimerización interfacial, consiguiendo microcápsulas altamente resistentes debido al entrecruzamiento entre ambos tipos de moléculas (195).



### 2.1.3. PROTEÍNAS LÁCTEAS

Las proteínas lácteas presentan unas propiedades físico-químicas y estructurales apropiadas para su uso como agentes naturales de transporte de bioactivos, incluidos los probióticos. Entre ellas destacan su capacidad para formar interacciones con moléculas e iones con diferentes grados de afinidad y especificidad, su carácter anfifílico, que le permite estabilizar emulsiones aceite-agua y establecer interacciones con otros polímeros, su capacidad para auto-ensamblarse y co-ensamblarse, y su capacidad gelificante (193). En 2009, Heidebach *et al.* (2009) encapsularon *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 y *Bifidobacterium lactis* Bb-12 en proteínas de leche gelificadas mediante la reacción enzimática inducida por la quimosina (218) y en caseína gelificada mediante la acción de la enzima transglutaminasa (194). En ambos casos, se consiguió incrementar la viabilidad celular frente a diferentes medios ácidos.

### 2.1.4. FTALATO ACETATO DE CELULOSA

El ftalato acetato de celulosa es insoluble a pH inferiores a 5 y soluble a pH iguales o superiores a 6, por lo que se utiliza para liberar de manera controlada medicamentos a nivel intestinal (7). Rao *et al.* (1989), consiguieron incrementar la viabilidad de una especie de *Bifidobacterium* en simulante gástrico (SG) utilizando este material como agente de recubrimiento mediante un método de encapsulación que combinaba la separación de fases y la coacervación (219). Fávaro-Trindade *et al.* (2002) utilizaron el ftalato acetato de celulosa como agente de recubrimiento para la encapsulación de *Lactobacillus acidophilus* (La-05) y *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) mediante *spray-drying*, mejorando la resistencia de ambas cepas frente a medios ácidos. Las micropartículas, fueron formuladas con un tipo de FOS (Raftilosa®) además de otros materiales como p. ej., maltodextrina (para ajustar la densidad de las micropartículas), glicerol (plastificante) y leche reconstituida (material soporte de los microorganismos) (220).

## 2.2. TECNOLOGÍAS DE ENCAPSULACIÓN

Existen numerosas tecnologías para la encapsulación de bioactivos que pueden aplicarse a la microencapsulación de probióticos. Para la selección de una u otra es importante tener en cuenta una serie de factores como son:

1. ¿Qué condiciones afectan a la viabilidad del probiótico a proteger?

2. ¿Qué condiciones de proceso se van a dar durante la producción del alimento en el cual se va a incorporar el probiótico?
3. ¿En qué tipo de alimento se van a aplicar los probióticos microencapsulados?
4. ¿Cuáles van a ser las condiciones de almacenamiento del probiótico y/o del alimento en el que se va a añadir el probiótico microencapsulado?
5. ¿Qué tamaño y densidad de micropartícula se requiere para la incorporación de los probióticos encapsulados en el alimento?
6. ¿Cuál debe ser el mecanismo de liberación del probiótico desde el interior de las micropartículas?
7. ¿Cuál es el coste máximo de proceso para que la microencapsulación sea viable desde el punto de vista económico?
8. ¿Existe algún otro requerimiento que sea necesario tener en cuenta: p. ej., debe ser una formulación de origen vegetal, sin alérgenos, apta para su aplicación en alimentos destinados para lactantes o niños de corta edad? (3)

Además, es necesario tener en cuenta que la selección de una tecnología de encapsulación estará condicionada por el tipo de material o materiales seleccionados, ya que las características físico-químicas de los mismos condicionarán la posibilidad del uso de una tecnología u otra. Es decir, no todos los materiales de encapsulación serán compatibles con todas las tecnologías de encapsulación y viceversa.

### 2.2.1. EXTRUSIÓN

La extrusión es uno de los métodos más utilizados para la encapsulación de probióticos ya que es simple, tiene bajo coste y las condiciones en las que se lleva el proceso de encapsulación son suaves, consiguiendo elevadas tasas de viabilidad celular (200). Consta de las siguientes etapas:

1. Preparación de la disolución del hidrocoloide.
2. Adición de la suspensión del probiótico.
3. Extrusión de la mezcla para favorecer la formación de pequeñas gotas sobre una solución que produce la gelificación.
4. Endurecimiento de la mezcla (221).

Existen diferentes sistemas que favorecen la extrusión de la mezcla del polímero y los probióticos. El más sencillo se trata de una jeringa provista de una

aguja, pero existen equipos que permiten formar las partículas de una forma continua y, sobre todo, controlando el tamaño y el índice de polidispersión o grado de variación del tamaño de las micropartículas formadas. Además de estos factores, la selección de un equipamiento u otro dependerá también de la escala de producción y de la fuerza mecánica que pueda soportar una cepa determinada (198).

Los sistemas de extrusión pueden clasificarse en dos grupos: (i) extrusión mediante goteo, cuando el flujo de la mezcla durante la extrusión se produce lentamente y se forman gotas individuales; y (ii) extrusión mediante ruptura del chorro, cuando el flujo se incrementa de tal forma que la mezcla se extruye continuamente y es necesario favorecer la disrupción del flujo, con el fin de formar gotas de menor tamaño.

En el caso de la extrusión mediante goteo, las gotas pueden formarse mediante gravedad, mediante la aplicación de un flujo coaxial con aire o mediante la aplicación de un potencial electrostático. Por el contrario, la ruptura del chorro se puede llevar a cabo mediante sistemas mecánicos de vibración, de corte o mediante la aplicación de fuerza centrífuga (3, 198).

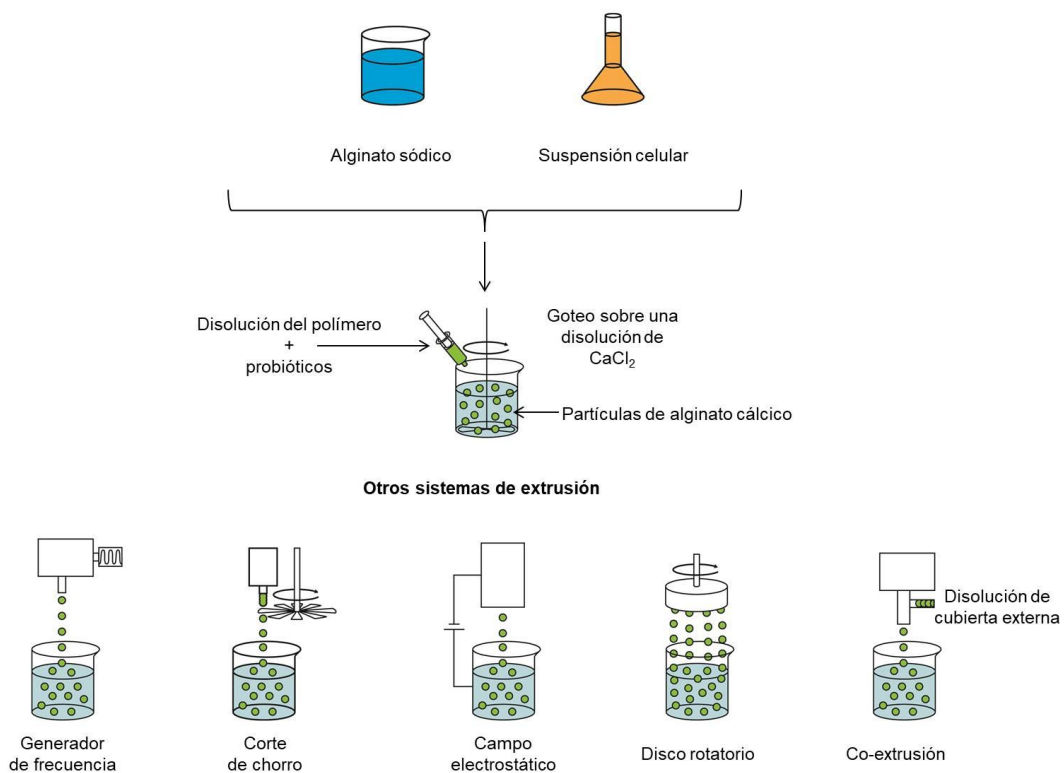


Figura 10. Sistemas de extrusión.

### 2.2.2. EMULSIÓN

Una emulsión es una dispersión de dos fases líquidas inmiscibles en la presencia de un compuesto estabilizante o emulsionante (221, 222). En el caso de la microencapsulación de probióticos mediante emulsión, la fase discontinua es acuosa y está constituida por la mezcla de la disolución del polímero y la suspensión celular, que se adiciona sobre un volumen mayor de aceite en agitación vigorosa, que constituye la fase continua. La fase continua puede contener un emulsionante, si es necesario, que reduce la tensión superficial, evitando la separación de ambas fases y consiguiendo tamaños de partícula más pequeños (200). La mezcla se homogeniza mediante agitación, formando una emulsión w/o (*water-in-oil*). Una vez formada la emulsión w/o, la fase acuosa se insolubiliza mediante la adición de un agente reticulante, formándose las micropartículas en el seno de la fase oleosa que son finalmente colectadas mediante filtración (221). El tamaño de las micropartículas puede controlarse mediante la velocidad de agitación y puede oscilar entre las 25  $\mu\text{m}$  y los 2 mm (3).

Este método es sencillo y fácilmente escalable. Sin embargo, presenta el inconveniente de que la heterogeneidad del tamaño de partícula resultante puede ser grande (198).

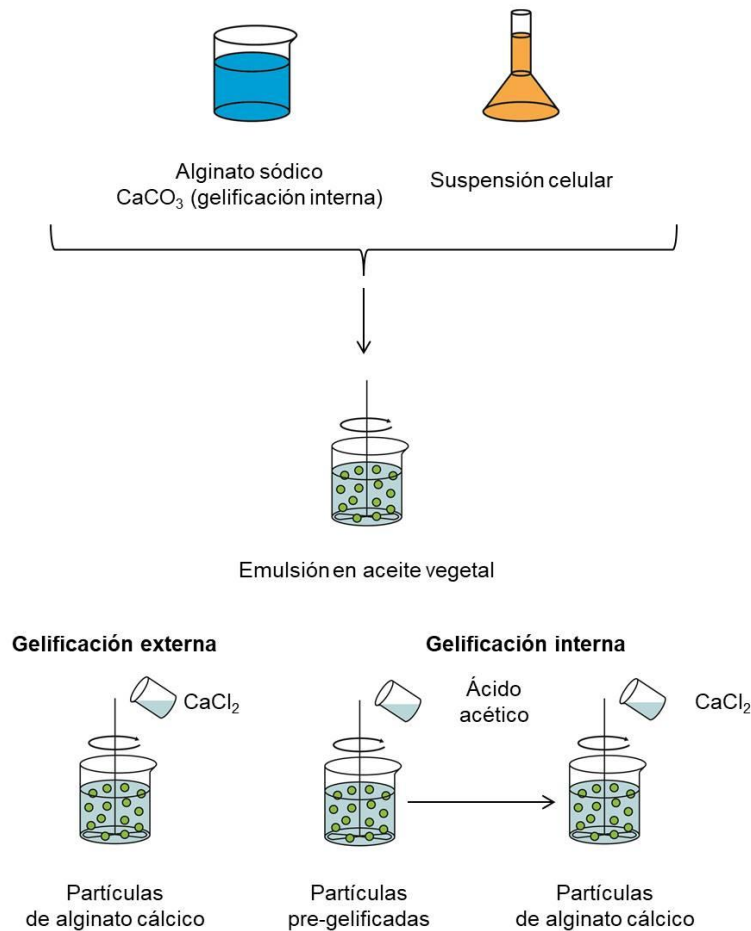


Figura 11. Métodos de emulsión.

### 2.2.3. SECADO POR ATOMIZACIÓN O *SPRAY-DRYING*

El *spray-drying* es la tecnología de encapsulación más extendida en la industria alimentaria ya que es económica y flexible. El gasto energético es entre 6 y 10 veces más barato que la liofilización (3, 223). El proceso de encapsulación consiste en la preparación de una emulsión o dispersión del material o materiales encapsulantes junto con el ingrediente a encapsular, su homogeneización y la atomización de la mezcla en una cámara de secado en la que circula un gas caliente. La atomización del producto se realiza a través de una boquilla o tobera o un disco rotatorio provisto de canales que permiten formar microgotas. De esta forma, la evaporación del disolvente se produce de una forma rápida, evitando un incremento de temperatura en el producto. Normalmente se utiliza aire como gas debido a que resulta ser más económico (3). Sin embargo, para productos fácilmente oxidables o en el caso de que se utilicen disolventes orgánicos a elevadas concentraciones (>20% v/v), se utiliza

nitrógeno para evitar la oxidación y posibles explosiones en el sistema, respectivamente.

Los principales parámetros de proceso del *spray-drying* son la temperatura de entrada del producto en la cámara de secado, el flujo de la alimentación del producto y el flujo del gas (224). Estos parámetros condicionarán la temperatura en la salida de la cámara de secado y la presión del sistema.

Una de las principales ventajas adicionales que presenta la atomización frente a otras tecnologías de encapsulación, es que se trata de un proceso continuo. Sin embargo, su principal desventaja radica en que requiere elevadas temperaturas, lo que puede afectar a la estabilidad de los compuestos termosensibles y la viabilidad de los probióticos. Así, temperaturas de salida en la cámara de secado superiores a 85-90 °C podrían ser letales para muchas de las cepas de interés ya que se producen poros en la membrana citoplasmática, lo que provoca la salida de sustancias intracelulares vitales para los microorganismos (224). Además, también se producen daños a nivel de la pared celular, ribosomas y ADN no sólo como consecuencia de las altas temperaturas sino también por la propia deshidratación de las células (225). Por lo tanto, para la aplicación de la atomización en la encapsulación de probióticos es imprescindible controlar la temperatura de salida del producto para evitar el daño o la muerte celular.

Otros factores que afectan a la viabilidad de los probióticos son: (i) el tipo de cepa y su tolerancia frente a diferentes condiciones de estrés (226), (ii) el material encapsulante (211), (iii) si la protección de este material tiene lugar antes o durante la atomización, (iv) la temperatura y el tiempo de exposición a temperaturas altas antes de la atomización, (v) la actividad de agua, y (vi) las condiciones de almacenamiento después del proceso de secado (206).

Para evitar la pérdida de viabilidad durante la atomización se han utilizado, p. ej., agentes protectores como trehalosa (124), factores promotores del crecimiento incluyendo varias combinaciones de probióticos y prebióticos (125, 126), gránulos de almidón (78) que parecen mejorar la estabilidad durante el secado y el almacenamiento (79, 80).

Otra alternativa para la mejora de la supervivencia de los probióticos es el uso de tecnologías basadas en el *spray-drying*, pero que incluyen ciertas particularidades, tal y como se detalla a continuación.

### 2.2.3.1. **Secado en dos etapas**

Chavez y Ledebøer (2007), encapsularon con éxito *Bifidobacterium lactis* Bb-12 mediante la aplicación combinada de dos etapas de secado. La primera etapa constaba de una atomización a temperaturas de secado más suaves que las habituales ( $T_{\text{entrada}} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $T_{\text{salida}} = 48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), seguida de un secado a vacío (45 °C a 10 mbar durante 24 horas). Como agentes encapsulantes utilizaron leche desnatada en polvo sola o en combinación con goma arábica, maltodextrina 20 DE (*Dextrose Equivalents*) o trehalosa y aislado de proteína de soja sola o en combinación con el mismo tipo de maltodextrina, lactosa o sacarosa. De esta forma consiguieron una viabilidad celular de  $10^5 - 10^7$  UFC/g aproximadamente, después de un periodo de almacenamiento de 90 días a 30 °C.

Este sistema podría suponer una alternativa a la formación de probióticos en polvo con una alta viabilidad durante su procesado y almacenamiento y con un coste de producción unas 3 veces inferior a la liofilización (3, 112).

### 2.2.3.2. **Spray freeze-drying**

El *spray freeze-drying* consiste en la atomización de la mezcla del agente encapsulante con el ingrediente a encapsular en la forma de emulsión o dispersión sobre una corriente de vapor frío generada por un líquido criogénico como el nitrógeno líquido. En este paso se produce una dispersión de gotas congeladas que a continuación pasan a una cámara de liofilización (227). Esta tecnología presenta una serie de ventajas como son el control del tamaño de partícula y el aumento de la superficie específica con respecto a las partículas producidas por *spray-drying*. Además, las partículas resultantes pueden ser recubiertas con otros materiales adicionales mediante un proceso posterior de encapsulación como el lecho fluido (228). Sin embargo, algunas de sus principales desventajas están relacionadas con el elevado coste energético que puede ser entre 30 y 50 veces superior a la atomización. Algunos de los materiales que se han utilizado para encapsular probióticos (p. ej., *Lactobacillus paracasei*) han sido la maltodextrina y la trehalosa, consiguiendo un elevado porcentaje de supervivencia durante el procesado (229).

### 2.2.3.3. **Spray-chilling**

El *spray-chilling* o *spray-cooling* es una tecnología similar a la atomización en relación a la formación de pequeñas gotas. Algunos equipos de atomización permiten acoplar un accesorio en la parte superior de la tobera para trabajar en modo *spray-chilling*, como p. ej., el atomizador de escala laboratorio Mini Spray Dryer B-290 de

Büchi (Büchi Switzerland, Flawil, Suiza). La diferencia entre ambas tecnologías se encuentra en la temperatura del gas de la cámara de secado. En el caso del *spray-chilling*, las gotas pulverizadas entran en contacto en la cámara de secado con una corriente de gas frío y no caliente, y se secan mediante solidificación. Por tanto, su aplicación condiciona el uso de materiales encapsulantes que deben ser sólidos a temperatura ambiente, pero fundirse con la aplicación de calor, como p. ej., las ceras. Mediante la aplicación de calor, la grasa se funde y a continuación se homogeneiza junto con el ingrediente a encapsular para finalmente la mezcla ser atomizada en la corriente de aire frío (230). El *spray-chilling* es considerada como una de las tecnologías de encapsulación más económicas a nivel industrial (205). Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes como son una baja eficiencia de encapsulación y la liberación del activo durante el almacenamiento en algunos casos (3). Su aplicación para la encapsulación de probióticos como *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus*, utilizando como material de recubrimiento aceite de palma interesterificado han permitido mejorar la resistencia GI *in vitro* de ambas cepas (231).

#### **2.2.3.4. Ultrasónico a vacío**

El secado de atomización ultrasónico a vacío está basado en la tecnología de *spray-drying*. El sistema está provisto de una tobera en la que se aplican ultrasonidos y la mezcla se pulveriza en una cámara de secado a baja temperatura y bajo atmósfera de vacío. Semyonov *et al.* (2011) encapsularon *Lactobacillus casei sp. paracasei* LMG P-21380 mediante esta tecnología utilizando como materiales de recubrimiento maltodextrina y trehalosa, consiguiendo una alta viabilidad celular, del orden de  $10^9$  UFC/g. Como parámetros internos de la disolución de alimentación estudiaron la concentración de sólidos totales, los DE de maltodextrina y la relación maltodextrina-trehalosa. Consiguieron una mayor viabilidad con una mayor concentración de sólidos totales y utilizando la maltodextrina DE 5. La adición de trehalosa a la maltodextrina, mejoró la viabilidad celular hasta una concentración del 33% con respecto a la maltodextrina sola (232).

#### **2.2.4. LECHO FLUIDO**

La tecnología de lecho fluido comprende una serie de invenciones patentadas por el Dr. Wurster entre los años 1957 y 1966 (198). Esta tecnología está basada en el uso de aire fluidizado que permite la suspensión del ingrediente a proteger, como los probióticos, sobre el que se atomiza el material de recubrimiento que solidifica bien por



enfriamiento o por evaporación. El lecho fluido se utiliza para la granulación o aglomeración y el recubrimiento de ingredientes con una o varias capas de diferentes materiales encapsulantes, dando lugar a partículas con un amplio rango de tamaños. En base a la localización de la tobera por donde se atomiza el material o los materiales encapsulantes, se distinguen tres tipos de diseño de lecho fluido: *spray superior (top-spray)*, *spray inferior (bottom spray)* o *spray tangencial (tangential spray)* (Figura 12). En función de la aplicación, se utiliza un diseño u otro.

El lecho fluido en el que la atomización se produce en la parte superior del sistema, se utiliza normalmente para la fabricación de granulados siendo su uso como tecnología de recubrimiento limitado (233). Es el sistema más sencillo, económico y con mayor capacidad de los tres. Se utiliza para enmascarar sabores y para conferir un efecto barrera. Sin embargo, no es la mejor opción para conferir una liberación controlada ya que no se consigue una buena uniformidad en cuanto al grosor del recubrimiento y en ocasiones pueden aparecer poros en el mismo. Se utiliza en alimentación humana y animal y en la industria química con el fin de mejorar la manipulación de los ingredientes y aumentar su estabilidad.

En cambio, el *bottom-spray* también conocido como Wurster, se utiliza en la industria farmacéutica. Este sistema cuenta con una particularidad: está provisto de un cilindro denominado columna Wurster donde se encuentra la tobera de atomización en la parte inferior del lecho, perpendicular a la base y paralela a la columna. Este diseño minimiza la distancia entre el núcleo a recubrir y el material encapsulante atomizado, lo que permite un recubrimiento uniforme y altamente eficiente, lo que facilita la liberación controlada. Una vez que se produce el recubrimiento, las partículas son expulsadas por la corriente de aire, desde el cilindro hacia la cámara de expansión, lo que permite la solidificación o la evaporación antes de que entren en contacto con otras partículas, minimizando así la aglomeración entre ellas. Con este diseño se consiguen los recubrimientos más uniformes y los tamaños de partícula más pequeños mediante la tecnología de lecho fluido.

En el caso del lecho fluido tangencial, la tobera se encuentra en un lateral del sistema. Esta configuración permite una mejor fluidización de ingredientes con diferentes densidades aparentes, por lo que permite la granulación de mezclas de ingredientes de una forma más eficiente (233).

En el caso particular del uso de esta tecnología para la encapsulación de probióticos, se utiliza el sistema Wurster de lecho fluido (3). Como materiales de recubrimiento se utilizan normalmente lípidos pero también carbohidratos y proteínas

(230). Los probióticos que se introducen en el sistema deben estar previamente liofilizados (198) o atomizados sobre algún agente de soporte como leche desnatada, alginato de calcio o grasas. El lecho fluido permite una producción a nivel industrial y es una de las tecnologías más aplicadas a nivel de mercado para la encapsulación de probióticos. Existen diversas empresas que comercializan probióticos encapsulados mediante esta tecnología como Probiocap® y Duaolac® (4).

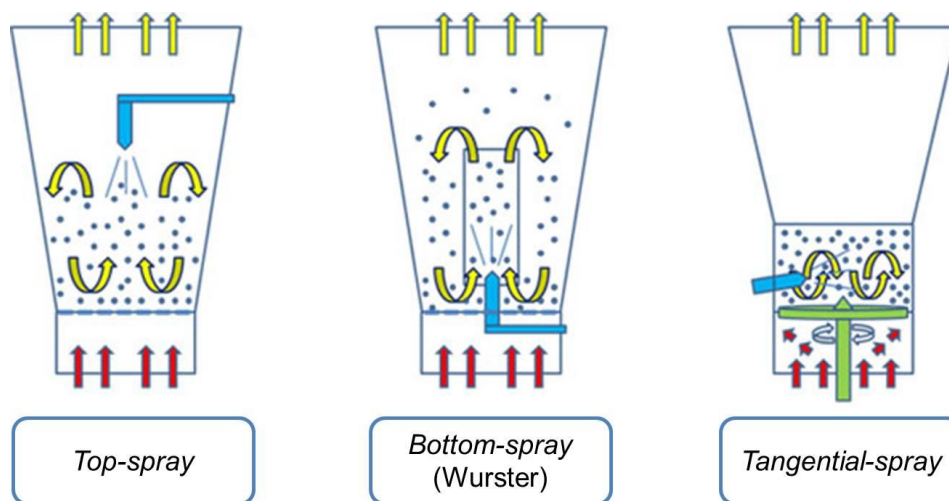


Figura 12. Tipos de diseño de lecho fluido (234).

### 2.2.5. LIOFILIZACIÓN

Tal y como se ha comentado anteriormente, la liofilización es una tecnología de secado ampliamente utilizada para la deshidratación de los probióticos. Para mejorar su viabilidad durante el proceso, se emplea el uso de crioprotectores o lioprotectores, para incrementar la supervivencia durante la congelación y la deshidratación, respectivamente. En los últimos años, se ha combinado la liofilización con el concepto de encapsulación, siendo la liofilización una segunda etapa de secado de los probióticos previamente encapsulados mediante otras tecnologías como la emulsión (235) o la gelificación iónica (236). De esta forma, es posible mejorar la resistencia en el tracto GI y por tanto, optimizar el efecto beneficioso relacionado con el consumo de probióticos.

### 2.2.6. COACERVACIÓN

La coacervación implica la precipitación de un polímero (coacervación simple) o de varios polímeros (coacervación compleja) inducida por una separación de fases. En

el caso de la coacervación simple, se utilizan proteínas como material encapsulante. Una vez formada la dispersión, se adiciona la suspensión de probióticos. La precipitación de la proteína puede ser inducida por un cambio de pH (hasta el punto isoelectrico de la proteína) o por un cambio en la fuerza iónica mediante la adición de sales, las cuales presentan una mayor afinidad por el agua que el polímero. En el caso de la coacervación compleja, se produce la mezcla de dos dispersiones de dos polímeros opuestamente cargados a un mismo pH (p. ej., caseína y pectina) (237) y de la suspensión celular. El entrecruzamiento de ambos polímeros y su precipitación se lleva a cabo mediante el ajuste de pH y el enfriamiento de la mezcla (Figura 13). Una vez que las partículas han sido formadas, es necesario realizar un secado como puede ser mediante atomización o liofilización. La encapsulación de probióticos mediante coacervación presenta una serie de ventajas frente a otros métodos de encapsulación como son su simplicidad, su coste relativamente bajo y la elevada tasa de encapsulación ya que permite incorporar una gran cantidad de microorganismos en relación a la cantidad de material encapsulante. Sin embargo, puede resultar un proceso difícilmente escalable y además requiere una etapa posterior de secado para incrementar la estabilidad de las partículas producidas.

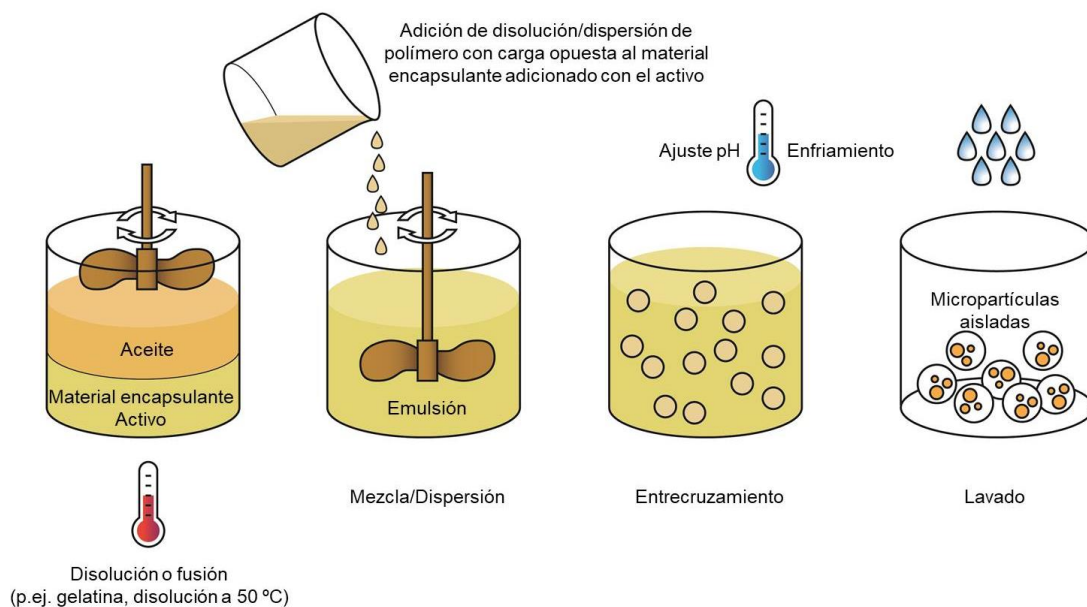


Figura 13. Formación de micropartículas mediante coacervación compleja.

Da Silva *et al.* (2018), desarrollaron y caracterizaron microcápsulas producidas mediante coacervación compleja de gelatina y goma arábica conteniendo

*Bifidobacterium lactis* Bb-12 seguida de una liofilización. Tanto las microcápsulas húmedas como liofilizadas presentaron una alta eficiencia de encapsulación (99%). Adicionalmente, la microencapsulación confirió protección a los microorganismos frente a condiciones GI y logró mantener la concentración probiótica durante el almacenamiento a 25 °C durante 3 meses (238).

### **2.2.7. SISTEMA DE HIBRIDACIÓN O PROCESO DE REFORMADO DE SUPERFICIE EN SECO**

El sistema de hibridación es una tecnología de encapsulación en seco también denominada proceso de reformado de superficie en seco. Consiste en un disco rotatorio que gira a gran velocidad (15.000 rpm) provisto de cuchillas, un estator y un circuito por donde recircula la mezcla en polvo. El material encapsulante y los probióticos en formato polvo impactan entre sí a gran velocidad como consecuencia de la corriente de aire generada por las cuchillas en rotación, de tal forma que los probióticos quedan embebidos o recubiertos por el material encapsulante. Este sistema, aunque no ha sido ampliamente utilizado en la encapsulación de probióticos, presenta altos rendimientos de encapsulación. Además, al trabajar a temperaturas por debajo de 30 °C, se evita el daño celular por calor (3, 239). Ann *et al.* (2007) encapsularon *Lactobacillus acidophilus* utilizando como materiales de recubrimiento diferentes prebióticos (lactulosa, FOS y rafinosa) y un recubrimiento entérico comercial (Sureteric™ sans) mediante esta tecnología. Para ello, los probióticos fueron liofilizados en un medio acuoso conteniendo un 10% de leche desnatada con un contenido en lactosa del 10%. Una vez liofilizados, se introdujeron en el sistema con un tamaño de partícula comprendido entre 100 y 200 µm, donde fueron encapsulados con cada uno de los prebióticos seleccionados en una relación probiótico/prebiótico en peso de 9:1, 4:1 y 2:1. Sobre las partículas resultantes se llevó a cabo una segunda encapsulación con el recubrimiento polimérico entérico en una relación probiótico/polímero de 9:1 (p/p). La doble encapsulación mejoró significativamente la termotolerancia a 55 °C y la viabilidad de las células en SG (240).

### **2.2.8. ELECTROSPINNING**

El *electrospinning* es una técnica de encapsulación en la que se aplica un campo eléctrico de alto voltaje sobre el fluido que contiene la mezcla del material encapsulante y los probióticos en el momento en que atraviesan la punta de una aguja metálica la cual actúa como un electrodo. La aplicación del campo provoca la

deformación de las gotas desde la punta de la aguja hacia el electrodo contrario, dando lugar a la formación de fibras continuas o partículas de tamaño nano o micrométrico. Con respecto a su aplicación en la encapsulación de probióticos, se ha validado esta tecnología para la encapsulación de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 utilizando como materiales de encapsulación proteína de suero lácteo y pululano, un polisacárido de origen microbiano que se utiliza como aditivo alimentario (E1204), entre otras aplicaciones. El estudio demostró que las microcápsulas constituidas por la proteína de suero lácteo mejoraron la viabilidad de las bacterias con respecto al control, formado por la mezcla física del biopolímero y las bacterias liofilizada, especialmente a una temperatura de almacenamiento de 20 °C (241).

### 2.2.9. TECNOLOGÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La tecnología de fluidos supercríticos permite la extracción de compuestos, fundamentalmente lipofílicos a partir de matrices alimentarias como vegetales, frutas, semillas y microalgas, para la obtención de extractos con alto valor añadido de aplicación en diferentes sectores industriales (242, 243). Recientemente, se ha utilizado como tecnología no térmica de conservación de algunos alimentos, por su capacidad de inactivación de microorganismos (244, 245). Además, esta tecnología permite el fraccionamiento de proteínas (246) y lípidos (247), así como la encapsulación de compuestos bioactivos (248), entre los que se encuentran los probióticos (249). Esta tecnología utiliza el dióxido de carbono en estado supercrítico. Es decir, a temperaturas y presiones superiores al estado crítico del dióxido de carbono (31 °C y 7,38 MPa, respectivamente). En estas condiciones el dióxido de carbono presenta unas propiedades específicas: (i) una densidad similar a la de un líquido, (ii) una viscosidad baja, y (iii) una difusividad dos órdenes de magnitud superior a la de un líquido y similar a la de un gas (242). Estas propiedades permiten que el dióxido de carbono penetre rápidamente en las células y en las partículas de una muestra, disolviendo y extrayendo el material de su interior (244).

Como tecnología de encapsulación, se utiliza para extraer o eliminar la fase orgánica de una emulsión o/w (*oil-in-water*) en la que se ha disuelto tanto el material de encapsulación como el activo a encapsular. Al eliminar la fase orgánica, el polímero precipita recubriendo el activo generando las micropartículas o las nanopartículas. En el caso de que el activo sea soluble en agua, como los probióticos, la emulsión de partida es del tipo w/o/w (*water-in-oil-in-water*) (250). Presenta una serie de ventajas frente a otras tecnologías como son la ausencia de calor y oxígeno durante el proceso,

lo que permite la estabilización de compuestos sensibles a estos factores (251). Además, es considerada una tecnología limpia y respetuosa con el medio ambiente (252) y segura ya que no deja residuos ni en los extractos ni en los encapsulados, lo que supone una ventaja para la aplicación directa de los productos resultantes tanto en alimentos como en fármacos (248).

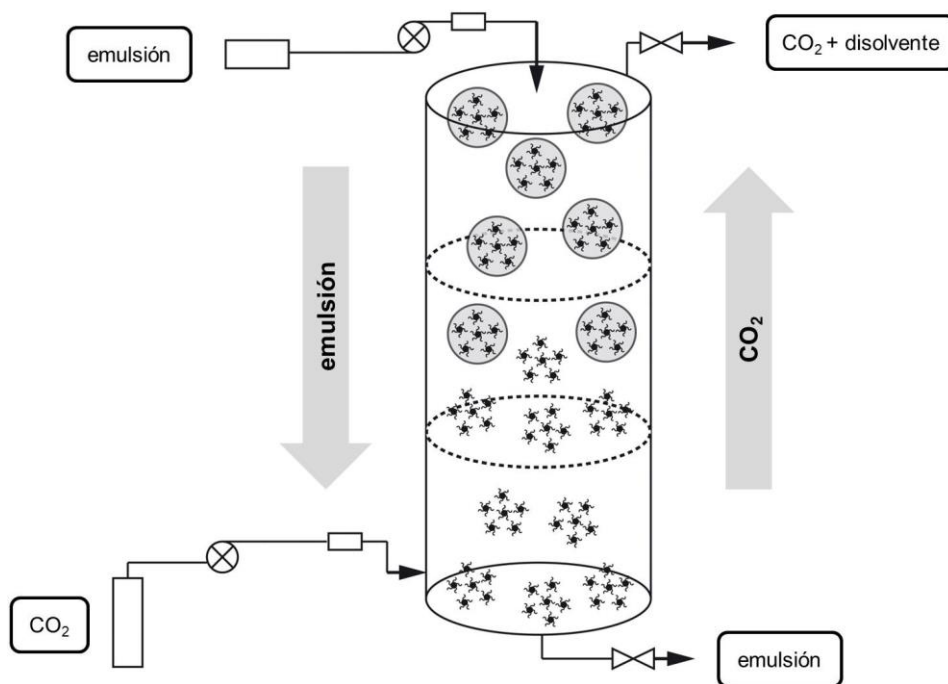


Figura 14. Esquema de la tecnología de fluidos supercríticos como tecnología de encapsulación.

Thantsha *et al.* (2009) encapsularon *B. longum* Bb-46 mediante la formación de un complejo interpolimérico con diferentes materiales como poli (vinilpirrolidona) en dióxido de carbono en estado supercrítico, consiguiendo mejorar la viabilidad celular en condiciones GI *in vitro* (249).

### 3. PREBIÓTICOS COMO ESTRATEGIA PARA FAVORECER EL CRECIMIENTO DE LOS PROBIÓTICOS A NIVEL INTESTINAL

El término prebiótico fue utilizado por primera vez por Gibson y Roberfroid (1995) para definir “un ingrediente no digerible que beneficia al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon que pueden mejorar la salud del huésped” (7, 253, 254). Es decir, la función de los prebióticos es estimular el metabolismo ya existente en el colon (7).

Los prebióticos, son normalmente carbohidratos de cadena corta, como p. ej., la inulina y los FOS (255). Un producto simbiótico es aquel en el que se administra un probiótico en combinación con un prebiótico con el fin de conseguir un efecto beneficioso sobre la salud a través del efecto sinérgico de ambos ingredientes (256). Dadas las propiedades de los prebióticos (no son digeribles y producen un beneficio sobre el huésped mediante la estimulación del crecimiento y/o de la actividad de los microorganismos probióticos), se han utilizado también como material de encapsulación de probióticos. Entre los prebióticos más utilizados en aplicaciones de microencapsulación de probióticos destacan los siguientes materiales: inulina, oligosacáridos, FOS y almidón resistente (257, 258). En general, se han utilizado poco como agentes de recubrimiento por sí solos. Existe un mayor número de estudios en los que se han aplicado en combinación con otros materiales de encapsulación como otros carbohidratos (259) o proteínas (196, 258, 260). La utilización de combinaciones de prebióticos y probióticos supone un incremento en el coste de producción, lo que podría frenar el desarrollo de nuevos productos simbióticos (6). Para contrarrestar este efecto, algunos autores proponen la utilización de *Bifidobacteria* que sintetizan galacto-oligosacáridos, con efecto prebiótico demostrado (261).

### 3.1. INULINA

La inulina es una mezcla de cadenas de polímeros y oligómeros formados por unidades de D-fructosa (fructanos) unidos entre sí mediante enlaces  $\beta$ -(2,1). Constituye una reserva de carbohidratos en más de 36.000 especies de plantas. En combinación con otros materiales como leche desnatada en polvo, se han encapsulado cepas como p. ej., *Lactobacillus rhamnosus* GG mediante *spray-drying*, consiguiendo un producto simbiótico en polvo con una alta viabilidad celular ( $10^9$  UFC/g aproximadamente) (144). En este mismo estudio, obtuvieron similares resultados con otro tipo de prebiótico, la polidextrosa. En ambos casos, la introducción de los prebióticos no mejoró significativamente la viabilidad celular ni durante la atomización de los probióticos ni durante el almacenamiento de las micropartículas.

### 3.2. FOS

Los FOS son oligosacáridos presentes de forma natural en vegetales como cebolla, achicoria, ajo, espárrago, alcachofa, entre otras (262). Además, pueden sintetizarse a partir de la sacarosa mediante reacciones enzimáticas (263). Los FOS están constituidos por cadenas lineales de fructosa (entre 2 y 60 unidades) unidas

entre sí mediante enlaces  $\beta$ -(2,1). Uno de los inconvenientes de los FOS es que tienen una temperatura de transición vítrea baja, lo que provoca la adhesión de este material a la superficie de un atomizador. Para evitar este problema, se han utilizado los FOS en combinación con otros materiales como los aislados de proteínas de suero lácteo (WPI, *Whey Protein Isolate*) o los aislados de proteína de suero lácteo desnaturalizadas (DWPI, *Denatured Whey Protein Isolate*), con el fin de microencapsular probióticos mediante tecnología *spray-drying*. Así, la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) en FOS + DWPI en una relación núcleo/cubierta de 1:1 presentó la mejor eficiencia de encapsulación, mientras que un ratio 1:1,5 ofreció mayor viabilidad celular durante el almacenamiento y confirió mejor protección bajo condiciones GI simuladas (127).

### 3.3. PECTINA

La pectina es un heteropolisacárido obtenido principalmente a partir de algunas frutas, como, p. ej., la manzana. Se utiliza como aditivo gelificante y como fibra dietética en alimentación (3). La microencapsulación de *Lactobacillus acidophilus* en microcápsulas de pectina recubiertas con proteínas de suero lácteo incrementó significativamente la viabilidad celular en comparación con las células libres. Sin embargo, esta misma cepa encapsulada en micropartículas de suero lácteo recubiertas de pectina, no confirió efecto protector alguno (187). No obstante, este último sistema fue utilizado por Gerez *et al.* (2012) para la encapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 y sí observaron una mejora significativa en su supervivencia después de una exposición en condiciones *in vitro* GI (188).

### 3.4. ALMIDÓN RESISTENTE

El almidón es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos. Los principales constituyentes del almidón son la amilosa, un polímero lineal formado por unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos y la amilopectina, un polímero de glucosa ramificado unido por enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos y  $\alpha$ -1,6-glicosídicos en las ramificaciones (264). El almidón que no es digerido en el intestino delgado por las enzimas amilasas secretadas por el páncreas se denomina almidón resistente, el cual es fermentado por algunos probióticos en el colon (217). La adhesión de probióticos a gránulos de almidón resistente han constituido un sistema de protección de algunas *Bifidobacteria* frente a sales biliares (265). También se ha utilizado en combinación con alginato para



la encapsulación de probióticos mediante gelificación iónica para mejorar la viabilidad de los microorganismos (266, 267).

#### **4. VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA. USO DE LAS PROTEÍNAS DE SOJA COMO AGENTES DE RECUBRIMIENTO**

El cultivo de soja es uno de los más importantes a nivel mundial. Desde hace miles de años, la soja ha constituido la principal fuente de proteína vegetal en los países orientales y, más recientemente, se ha incluido en la dieta occidental (268). Las habas de soja destacan por su alto contenido en proteína y aceite (aproximadamente 40% y 20% en peso seco, respectivamente) (269). La proteína de soja contiene todos los aminoácidos esenciales para la nutrición humana. Aunque su contenido en metionina y triptófano es bajo, complementada con cereales, la calidad nutricional de la proteína de soja es comparable a la proteína de origen animal (270). Además, la soja contiene otros componentes de interés por sus efectos beneficiosos sobre la salud como los fitosteroles (especialmente el  $\beta$ -sitosterol, que inhibe la absorción de colesterol y reduce los niveles de colesterol LDL en sangre (271, 272)) y elementos esenciales como vitaminas y minerales (269).

La producción de soja ha aumentado de 17 millones de toneladas en 1960 hasta 370 millones de toneladas en 2018 (273, 274) y se espera que su crecimiento en el futuro sea mayor que otros cultivos, debido a la expansión de su cultivo y el aumento de rendimiento de los mismos. En 2018 los principales países productores de soja fueron EE. UU., Brasil y Argentina, superando el 80% de producción a nivel mundial (Figura 15) (274).

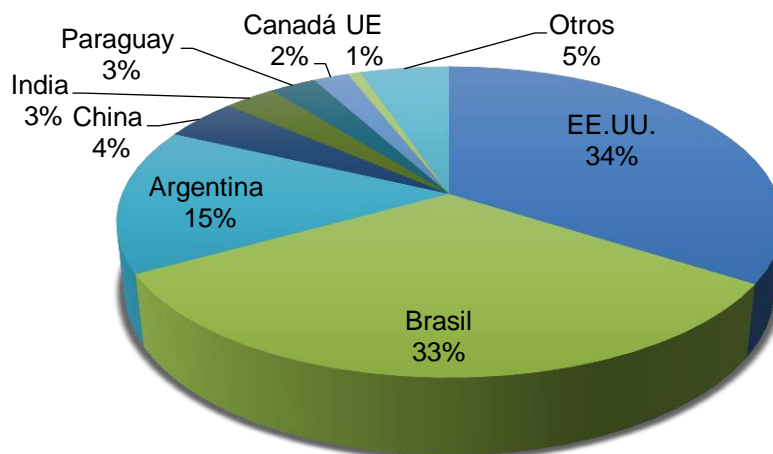


Figura 15. Producción mundial de soja (2018-2019) (274).

Por otro lado, según un estudio de Naciones Unidas, la población mundial crecerá a lo largo del siglo XXI hasta alcanzar una cifra de entre 9.600 y 12.300 millones de personas en 2100 (275). El crecimiento global de la población unido al cambio climático, la competencia por los recursos (agua, tierra, aire, biodiversidad y energía) y los cambios en los hábitos de consumo afectan al sistema alimentario (276, 277). Por otra parte, a pesar de los esfuerzos invertidos para combatir el hambre en algunos países de Asia y África, la realidad es que muchos de ellos sufren hambrunas crónicas (277). Paradójicamente, al mismo tiempo, en países desarrollados como los EE. UU. o Europa, la obesidad y las enfermedades crónicas relacionadas con una dieta no saludable como diabetes y dislipemia, además de malnutrición, se han convertido en un problema creciente de la sociedad (278, 279). Adicionalmente, un tercio de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o se desperdicia a lo largo de toda la cadena de suministro en todo el mundo, desde la producción agrícola hasta el consumo final en los hogares (280). Por todo ello, garantizar un sistema de producción de alimentos saludables y seguros, de una manera sostenible teniendo en cuenta aspectos económicos, de salud y medioambientales es un reto al que se enfrentan los gobiernos y la población mundial en general (277). Para poder lograr este objetivo, el informe Foresight (2011), enfatiza en la obligatoriedad de reducir los residuos alimentarios, entre otros aspectos. El desarrollo de nuevos procesos de producción y la valorización de los subproductos de la industria alimentaria en productos de mayor valor, son necesarios para alcanzar dicho objetivo (281).

La okara es el mayor residuo agrícola producido a nivel mundial, derivado de la fabricación de bebida de soja, tofu y sus derivados. La producción de 1000 L de bebida de soja puede llegar a generar unos 250 kg de okara. Teniendo en cuenta el consumo de este producto y otros derivados, se estima que, aproximadamente 14 millones de toneladas de este subproducto se generan a nivel mundial cada año, lo que supone un problema medioambiental considerable (282).

La okara contiene aproximadamente un 27% de proteína en base a peso seco de gran calidad nutricional, cuyo aprovechamiento directo o tras un proceso de extracción es una fuente de proteína barata de interés para su consumo en alimentos (283, 284). La okara en polvo se ha utilizado directamente como sustitutivo de la harina de trigo en la fabricación de pan y en la sustitución de harina de soja en la producción de tofu (283). Otros estudios se han centrado en su extracción para la obtención de aceite, proteínas y compuestos bioactivos de interés (285) y en su digestión enzimática para su aplicación en alimentación animal (286). La okara, además, presenta un alto contenido de carbohidratos (50%, aproximadamente), por lo que este residuo es además una biomasa de interés para la producción de bioetanol (284).

Otro de los subproductos derivados de la soja es la harina de soja, que se obtiene como residuo después de extraer el aceite de las habas. Su contenido en proteína es también elevado y de su extracción y purificación se obtienen el concentrado de proteína de soja (*Soybean Protein Concentrate*, SPC) y el aislado de proteína de soja (*Soybean Protein Isolate*, SPI) (287). La purificación de una fracción proteica concreta de la proteína de soja como la  $\beta$ -conglucina a partir de la harina de soja se ha utilizado para mejorar la estructura y el perfil nutricional de los panes sin gluten (288).

La proteína de soja y otras proteínas vegetales presentan una serie de ventajas como materiales de encapsulación con respecto a otros materiales: biocompatibilidad, biodegradabilidad, carácter anfífilo, emulsificante y buenas propiedades nutricionales (289, 290). En comparación con las proteínas de origen animal, como p. ej., el caseinato sódico o las proteínas de suero lácteo, las cuales han sido ampliamente caracterizadas y aplicadas en el campo de la microencapsulación (291), el uso de las proteínas vegetales contribuye al aprovechamiento de los recursos, la sostenibilidad e incluso a una dieta saludable (292). Con respecto al uso de las proteínas vegetales como agentes encapsulantes, el SPI y el aislado de proteína de guisante o las proteínas de cereales, han sido las más utilizadas, posiblemente gracias a su disponibilidad en el mercado (290-292). Por su capacidad para formar películas, el SPI

se ha estudiado con el fin de sustituir el plástico en el envasado de alimentos (287, 293). Además, se ha evaluado su uso para la encapsulación de diferentes ingredientes mediante el uso de diversas tecnologías. P. ej., se ha descrito la encapsulación de aceite de pescado con proteínas de soja mediante emulsión seguida de atomización (294), de extracto de propolis mediante coacervación compleja de proteínas de soja junto con pectina y posterior liofilización (295), de extracto de granada atomizado directamente en una dispersión de SPI, previa homogeneización (296) o la formación de coacervados complejos de SPI y quitosano (297). En comparación con otras proteínas de origen animal como el caseinato sódico y las proteínas de suero lácteo, las proteínas de origen vegetal y en concreto el SPI, han presentado propiedades barrera similares o incluso superiores en relación a la eficiencia de encapsulación y la mejora de la estabilidad frente a procesos de oxidación (298, 299).

En general, la aplicación de las proteínas de soja como materiales de encapsulación se ha limitado al campo de la investigación (292) y, concretamente, su estudio para la encapsulación de probióticos ha sido muy reducido. Se ha evaluado la formación de geles de SPI con diferentes residuos agrícolas de banana y pomelo mediante reacción enzimática con transglutaminasa para la encapsulación de *Lactobacillus bulgaricus*. La adición de los subproductos de las frutas, adicionados en polvo sobre la dispersión de SPI, reduce la fortaleza de los geles, posiblemente como consecuencia de la obstrucción de diferentes puntos de reacción entre la proteína y la enzima, por lo que las estructuras resultan más porosas y menos reticuladas que las constituidas sólo por SPI. A pesar de ello, estos sistemas han permitido mejorar la viabilidad celular en condiciones gástricas simuladas (300). Sun *et al.* (2014) estudiaron el uso combinado de diferentes concentraciones de SPI y de pectinas de alto metoxilo para la encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii* mediante coacervación compleja, ajustando el pH de las mezclas tras la adición de la suspensión bacteriana. Así, consiguieron mejorar la viabilidad de los probióticos en tres unidades logarítmicas en comparación con el control (301). Otros trabajos, se han focalizado en el estudio de las interacciones producidas entre el SPI y los probióticos, como p. ej., *Bifidobacterium longum*, con el objetivo de evaluar el mecanismo de protección de este material en la encapsulación de *Bifidobacteria*. Los resultados mostraron que el SPI y estos microorganismos forman complejos mediante la interacción de fuerzas hidrofóbicas, en los que las células permanecen en el interior de los agregados de SPI, actuando la proteína como material de recubrimiento (302). Por lo tanto, el SPI es potencialmente un ingrediente alimentario eficaz como agente encapsulante de probióticos.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 1998;39(3):237-8.
2. FAO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2006. Contract No.: ISSN 1014-2916.
3. Martin J, Villoslada L, Ruiz A, Morales E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2015;27:15-25.
4. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 2011;104(4):467-83.
5. Singh B, Mal G, Marotta F. Designer Probiotics: Paving the Way to Living Therapeutics. *Trends in Biotechnology*. 2017;35(8):679-82.
6. Champagne CP, Gardner NJ, Roy D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005;45(1):61-84.
7. Sarao LK, Arora M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(2):344-71.
8. 2019 NoNMA. Ilya Mechnikov – Biographical [Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/mechnikov/biographical/>.]
9. Fresquet JL. Elie Metchnikoff (1845-1916) 2009 [Available from: <https://www.historiadelamedicina.org/metchnikoff.html>.]
10. [Available from: <https://www.biografiasyvidas.com/biografia/m/mechnikow.htm>.]  
Fecha de acceso: 26/01/2019.
11. Mackowiak PA. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in public health*. 2013;1:52.
12. Anukam KC, Reid G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007:466-74.
13. FAO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para su evaluación. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición*, 85.; 2006 27/12/2017.

14. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *Embo Reports*. 2006;7(7):688-93.
15. Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, Garg N, Reddivari L, Vanamala J, et al. The Intestinal Metabolome: An Intersection Between Microbiota and Host. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1470-6.
16. Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):7493-519.
17. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 2017;3(1):71-82.
18. Scarpellini E, Ianiro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease*. 2015;47(12):1007-12.
19. Zoumpopoulou G, Pot B, Tsakalidou E, Papadimitriou K. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal*.
20. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biology*. 2007;5(7):1556-73.
21. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes and Nutrition*. 2011;6(3):209-40.
22. Kang Z, Zhang J, Zhou J, Qi Q, Du G, Chen J. Recent advances in microbial production of  $\delta$ -aminolevulinic acid and vitamin B12. *Biotechnology Advances*. 2012;30(6):1533-42.
23. Morowitz MJ, Carlisle EM, Alverdy JC. Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill. *Surgical Clinics of North America*. 2011;91(4):771-85.
24. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*. 2009;11(8):2112-22.
25. Cani PD, Everard A, Duparc T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*. 2013;13(6):935-40.
26. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2012;9(10):577-89.

27. Magrone T, Jirillo E. The Interplay between the Gut Immune System and Microbiota in Health and Disease: Nutraceutical Intervention for Restoring Intestinal Homeostasis. *Current Pharmaceutical Design*. 2013;19(7):1329-42.
28. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2016;22(5):1137-50.
29. Parseus A, Sommer N, Sommer F, Caesar R, Molinaro A, Stahlman M, et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut*. 2017;66(3):429-37.
30. Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *Journal of Physiology-London*. 2009;587(17):4153-8.
31. Li J, Zhao FQ, Wang YD, Chen JR, Tao JE, Tian G, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017;5.
32. Dinan TG, Cryan JF. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2017;46(1):77.
33. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-U119.
34. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *Embo Reports*. 2012;13(5):440-7.
35. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*. 2014;20(2):159-66.
36. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circulation Research*. 2017;120(7):1183-96.
37. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*. 2012;22(2):299-306.
38. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*. 2012;22(2):292-8.

39. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013;499(7456):97.
40. Wen L, Duffy A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. *Journal of Nutrition*. 2017;147(7):1468S-75S.
41. Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linlokken A, Wilson R, et al. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterology and Motility*. 2014;26(8):1155-62.
42. Wong ML, Inserra A, Lewis MD, Mastronardi CA, Leong L, Choo J, et al. Inflammasome signaling affects anxiety- and depressive-like behavior and gut microbiome composition. *Molecular Psychiatry*. 2016;21(6):797-805.
43. Foster JA, Neufeld KAM. Gut-brain: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*. 2013;36(5):305-12.
44. Vuong HE, Hsiao EY. Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*. 2017;81(5):411-23.
45. Alkadir R, Li J, Li XD, Jin M, Zhu BL. Human gut microbiota: the links with dementia development. *Protein & Cell*. 2017;8(2):90-102.
46. Provasi S, Ferrari C, Festari C, Boccardi M, Frisoni G, Cattaneo A. Gut bacteria and Alzheimer's disease: from dysbiosis to beta-amyloid plaques. *European Neuropsychopharmacology*. 2017;27:S1027-S.
47. Westfall S, Lomis N, Kahouli I, Dia SY, Singh SP, Prakash S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(20):3769-87.
48. Byndloss MX, Baumler AJ. The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nature reviews Microbiology*. 2018.
49. Parashar A, Udayabanu M. Gut microbiota: Implications in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2017;38:1-7.
50. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*. 2017;20(2):145-55.
51. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, et al. Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell*. 2013;155(7):1451-63.



52. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim H-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 2006;100(6):1171-85.
53. Ding R-x, Goh W-R, Wu R-n, Yue X-q, Luo X, Khine WWT, et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019.
54. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(3):171-84.
55. Song D, Ibrahim S, Hayek S. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. In: Rigobelo EC, editor. *Probiotics: InTech*; 2012. p. 3-36.
56. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*. 2003;82(4):627-31.
57. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*. 2004;27(6):319-26.
58. Jin LZ, Marquardt RR, Zhao X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(10):4200-4.
59. Musa HH, Wu SL, Zhu CH, Seri HI, Zhu GQ. The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009;8(2):313-21.
60. Hashemipour H, Khaksar V, Kermanshahi H. Application of probiotic on egg production and egg quality of chukar partridge. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(82):19244-8.
61. Krehbiel CR, Gilliland SE. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *Journal of Dairy Science*. 2002;85(Supplement 1):104-5.
62. Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*. 2003;44(1):139-44.
63. Balcazar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 2006;114(3-4):173-86.

64. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;84(1):11-8.
65. Compant S, Clement C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry*. 2010;42(5):669-78.
66. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014;9:225-41.
67. Statista. Revenue generated by the functional food market worldwide in 2017 and 2022 [Available from: <https://www.statista.com/statistics/252803/global-functional-food-sales/>.]
68. Kolozyn-Krajewska D, Dolatowski ZJ. Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*. 2012;47(12):1761-72.
69. Granato D, Branco GF, Cruz AG, Faria JDF, Shah NP. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010;9(5):455-70.
70. Luckow T, Delahunty C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference*. 2004;15(7-8):751-9.
71. Charalampopoulos D, Pandiella SS, Webb C. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;92(5):851-9.
72. Capozzi V, Russo P, Teresa Duenas M, Lopez P, Spano G. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;96(6):1383-94.
73. Cheng C-P, Tsai S-W, Chiu CP, Pan T-M, Tsai T-Y. The effect of probiotic-fermented soy milk on enhancing the NO-mediated vascular relaxation factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(5):1219-25.
74. Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: Comparison of two probiotic agents. *Pediatrics*. 2005;115(1):5-9.
75. Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1994;202:7-20.
76. Ribes Koninckx C. Intolerancia a la lactosa en la edad infantil. In: (FEAD) FEAD, editor. *Puesta al día en común en la intolerancia a la lactosa 2017*.

77. Grzeskowiak L, Isolauri E, Salminen S, Gueimonde M. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *British Journal of Nutrition*. 2011;105(6):887-94.
78. Forssten SD, Sindelar CW, Ouwehand AC. Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*. 2011;17(6):410-3.
79. Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *Jornal de pediatria*. 2015;91(1):6-21.
80. Denkova Z, Krastanov A. Development of New Products: Probiotics and Probiotic Foods. In: Rigobelo EC, editor. *Probiotics 2012*. p. 81-120.
81. Mohammadi R, Mortazavian AM. Review Article: Technological Aspects of Prebiotics in Probiotic Fermented Milks. *Food Reviews International*. 2011;27(2):192-212.
82. Boylston TD, Vinderola CG, Ghoddusi HB, Reinheimer JA. Incorporation of *bifidobacteria* into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*. 2004;14(5):375-87.
83. Desmond C, Stanton C, Fitzgerald GF, Collins K, Ross RP. Environmental adaptation of probiotic *lactobacilli* towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*. 2001;11(10):801-8.
84. Gardiner GE, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MAE, Fitzgerald GF, Collins JK, et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L-salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(6):2605-12.
85. Teixeira P, Castro H, Kirby R. Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology*. 1994;18(4):218-21.
86. Gaudreau H, Champagne CP, Remondetto GE, Bazinet L, Subirade M. Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. *Food Research International*. 2013;53(2):751-7.
87. da Cruz AG, Faria JdAF, Van Dender AGF. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*. 2007;40(8):951-6.
88. Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;98(6):1410-7.

89. Ahn JB, Hwang HJ, Park JH. Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2001;11(3):443-51.
90. Akin MB, Akin MS, Kirmaci Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*. 2007;104(1):93-9.
91. Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Cell Injury: Mechanisms, Responses, and Repair*. 2005;1066:119-35.
92. Broeckx G, Vandenheuvel D, Claes IJJ, Lebeer S, Kiekens F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;505(1):303-18.
93. Bushani A, Anandharamakrishnan C. Freeze Drying. In: Anandharamakrishnan C, editor. *Handbook of Drying for Dairy Products*. John Wiley & Sons Lt ed2017. p. 95-121.
94. Brennan M, Wanismail B, Johnson MC, Ray B. Cellular Damage in Dried *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection*. 1986;49(1):47-53.
95. Maltesen MJ, van de Weert M. Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2008;5(2):e81-e8.
96. Fonseca F, Beal C, Corrieu G. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*. 2000;67(1):83-90.
97. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;105(1):1-13.
98. Capela P, Hay TKC, Shah NP. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*. 2006;39(2):203-11.
99. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*. 2004;20(1):248-54.

100. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2004;14(10):835-47.
101. Garvey JC, Lenné T, Koster LK, Kent B, Bryant G. Phospholipid Membrane Protection by Sugar Molecules during Dehydration—Insights into Molecular Mechanisms Using Scattering Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(4).
102. Bryant G, Koster KL, Wolfe J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research*. 2001;11(1):17-25.
103. Grasmeijer N, Stankovic M, de Waard H, Frijlink HW, Hinrichs WLJ. Unraveling protein stabilization mechanisms: Vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2013;1834(4):763-9.
104. Aschenbrenner M, Grammueller E, Kulozik U, Foerst P. The Contribution of the Inherent Restricted Mobility of Glassy Sugar Matrices to the Overall Stability of Freeze-Dried Bacteria Determined by Low-Resolution Solid-State H-1-NMR. *Food and Bioprocess Technology*. 2014;7(4):1012-24.
105. Golovina EA, Golovin AV, Hoekstra FA, Faller R. Water Replacement Hypothesis in Atomic Detail—Factors Determining the Structure of Dehydrated Bilayer Stacks. *Biophysical Journal*. 2009;97(2):490-9.
106. Andersen HD, Wang C, Arleth L, Peters GH, Westh P. Reconciliation of opposing views on membrane-sugar interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(5):1874-8.
107. Panoff J-M, Thammavongs B, Guéguen M. Cryoprotectants Lead to Phenotypic Adaptation to Freeze–Thaw Stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*. 2000;40(3):264-9.
108. Tsvetkov T, Brankova R. Viability of *Micrococci* and *Lactobacilli* upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*. 1983;20(3):318-23.
109. To BCS, Etzel MR. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science*. 1997;62(3):576.
110. Schoug Å, Olsson J, Carlfors J, Schnürer J, Håkansson S. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3—effects of sucrose concentration, cell density, and

freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology*. 2006;53(1):119-27.

111. Peighambardoust SH, Golshan Tafti A, Hesari J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2011;22(5):215-24.

112. Chávez BE, Ledebøer AM. Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. *Drying Technology*. 2007;25(7-8):1193-201.

113. Büchi. [Available from:

[https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/093004\\_B-](https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/093004_B-290_OM_ES_I_LR_0_0.pdf?e2e37389b13fe1da9d4f4140540be60398cd3f58)

[290\\_OM\\_ES\\_I\\_LR\\_0\\_0.pdf?e2e37389b13fe1da9d4f4140540be60398cd3f58](https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/093004_B-290_OM_ES_I_LR_0_0.pdf?e2e37389b13fe1da9d4f4140540be60398cd3f58). Fecha

de acceso: 06/02/2019

114. Donsi F, Ferrari G, Lenza E, Maresca P. Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: Operating parameters and scale of operation. *Chemical Engineering Science*. 2009;64(3):520-32.

115. Fu N, Chen XD. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*. 2011;44(5):1127-49.

116. Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*. 2008;106(4):1406-16.

117. Kim SS, Bhowmik SR. Survival of Lactic Acid Bacteria during Spray Drying of Plain Yogurt. *Journal of Food Science*. 1990;55(4):1008-10.

118. Zayed G, Roos YH. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*. 2004;39(9):1081-6.

119. Pispán S, Hewitt CJ, Stapley AGF. Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12 and *L. acidophilus* undergoing spray drying. *Food and Bioproducts Processing*. 2013;91(C4):362-9.

120. Riveros B, Ferrer J, Borquez R. Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology*. 2009;27(1):123-32.

121. Ghandi A, Powell IB, Howes T, Chen XD, Adhikari B. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: A laboratory and pilot scale study. *Journal of Food Engineering*. 2012;113(2):194-200.

122. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*. 2007;23(2):302-15.
123. Kets EPW, Teunissen PJM, DeBont JAM. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(1):259-61.
124. Lapsiri W, Bhandari B, Wanchaitanawong P. Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in Different Protectants during Spray Drying and Storage. *Drying Technology*. 2012;30(13):1407-12.
125. Avila-Reyes SV, Garcia-Suarez FJ, Jimenez MT, San Martin-Gonzalez MF, Bello-Perez LA. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate Polymers*. 2014;102:423-30.
126. Golowczyc MA, Gerez CL, Silva J, Abraham AG, De Antoni GL, Teixeira P. Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. *Biotechnology Letters*. 2011;33(4):681-6.
127. Rajam R, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;60(2):773-80.
128. Paez R, Lavari L, Vinderola G, Audero G, Cuatrin A, Zaritzky N, et al. Effect of heat treatment and spray drying on *Lactobacilli* viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*. 2012;48(2):748-54.
129. Silva J, Carvalho AS, Ferreira R, Vitorino R, Amado F, Domingues P, et al. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;98(3):775-82.
130. Ananta E, Knorr D. Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG by pressure pre-treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;96(3):307-13.
131. Desmond C, Stanton C, Fitzgerald GF, Collins K, Paul Ross R. Environmental adaptation of probiotic *Lactobacilli* towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*. 2002;12(2):183-90.
132. Lavari L, Ianniello R, Paez R, Zotta T, Cuatrin A, Reinheimer J, et al. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;63(1):322-30.

133. Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezaei K, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *International Journal of Dairy Technology*. 2007;60(2):123-7.
134. Bruno FA, Shah NP. Viability of Two Freeze-dried Strains of *Bifidobacterium* and of Commercial Preparations at Various Temperatures During Prolonged Storage. *Journal of Food Science*. 2003;68(7):2336-9.
135. Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;99(3):493-501.
136. Passot S, Cenard S, Douania I, Trélea IC, Fonseca F. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry*. 2012;132(4):1699-705.
137. Vega C, Roos YH. Invited review: Spray-dried dairy and dairy-like - emulsions compositional considerations. *Journal of Dairy Science*. 2006;89(2):383-401.
138. Akasaka S. Inactivation of transforming activity of plasmid DNA by lipid-peroxidation. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1986;867(4):201-8.
139. Schutyser MAI, Perdana J, Boom RM. Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 2012;27(2):73-82.
140. Ying DY, Phoon MC, Sanguansri L, Weerakkody R, Burgar I, Augustin MA. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *Journal of Food Science*. 2010;75(9):E588-E95.
141. Teixeira P, Castro H, Kirby R. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology*. 1996;22(1):34-8.
142. Savini M, Cecchini C, Verdenelli MC, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. Pilot-scale Production and Viability Analysis of Freeze-Dried Probiotic Bacteria Using Different Protective Agents. *Nutrients*. 2010;2(3):330.
143. Ananta E, Volkert M, Knorr D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*. 2005;15(4):399-409.



144. Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96(5):1024-39.
145. Krasaekoopt W, Watcharapoka S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT-Food Science and Technology*. 2014;57(2):761-6.
146. Rajam R, Kumar SB, Prabhasankar P, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* MTCC 5422 in fructooligosaccharide and whey protein wall systems and its impact on noodle quality. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 2015;52(7):4029-41.
147. Yoo B, Lee CM. Thermoprotective effect of sorbitol on proteins during dehydration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993;41(2):190-2.
148. Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 2002;12(2):173-82.
149. Teixeira PC, Castro MH, Malcata FX, Kirby RM. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Following Spray-Drying. *Journal of Dairy Science*. 1995;78(5):1025-31.
150. Kurtmann L, Carlsen CU, Risbo J, Skibsted LH. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology*. 2009;58(2):175-80.
151. Nag A, Das S. Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(1):170-7.
152. Zhao G, Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;99(2):333-8.
153. Wang YC, Yu RC, Chou CC. Viability of lactic acid bacteria and *bifidobacteria* in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;93(2):209-17.
154. Muller JA, Stanton C, Sybesma W, Fitzgerald GF, Ross RP. Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;108(4):1369-79.

155. Costa E, Usall J, Teixido N, Garcia N, Vinas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*. 2000;89(5):793-800.
156. Abadias M, Teixido N, Usall J, Benabarre A, Vinas I. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*. 2001;64(6):856-61.
157. Mille Y, Obert JP, Beney L, Gervais P. New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;88(1):71-6.
158. Devaldez GF, Degiori GS, Holgado APD, Oliver G. Effect of drying medium on residual moisture-content and viability of freeze-dried lactic-acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985;49(2):413-5.
159. Marteau P. Safety aspects of probiotic products. *Näringsforskning*. 2001;45(1):22-4.
160. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, et al. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L-rhamnosus strain* GG. *Clinical Infectious Diseases*. 1999;28(5):1159-60.
161. Harty DWS, Oakey HJ, Patrikakis M, Hume EBH, Knox KW. Pathogenic potential of *Lactobacilli*. *International Journal of Food Microbiology*. 1994;24(1-2):179-89.
162. Marteau P, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier E, Trivin F, Rambaud JC. Metabolism of Bile Salts by Alimentary Bacteria During Transit in the Human Small Intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1995;8(4):151-7.
163. Marteau P, Cellier C. Immunological effects of biotherapeutic agents. *Biotherapeutic Agents and Infectious Diseases*. 1999:121-44.
164. Awaisheh SS. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. In: Rigobelo E, editor. *Probiotics*. 2012. p. 551-82.
165. McConnell, M. A, Mercer AA, Tannock GW. Transfer of Plasmid pAM $\beta$ I Between Members of the Normal Microflora Inhabiting the Murine Digestive Tract and Modification of the Plasmid in a *Lactobacillus reuteri* Host. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1991;4(6):343-55.

166. FDA. Generally Recognized As Safe (GRAS) [Available from: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>.]

167. EFSA. Qualified Presumption of Safety (QPS) [Available from: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>.]

168. EFSA. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives (Request No EFSA-Q-2004-021) (adopted on 15 April 2005). 2005.

169. Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Girones R, et al. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards); 2017.

170. Wassenaar TM, Klein G. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. *Journal of Food Protection*. 2008;71(8):1734-41.

171. Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de noviembre de 2015, relativo a los nuevos alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo y se derogan el Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1852/2001 de la Comisión, (2015).

172. Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n° 1924/2006 y (CE) n° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n° 608/2004 de la Comisión, (2011).

173. Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, (2006).

174. Commission E. Guidance on the implementation of Regulation n° 1924/2006 on nutrition and health claims made on foods. Conclusions of the Standing Committee on

the food chain and animal health 2007 [Available from: [https://ec.europa.eu/food/safety/labelling\\_nutrition/claims\\_en.](https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims_en.)]

175. Health and Nutrition Claims [Internet]. [cited 03/01/2018]. [Available from: [http://ec.europa.eu/food/safety/labelling\\_nutrition/claims/register/public/?event=search.](http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=search.)]

176. Bañares S. Los probióticos: ¿algo nuevo en el horizonte? [Available from: <http://ceeudeco3.blogspot.com.es/2016/03/los-probioticos-algo-nuevo-en-el.html.>]

177. AFEPADI. Los probióticos, nuevo debate en Europa 2017 [Available from: <http://www.afepadi.org/index.php/component/k2/item/376-los-probioticos-sobre-la-mesa-de-los-parlamentarios-europeos.>]

178. FDA. Guidance for Industry on Complementary and Alternative Medicine Products and their Regulation by the Food and Drug Administration. In: Services USDoHaH, editor. 2006.

179. Food for Specified Health Uses (FOSHU): Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; [Available from: <https://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html.>]

180. Guidance Document - The Use of Probiotic Microorganisms in Food: Food Directorate. Health Products and Food Branch. Health Canada; 2009 [Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/legislation-guidelines/guidance-documents/guidance-document-use-probiotic-microorganisms-food-2009.html.>]

181. Nazzaro F, Orlando P, Fratianni F, Coppola R. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012;23(2):182-6.

182. Wong CY, Al-Salami H, Dass CR. Microparticles, microcapsules and microspheres: A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;537(1):223-44.

183. Sobel R, Versic R, Gaonkar AG. Chapter 1 - Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. In: Gaonkar AG, Vasisht N, Khare AR, Sobel R, editors. *Microencapsulation in the Food Industry*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 3-12.

184. Corona-Hernandez RI, Alvarez-Parrilla E, Lizardi-Mendoza J, Islas-Rubio AR, de la Rosa LA, Wall-Medrano A. Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013;12(6):614-28.

185. O'Riordan K, Andrews D, Buckle K, Conway P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91(6):1059-66.
186. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 2004;14(8):737-43.
187. Gebara C, Chaves KS, Ribeiro MCE, Souza FN, Grosso CRF, Gigante ML. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 2013;51(2):872-8.
188. Gerez CL, Font de Valdez G, Gigante ML, Grosso CRF. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Letters in Applied Microbiology*. 2012;54(6):552-6.
189. Adhikari K, Mustapha A, Grun IU, Fernando L. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 2000;83(9):1946-51.
190. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth HC. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *Lwt-Food Science and Technology*. 2006;39(2):177-83.
191. Shi L-E, Zheng W, Zhang Y, Liu X-Y, Tang Z-X. Soy milk-based microspheres as potential carriers for the protection of *Enterococcus faecalis* HZNU P2. *Journal of Functional Foods*. 2015;18:487-91.
192. Reid AA, Champagne CP, Gardner N, Fustier P, Vuilleumard JC. Survival in Food Systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 Microentrapped in Whey Protein Gel Particles. *Journal of Food Science*. 2007;72(1):M031-M7.
193. Livney YD. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2010;15(1-2).
194. Heidebach T, Foerst P, Kulozik U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*. 2009;19(2):77-84.
195. Hyndman CL, Groboillot AF, Poncelet D, Champagne CP, Neufeld RJ. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 1993;56(3):259-63.

196. Corona-Hernandez RI, Álvarez-Parrilla E, Lizardi-Mendoza J, Islas-Rubio AR, de la Rosa LA, Wall-Medrano A. Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013;12(6):614-28.
197. Islam MA, Yun CH, Choi YJ, Cho CS. Microencapsulation of Live Probiotic Bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;20(10):1367-77.
198. Chávarri M, Marañón I, Villarán MC. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In: Rigobelo EC, editor.: *InTech*; 2012. p. 513-40.
199. Ouwerx C, Velings N, Mestdagh MM, Axelos MAV. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks*. 1998;6(5):393-408.
200. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 2003;13(1):3-13.
201. Dhawan S, Singla AK, Sinha VR. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *Aaps Pharmscitech*. 2004;5(4).
202. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:194-205.
203. Chen S, Cao Y, Ferguson LR, Shu Q, Garg S. Evaluation of mucoadhesive coatings of chitosan and thiolated chitosan for the colonic delivery of microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Microencapsulation*. 2013;30(2):103-15.
204. Mortazavian AM, Aziz A, Ehsani MR, Razavi SH, Mousavi SM, Sohrabvandi S, et al. Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft-Milk Science International*. 2008;63(4):427-9.
205. Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*. 2004;15(7-8):330-47.
206. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 2000;62(1-2):47-55.
207. Chavarri M, Maranon I, Ares R, Ibanez FC, Marzo F, Villaran MD. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves

survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;142(1-2):185-9.

208. Sun W, Griffiths MW. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*. 2000;61(1):17-25.

209. Fialho AM, Moreira LM, Granja AT, Popescu AO, Hoffmann K, Sa-Correia I. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;79(6):889-900.

210. Albertini B, Vitali B, Passerini N, Cruciani F, Di Sabatino M, Rodriguez L, et al. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;40(4):359-66.

211. Picot A, Lacroix C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*. 2004;14(6):505-15.

212. Hebrard G, Hoffart V, Cardot JM, Subirade M, Beyssac E. Development and characterization of coated-microparticles based on whey protein/alginate using the Encapsulator device. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013;39(1):128-37.

213. Koo SM, Cho YH, Huh CS, Baek YJ, Park J. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2001;11(3):376-83.

214. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Production and Evaluation of Dry Alginate-Chitosan Microcapsules as an Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. *Biomacromolecules*. 2011;12(7):2834-40.

215. Groboillot AF, Champagne CP, Darling GD, Poncelet D, Neufeld RJ. Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993;42(10):1157-63.

216. Koppova I, Bures M, Simunek J. Intestinal bacterial population of healthy rats during the administration of chitosan and chitooligosaccharides. *Folia Microbiologica*. 2012;57(4):295-9.

217. Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(5):240-51.

218. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*. 2009;23(7):1670-7.
219. Rao AV, Shiwnarain N, Maharaj I. Survival of Microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in Simulated Gastric and Intestinal Juices. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 1989;22(4):345-9.
220. Fávaro-Trindade CS, Grosso CRF. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*. 2002;19(4):485-94.
221. Heidebach T, Forst P, Kulozik U. Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012;52(4):291-311.
222. Ephrem E, Najjar A, Charcosset C, Greige-Gerges H. Encapsulation of natural active compounds, enzymes, and probiotics for fruit juice fortification, preservation, and processing: An overview. *Journal of Functional Foods*. 2018;48:65-84.
223. Barbosa J, Borges S, Amorim M, Valle Pereira MJ, Oliveira A, Pintado M, et al. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *J. Funct. Foods* 2015, 17, 340–351
224. Anekella K, Orsat V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. 2013;50(1):17-24.
225. Teixeira P, Castro H, MohacsiFarkas C, Kirby R. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology*. 1997;83(2):219-26.
226. Shima M, Matsuo T, Yamashita M, Adachi S. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*. 2009;23(2):281-5.
227. Amin T, Thakur M, Jain SC. Microencapsulation the future of probiotic cultures 2013. 35-43 p.
228. Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N, Shimoni E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*. 2010;43(1):193-202.
229. Zuidam N, Nedovic V. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, © Springer Science+ Business Media. LLC; 2010.



230. Champagne CP, Fustier P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007;18(2):184-90.
231. Pedroso DdL, Thomazini M, Heinemann RJB, Favaro-Trindade CS. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*. 2012;26(2):127-32.
232. Semyonov D, Ramon O, Shimoni E. Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. *LWT - Food Science and Technology*. 2011;44(9):1844-52.
233. Srivastava S, Mishra G. Fluid Bed Technology: Overview and Parameters for Process Selection. 2010. 236-46 p.
234. COLORCON. [Available from: <https://www.colorcon.com/es/products-formulation/process/fluid-bed-coating>.] Fecha de acceso: 06/02/2019.
235. Heidebach T, Foerst P, Kulozik U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*. 2010;98(3):309-16.
236. Reid AA, Vuilleumard JC, Britten M, Arcand Y, Farnworth E, Champagne CP. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>2+</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation*. 2005;22(6):603-19.
237. Oliveira AC, Moretti TS, Boschini C, Baliero JCC, Freitas O, Favaro-Trindade CS. Stability of microencapsulated *B lactis* (BI 01) and *L acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*. 2007;24(7):685-93.
238. Marques da Silva T, Jacob Lopes E, Codevilla CF, Cichoski AJ, Flores ÉMdM, Motta MH, et al. Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. *LWT*. 2018;90:412-7.
239. Ishizaka T, Honda H, Koishi M. Drug Dissolution from Indomethacin-starch Hybrid Powders Prepared by the Dry Impact Blending Method. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1993;45(9):770-4.
240. Ann EY, Kim Y, Oh S, Imm J-Y, Park D-J, Han KS, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International Journal of Food Science & Technology*. 2007;42(4):411-9.

241. López-Rubio A, Sanchez E, Wilkanowicz S, Sanz Y, Lagaron JM. Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living *bifidobacteria* in food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*. 2012;28(1):159-67.
242. Brunner G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. 2005;67(1):21-33.
243. Abrahamsson V, Cunico LP, Andersson N, Nilsson B, Turner C. Multicomponent inverse modeling of supercritical fluid extraction of carotenoids, chlorophyll A, ergosterol and lipids from microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2018;139:53-61.
244. de Toledo Guimarães J, Silva EK, de Freitas MQ, de Almeida Meireles MA, da Cruz AG. Non-thermal emerging technologies and their effects on the functional properties of dairy products. *Current Opinion in Food Science*. 2018;22:62-6.
245. Amaral GV, Silva EK, Cavalcanti RN, Cappato LP, Guimaraes JT, Alvarenga VO, et al. Dairy processing using supercritical carbon dioxide technology: Theoretical fundamentals, quality and safety aspects. *Trends in Food Science & Technology*. 2017;64:94-101.
246. Bonnaillie LM, Qi P, Wickham E, Tomasula PM. Enrichment and Purification of Casein Glycomacropeptide from Whey Protein Isolate Using Supercritical Carbon Dioxide Processing and Membrane Ultrafiltration. *Foods*. 2014;3(1):94.
247. Costa MR, Elias-Argote XE, Jiménez-Flores R, Gigante ML. Use of ultrafiltration and supercritical fluid extraction to obtain a whey buttermilk powder enriched in milk fat globule membrane phospholipids. *International Dairy Journal*. 2010;20(9):598-602.
248. Monteagudo-Olivan R, Cocero MJ, Coronas J, Rodríguez-Rojo S. Supercritical CO<sub>2</sub> encapsulation of bioactive molecules in carboxylate based MOFs. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*. 2019;30:38-47.
249. Thantsha MS, Cloete TE, Moolman FS, Labuschagne PW. Supercritical carbon dioxide interpolymers improve survival of *B. longum* Bb-46 in simulated gastrointestinal fluids. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;129(1):88-92.
250. UCM. Formación de nanopartículas y nanoencapsulados mediante extracción supercrítica de emulsiones (ESE).

[Available from: <https://www.ucm.es/otri/complutransfer-formacion-de-nanoparticulas-y-nanoencapsulados-mediante-extraccion-supercritica-de-emulsiones>.]

251. Vidhyalakshmi R, Bhagyaraj R, Subhasree RS. Encapsulation "The Future of Probiotics"-A Review. *Advances in Biological Research*. 2009;3(3-4):96-103.
252. Amaral GV, Silva EK, Cavalcanti RN, Martins CPC, Andrade LGZS, Moraes J, et al. Whey-grape juice drink processed by supercritical carbon dioxide technology: Physicochemical characteristics, bioactive compounds and volatile profile. *Food Chemistry*. 2018;239:697-703.
253. Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH. Selective stimulation of *Bifidobacteria* in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 1995;108(4):975-82.
254. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota - introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 1995;125(6):1401-12.
255. Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;71(6):1682S-7S.
256. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):361s-4s.
257. Escobar MC, Van Tassell ML, Martinez-Bustos F, Singh M, Castano-Tostado E, Amaya-Llano SL, et al. Characterization of a Panela cheese with added probiotics and fava bean starch. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(6):2779-87.
258. Fritzen-Freire CB, Prudencio ES, Pinto SS, Munoz IB, Amboni R. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT-Food Science and Technology*. 2013;50(1):39-44.
259. Okuro PK, Thomazini M, Balieiro JCC, Liberal R, Favaro-Trindade CS. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International*. 2013;53(1):96-103.
260. Bedani R, Rossi EA, Saad SMI. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*. 2013;34(2):382-9.
261. Goulas A, Tzortzis G, Gibson GR. Development of a process for the production and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *International Dairy Journal*. 2007;17(6):648-56.

262. Sabater-Molina M, Larque E, Torrella F, Zamora S. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2009;65(3):315-28.
263. Lorenzoni ASG, Aydos LF, Klein MP, Rodrigues RC, Hertz PF. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*. 2014;103:193-7.
264. Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. Resistant starch - A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2006;5(1):1-17.
265. Crittenden R, Laitila A, Forssell P, Matto J, Saarela M, Mattila-Sandholm T, et al. Adhesion of *Bifidobacteria* to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(8):3469-75.
266. Mirzaei H, Pourjafar H, Homayouni A. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry*. 2012;132(4):1966-70.
267. Zanjani MAK, Tarzi BG, Sharifan A, Mohammadi N, Bakhoda H, Madanipour MM. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *African Journal of Microbiology Research*. 2012;6(26):5511-7.
268. de Luna Jiménez A. Valor Nutritivo de la Proteína de Soya. *Investigación y Ciencia [Internet]*. 2006;14(36):29-34.
269. Chuffa LG, Rocha Vieira F, Alessandra Fossato da Silva D, Franco D. Soybean Seed Oil: Nutritional Composition, Healthy Benefits and Commercial Applications. 2014. p. 1-54.
270. FAO/WHO. Protein quality evaluation: Report of joint FAO/WHO expert consultation. 1991.
271. Jones PJ, MacDougall DE, Ntanos F, Vanstone CA. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can J Physiol Pharmacol*. 1997;75(3):217-27.
272. Normén L, Dutta P, Lia Å, Andersson H. Soy sterol esters and  $\beta$ -sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel-. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(4):908-13.

273. L. Hartman G, D. West E, Herman T. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. 2011. 5-17.
274. SOPA. World Soybean Production 2019 [Available from: [http://www.sopa.org/statistics/world-soybean-production/.](http://www.sopa.org/statistics/world-soybean-production/)]
275. Gerland P, Raftery AE, Sevcikova H, Li N, Gu D, Spoorenberg T, et al. World population stabilization unlikely this century. *Science*. 2014;346(6206):234-7.
276. Otles S, Kartal C. 11 - Food Waste Valorization. In: Galanakis CM, editor. *Sustainable Food Systems from Agriculture to Industry*: Academic Press; 2018. p. 371-99.
277. Foresight. *The Future of Food and Farming*. Final Project Report. The Government Office for Science. London; 2011.
278. Story M, Hamm MW, Wallinga D. Food Systems and Public Health: Linkages to Achieve Healthier Diets and Healthier Communities. *Journal of Hunger & Environmental Nutrition*. 2009;4(3-4):219-24.
279. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *PharmacoEconomics*. 2015;33(7):673-89.
280. FAO. *Global Food Losses and Waste. Extent, Causes and Prevention*. 2011.
281. Poinern GEJ, Fawcett D. Food Waste Valorization: New Manufacturing Processes for Long-Term Sustainability. In: Ferranti P, Berry EM, Anderson JR, editors. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*. Oxford: Elsevier; 2019. p. 429-33.
282. Nguyen TAH, Ngo HH, Guo WS, Zhang J, Liang S, Tung KL. Feasibility of iron loaded 'okara' for biosorption of phosphorous in aqueous solutions. *Bioresource Technology*. 2013;150:42-9.
283. Ma CY, Liu WS, Kwok KC, Kwok F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International*. 1996;29(8):799-805.
284. Choi IS, Kim YG, Jung JK, Bae H-J. Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production. *Energy*. 2015;93:1742-7.
285. Alvarez MV, Cabred S, Ramirez CL, Fanovich MA. Valorization of an agroindustrial soybean residue by supercritical fluid extraction of phytochemical compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019;143:90-6.

286. Wong MH, Tang LY, Kwok FSL. The use of enzyme-digested soybean residue for feeding common carp. *Biomedical and Environmental Sciences*. 1996;9(4):418-23.
287. Garrido T, Etxabide A, Leceta I, Cabezudo S, de la Caba K, Guerrero P. Valorization of soya by-products for sustainable packaging. *Journal of Cleaner Production*. 2014;64:228-33.
288. Espinosa-Ramírez J, Garzon R, Serna-Saldivar SO, Rosell CM. Functional and nutritional replacement of gluten in gluten-free yeast-leavened breads by using  $\beta$ -conglycinin concentrate extracted from soybean flour. *Food Hydrocolloids*. 2018;84:353-60.
289. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 2007;40(9):1107-21.
290. Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties:  $\alpha$ -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*. 2012;48(2):387-96.
291. Gharsallaoui A, Saurel R, Chambin O, Voilley A. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5(6):2211-21.
292. Liu F, Chen Z, Tang C-H. Microencapsulation properties of protein isolates from three selected Phaseolus legumes in comparison with soy protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*. 2014;55(1):74-82.
293. Guerrero P, Arana P, O'Grady MN, Kerry JP, de la Caba K. Valorization of industrial by-products: development of active coatings to reduce food losses. *Journal of Cleaner Production*. 2015;100:179-84.
294. Di Giorgio L, Salgado PR, Mauri AN. Encapsulation of fish oil in soybean protein particles by emulsification and spray drying. *Food Hydrocolloids*. 2019;87:891-901.
295. Nori MP, Favaro-Trindade CS, Matias de Alencar S, Thomazini M, de Camargo Balieiro JC, Contreras Castillo CJ. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT - Food Science and Technology*. 2011;44(2):429-35.
296. Robert P, Gorena T, Romero N, Sepulveda E, Chavez J, Saenz C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*. 2010;45(7):1386-94.

297. Huang G-Q, Sun Y-T, Xiao J-X, Yang J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*. 2012;135(2):534-9.
298. Charve J, Reineccius GA. Encapsulation Performance of Proteins and Traditional Materials for Spray Dried Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(6):2486-92.
299. Rascón MP, Beristain CI, García HS, Salgado MA. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Science and Technology*. 2011;44(2):549-57.
300. Yew S-E, Lim T-J, Lew L-C, Bhat R, Mat-Easa A, Liong M-T. Development of a Probiotic Delivery System from Agrowastes, Soy Protein Isolate, and Microbial Transglutaminase. *Journal of Food Science*. 2011;76(3):H108-H115.
301. Sun Q, Wang F, Han D, Zhao Y, Liu Z, Lei H, et al. Preparation and optimization of soy protein isolate-high methoxy pectin microcapsules loaded with *Lactobacillus delbrueckii*. *International Journal of Food Science and Technology*. 2014;49(5):1287-93.
302. Pan Q, Zhou B, Liu L, Wang L, Yuan F, Gao Y. The aggregation of soy protein isolate on the surface of *Bifidobacterium*. *Food Research International*. 2014;64:323-8.





## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

---



## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido el de evaluar la capacidad de las proteínas de soja, obtenidas a partir de un subproducto de la industria alimentaria, como material para la microencapsulación de probióticos, utilizando *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* como microorganismos modelo.

El objetivo general del trabajo se subdividió en los siguientes objetivos específicos:

1. Obtención y caracterización físico-química de un extracto proteico procedente de un residuo generado en la producción de bebida de soja.
2. Utilización de dicho extracto para el desarrollo y optimización de biocápsulas/micropartículas para la encapsulación de probióticos.
3. Evaluación de las biocápsulas/micropartículas desarrolladas como sistemas para incrementar la viabilidad de los probióticos durante el procesado, almacenamiento y tránsito gastrointestinal.
4. Aplicación de las biocápsulas/micropartículas con probióticos en diferentes matrices alimentarias.

En la Figura 1 se muestra un esquema gráfico del desarrollo de esta Tesis.

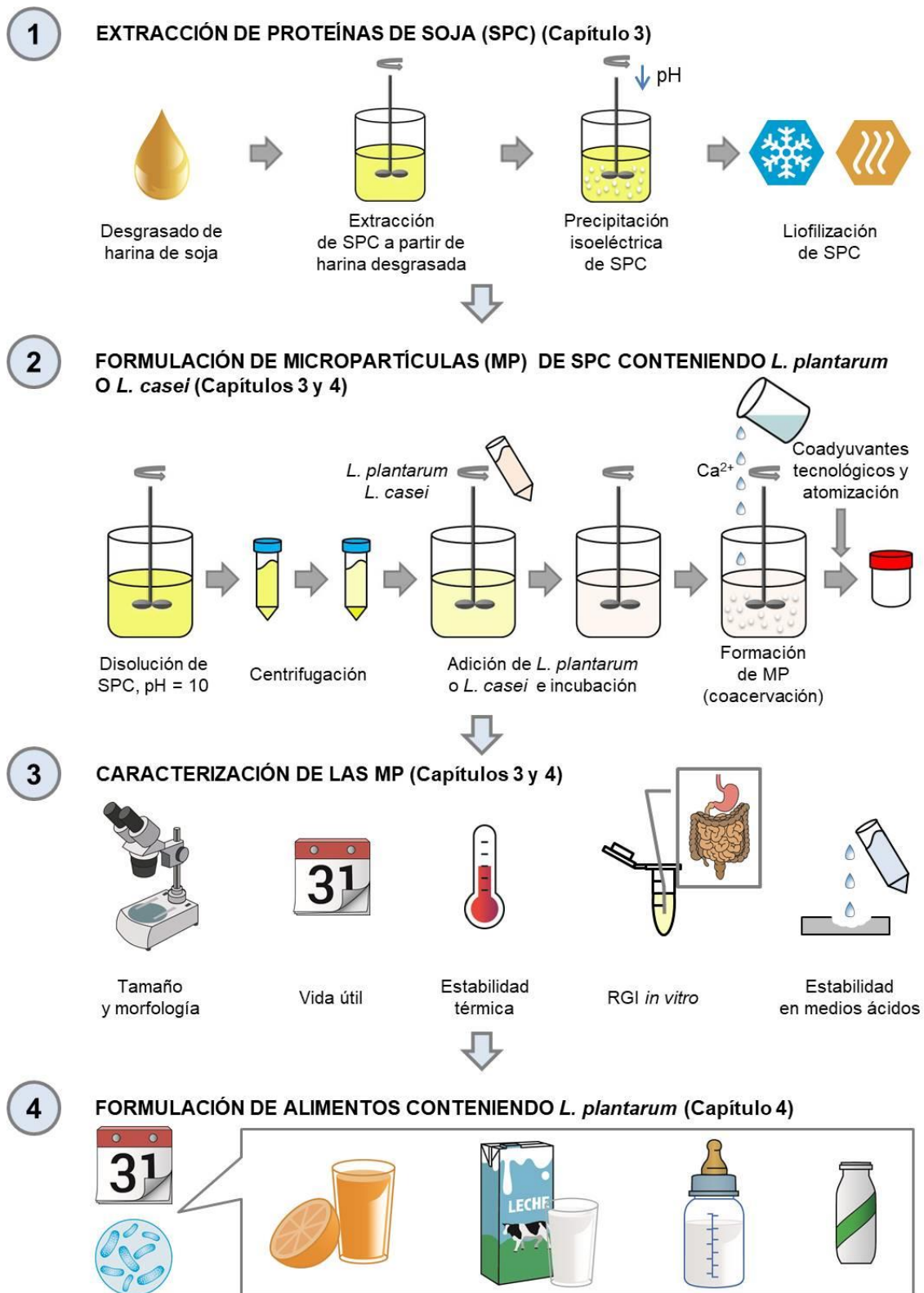


Figura 16. Esquema gráfico del desarrollo de esta Tesis.

## **CAPÍTULO 3**

### ***Soybean protein-based microparticles for oral delivery of probiotics with improved stability during storage and gut resistance***

---

**Manuscript published at Food Chemistry 239 (2018) 879-888**

**C. González-Ferrero, *et al.***



## ABSTRACT

The present work describes the encapsulation of probiotics using a by-product as wall material and a process feasible to be scaled-up: coacervation of soybean protein concentrate (SPC) by using calcium salts and spray-drying. SPC was extracted from soybean flour, produced during the processing of soybean milk, by alkaline extraction following isoelectric precipitation. Two probiotic strains were selected for encapsulation (*Lactobacillus plantarum* CECT 220 and *Lactobacillus casei* CECT 475) in order to evaluate the ability of SPC to encapsulate and protect bacteria from stress conditions. The viability of these encapsulated strains under *in vitro* gastrointestinal conditions and shelf-life during storage were compared with the most common forms commercialized nowadays. Results show that SPC is a feasible material for the development of probiotic microparticles with adequate physicochemical properties and enhanced significantly both probiotic viability and tolerance against simulated gastrointestinal fluids when compared to current available commercial forms.

## HIGHLIGHTS

- Soybean protein is a feasible material to prepare probiotic-loaded microparticles
- Microparticles were prepared by coacervation, and subsequent spray-drying
- Microparticles enhanced significantly the viability of *Lactobacillus* spp. at 25 °C
- Probiotic-loaded microparticles increased the simulated gastrointestinal resistance

## KEYWORDS

Microparticles, Soybean protein, Probiotics, Lactic acid bacteria, Coacervation, Stability, Gastrointestinal resistance

## 1. INTRODUCTION

The intestinal microbiota of a healthy adult is relatively stable and contains various beneficial bacterial populations comprising primarily *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species that play an important role in host health. Other microbes such as bacteriophages, fungi, protozoa, archaea and viruses are also constituents of the gut microbiota. Recent studies have revealed that bacteriophages are as prevalent as bacteria in the gut (1). The intestinal homeostasis can be altered by different factors: diet, environment conditions (i.e., stress) and antibiotics overuse (2). However, over 70% of the fecal microbiota is remarkably stable (3). An imbalance in the colonic microbiota may contribute to the development of different disorders including gastrointestinal tract infections, irritable syndromes, allergies, heart diseases and colon cancer (4, 5). Nowadays, it is still unclear if intestinal bowel diseases-associated dysbiosis is causative, contributory, or consequential to the disease. This uncertainty is related to the limitations in technology, bioinformatics and clinical study design (1). Despite these unresolved questions, probiotics are able to restore the intestinal microbial ecosystem balance and contribute to the health promotion of the host (6). The joint Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO) Committee has recommended the use of probiotics to prevent these risks (7). The term probiotic defines the living microorganisms, which when consumed in adequate amount, may offer a healthy effect on the host (8). Among others, the most common probiotics that are used nowadays include bacteria such as lactic-acid bacteria (LAB) and *Escherichia coli* strains, as well as yeast species such as *Saccharomyces boulardii* (9). In any case, a daily dose of at least  $10^6$ - $10^9$  living cells has been suggested to assure health-relevant effects following the consumption of probiotic products (10). The mechanisms by which probiotic bacteria confer such effects have been divided into three areas: (i) production of nutrients and co-factors, (ii) competition with pathogens and (iii) stimulating the host immune response (11).

In general, four different ways for consuming probiotics may be distinguished: (i) as a concentrated culture added to a beverage (e.g., fruit juice, etc.), (ii) inoculated in prebiotic fibers, (iii) as a freeze-dried dietary supplement formulated in solid dosage forms (e.g., powder, capsules, tablets, etc.) and (iv) inoculated in milk-based foods.

However, many of these probiotics (e.g. *Lactobacillus* spp.) are faced to important challenges that seriously hamper their beneficial and healthy effects. Thus, the harsh pH conditions in the stomach as well as the presence of bile salts in the upper regions of the small intestine are the main barriers limiting the arrival of these



microorganisms to the ileum and colon, where they have to compete with the endogenous microbiota for adhering to the mucosa (12). Another important factor limiting the efficacy of probiotics is their vulnerability. In fact, their viability may be compromised during processing, storage and consumption (13).

To overcome these problems, microencapsulation is presented as one of the most efficient solutions not only to maintain the viability of probiotics during processing and storage, but also to ensure their activity within the gut (14). Different materials have been recommended for the microencapsulation of probiotics, including alginate (15), guar gum, locust bean gum (16) or waxy maize starch. Apart the use of carbohydrates, proteins have also been suggested for the design of biodegradable microparticles (17). In this context, microparticles based on soybean protein isolates (SPI) have been proposed for the oral delivery of *Bifidobacterium longum* (18). More recently, Sun et al. (2014) describe a combination between SPI and high methoxy pectin (HMP) as encapsulating material for probiotic bacteria.

In spite of the benefits obtained with the microencapsulation of these microorganisms in biodegradable microparticles, there is still an important need of delivery systems offering both a superior protective capability against the physiological conditions of the gut and controlled release properties. In addition, these ideal microparticles should be prepared following simple preparative processes to be easily implemented at an industrial scale.

In this work, the production of encapsulated probiotics in soybean protein-based microparticles by a coacervation process in the presence of calcium salts followed by a drying step by spray-drying was studied. Soybean protein concentrate (SPC) was obtained from the soybean flour, a by-product from the processing of soybean milk. The work also describes the viability of the encapsulated bacteria during storage under controlled conditions (25 °C/60% RH) and the *in vitro* gastrointestinal resistance with respect to the most common forms commercialized nowadays.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

Soybean flours, obtained as by-products from the soybean milk processing, were kindly provided by Iparlat S.A. (Urnieta, Guipúzcoa, Spain). Solvents and reagents used for the extraction of soybean protein were of analytical grade and purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

Probiotic bacteria strains *L. plantarum* CECT 220 and *L. casei* CECT 475, isolated from corn silage and cheese, respectively, were purchased from the *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT) - University of Valencia (Valencia, Spain). MRS broth and Buffered Peptone Water (BPW) broth were acquired from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Maltodextrin (MD) Glucidex® 21 and the commercial blend of oligofructose-enriched inulin (OEI) Orafty® Synergy1 were kindly provided by Roquette Frères (Lestrem, France) and Beneo GmbH (Mannheim, Germany), respectively. Chromatography solvents were purchased from Sigma (Barcelona, Spain).

The enzymes and reagents used for *in vitro* gastrointestinal resistance assays were provided by Sigma (Barcelona, Spain) except  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  which was acquired from Panreac (Barcelona, Spain). Chips and analysis kit for microfluidic assays were purchased from Bio-Rad Laboratories Inc. Spain (Barcelona, Spain).

## 2.1. CHARACTERIZATION OF COMPOSITION OF SOYBEAN FLOUR

The soybean flour was characterized in relation to its nutritive value in order to determine the homogeneity among batches from the soybean milk production, mainly regarding total protein content. The following parameters were determined: humidity, protein content, fat content, total dietary fiber, ash, carbohydrate, energy value, sugar profile, fatty acid profile, and sodium content.

Briefly, the humidity was determined by gravimetric analysis to a constant weight at  $105 \pm 3$  °C. Protein content was estimated from the total nitrogen content determined by Kjeldahl method using a conversion factor ( $\text{N} \times 6.25$ ). Total lipid content was determined after extraction with a mixture of chloroform and methanol as described previously by (19), whereas the fatty acid profile was determined by Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) according to the European Commission (20). The total dietary fiber was analyzed following the method described by the AOAC International (21). Ash content was determined by gravimetric analysis after the incineration of samples at  $550 \pm 50$  °C for at least 8 hours. Sugar profile was analyzed by High Performance Liquid Chromatography-Refractive Index (HPLC-RI) following the method described by White and Kennedy (1983) (22) and the carbohydrate content was calculated by difference. Finally, the energy value was calculated in accordance with the technique suggested by the European Commission (23).

All the experiments were conducted in duplicate (except for sodium analysis) and three different samples were analysed, corresponding to different batches produced approximately over a year (April and November 2011, and March 2012). These samples are identified in Supplementary Table 1 as A, B and C, respectively.

Supplementary Table 1. Nutritional characteristics of the soybean flour batches. Data expressed as mean  $\pm$  SD (n=2) (with the exception of sodium content, n=1).

<b>PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Nutritional Value (Group II)</b>			
Humidity (g/100 g)	11.90 $\pm$ 0.01	10.70 $\pm$ 0.04	11.40 $\pm$ 0.09
Proteins (g/100 g)	35.28 $\pm$ 1.43	32.41 $\pm$ 0.28	32.67 $\pm$ 0.58
Fats (g/100 g)	13.90 $\pm$ 2.16	15.04 $\pm$ 0.40	16.02 $\pm$ 0.49
Total dietary fiber (g/100 g)	19.94 $\pm$ 1.53	21.56 $\pm$ 0.05	30.79 $\pm$ 0.42
Ashes (g/100 g)	4.92 $\pm$ 0.04	4.56 $\pm$ 0.01	4.35 $\pm$ 0.08
Carbohydrates (g/100 g)	14.06 $\pm$ 2.04	15.73 $\pm$ 0.78	4.77 $\pm$ 0.15
Energy value (kJ/100 g)	12.60 $\pm$ 57.50	47.43 $\pm$ 6.89	75.54 $\pm$ 9.01
<b>Sugar profile</b>			
Fructose (g/100 g)	1.72 $\pm$ 0.08	1.34 $\pm$ 0.09	1.19 $\pm$ 0.04
Glucose (g/100 g)	1.45 $\pm$ 0.18	1.37 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.03
Sucrose (g/100 g)	2.40 $\pm$ 0.03	3.17 $\pm$ 0.20	3.03 $\pm$ 0.11
Maltose (g/100 g)	<0.50	<0.50	<0.50
Lactose (g/100 g)	<0.50	<0.50	<0.50
<b>Fatty acid profile</b>			
Caproic acid (g/100 g fat)	<0.03	<0.03	<0.03
Caprylic acid (g/100 g fat)	<0.02	<0.02	<0.02
Capric acid (g/100 g fat)	<0.02	<0.02	<0.02
Lauric acid (g/100 g fat)	<0.02	0.04 $\pm$ 0.00	<0.02
Myristic acid (g/100 g fat)	0.12 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.00
Myristoleic acid (g/100 g fat)	<0.02	<0.02	<0.02
Palmitic acid (g/100 g fat)	11.89 $\pm$ 0.01	12.60 $\pm$ 0.00	13.69 $\pm$ 0.05

PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS	A	B	C
Palmitoleic acid (g/100 g fat)	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Heptadecanoic acid (g/100 g fat)	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.00	0.10 ± 0.01
Cis-10-heptadecanoic acid (g/100 g fat)	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Elaidic acid (g/100 g fat)	<0.02	<0.02	<0.02
Stearic acid (g/100 g fat)	5.16 ± 0.02	4.50 ± 0.01	5.72 ± 0.06
Oleic acid (g/100 g fat)	18.28 ± 0.06	15.94 ± 0.01	15.12 ± 0.02
Linolelaidic acid (g/100 g fat)	<0.02	<0.02	<0.02
Linoleic acid (g/100 g fat)	53.31 ± 0.10	52.61 ± 0.01	52.25 ± 0.19
Linolenic acid (g/100 g fat)	9.14 ± 0.01	13.11 ± 0.01	11.77 ± 0.04
Arachidic acid (g/100 g fat)	0.39 ± 0.01	0.22 ± 0.00	0.26 ± 0.00
Cis-11-eicosanoic acid (g/100 g fat)	0.20 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.13 ± 0.00
Arachidonic acid (g/100 g fat)	0.03 ± 0.00	<0.02	<0.02
Cis-11-eicosapentanoic acid (g/100 g fat)	<0.02	<0.02	<0.02
Behenic acid (g/100 g fat)	0.55 ± 0.03	0.24 ± 0.00	0.16 ± 0.00
Erucic acid (g/100 g fat)	0.33 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.42 ± 0.01
Lignoceric acid (g/100 g fat)	0.18 ± 0.00	<0.04	<0.04
Docosahexanoic acid (g/100 g fat)	<0.02	<0.02	<0.02
Nervonic acid (g/100 g fat)	<0.02	0.09 ± 0.00	0.14 ± 0.01
Total saturated fats (g/100 g fat)	18.25 ± 0.03	17.84 ± 0.00	20.06 ± 0.02
Total monounsaturated fats (g/100 g fat)	18.94 ± 0.02	16.44 ± 0.00	15.93 ± 0.00
Total polyunsaturated fats (g/100 g fat)	62.81 ± 0.02	65.72 ± 0.02	64.02 ± 0.04
Total trans fats (g/100 g fat)	<0.02	<0.02	<0.02
Sodium (mg/Kg)	61.8	24.4	<20

## 2.2. EXTRACTION OF SOYBEAN PROTEIN FROM SOYBEAN FLOUR

The extraction of proteins from soybean was carried out following a protocol described by Ma *et al.* (1996) (24) with minor modifications. For this purpose, 100 g soybean flour was first defatted with hexane (mixture of isomers) using a soybean flour/hexane ratio (by weight) of 1/10. Once the solvent was removed by centrifugation

(10 min, 15,317 g) followed by evaporation at room temperature, the soybean flour was moistened with water and sterilized in a RF42J1P rotary autoclave at 121 °C for 15 minutes (Ferlo, San Adrián, Spain). Afterwards, the protein was extracted using a carbonate buffer solution (by weight ratio soybean flour/buffer of 1/10) at 80 °C for 30 minutes and the mixture was centrifuged at 15,317 g for 15 minutes. The protein was recovered from supernatants by isoelectric precipitation (pH 4.5) with a 10% HCl solution (v/v). Finally, the solution of proteins was filtered, dried by lyophilization and homogenized using a milling cutter. The process was optimized by evaluating the influence of pH and temperature conditions.

### **2.3. CHARACTERIZATION OF THE COMPOSITION OF SOYBEAN PROTEIN**

The following parameters were determined: protein content, the molecular weight distribution and the amino acid profile.

Protein content was estimated from the total nitrogen content determined by Kjeldahl method using a conversion factor (N x 6.25). Additionally, the amino acid profile was carried out by an external laboratory. All amino acids but tryptophan were analyzed according to the ISO 13903:2005 method (25), while total tryptophan was determined by following ISO 13904:2016 method (26).

The molecular weight soluble fractions analysis were carried out by microfluidic technology, using the Experion Pro260 analysis kit with the Experion automated electrophoresis system, according to the manufacturer's instructions with supplied chemicals (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Samples were prepared within the linear dynamic range (5-2,000 ng/μL) with water and 3 M urea; and kept under orbital agitation for two hours at room temperature. The soluble fraction was collected by centrifugation at 4,500 g for 20 minutes, and the chip was loaded. Thus, a sample (4 μL) was mixed with 2 μL of non-reducing sample buffer, and after 4 minutes boiling, 84 μL of deionised water was added and vortexed briefly. After the priming of the chip with the gel and gel-staining solution, the chip was loaded with each sample mixture (6 μL) and the Pro260 Ladder provided in the kit as a molecular weight standard.

### **2.4. PROBIOTICS PRODUCTION**

Commercial freeze-dried samples of both *L. plantarum* and *L. casei* were revitalized in a MRS broth at 37 °C under anaerobic atmosphere (85% nitrogen, 10%

hydrogen, 5% carbon dioxide) in anaerobic chamber (MACS 500 AIRLOCK, AES Chemunex, Spain).

Suspensions were prepared from 100  $\mu\text{L}$  of an aliquot of each microorganism which was transferred to 10 mL MRS broth. After incubation for 12 hours/37 °C under anaerobic conditions, a cell count was performed in a microscope using a Thoma chamber in order to calculate the volume of the inoculum. This latter was transferred to a 50 mL flask containing MRS broth up to a final count of  $10^6$  CFU/mL. Afterwards, the flasks were incubated at conditions described above for 24 hours until reaching the early stationary growth phase. The bacterial population was tracked and counted by means of seeding decimal dilutions using 0.1% BPW broth in MRS agar at each sampling time.

The final working suspensions were prepared by centrifugation of a volume of 2 L MRS broth suspension at 15,317 g for 10 minutes. Supernatant was removed and the pellet was washed twice and resuspended in a 2% (w/v) sucrose solution. The counts of final suspensions were around  $10^{10}$  –  $10^{11}$  CFU/mL depending on the LAB strain.

Lyophilized LAB were prepared from 2% sucrose (w/v) suspensions by freeze-drying using a LyoAlfa equipment from Telstar (Terrassa, Spain).

Spray-dried LAB were obtained from 2% sucrose (w/v) suspensions using a Büchi B-290 Mini Spray-Dryer coupled to B-295 Inert Loop accessory (Büchi Switzerland, Flawil, Switzerland). The drying parameters were: air inlet temperature, 85 °C; air outlet temperature, 67 °C  $\pm$  2 °C; suction, 100%; sample pumping rate, 3.5 mL/min; air pressure, -60 mbar and air flow, 600 L/h.

## **2.5. PREPARATION OF PROBIOTIC-LOADED MICROPARTICLES**

Probiotic bacteria microparticles were prepared from the previously described soybean protein. For this purpose, 750 mg protein were dissolved in 25 mL carbonate buffer (pH 10) by magnetic agitation for 20 minutes at room temperature. The resulting mixture was centrifuged at 9,600 g for 10 min and the clear supernatant was collected.

In parallel, the suspensions of bacteria (2 L) were washed twice with 25 mL of an aqueous solution of sucrose (2% w/v), centrifuged at 5,311 g or 10 minutes and finally resuspended in 50 mL 2% sucrose (w/v). The mean count for *L. plantarum* was  $3.9 \times 10^{10}$  CFU/mL for Sp microparticles and  $2.5 \times 10^9$  CFU/mL for Sp 250, Sp 500 and

Sp 750; whereas the mean concentration for *L. casei* suspension was  $2.6 \times 10^{10}$  CFU/mL.

For the preparation of probiotic-loaded microparticles, 2 mL of the bacterial suspension was added to 25 mL of the soybean protein supernatant. After five minutes of incubation under magnetic stirring, an aqueous solution of calcium chloride was added, 30 mL (0.2% w/v) for *L. plantarum* or 18 mL (1% w/v) in the case of *L. casei*. The resultant mixture was incubated for 20 minutes under stirring and then, an equal weight of MD, OEI or combinations of these drying-adjuvants were added and dissolved. For *L. plantarum* microparticles, four different mixtures of spray-drying protectants were evaluated: (i) MD (Sp), (ii) MD/OEI (2/1, w/w) (Sp 250), (iii) MD/OEI (1/2, w/w) (Sp 500) and (iv) OEI (Sp 750). For microparticles containing *L. casei*, only MD was evaluated (Sc) (Table 1). Finally, the suspensions were spray-dried using a Büchi B-290 Mini Spray-Dryer coupled to B-295 Inert Loop accessory (Büchi Switzerland, Flawil, Switzerland). The drying parameters were as follows: air inlet temperature, 85 °C; air outlet temperature, 67 °C  $\pm$  2 °C; suction, 100%; sample pumping rate, 3.5 mL/min; air pressure, -60 mbar and air flow rate of 600 L/h.

Table 2. Composition of feed solutions.

Sample	Wall materials ratio (w/w)	SPC (g)	MD (g)	OEI (g)	SPC/CaCl <sub>2</sub> (w/w)	Core	Probiotic concentrate (mL)
Sp	1:1	0.75	0.75	-	12.5:1	<i>L. plantarum</i>	2
Sp 250	1:1	0.75	0.50	0.25	12.5:1	<i>L. plantarum</i>	2
Sp 500	1:1	0.75	0.25	0.50	12.5:1	<i>L. plantarum</i>	2
Sp 750	1:1	0.75	-	0.75	12.5:1	<i>L. plantarum</i>	2
Sc	1:1	0.75	0.75	-	4.2:1	<i>L. casei</i>	2

SPC – Soybean protein concentrate; MD – maltodextrin; OEI – oligofructose-enriched inulin

## 2.6. PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF MICROPARTICLES

### 2.6.1. SIZE AND MORPHOLOGY

The size of the microparticles was determined by means of confocal microscopy using a Nikon ECLIPSE 55 microscope with Colorview Soft Imaging Systems Camera

DS-L2 (Tokyo, Japan). The samples were prepared by resuspending bacteria-loaded microparticles in MilliQ water.

Morphology analysis was additionally performed with an energy filtering Carl Zeiss LIBRA 120 transmission electron microscope (TEM) (Oberkochen, Germany) coupled a Gatan Ultrascan 1000 2k x 2k CCD camera (Pleasanton, CA, US) with accelerating voltage of 80 kV.

### 2.6.2. QUANTIFICATION OF BACTERIA LOADED IN MICROPARTICLES AND DETERMINATION OF BACTERIAL DEATH CYCLES

In order to determine the viable bacteria in microparticles, samples of the dried powder containing the bacteria-loaded microparticles were accurately weighed in an analytical balance (Sartorius, SAR ME 235S, Göttingen, Germany) and dispersed in 1 mL BPW broth (0.1% w/v) under vortex agitation for a few seconds and then homogenized in an orbital shaker (Eppendorf AG, Mixmate, Hamburg, Germany) at 900 rpm for 1 hour. After the disruption of microparticles, confirmed by optical microscopy, decimal dilutions were performed in 0.1% BPW broth (w/v) and seeded in MRS plates. After incubation at 37 °C under anaerobic conditions for 24-48 hours, colony counts were performed and the bacterial death cycles were determined using the following equation:

$$\text{Bacterial death cycles} = \text{Log}(\text{initial CFU/g}) - \text{Log}(\text{recovered CFU/g}) \quad [1]$$

In which the *Log (initial CFU/g)* was the amount of bacteria initially included in the preparative process (before the drying process) per gram of formulation, and *Log (recovered CFU/g)* represented the counts of viable bacteria obtained at the end of the preparative process of microparticles.

In addition, the bacteria loading was expressed in terms of number of viable bacteria per mass of formulation and calculated as follows:

$$\text{Bacteria loading} = A/B \quad [2]$$

In which *A* is *Log (recovered CFU)* and *B* the mass of powder containing the microparticles.



### 2.6.3. EVALUATION OF STABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA DURING STORAGE UNDER CONTROLLED CONDITIONS OF RELATIVE HUMIDITY AND TEMPERATURE

For this purpose, microparticles and control samples were stored in 50 mL sterilized polypropylene containers in a climate chamber (Memmert GmbH, HPP108, Schwabach, Germany) at 25 °C and 60% Relative Humidity (RH).

As control samples the following bacterial presentations were selected: (i) non-encapsulated lyophilized bacteria as the commercial format nowadays, (ii) non-encapsulated spray-dried bacteria from fresh suspensions in 2% sucrose (w/v), (iii) bacterial suspensions in MRS broth medium and (iv) fresh suspensions in 2% sucrose (w/v).

The plot of logarithmic of the relative viability ( $\text{Log } N_t/N_0$ ) versus storage time ( $t$ , days) was fitted to a first order reaction kinetics model as described by the following equation:

$$\text{Log } (N_t/N_0) = k_t t \quad [3]$$

Where  $N_t$  represents the total viable bacteria at a particular storage period (in CFU/g), and  $N_0$  represents the number of viable cells at the beginning of storage (in CFU/g),  $t$  is the storage time (in days), and  $k_t$  is the specific rate of viability loss at 25 °C/60% RH per day.

### 2.6.4. EVALUATION OF DIGESTION STABILITY OF ENCAPSULATED PROBIOTIC BACTERIA IN SIMULATED GASTROINTESTINAL MEDIUM

The gastrointestinal (GI) resistance of *L. plantarum* and *L. casei* assays were carried out following a protocol described previously by (27) with some modifications.

Simulated gastric (SGF) and simulated intestinal (SIF) fluids were freshly prepared before each experiment. For SGF, 2.0 g NaCl and 3.2 g pepsin were dissolved in 7.0 mL HCl and a sufficient volume of sterilized water to make 1 L. The pH of SGF was fixed to  $2.5 \pm 0.1$ . For SIF, 6.8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was dissolved in 250 mL water. Then, 77 mL 0.2 N NaOH and 500 mL water were added and mixed along with 10.0 g pancreatin. The SIF solution was adjusted to pH  $6.8 \pm 0.1$  with either 0.2 N NaOH or 0.2 N HCl and then diluted with water to 1 L.

For the evaluation of the GI resistance of bacteria, an accurately weighed amount of microparticles were added to polyvinyl chloride tubes and dispersed in 990

µL SGF. At predetermined time points (0.1, 0.5 and 2 hours), the tubes were centrifuged and the amount of viable bacteria was calculated. On the other hand, and in order to simulate the *in vivo* behaviour, microparticles containing probiotics were also dispersed in SGF and, two hours later, the samples were centrifuged at 9,600 g for 10 minutes and the supernatant was removed. The samples were kept in contact with the SIF for 0.1, 3 and 6 hours (2.1, 5 and 8 hours after from the start of the assay). The experiments were performed in triplicate. As controls, lyophilized bacteria and spray-dried bacteria were used and treated in the same way than microparticles.

For analysis, the samples were centrifuged and the pellets were treated according to the method for the microparticle disruption aforementioned. The viable bacteria count was performed using the method of counting in a MRS agar plate described in Section 2.6.2. The survival of bacteria released in SGF/SIF was expressed in terms of relative viability (a ratio of viable cells at time  $t$  to that time zero in hours).

## **2.7. STATISTICAL ANALYSIS**

For all the statistical approaches, the statistics program PAST3 was used. A one way analysis of variance (ANOVA) on the data of gastrointestinal resistance assay was conducted. Mean differences were compared by employing Tukey's test at two times ( $t=2$  h and  $t=8$  h) for each bacteria. Differences between means were considered significant at  $p<0.05$ .

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. NUTRITIONAL VALUE OF SOYBEAN FLOUR**

Supplementary Table 1 summarizes the nutritional value and composition of the different soybean flour batches analysed in this work. The three soybean flours showed similar protein and fat concentration. The mean content in protein was approximately 33%, whereas the mean fat concentration was close to 15%. From a general point of view, the protein content in the three analysed batches was found to be slightly lower than other contents reported previously (28). These differences may be explained by the variety used for the experiments and the edaphological conditions in which the soybean cultures were grown. In line with this, Yu *et al.* (2016) (29) have reported that

different varieties of soybean seeds result in a wide variation in the protein and carbohydrate composition that impact in the resulting soyfood yield and quality.

On the other hand, it was noteworthy the wide differences observed in the content of sodium, which presented a range from <20 mg/kg to 61.8 mg/kg. This variation may be related to the soy-based food manufactured (soymilk, tofu, etc.) from which the by-products were provided. Unfortunately, this idea was not possible to confirm due to the lack of information, regarding this point, from the manufacturer.

### **3.2. CHARACTERISTICS OF THE ISOLATED SOYBEAN PROTEIN**

In this work, the extraction process of the soybean protein from the flour was carried out at pH 10 and 80 °C. The adequate selection of both the pH and temperature conditions is an important factor that determines the yield of the process (24). Thus, at pH 5, close to the isoelectric point, the variation of the temperature (from 20 °C to 80 °C) did not induce any significant effect in the extraction of protein ( $p < 0.05$ ) (data not shown). However, at pH 10, the efficiency of the process improved by increasing the temperature. These results are in accordance with those obtained by Ma and collaborators, who observed a progressive increase in the protein extractability with temperature at pH 9.0 (24). In the soybean protein extracts used in this work, the mean total protein was calculated to be  $74.77 \pm 4.06$  g/100 g. Thus, in accordance with the AAFCO (Association of American Feed Control Officials), these extracts have to be considered as SPC rather than SPI. In fact, SPC are characterised for a protein content higher than 70% on a moisture free basis, whereas a SPI is characterised for having a minimum protein concentration of 90% on a dried basis (30).

Regarding the molecular mass of the SPCs, results from the microfluidic analysis of the three different batches (A, B and C) prepared in water are shown in Fig. 1 (lanes 1, 2 and 3, respectively).

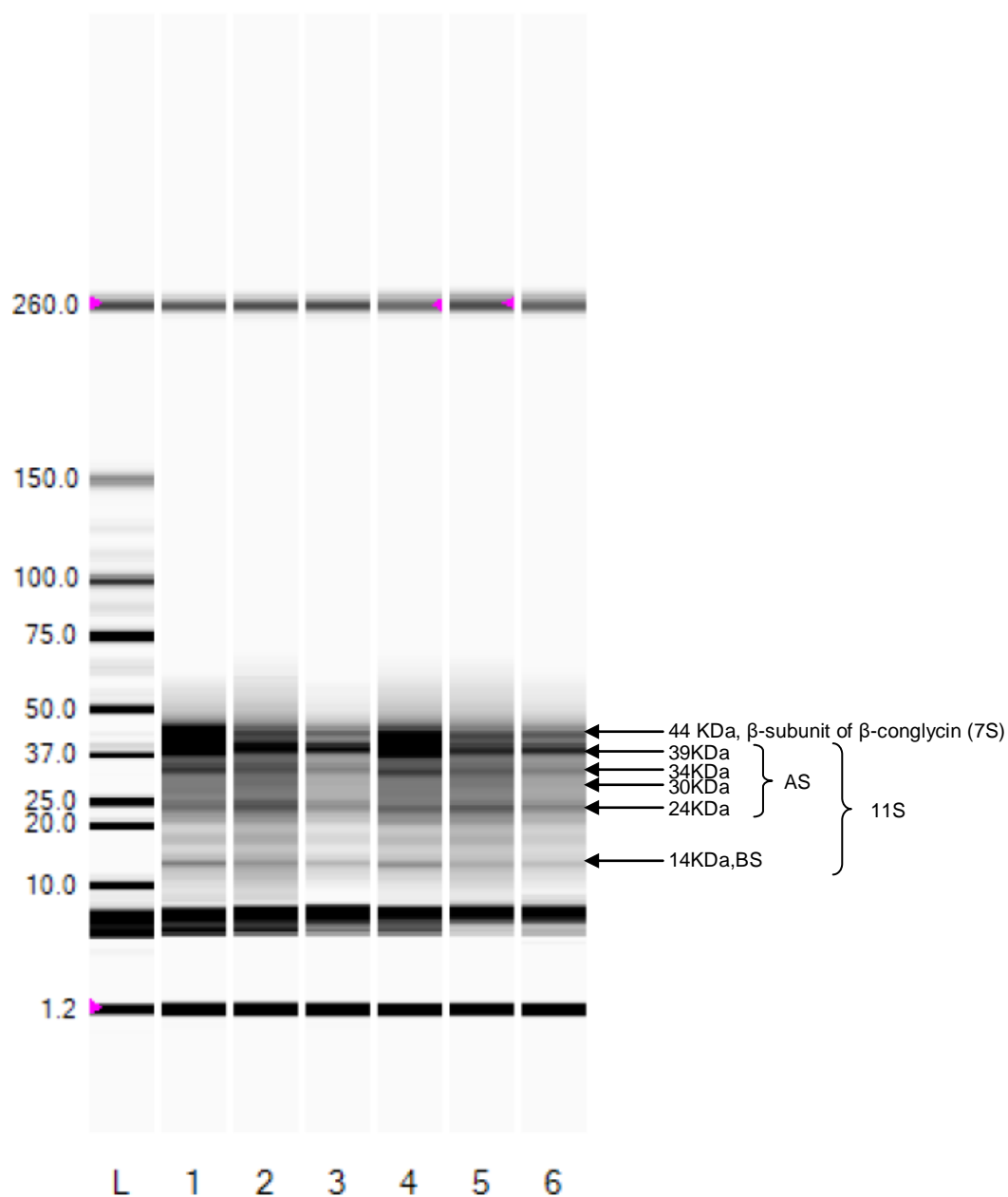


Fig.1. Virtual gel output from Experion system from protein samples at non-reducing conditions. Lane L: Pro260 ladder; lane 1: SPC from A flour in water; lane 2: SPC from B flour in water; lane 3: SPC from C flour in water; lane 4: SPC from A flour in 3 M urea; lane 5: SPC from B from in 3 M urea and lane 6: SPC from C flour in 3 M urea. Molecular weights expressed in kDa.

The band pattern exhibits six intense bands with molecular mass at around 44 kDa (19-26%), which might attribute to the  $\beta$  subunit of  $\beta$ -conglycinin (7S globulin). The other five show molecular mass of approximately 39 kDa (18-48%), 34 kDa (11-14%),

30 kDa (0.7-8%), 24 kDa (8-19%) and 14 kDa (4-15%). These fractions might represent the subunits of acidic and basic polypeptides which were dissociated from glycinin (11S globulin). All of these bands correspond to the main protein fractions that can be found in SPIs (31-34). Analysis of SPC from flour A (lane 1) also revealed the presence of other less intense bands at about 28 kDa (7%), 18 kDa (5%), 10 kDa (1%) and 9 kDa (2%). Protein subunits of 18 kDa (7%) and 9 kDa (1.5%) were also observed in flour B (lane 2). Moreover in this sample a very small fraction (1.4%) also appears at about 61 kDa which might correspond to the  $\alpha$  subunit of conglycin (32). Concerning the samples prepared in 3 M urea (lanes 4, 5 and 6), five of the six bands which were observed in aqueous samples were also presented in those lanes: 44 kDa, 39 kDa, 34 kDa, 24 kDa and 14 kDa with similar percentages with respect to the total protein fractions.

Supplementary Table 2 shows the amino acid profile of the three SPC extracted from the different batches of soybean defatted flours.

Supplementary Table 3. Amino acid profile of the soybean flour batches. Data expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

Amino acid	Amino acid composition (wt%)		
	A	B	C
Aspartic Acid (Asp)	11.71 $\pm$ 0.51	11.59 $\pm$ 0.45	11.58 $\pm$ 0.45
Serine (Ser)	5.26 $\pm$ 0.26	5.29 $\pm$ 0.23	5.19 $\pm$ 0.22
Lysine (Lys)	6.43 $\pm$ 0.31	6.47 $\pm$ 0.27	6.54 $\pm$ 0.28
Valine (Val)	4.88 $\pm$ 0.27	4.94 $\pm$ 0.24	4.69 $\pm$ 0.23
Proline (Pro)	5.45 $\pm$ 0.39	5.48 $\pm$ 0.34	5.46 $\pm$ 0.34
Alanine (Ala)	4.20 $\pm$ 0.18	4.38 $\pm$ 0.17	4.34 $\pm$ 0.17
Threonine (Thr)	3.85 $\pm$ 0.18	3.95 $\pm$ 0.16	4.03 $\pm$ 0.16
Phenylalanine (Phe)	5.17 $\pm$ 0.24	5.14 $\pm$ 0.21	5.22 $\pm$ 0.21
Isoleucine (Ile)	4.71 $\pm$ 0.33	4.73 $\pm$ 0.29	4.81 $\pm$ 0.30
Glycine (Gly)	4.20 $\pm$ 0.23	4.29 $\pm$ 0.20	4.30 $\pm$ 0.20
Tyrosine (Tyr)	3.66 $\pm$ 0.33	3.68 $\pm$ 0.29	3.61 $\pm$ 0.29
Arginine (Arg)	7.51 $\pm$ 0.38	7.35 $\pm$ 0.33	7.43 $\pm$ 0.33
Leucine (Leu)	7.85 $\pm$ 0.47	7.93 $\pm$ 0.41	7.81 $\pm$ 0.41

Amino acid	Amino acid composition (wt%)		
	A	B	C
Histidine (His)	2.59 ± 0.30	2.63 ± 0.27	2.62 ± 0.27
Glutamic acid (Glu)	18.41 ± 0.70	17.94 ± 0.30	18.11 ± 0.60
Methionine (Met)	1.37 ± 0.09	1.39 ± 0.08	1.38 ± 0.08
Cystein + Cystine (Cys)	1.46 ± 0.11	1.51 ± 0.10	1.54 ± 0.10
Tryptophan (Total) (Trp)	1.29 ± 0.09	1.32 ± 0.08	1.36 ± 0.08

Glutamic and aspartic acids were the major amino acids, representing almost 30 wt% of the total amino acid content. In a similar way, leucine, arginine and lysine were also present in relatively high amounts (6-8 wt%, approximately), representing nearly 22 wt%. Minor amino acids were methionine, cysteine, cystine and tryptophan with concentrations around 1.3-1.5 wt%. The content of the rest of amino acids were presented between 2.6 wt% and 5.5 wt%. The content and compositions were in accordance to the amino acid composition reported previously by other research groups (32, 35).

### 3.3. PROBIOTIC-LOADED MICROPARTICLES

Microparticles, after spray-drying, were collected in the form of cream colour powder. Table 2 shows cell counts before and after the microencapsulation process expressed as Log CFU/g, the bacteria death cycles, and the particle size of the different formulations.

Table 4. Effect of drying agent on final probiotic cell viability and particle size in the microparticles. Data expressed as mean ± SD (n=3 for cell counts; n=300 for particle size).

Sample	Cell viability (Log CFU/g) before encapsulation	Cell viability		Particle size (µm)
		(Log CFU/g) after spray-drying	Bacteria death cycles	
Sp	10.7 ± 0.1	9.6 ± 0.5	1.1 ± 0.5	11 ± 5
Sp 250	9.5 ± 0.1	9.7 ± 0.5	-0.2 ± 0.5	10 ± 3

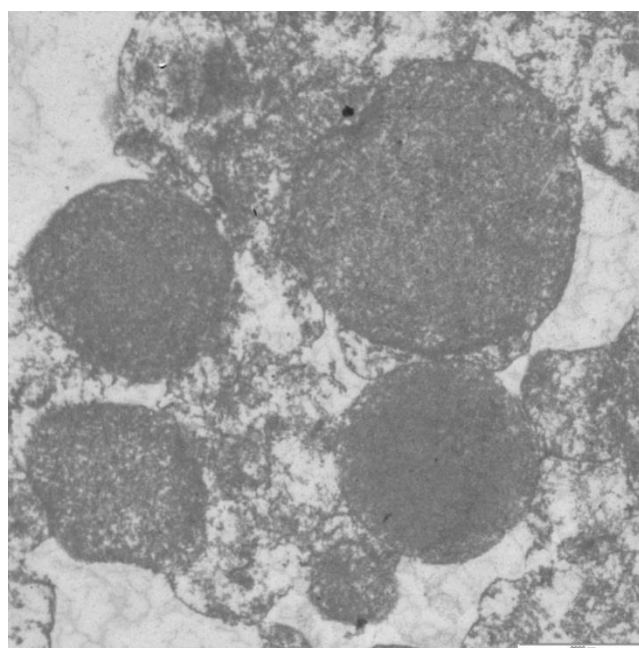
Sample	Cell viability (Log CFU/g) before encapsulation	Cell viability		Particle size (µm)
		(Log CFU/g) after spray-drying	Bacteria death cycles	
Sp 500	9.5 ± 0.1	9.8 ± 0.4	-0.3 ± 0.4	11 ± 5
Sp 750	9.5 ± 0.1	10.0 ± 0.2	-0.5 ± 0.2	11 ± 4
Sc	10.5 ± 0.1	10.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	11 ± 5

*L. plantarum* death cycles were  $1.1 \pm 0.5$  for the soybean protein microparticles formulated with MD as drying agent. However, when the drying agent was partially or totally replaced by OEI (Sp 250, Sp 500 and Sp 750), the overall survival rates of bacteria were of 100%. For *L. casei*, the loss of bacteria during the preparative process of microparticles was of about 0.3 logs.

The mean size, calculated from the histogram of 100 data from three replicates, was calculated to be 11 µm for all microparticles with the exception of Sp 250 in which the mean particle size was 10 µm. Thus, the use of different drying agents did not affect the final cell viability and the particle size.

Fig. 2 shows TEM images both of empty (A) and *L. plantarum*-loaded microparticles (B).

A



**B**

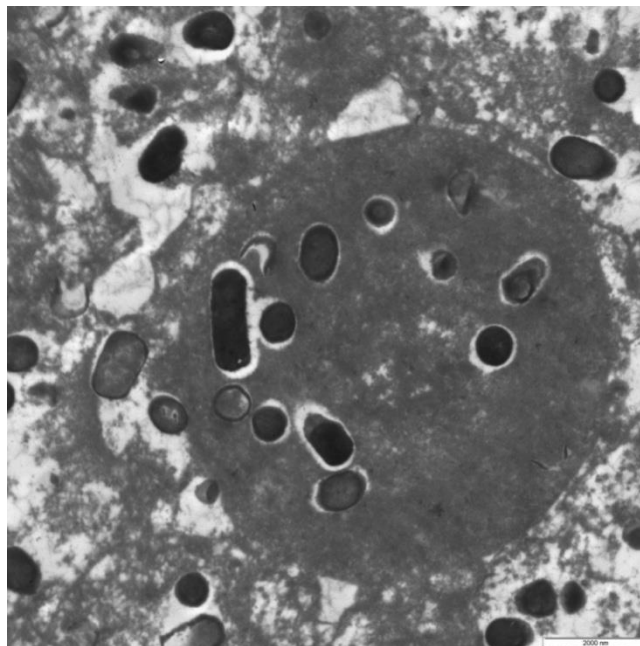


Fig.2. TEM images showing empty (A, x 2520) and *L. plantarum*-loaded microparticles (B, x 2520). The scale in the lower right part represents 2000 nm.

In both cases the shape of microparticles was round and presented a regular and smooth surface. Empty microparticles displayed a continuous structure which is typical of microspheres (36). For bacteria-loaded microparticles, the presence of *L. plantarum* cells can be seen in black, entrapped and distributed in the matrix of the microsphere.

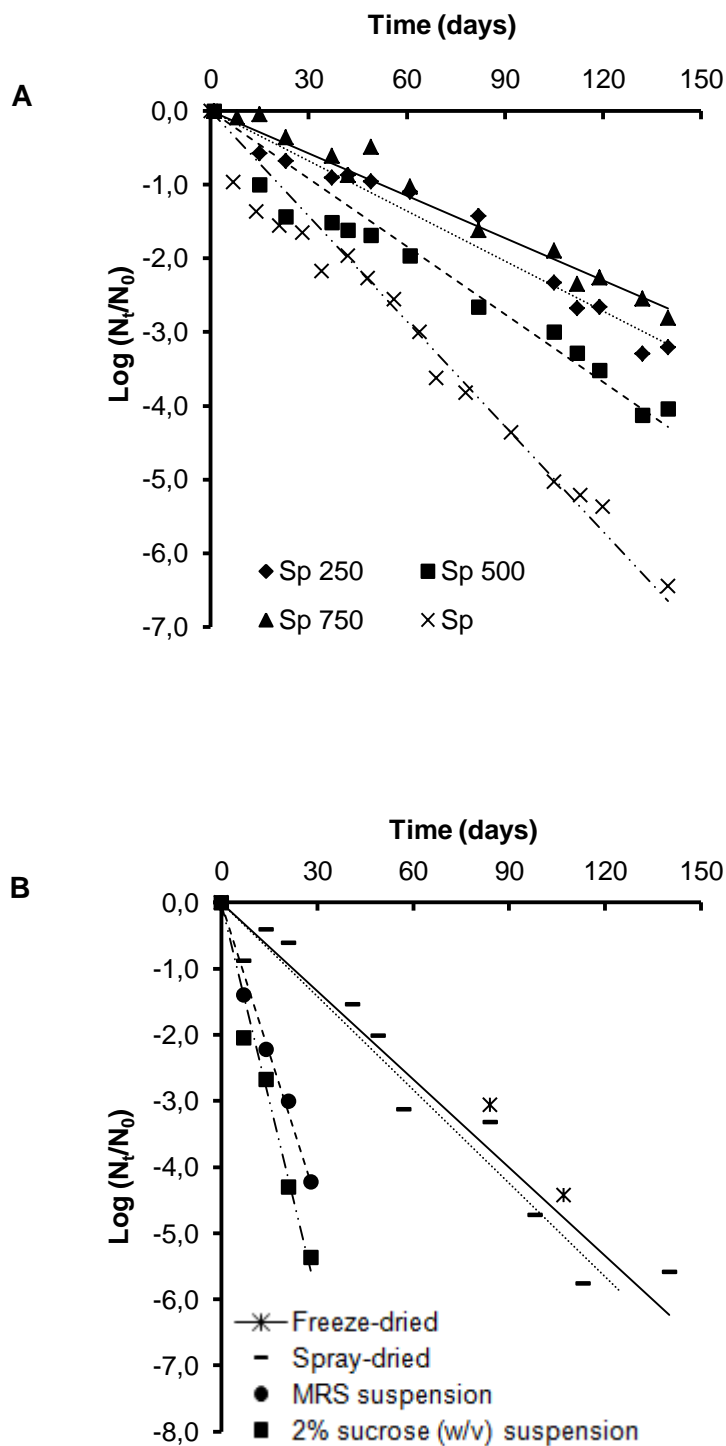
#### **3.4. VIABILITY OF ENCAPSULATED PROBIOTICS DURING STORAGE**

The survival of LAB starter cultures during storage is mainly due to membrane lipid oxidation. Thus, temperature and RH of the LAB starter cultures are key factors that affect the cell viability (37).

*L. plantarum*-loaded (Sp, Sp 250, Sp 500 and Sp 750) and *L. casei*-loaded microparticles (Sc) were stored in 50 mL polypropylene containers in a climate chamber at 25 °C and 60% RH. As controls, non-encapsulated lyophilized, non-encapsulated spray-dried, fresh suspension in MRS culture medium and 2% sucrose (w/v) of the respective probiotic bacteria were studied.



Fig. 3 shows the rate of viability loss of encapsulated *L. plantarum* (A); unencapsulated *L. plantarum* (B); encapsulated *L. casei*; free lyophilized and spray-dried *L. casei* (C); and free *L. casei* suspensions (D) at 25 °C and 60% RH.



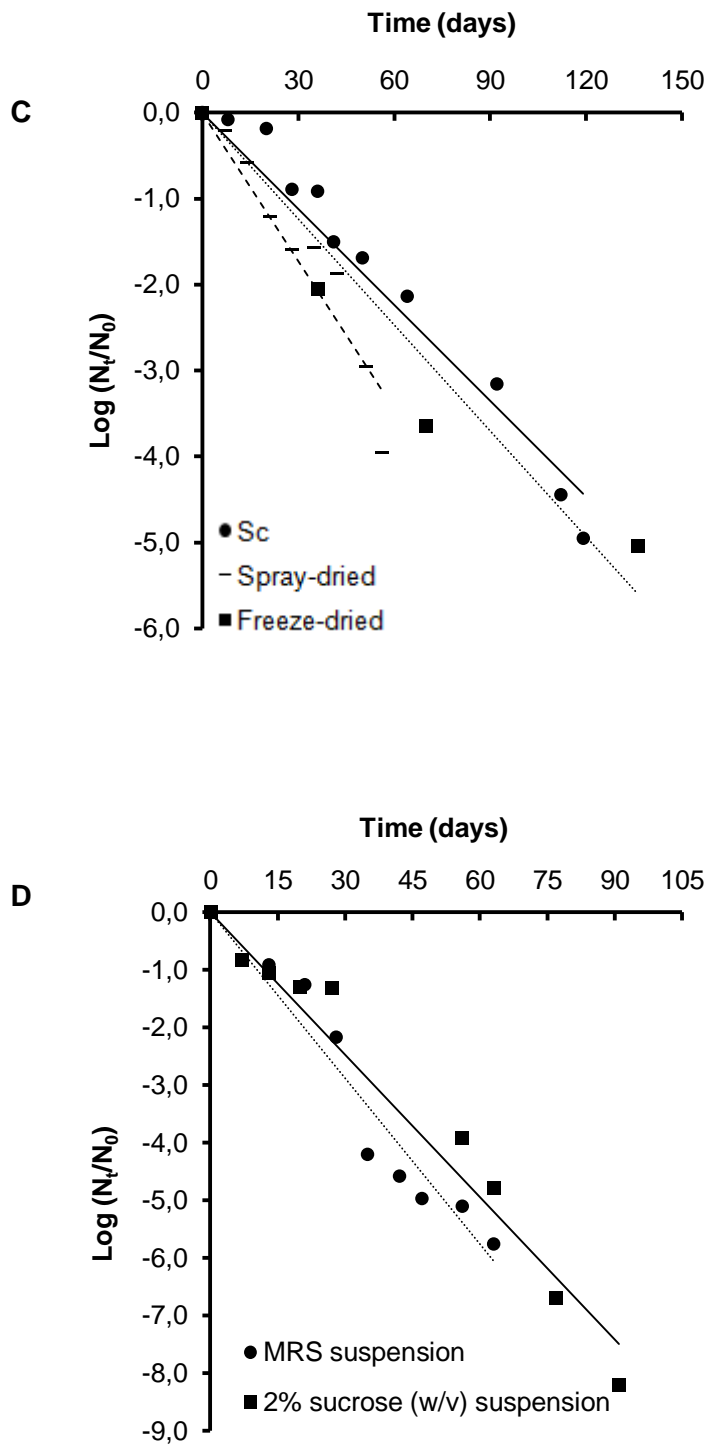


Fig.3. Viability loss under controlled conditions (25 °C/60% RH) over time: (A) *L. plantarum* encapsulated in soybean protein-based microparticles (Sp (---),  $k_{Sp} = -0.047$ ,  $R^2 = 0.962$ ; Sp 250 (.....),  $k_{Sp250} = -0.022$ ,  $R^2 = 0.965$ ; Sp 500 (- - -),  $k_{Sp500} = -0.030$ ,  $R^2 = 0.935$ ; Sp 750 (—),  $k_{Sp750} = -0.019$ ,  $R^2 = 0.971$ ); (B) Non-encapsulated freeze-dried *L. plantarum* (—), ( $k_{Freeze-dried} = -0.043$ ,  $R^2 = 0.950$ ); non-encapsulated spray-dried *L. plantarum* (.....) ( $k_{Spray-dried} = -0.047$ ,  $R^2 = 0.903$ ); fresh concentrated suspension of *L. plantarum* in MRS culture medium (---) ( $k_{MRS} = -0.151$ ,  $R^2 = 0.984$ ) and fresh

concentrated suspension of *L. plantarum* in 2% sucrose (w/v) solution (---) ( $k_{2\% \text{ sucrose}} = -0.198$ ,  $R^2 = 0.971$ ); (C) *L. casei* encapsulated in soybean protein with calcium microparticles in the presence of a protecting agent (Sc (—),  $k_{Sc} = -0.037$ ,  $R^2 = 0.952$ ); non-encapsulated freeze-dried *L. casei* (.....) ( $k_{\text{Freeze-dried}} = -0.041$ ,  $R^2 = 0.912$ ); non-encapsulated spray-dried *L. casei* (---) ( $k_{\text{Spray-dried}} = -0.057$ ,  $R^2 = 0.915$ ); (D) fresh concentrated suspension of *L. casei* in MRS culture medium (.....) ( $k_{MRS} = -0.096$ ,  $R^2 = 0.934$ ) and fresh concentrated suspension of *L. casei* in 2% sucrose (w/v) solution (—) ( $k_{2\% \text{ sucrose}} = -0.082$ ,  $R^2 = 0.966$ ). Linear regression analysis was used to obtain the rate constant,  $k$ , for each formulation.

The viability was adjusted to first-order kinetics ( $R^2 = 0.903$ - $0.984$ ). *L. plantarum* encapsulated with SPC using OEI (Sp 750) as adjuvant in the spray-drying process showed lower rate of viability loss ( $k_{Sp \ 750} = -0.019$ ,  $R^2 = 0.971$ ) than the microparticles encapsulated with SPC using the mixture of MD/OEI (2/1, w/w; Sp 250) ( $k_{Sp \ 250} = -0.022$ ,  $R^2 = 0.965$ ) and MD/OEI (1/2, w/w; Sp 500) ( $k_{Sp \ 500} = -0.030$ ,  $R^2 = 0.935$ ). However, *L. plantarum* encapsulated with SPC using MD as adjuvant during spray-drying showed the highest rate of viability loss ( $k_{Sp} = -0.047$ ,  $R^2 = 0.962$ ), similar to that showed by freeze-dried and spray-dried ( $k_{\text{Freeze-dried}} = -0.043$ ,  $R^2 = 0.950$  and  $k_{\text{Spray-dried}} = -0.047$ ,  $R^2 = 0.903$ , respectively). Thus, *L. plantarum* encapsulated in soybean protein microparticles in the presence of an adjuvant (mixture of MD and OEI or OEI) remained the probiotic concentration ( $\geq 10^7$  CFU/g) between 100 and 158 days, having the best results for that formulation where the MD was totally replaced by OEI (Sp 750). This formulation maintained the probiotic concentration for 5.3 months whereas the freeze-dried or the spray-dried forms lost the probiotic concentration after just over two months. Higher survival rate was found in bacteria when inulin and/or oligosaccharides were used as wall material in combination with others such as alginate, chitosan and whey protein isolate comparing with their respective controls (38, 39). According to Rajam *et al.* (2015), prebiotics might prevent excessive drying due to their moisture retaining capacity, improving the cell viability during storage.

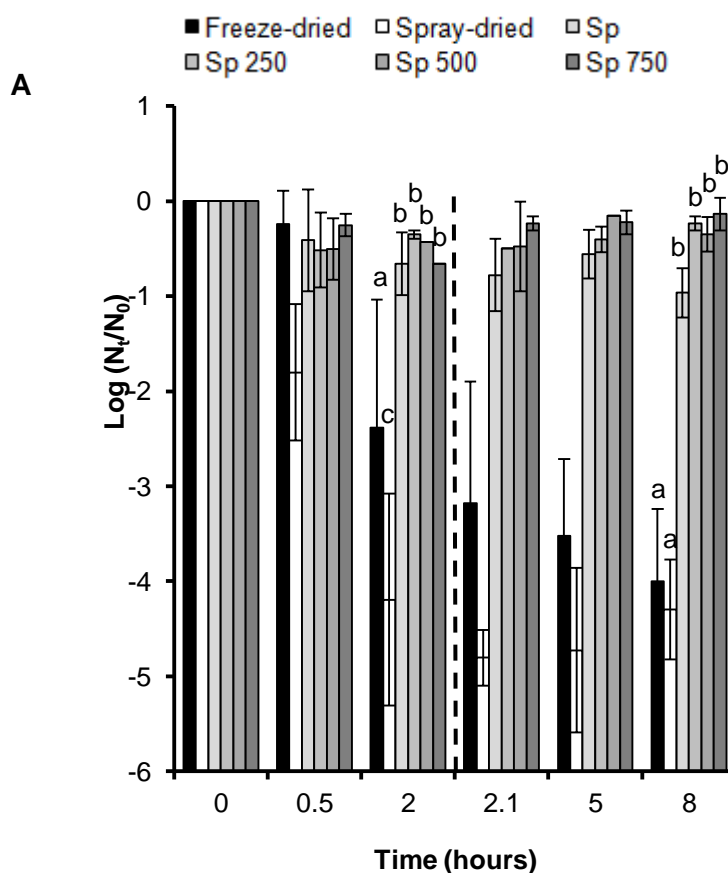
Interestingly, freshly *L. plantarum* suspensions showed the lowest rates of viability both in MRS and 2% sucrose with a  $k$  value of  $-0.151$  and  $-0.198$ , respectively. Thus, the mean probiotic concentration only remained 15 and 20 days for these formulations.

Concerning *L. casei* [Fig.3 (C) and Fig. 3 (D)] the rate of viability loss of bacteria encapsulated in SPC using MD as adjuvant was slightly lower than that observed for

the freeze-dried form, prolonging 10 days the probiotic concentration of  $10^7$  CFU/g. However, by comparing the survival of encapsulated cells with respect to the free spray-dried cells, the viability was improved by one month. Regarding the suspensions, they showed higher rates of viability loss like *L. plantarum* ones, with  $k_{2\% \text{ sucrose}}$  values of -0.082 for 2% sucrose suspension and -0.096 for MRS suspension. Thus, the encapsulation of *L. casei* in SPC enhanced the cell survival in 2 months in these particular cases.

### 3.5. IN VITRO GASTROINTESTINAL RESISTANCE

*In vitro* gastrointestinal resistance assays were performed using microparticles previously stored at 25 °C/60% RH. Fig.4 (A) shows the results obtained for the *L. plantarum*-loaded microparticles (Sp, Sp 250, Sp 500 and Sp 750).



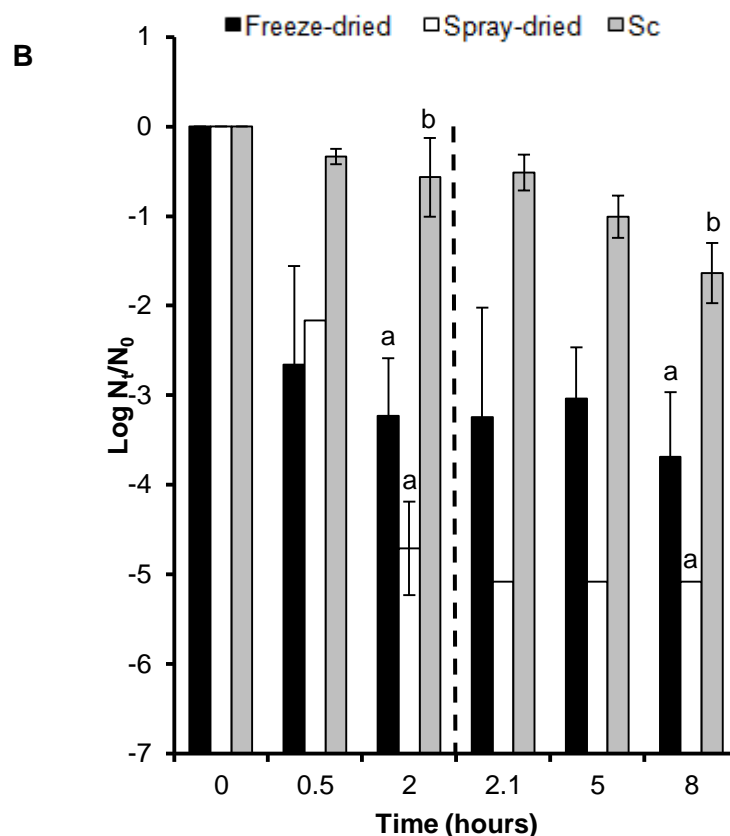


Fig.4. *In vitro* gastrointestinal resistance of probiotic bacteria (A) *L. plantarum* non-encapsulated freeze-dried, *L. plantarum* non-encapsulated spray-dried and *L. plantarum* encapsulated in soybean protein based microparticles (Sp, Sp 250, Sp 500, Sp 750) (B) *L. casei* non-encapsulated freeze-dried, non-encapsulated spray-dried *L. casei* and *L. casei* encapsulated in soybean protein microparticles in the presence of a protecting agent (Sc); in simulated gastrointestinal medium (0 to 2 hours: simulated gastric medium; 2.1 to 8 hours: simulated intestinal medium). Different letters mean statistically significant difference among formulations, according to the Tukey test ( $p < 0.05$ ) in each time evaluated ( $t=2$  h and  $t=8$  h).

Interestingly, for the formulations containing a mixture of MD and OEI (Sp 250, Sp 500 and Sp 750), the number of viable bacteria remained constant in both SGF and SIF. For Sp, a reduction of about one log unit at the end of the experiment (8 h) was observed. On the contrary, the counts of freeze-dried, non-encapsulated and spray-dried bacteria decreased significantly (more than 2 log units,  $p < 0.001$ ) when incubated in SGF. Similarly, at the end of the experiment, the non-microencapsulated

forms of bacteria displayed a reduction of more than 4 logs in the number of viable cells in comparison with probiotic-loaded microparticles ( $p < 0.001$ ).

When *L. casei*-loaded microparticles were evaluated (Fig.4 (B)), there was not any significant variation in the number of viable bacteria after incubation in SGF. However, after incubation in SIF for 8 h, the number of viable counts decreased 1.6 logs. In any case, it is interesting to highlight that, for controls (lyophilized and spray-dried bacteria); the number of viable cells decreased more than 4 logs. This reduction of viability was significant with respect to the soybean protein-based microparticles ( $p = 0.002$  for  $t = 2$  h and  $p = 0.023$  for  $t = 8$  h).

Therefore, the selected microparticles significantly enhanced the tolerance of both *L. plantarum* and *L. casei* to simulated gastrointestinal fluids in 3-4 logarithmic as mean cycles with respect to the non-encapsulated forms at the end of the assays

Our results are in line with those reported by Yang *et al.* (40), who describe the protective effect of encapsulated probiotics with oat protein gels in the simulated gastric environment. After 2 hours, the survival rate was of 29.7% in macroscopic particles (2 mm x 2 mm x 2 mm, after drying). The soybean protein-based microparticles described here appear to provide higher protective capability than oat protein gel particles, with survival rates up to 45% for the Sp 250 microparticles after 2 hours of incubation in SGF.

#### 4. CONCLUSIONS

This study reports the capacity of SPC for encapsulating probiotics in biodegradable microparticles prepared by coacervation and dried by spray-drying. The resulting microparticles, of about 11  $\mu\text{m}$ , showed a spherical matrix in which bacteria were uniformly distributed. The encapsulation of probiotics increased significantly their stability during storage under controlled conditions (25 °C/60% RH). Particularly, *L. plantarum* CECT 220 encapsulated with OEI as carrier agent increased its shelf-life by 52.4% with respect to the lyophilized form. In the case of *L. casei* CECT 475, the soybean-based microparticles provided an increase of viability of 11% during the storage at room temperature.

Additionally, the encapsulation enhanced the tolerance of *L. plantarum* and *L. casei* to simulated gastrointestinal fluids in a mean of 3-4 logarithmic cycles with respect to the respective lyophilized and spray-dried forms, assuring that a probiotic

concentration may reach the intestine, where these bacteria would exert their physiological activity.

Considering the results of the storage viability, the soybean based microparticles that showed the most significant improvement in the *L. plantarum* shelf-life was Sp 750 formulation, in which the drying agent was OEI. Taking into account that all *L. plantarum*-loaded microparticles enhanced significantly the *in vitro* gut resistance of the LAB strain, this formulation conferred the best protection.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge the grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (code IPT-2011-1717-900000) and the grant from the Navarre Government (code IIM14256.RI1) for co-financing the project *ADITIVOS ENCAPSULADOS (ADICAP)*. The present work was funded by the Spanish National Plan I+D+i and the Navarre Plan Tecnológico.

The authors gratefully acknowledge Iparlat S.A., especially José Alberto Larrauri, for the supply of soybean flours.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interests.

## REFERENCES

1. Miyoshi J, Chang EB. The gut microbiota and inflammatory bowel diseases. *Translational Research*. 2017;179:38-48.
2. Sen T, Cawthon CR, Ihde BT, Hajnal A, DiLorenzo PM, de La Serre CB, et al. Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity. *Physiology & Behavior*. 2017;173:305-17.
3. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science (New York, NY)*. 2013;341(6141):1237439-.
4. Hod K, Ringel Y. Probiotics in functional bowel disorders. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2016;30(1):89-97.
5. Zoumpoulou G, Pot B, Tsakalidou E, Papadimitriou K. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal*.
6. Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(1):66-U90.
7. FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina; 2001.
8. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *International journal of food microbiology*. 1998;39(3):237-8.
9. Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2010;3(5):307-19.
10. Lee Y-K, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 1995;6(7):241-5.
11. Saier MH, Jr., Mansour NM. Probiotics and prebiotics in human health. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2005;10(1):22-5.
12. Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *Jornal de pediatria*. 2015;91(1):6-21.
13. Farnworth ER, Champagne C. Production of probiotic cultures and their incorporation into foods. 2010. p. 3-17.



14. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012;162(1):56-67.
15. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 2004;14(8):737-43.
16. Ding WK, Shah NP. Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria. *Journal of Food Science*. 2009;74(2):M100-M7.
17. O'Riordan K, Andrews D, Buckle K, Conway P. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91(6):1059-66.
18. Dianawati D, Mishra V, Shah NP. Survival of Bifidobacterium longum 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food Research International*. 2013;51(2):503-9.
19. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-7.
20. Regulation (EU) N° 1348/2013 of 16 December 2013 amending Regulation (EEC) N° 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis, (2013).
21. A.O.A.C. Official methods of analysis of the A.O.A.C.: Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods. Enzymatic-Gravimetric Method MES-TRIS Buffer. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists 1992.
22. White CA, Kennedy JF. HPLC in food analysis. Edited by R. Macrae, Academic Press, London, 1982. Pp XII + 340. ISBN 0-12-464780-4. *British Polymer Journal*. 1983;15(4):244.
23. Regulation (EU) N° 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) N° 1924/2006 and (EC) N° 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) N° 608/2004, (2011).

24. Ma CY, Liu WS, Kwok KC, Kwok F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International*. 1996;29(8):799-805.
25. ISO. ISO 13903:2005 Animal feeding stuffs: Determination of amino acids content. 2005.
26. ISO. ISO 13904:2016 Animal feeding stuffs: Determination of tryptophan content. 2016.
27. Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*. 2003;36(9–10):895-904.
28. Bainy EM, Tosh SM, Corredig M, Poysa V, Woodrow L. Varietal differences of carbohydrates in defatted soybean flour and soy protein isolate by-products. *Carbohydrate Polymers*. 2008;72(4):664-72.
29. Yu X, Yuan F, Fu X, Zhu D. Profiling and relationship of water-soluble sugar and protein compositions in soybean seeds. *Food Chemistry*. 2016;196:776-82.
30. Berk Z. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans 1992.
31. Tan E-S, Ying-Yuan N, Gan C-Y. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. *Food Chemistry*. 2014;152:447-55.
32. Samoto M, Maebuchi M, Miyazaki C, Kugitani H, Kohno M, Hirotsuka M, et al. Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chemistry*. 2007;102(1):317-22.
33. Chen N, Zhao M, Chassenieux C, Nicolai T. Data on the characterization of native soy globulin by SDS-Page, light scattering and titration. *Data in Brief*. 2016;9:749-52.
34. García MC, Torre M, Laborda F, Marina ML. Rapid separation of soybean globulins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997;758(1):75-83.
35. Kalman DS. Amino Acid Composition of an Organic Brown Rice Protein Concentrate and Isolate Compared to Soy and Whey Concentrates and Isolates. *Foods* [Internet]. 2014 January 31, 2016; (3):[394-402 pp.].

36. Singh MN, Hemant KSY, Ram M, Shivakumar HG. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2010;5(2):65-77.
37. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*. 2008;105(1):1-13.
38. Krasaekoopt W, Watcharapoka S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *Lwt-Food Science and Technology*. 2014;57(2):761-6.
39. Rajam R, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *Lwt-Food Science and Technology*. 2015;60(2):773-80.
40. Yang C, Wang Y, Chen L. Fabrication, characterization and controlled release properties of oat protein gels with percolating structure induced by cold gelation. *Food Hydrocolloids*. 2017;62:21-34.



## **CAPÍTULO 4**

***Encapsulation of probiotics in soybean protein-based microparticles preserves viable cell concentration in foods all along the production and storage processes***

---

**Manuscript submitted for publication at Journal of Food Engineering**

**C. González-Ferrero, J.M. Irache, B. Marín-Calvo, L. Ortiz-Romero, R. Virto-Resano, C.J. González-Navarro**



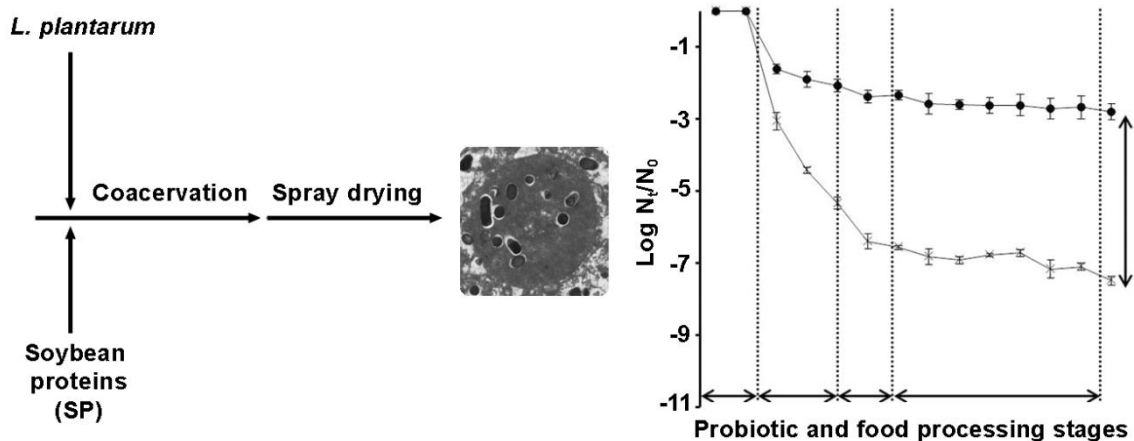
## ABSTRACT

This work studies the influence on the stability of *Lactobacillus plantarum* CECT 220 (25 °C/60% relative humidity, RH) of microencapsulation by simple coacervation followed by spray-drying using different Ca<sup>2+</sup>-to-soybean protein isolate (SPI) ratios. After optimization, the selected soybean protein concentrate microparticles (SPC-MP) were used to evaluate the tolerance of *L. plantarum* under acidic conditions (lactic acid, pH = 4; and HCl, pH = 3) and heat stress (80 °C for 1 min) in contrast to free cells. Moreover, after the heat treatment, the influence of the simulated gastric fluid (SGF) was evaluated. Additionally, different foods were formulated using either microencapsulated or freeze-dried *L. plantarum*, and the stability of cells during the shelf-life of the formulated foods was studied. Results show that SPC-MP encapsulation enhanced significantly the stability of the Lactic Acid Bacteria (LAB) all along the probiotic food value chain, from production to the end of the food shelf-life.

## HIGHLIGHTS

- The Ca<sup>2+</sup>-to-SPI ratio determines the quality of MP
- MP enhanced significantly the viability of *L. plantarum* under acidic conditions
- SP-based MP offered a significant resistance against heat treatment
- MP did not offer improvements on the viability of *L. plantarum* in foods

## GRAPHICAL ABSTRACT



**KEYWORDS**

Soybean proteins, Probiotics, Encapsulation, Thermal resistance, Gastric resistance, Probiotic food value chain



## 1. INTRODUCTION

The intestinal human microbiota has been considered as an “essential organ” because of its relevant role in the basic human biologic processes (1). It is constituted for more than  $10^{14}$  of live microorganisms (2) such as bacteria, bacteriophages, fungi, protozoa, archaea and viruses (3). The gut microbiota contributes to the lipid, carbohydrate and protein homeostasis and to the synthesis and transport of essential vitamins such as folates, vitamin K, or biotin and other B- vitamins (4, 5). The microbial imbalance in the microbiota or dysbiosis might be induced by changes in the number of microorganisms of the different populations, in their metabolic activity or even in their location. In general, dysbiosis can be classified into three categories: 1) loss of beneficial microorganisms; 2) excessive proliferation of potentially harmful microorganisms, and 3) loss in the diversification of microbial population in different gut segments (6). There are scientific evidences that relate the gut imbalance to non-transmissible diseases such as obesity (7), high blood pressure (8), irritable bowel syndrome (9), arthritis (10), allergic asthma (11), cardiovascular diseases (12), cancer (13), diabetes (14), and neurological disorders such as anxiety (15), autism spectrum syndrome (16), dementia (17), Alzheimer (18), and Parkinson (19). Despite the efforts to understand the mechanisms involved in these relationships, nowadays it is unclear if the disorders are causative, contributory, or consequential to the microbial imbalance (3). Thus, the term probiotic defines the living microorganisms, which when consumed in adequate amount, may offer a healthy effect on the host (20). In this sense, it is accepted that the use of probiotics as “bio-therapeutics” might contribute to the restore of the gut microbial ecosystem balance, and consequently, promote the health of the host (21, 22). The most common probiotics are bacteria from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* (23) although there are other microorganisms such as yeast species considered as probiotics (24).

Even though some studies have reported positive effects on the immune response as a consequence of the treatment with non-viable probiotics or their metabolites (25), the World Health Organization recommends to define probiotics as “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (26) so, nowadays cell viability at the moment of intake, is compulsory to get a health claim in relation to probiotics.

The stability of probiotics in food processing and food formulation can be influenced by different factors: 1) physical-chemical properties of food such as pH,

oxygen content, water activity or additive composition; 2) processing parameters (i.e.: thermal treatments, freezing-thawing steps, packaging, storage conditions, production scale, way of reconstitution of the inoculum or the food) and, 3) microbial parameters: type of strains, inoculum concentration, broth conditions (27). Additionally, probiotics are faced to other challenges before reaching the gut mucosa, including the stomach acid pH as well as the presence of digestive enzymes and bile salts in the upper regions of the small intestine (28).

In order to improve the stability of probiotics, microencapsulation is presented as one of the most efficient solutions not only to maintain their viability during processing and storage, but also to ensure their activity within the gut (29). The use of carbohydrates as wall materials, including alginate (30), and proteins such as SPI have been proposed for the oral delivery of probiotics (31). However, microencapsulation of probiotics still faces to a number of challenges, including the viability of cells during the total food value chain as it is required for bioactive compounds (32). In addition, the formulation of the encapsulated probiotics must be easily scalable from both, technical and economic points of view.

Recently, SP-based MP with improved stability during storage and gut resistance for two probiotic strains (*Lactobacillus plantarum* CECT 220 and *Lactobacillus casei* CECT 475) have been developed (González-Ferrero, Irache, & González-Navarro, 2018). In this work, the influence of factors influencing the stability of probiotics on their food value chain is evaluated. For this purpose, the influence of the Ca<sup>2+</sup>-to-SPI ratio on the microencapsulation of probiotics by simple coacervation was firstly studied. Then, the viability of the resulting MP as a function of pH and in suitable foods for probiotics delivery was also evaluated.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. MATERIALS**

SPC was extracted from soybean flour, a by-product obtained from the production of soybean milk, which was kindly provided by Iparlat S.A. (Urnieta, Guipúzcoa, Spain). Commercial SPI, Pro-Fam® 646, was contributed by Archer Daniels Midland Company (Chicago, USA). Calcium chloride was acquired from Panreac (Barcelona, Spain).

Probiotic bacteria strain *Lactobacillus plantarum* CECT 220 was purchased from the *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT) - University of Valencia (Valencia, Spain). MRS broth and Buffered Peptone Water (BPW) broth were acquired from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Maltodextrin (MD) Glucidex® 21 and the oligofructose-enriched inulin (OEI) Orafty® Synergy1 were kindly provided by Roquette Frères (Lestrem, France) and Beneo GmbH (Mannheim, Germany), respectively.

The enzymes and reagents used for the formulation of the SGF were provided by Sigma (Barcelona, Spain) except  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  which was acquired from Panreac (Barcelona, Spain). Lactic acid and HCl were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

Fresh orange juice and fresh whole milk (Lactalis Puleva S.L., Spain) were purchased from a supermarket. Commercial dairy infant formula, Nativa ProExcel 1 OPTIPRO® (Nestlé, France), natural fermented dairy drink, Actimel 0% (Danone España, Barcelona – Spain) and spring water used for the reconstitution of the infant dairy formula into baby feeding bottles (Espinelves, Spain) were purchased from commercial retailers.

## 2.2. PROBIOTICS PRODUCTION

Commercial freeze-dried *L. plantarum* was revitalized in a MRS broth at 37 °C under anaerobic atmosphere (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in anaerobic chamber (MACS 500 AIRLOCK, AES Chemunex, Spain).

A 100 µL aliquot of the pre-culture was transferred to 10 mL MRS broth in sterile conditions. After incubation for 12 hours/37 °C under anaerobic conditions, a cell count was performed in a microscope using a Thoma chamber in order to calculate the volume of the inoculum. This latter was transferred to a 50 mL flask containing MRS broth up to a final count of  $10^6$  CFU/mL. Afterwards, the flasks were incubated at conditions described above for 24 hours until reaching the early stationary growth phase. The bacterial population was tracked and counted by means of seeding decimal dilutions using 0.1% BPW broth in MRS agar at each sampling time.

The final working suspensions were prepared by centrifugation of a volume of 2 L MRS broth suspension at  $15,317 \times g$  for 10 minutes. Supernatant was removed and

the pellet was washed twice and resuspended in a 2% (w/v) sucrose solution. The counts of final suspensions were around  $10^{10} - 10^{11}$  CFU/mL.

Freeze-dried LAB was prepared from 2% sucrose (w/v) suspensions by freeze-drying using a LyoAlfa equipment from Telstar (Terrassa, Spain).

### 2.3. PROBIOTIC-LOADED MP FORMULATION

The probiotic bacteria MP were prepared according to the method described previously (33) with some modifications. In the present study, a commercial SPI was tested to evaluate the influence of the  $\text{Ca}^{2+}$ -to-SPI ratio on the morphology and the stability of the resultant MP. Concretely, two  $\text{Ca}^{2+}$ /SPI ratios were studied: 1:35 and 1:122 (w/w).

Briefly, 750 mg SPI were dissolved in 25 mL carbonate buffer (pH = 10) by magnetic stirring for 20 minutes at room temperature. The resulting mixture was centrifuged at  $9,600 \times g$  for 10 min and the clear supernatant was collected. In parallel, 2 L *L. plantarum* suspension was washed twice with 25 mL of an aqueous solution of sucrose (2% w/v), centrifuged at  $5,311 \times g$  for 10 minutes and, finally, resuspended in 50 mL of a 2% sucrose aqueous solution. The mean count for *L. plantarum* was  $2.9 \times 10^{10}$  CFU/mL for the preparation of MP.

For the formulation of the *L. plantarum*-loaded MP, 2 mL of the bacterial suspension was added to 25 mL of the SPI supernatant. After five minutes of incubation under magnetic stirring, 0.2% (w/v) calcium chloride solution was added (8.5 mL for the  $\text{Ca}^{2+}$ /SPI ratio of 1:122, and 30 ml for the  $\text{Ca}^{2+}$ /SPI ratio of 1:35). The resultant mixture was incubated for 20 minutes under stirring and then MD, previously dissolved in the minimum possible amount of water, was added in a weight ratio SPI/MD of 1:1.

Finally, the suspension was spray-dried using a Büchi B-290 Mini Spray-Dryer. The parameters of this process were as follows: air inlet temperature, 90 °C; air outlet temperature, 64 °C  $\pm$  2 °C; suction, 100%; sample pumping rate, 3.5 mL/min; air pressure, -60 mbar and air flow rate of 600 L/h.

Table 1 shows the composition of the different *L. plantarum*-loaded MP formulated in the present work and the count cell of the control samples and the MP before and after the food formulations.

Table 1. Composition of *L. plantarum*-loaded MP and count cell of *L. plantarum* control samples and MP containing *L. plantarum* used for the different experiments.

Experiment	SP	Ca <sup>2+</sup> /SP	SP/drying agent ratio (w/w)	Drying agent	<i>L. plantarum</i> concentration in suspensions (CFU/mL) or <i>L. plantarum</i> freeze-dried (CFU/g) before the formulation with simulants or foods	<i>L. plantarum</i> loaded MP concentration before simulant and food formulation (CFU/g)
Weight ratio Ca <sup>2+</sup> /SPI	SPI	1:35	1:1	MD	2.9 x 10 <sup>10</sup>	2.7 x 10 <sup>10</sup>
		1:122				1.2 x 10 <sup>10</sup>
Viability under acidic conditions (lactic acid, pH=4)	SPC	1:35	1:1	MD	3.9 x 10 <sup>10</sup>	4.1 x 10 <sup>9</sup>
Viability under acidic conditions (hydrochloric acid, pH=3)	SPC	1:35	1:1	MD	3.9 x 10 <sup>10</sup>	4.1 x 10 <sup>9</sup>
Stability under heat and SGF conditions	SPC	1:35	1:1	OEI	1.3 x 10 <sup>11</sup>	2.8 x 10 <sup>10</sup>
Stability in fresh orange juice	SPC	1:35	1:1	MD	3.4 x 10 <sup>11</sup>	4.8 x 10 <sup>10</sup>
Stability in fresh milk	SPC	1:35	1:1	MD	7.1 x 10 <sup>10</sup>	4.8 x 10 <sup>10</sup>
Stability in fermented dairy milk	SPC	1:35	1:1	OEI	1.2 x 10 <sup>11</sup>	9.1 x 10 <sup>10</sup>
Stability in dairy infant formula	SPC	1:35	1:1	OEI	2.4 x 10 <sup>11</sup>	1.2 x 10 <sup>11</sup>

## **2.4. CHARACTERIZATION OF MP**

### **2.4.1. SIZE AND MORPHOLOGY**

The dried bacteria-loaded MP were resuspended in BPW and observed using a Nikon ECLIPSE 55 microscope with Colorview Software Imaging Systems Camera DS-L2 (Tokyo, Japan). The size was determined by measuring the diameter of 100 MP.

### **2.4.2. QUANTIFICATION OF SURVIVAL BACTERIA FRACTION IN PROBIOTIC-LOADED MP AND FORMULATIONS CONTAINING THOSE MP**

The quantification of the viability of bacteria in probiotic-loaded MP, simulants and food formulations containing those MP were performed according to the method described previously (33). Briefly, the samples were accurately weighed in an analytical balance (Sartorius, SAR ME 235S, Göttingen, Germany), dispersed in 1 mL BPW broth (0.1% w/v) under vortex agitation for a few seconds and then homogenized in an orbital shaker (Eppendorf AG, Mixmate, Hamburg, Germany) at 900 rpm for 1 hour. After the disruption of MP, confirmed by optical microscopy, decimal dilutions were performed in 0.1% BPW broth (w/v) and seeded in MRS plates. After incubation at 37 °C under anaerobic conditions for 24-48 hours, colony counts were performed and the bacterial death cycles were determined using the following equation:

$$\text{Bacterial death cycles} = \text{Log (initial CFU/g)} - \text{Log (recovered CFU/g)} \quad [1]$$

In which the *Log (initial CFU/g)* was the amount of bacteria initially included in the preparative process (before the drying process) per gram of formulation, and *Log (recovered CFU/g)* represented the counts of viable bacteria obtained at the end of the preparative process of MP.

In addition, the bacteria loading was expressed in terms of number of viable bacteria per mass of formulation and calculated as follows:

$$\text{Bacteria loading} = A/B \quad [2]$$

In which *A* is *Log (recovered CFU)* and *B* the mass of powder containing the MP or the mass of food formulation.

## 2.5. EVALUATION OF THE Ca<sup>2+</sup>-TO-SPI RATIO IN THE STABILITY OF PROBIOTIC-LOADED MP DURING STORAGE UNDER TEMPERATURE AND RH CONTROLLED

Probiotic-loaded MP were stored in 50 mL sterilized polypropylene containers in a climate chamber (Memmert GmbH, HPP108, Schwabach, Germany) at 25 °C and 60% RH.

The logarithmic plot of the relative viability ( $\text{Log } N_t/N_0$ ) versus storage time ( $t$ , days) was fitted to a first order reaction kinetics model for the Ca<sup>2+</sup>-to-SPI ratio of 1:35 and to a second order polynomial model for the Ca<sup>2+</sup>/SPI ratio of 1:122 as described by the following equations, respectively:

$$\text{Log } (N_t/N_0) = k_t t \quad [3]$$

$$\text{Log } (N_t/N_0) = k_t t^2 + k'_t t \quad [4]$$

Where  $N_t$  represents the total viable bacteria at a particular storage period (in CFU/g), and  $N_0$  represents the number of viable cells at the beginning of storage (in CFU/g),  $t$  is the storage time (in days),  $k_t$ , and  $k'_t$  are the specific rates of viability loss at 25 °C/60% RH per day.

## 2.6. CONTROLLED RELEASED IN ACIDIC CONDITIONS

A lactic acid solution with (pH = 4) and a 0.001 M HCl solution (pH = 3) were prepared in a final volume of 1 L each one. A 2% (w/v) sucrose *L. plantarum* suspension  $3.9 \times 10^{10}$  CFU/mL was added to the acid solutions until final concentration of  $10^7$ - $10^8$  CFU/mL, considered probiotic. Similarly, *L. plantarum*-loaded MP ( $4.1 \times 10^9$  CFU/g) were accurately weighed to be added to the acid solutions to achieve final concentration of  $10^7$ - $10^8$  CFU/mL. In the particular case of the HCl solution, and due to the low stability of fresh bacteria in such medium, freeze-dried cells were also used as a second control. The final suspensions were stored at 4 °C and samples were collected over time and cell counts performed in MRS agar plates as described above.

## 2.7. VIABILITY OF PROBIOTICS DURING HEAT AND SGF TREATMENTS

Viability of *L. plantarum*-loaded soybean MP during heat treatment was performed following the method described by Chen, Chen and Kuo (2007) with slight modifications. 5 mg of freeze-dried microorganisms and 5 mg of microencapsulated

bacteria were incubated in a water bath at 80 °C for 1 min with agitation and, afterwards, cell count was measured. Resistance to the SGF was evaluated by adding 1 mL of SGF into each sample and incubated at 37 °C for 2 h under orbital agitation at 150 rpm. The SGF was prepared as follows: 2.0 g NaCl and 3.2 g pepsin were dissolved in 7.0 mL HCl and sterilized water was added to make 1 L. The pH of SGF was fixed to  $2.5 \pm 0.1$ . After 2 h of incubation, the tubes were centrifuged and the amount of viable bacteria calculated.

For analysis, once the samples were centrifuged, the pellets were treated for MP disruption and the viable bacteria count was performed in MRS agar, as described in Section 2.3. The survival of bacteria during the heat or the SGF treatments was expressed in terms of relative viability (a ratio of viable cells at time  $t$  to that time zero in hours). Each experiment was repeated twice, performing three replicates each time.

## **2.8. EVALUATION OF THE VIABILITY OF BACTERIA-LOADED MP IN FOOD FORMULATIONS DURING STORAGE UNDER CONTROLLED CONDITIONS**

### **2.8.1. FRESH ORANGE JUICE AND FRESH MILK**

Freeze-dried and microencapsulated *L. plantarum* were accurately weighed in quantity enough to achieve a probiotic concentration and added to 250 mL crystal bottles containing 200 mL of commercial fresh orange juice or fresh milk. Samples were stored at 4 °C and cell count was performed over time, following the disruption protocol of microcapsules described previously for all the samples, including the control non-encapsulated samples.

All the probiotic food formulations were prepared in duplicate and the cell count was carried out by triplicate over each bottle or flask.

### **2.8.2. INFANT DAIRY FORMULA RECONSTITUTED IN WATER**

For the preparation of probiotic infant dairy formula, freeze-dried bacteria and *L. plantarum*-loaded MP were weighed and added into 50 mL polypropylene jars and blended with 20 g of the infant dairy formula. The final count for both types of samples was around  $10^7$ - $10^8$  CFU/g.



12.9 g of infant dairy formula were weighed into baby feeding bottles. 10 mg of freeze-dried or microencapsulated *L. plantarum* were added and mixed into the baby bottles in order to obtain a probiotic concentration after reconstitution with water.

The reconstitution of the final probiotic product was performed according the indications of the infant dairy formula manufacturer. Spring water was heated up to boiling point, cooled up to 40 °C and then 90 mL were added into each baby bottle and manually mixed. Samples were taken to evaluate the stability of the bacteria by counting cells every 15 min up to 60 min following the disruption method described above.

The baby bottles were prepared in duplicate and the cell count over time was performed in triplicates.

### **2.8.3. FERMENTED DAIRY DRINK TREATED BY HIGH HYDROSTATIC PRESSURE (HHP)**

Commercial fermented dairy drink was treated by HHP in order to eliminate microorganisms that might interfere with probiotic inoculations. A vertical Single Vessel High Pressure System FPG 11500.B (Stansted Fluid Power LTD, Stansted, UK) with a pressure vessel (11 cm diameter and 55 cm height) of 5 L capacity and 800 MPa pressure limit was used for the HHP treatment. The pressurization medium was a mixture of distilled water and propylene glycol (50:50, v/v). The rate of pressurization was 4 MPa s<sup>-1</sup> and depressurization time was lower than 40 s. Pressure measurement was conducted with a strain gauge transducer connected with a PLC computer to monitor pressure and control system cycle. Temperature was measured with five T-type thermocouples (Stansted Fluid Power LTD). The commercial plastic bottles were placed in sealed vacuum bags. Vessel temperature was set at 20 °C. The HHP was set at 600 MPa for 5 min. After the treatment, the samples were cooled at 4 °C. LABs, molds and yeasts were analysed by cell counting using MRS and TSA-YE plates, respectively, in order to confirm product pasteurisation.

200 mL of this pasteurised fermented dairy drink were inoculated in duplicate with freeze-dried *L. plantarum* and *L. plantarum*-loaded MP and samples were homogenised. The final viable cells was around 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU/mL. Samples were stored at 4 °C and LAB count was performed over time for 4 weeks in triplicate. The method

used for the determination of the probiotic viability included the disruption method described in Section 2.3.

## 2.9. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical approach was conducted using STATGRAPHICS® Centurion XVII software. The differences in the cell viability after heat treatment and SGF treatment between the control samples (freeze-dried *L. plantarum*) and the *L. plantarum*-loaded microcapsules were assessed using a multifactor analysis of variance (ANOVA). As significant interaction was observed, one-way ANOVA with Tukey's honestly significant difference (HSD) post-hoc test was finally used. The level of significance was considered at  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. INFLUENCE OF THE $\text{Ca}^{2+}$ /SPI RATIO IN THE FORMULATION OF PROBIOTIC-LOADED SP MP

SPI-MP containing *L. plantarum* were formulated using two different  $\text{Ca}^{2+}$ -to-protein ratios (1:122 and 1:35 by weight). When a  $\text{Ca}^{2+}$ -to-SPI ratio of 1:35 was used, the coacervation of proteins (induced by the addition of calcium) produced uniform dispersions of MP. By contrast, at a  $\text{Ca}^{2+}$ -to-SPI ratio of 1:122, irregular and macroscopic aggregates of the protein were observed. This result is in line with some studies reporting the effect of increasing the ionic strength of aqueous solutions on the reduction of effective electrostatic interactions between protein molecules and, therefore, in their aggregation (34).

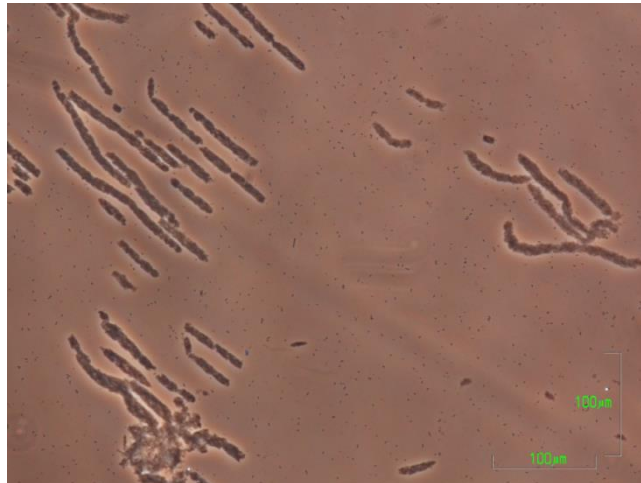
In all cases, MP were dried in a spray-drying apparatus and characterized in order to determine their viable cell count. The MP were collected in the form of an odorless cream colour powder and presented a payload of  $1.2 \times 10^{10}$  CFU/g (for MP prepared at a  $\text{Ca}^{2+}$ -to-protein ratio of 1:122) and  $2.7 \times 10^{10}$  CFU/g (for MP prepared at a  $\text{Ca}^{2+}$ /SPI weight ratio of 1:35) (Table 2).

Table 2. Initial count cell of *L. plantarum* control samples and MP containing *L. plantarum* in the different stability experiments.

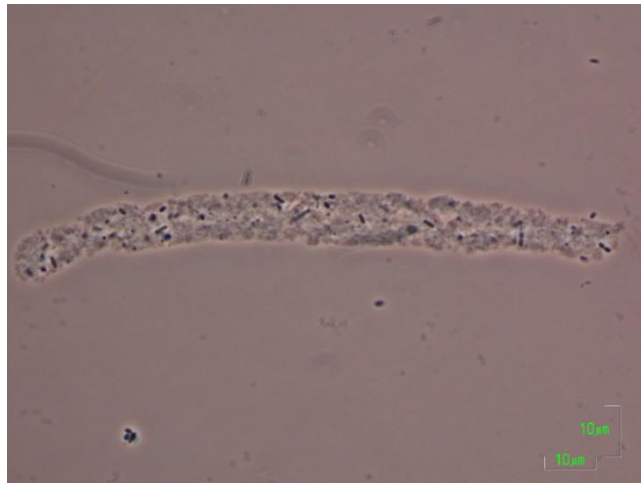
Experiment	Type of control sample	<i>L. plantarum</i> concentration in control samples: simulants, drinks (CFU/mL) and dairy infant formula (CFU/g) (t=0)	<i>L. plantarum</i> concentration in simulants, drinks (CFU/mL) and dairy infant formula (CFU/g) formulated with <i>L. plantarum</i> encapsulated (t=0)
Viability under acidic conditions (lactic acid, pH=4)	2% (w/v) sucrose suspension	$4.4 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$
Viability under acidic conditions (hydrochloric acid, pH=3)	2% (w/v) sucrose suspension + freeze-dried	$1.5 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$
Stability in fresh orange juice	Freeze-dried	$6.3 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$
Stability in fresh milk	Freeze-dried	$1.4 \times 10^7$	$2.2 \times 10^7$
Stability in fermented dairy milk	Freeze-dried	$1.2 \times 10^8$	$9.3 \times 10^7$
Stability in dairy infant formula	Freeze-dried	$7.4 \times 10^7$	$9.4 \times 10^7$

Additionally, bacteria-loaded MP prepared at a  $\text{Ca}^{2+}$ -to-SPI ratio of 1:122 presented an elongate or fusiform morphology with a mean size higher than 100  $\mu\text{m}$  of length and around 10  $\mu\text{m}$  of width (Figures 1A and 1B). On the contrary, MP formulated with a  $\text{Ca}^{2+}$ -to-SPI ratio of 1:35 showed a uniform rounded morphology with a mean size of 10  $\mu\text{m}$  (Figures 1C and 1D). In both cases, *L. plantarum* appeared to be entrapped into the MP.

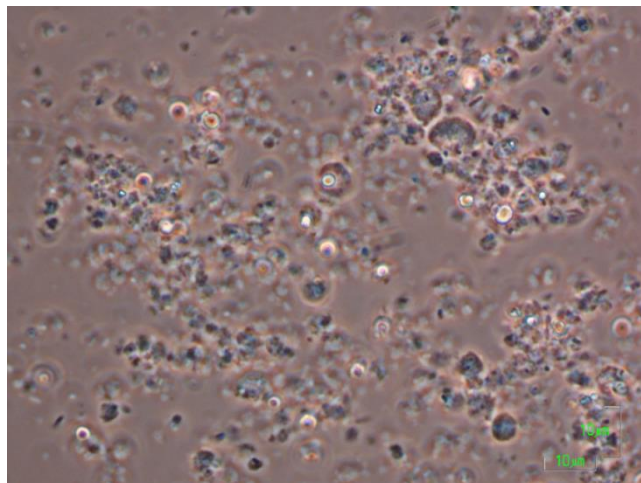
A



B



C



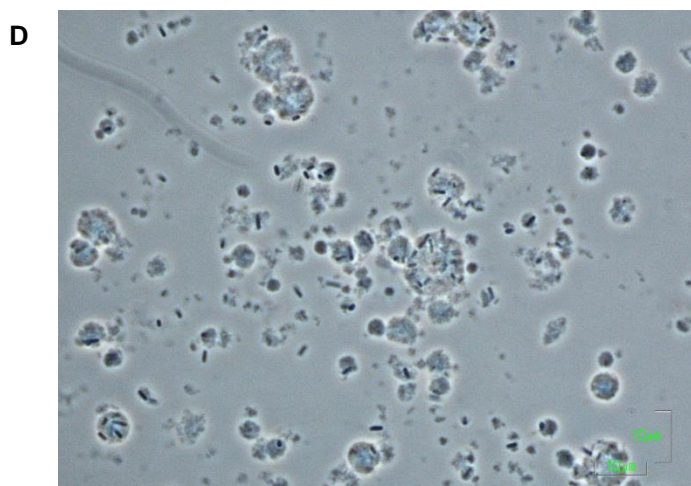


Figure 1. Optical microscopy images of *L. plantarum*-loaded MP using a  $\text{Ca}^{2+}$ /SPI ratio of: (A) 1:122 (w/w), before drying (40x); (B) 1:122 (w/w), after drying (100x); (C) 1:35 (w/w), before drying (100x) and; (D) 1:35 (w/w), after drying (100x).

Figure 2 shows the viability of probiotics microencapsulated in SP MP, when stored at 25 °C/60% RH.

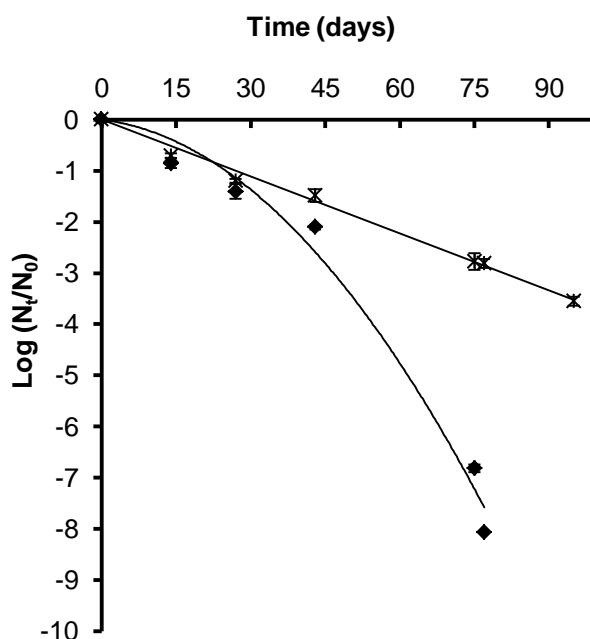


Figure 2. Influence of  $\text{Ca}^{2+}$ /SPI ratio on viability of *L. plantarum*-loaded MP during storage at 25 °C and 60% RH (\* 1:35,  $k_{\text{Ca}^{2+}/\text{SPI}, 1:35} = -0.0371$ ,  $R^2 = 0.9914$ ; ◆ 1:122,  $k_{\text{Ca}^{2+}/\text{SPI}, 1:122} = -0.0009$ ,  $k'_{\text{Ca}^{2+}/\text{SPI}, 1:122} = -0.0188$ ,  $R^2 = 0.9854$ ).

For MP prepared at a Ca<sup>2+</sup>-to-SPI ratio of 1:122, the viability of encapsulated probiotics slowly decreased with time during the first 45 days of incubation ( $k = -0.0009$ ;  $R^2 = 0.9854$ ). Then, the cell count dramatically dropped off in the following days, reaching viable bacterial levels below the limit of quantification at day 77 of incubation ( $k' = -0.0188$ ,  $R^2 = 0.9854$ ). On the other hand, for MP prepared at a Ca<sup>2+</sup>-to-protein ratio of 1:35, the viable cell count decreased linearly during the three months of the study ( $k = -0.0371$ ;  $R^2 = 0.9914$ ). Interestingly, only MP prepared at a Ca<sup>2+</sup>-to-SPI ratio of 1:35 maintained a probiotic concentration for at least 3 months. For MP prepared at a ratio of 1:122, the probiotic concentration, at 25 °C/60% RH, was maintained less than 75 days. In fact, at day 43, the mean cell count was  $9.3 \times 10^7$  CFU/g whereas at day 75, the cell count was  $1.7 \times 10^3$  CFU/g.

Considering these results, MP prepared at a Ca<sup>2+</sup>-to-SPI ratio of 1:35 (by weight) were selected for the following studies of stability and food processing.

### **3.2. STABILITY OF *L. plantarum*-LOADED MP AND FRESH SUSPENSION OF *L. plantarum* UNDER ACIDIC CONDITIONS**

It is well known that some species of probiotics are extremely sensitive to low pH and to the toxic effect produced by dissociated organic acids (35). The tolerance of LAB to acidic conditions is related to a constant gradient between extracellular and cytoplasmic pH. If the internal pH reaches a threshold value, cellular functions are interrupted, producing the cell death (36). These acidic conditions may inactivate *L. plantarum*.

In order to evaluate the capacity of SP microcapsules to protect LAB from acidic conditions and the presence of dissociated organic acids, stability of fresh 2% sucrose (w/v) suspension of *L. plantarum*, and *L. plantarum*-loaded MP were studied in both, a lactic acid solution (pH = 4.0) and a HCl solution (pH = 3.0). In the particular case of the HCl solution, and due to the low stability of fresh bacteria in such medium, freeze-dried *L. plantarum* were also used as a second control. Figure 3 shows the viability of cells in lactic acid (A), and HCl (B) stored at 4 °C over time.

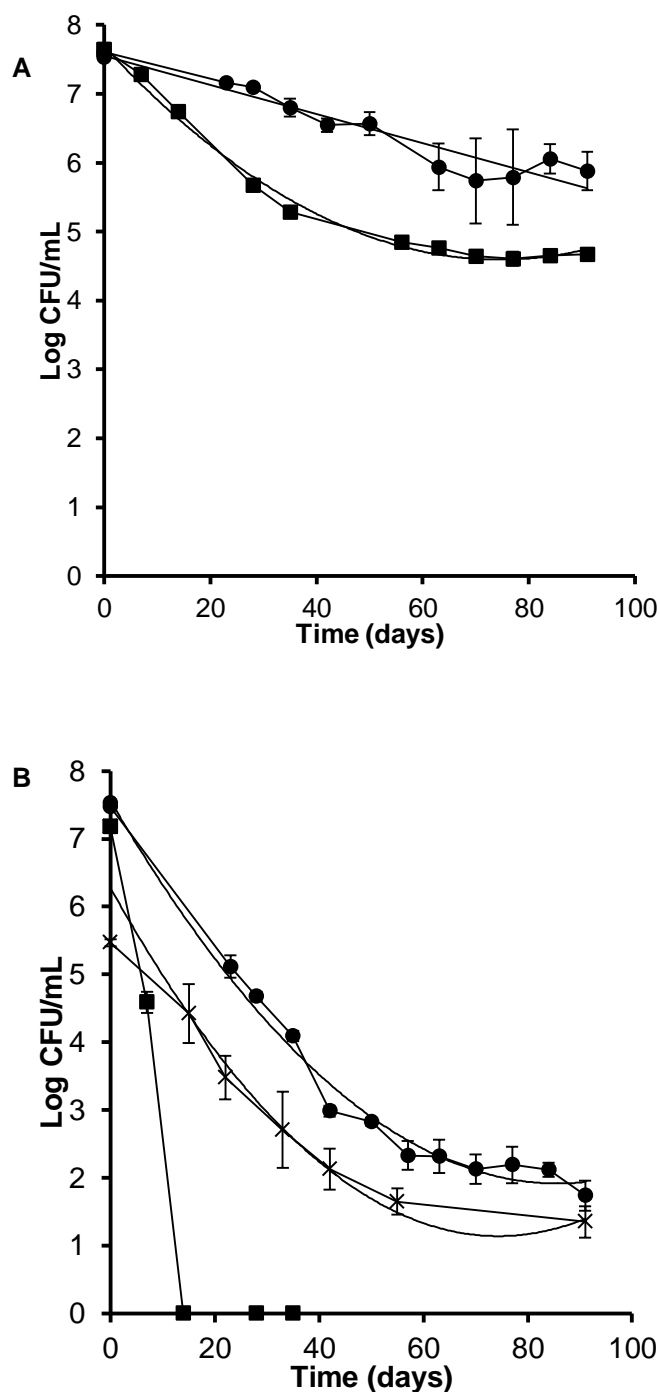


Figure 3. Stability of *L. plantarum* 2% sucrose (w/v) suspension (■), freeze-dried *L. plantarum* (×), and *L. plantarum*-loaded SPC MP (●) in acidic conditions: (A) lactic acid, pH = 4; (B) hydrochloric acid, pH = 3 at 4 °C.

When incubated at pH 4 (lactic acid aqueous medium), the bacterial formulation in sucrose 2% maintained its probiotic concentration during a week. After 14 days, the



cell count was below 7 Logs (6.74). The decrease of the stability was adjusted to a polynomial model of second order ( $k_{\text{sucrose } 2\% \text{ (w/v)}} = 0.0006$ ,  $k'_{\text{sucrose } 2\% \text{ (w/v)}} = -0.0831$ ,  $R^2 = 0.994$ ). However, the microencapsulation of *L. plantarum* into SP MP allowed increasing the probiotic concentration up to four weeks. The reduction of viability was adjusted to a linear model ( $k_{\text{SPC-MP}} = -0.025$ ,  $R^2 = 0.9815$ ).

Similar results were observed when the probiotics were kept into a HCl solution (pH = 3). The viability of fresh cells in sucrose 2% (w/v) was lower than that observed in acid lactic as the survival cells was less than 5 logarithmic units in a week. After two weeks, the cell count was below the limit of quantification of the method. Taking into consideration this important and rapid loss of viability, a second control with freeze-dried free *L. plantarum* was evaluated. The survival freeze-dried and microencapsulated bacteria were adjusted to a polynomial model of second order, where the rates of viability loss were:  $k_{\text{freeze-dried}} = 0.0009$ ,  $k'_{\text{freeze-dried}} = -0.1381$ ,  $R^2 = 0.9467$ ;  $k_{\text{SPC-MP}} = 0.0008$ ,  $k'_{\text{SPC-MP}} = -0.1316$ ,  $R^2 = 0.9904$ . The HCl solution reduced the probiotic concentration drastically in a few days for both the freeze-dried cells and the microencapsulated cells. However, the survival was higher for the *L. plantarum*-loaded MP during all the experiment. Thus, the cell count was 1.6 logarithmic units approximately higher for the bacteria microencapsulated than for the freeze-dried bacteria. Additionally, survival cells were below the limit of quantification of the technique after 2 months approximately for the freeze-dried free cells whereas the cell counts were higher than this limit during 3 months for the microencapsulated bacteria.

### **3.3. SURVIVAL OF MICROENCAPSULATED *L. plantarum* IN HEAT TREATMENT AND SGF TREATMENT**

Another important factor that may negatively affect to the viability of probiotics is heat (37). In fact, in a number of technological processes employed for the formulation and/or preparation of food products, heat is employed. For this purpose, the thermotolerance of microencapsulated bacteria was evaluated.

Figure 4 shows the cell count decrease for freeze-dried *L. plantarum* and *L. plantarum*-loaded SPC MP after two treatments: i) 80 °C for 1 minute and ii) 80 °C for 1 minute followed by a treatment with SGF (pH = 2.5) for 2 hours at 37 °C.

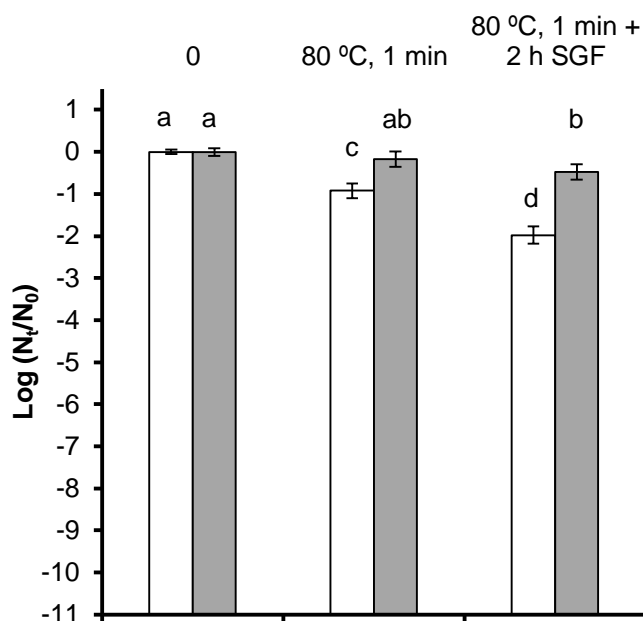


Figure 4. Loss of cell viability of *L. plantarum* freeze-dried (□) and *L. plantarum*-loaded SPC MP (■) after two treatments: 80 °C for 1 minute (80 °C, 1 min) and 80 °C for 1 minute followed by a treatment with SGF pH=2.5 for 2 hours at 37 °C (80 °C, 1 min + 2 h, SGF).

Different letters means significant differences at the 5% significance level.

A multifactor ANOVA was conducted where the factor related to the format of the bacteria (freeze-dried *L. plantarum* and *L. plantarum*-loaded MP), the type of treatment (0; 80 °C, 1 min; 80 °C, 1 min + 2 h, SGF), and the interaction between factors showed significant differences ( $p = 0.0002$ ,  $0.0000$  and  $0.0009$ , respectively). Thus, the cases were analysed separately using a one-way ANOVA with a Tukey's HSD post-hoc test.

Interestingly, in the case of the heat treatment for 1 minute at 80 °C, the viability of the *L. plantarum*-loaded MP showed no significant differences with respect to the initial cell count. However, the non-encapsulated bacteria showed a significant reduction of viability, losing one logarithmic unit in comparison with the initial cell count.

Concerning SFGT, the viable cell number of microencapsulated bacteria decreased significantly with respect to the initial cell count. However, there were no

significant differences between this treatment and the heat-treated sample (approximately 1/2 logarithmic unit) or between this latter and the initial count. On the contrary, for the freeze-dried *L. plantarum*, SGF treatment showed not only a significant loss of viability with respect to the initial cell count (approximately 2 logs) but also a significant decrease comparing to the heat treatment. In spite of this difference, the stability of the *L. plantarum*-loaded MP was significantly higher than the freeze-dried *L. plantarum* after the two treatments evaluated.

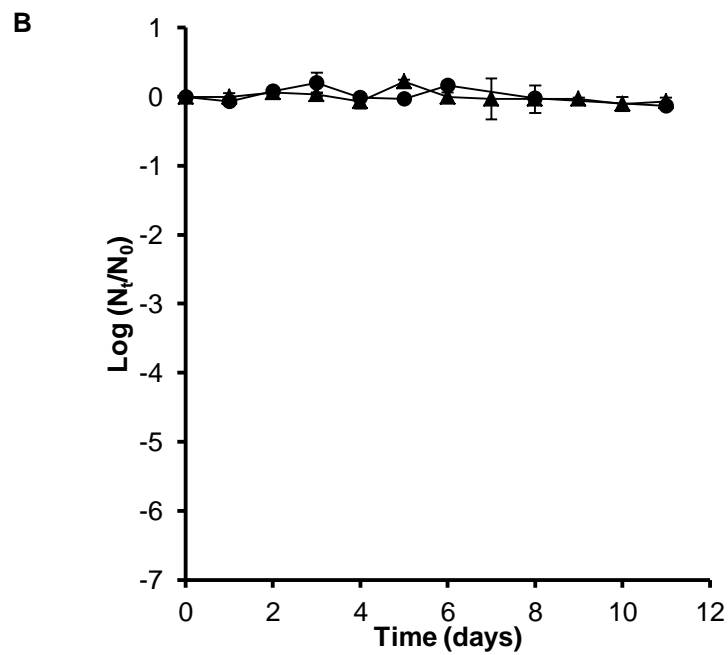
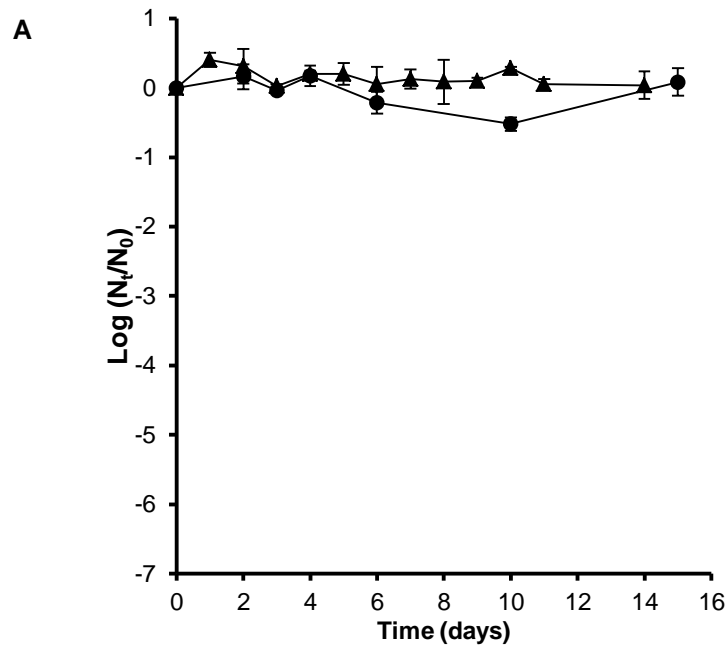
Therefore, the use of SPC as wall material for the encapsulation of *L. plantarum* conferred a protection of the bacteria, enhancing significantly their thermotolerance and their gastric resistance after the thermal treatment with respect to the freeze-dried cells.

All of these results are in line with previous works, demonstrating the capability of microencapsulation to protect microorganisms from heat stress. Thus, Chen *et al.* (2007) reported the capability of gellan-alginate microparticles as matrix to protect *Bifidobacterium bifidum* from a thermic treatment of 75 °C for 1 min. In a similar way, Rather, Akhter, Masoodi, Gani, and Wani (2017) revealed that double alginate coating increased microencapsulated bead strength, protecting two specific *L. plantarum* and *L. casei* strains against a heat treatment of 75 °C for 1 and 10 min.

### **3.4. SURVIVAL OF MICROENCAPSULATED *L. plantarum* IN FOOD FORMULATIONS**

Most of stability studies of probiotics in foods are referred to dairy foods. Anal and Singh (2007) (38) concluded in their review that there are still several problems concerning the low viability of probiotic bacteria in foods at industrial level in spite of the improvements achieved by means of microencapsulation. Ying, Schwander, Weerakkody, Sanguansri, Gantenbein-Demarchi, and Augustin (2013) evaluated the viability during the storage of *Lactobacillus rhamnosus* GG in apple juice when microencapsulated in whey protein and resistance starch matrices. Despite the differences showed among the different shells used in the formulations, no sample control was used to compare these results that would allow the stability improvement.

Figure 5 shows the viability of freeze-dried *L. plantarum* and *L. plantarum*-loaded MP in different food formulations during storage: A, fresh orange juice; B, fresh milk; C, infant formula reconstituted in water; and, D, fermented dairy drink treated by HHP.



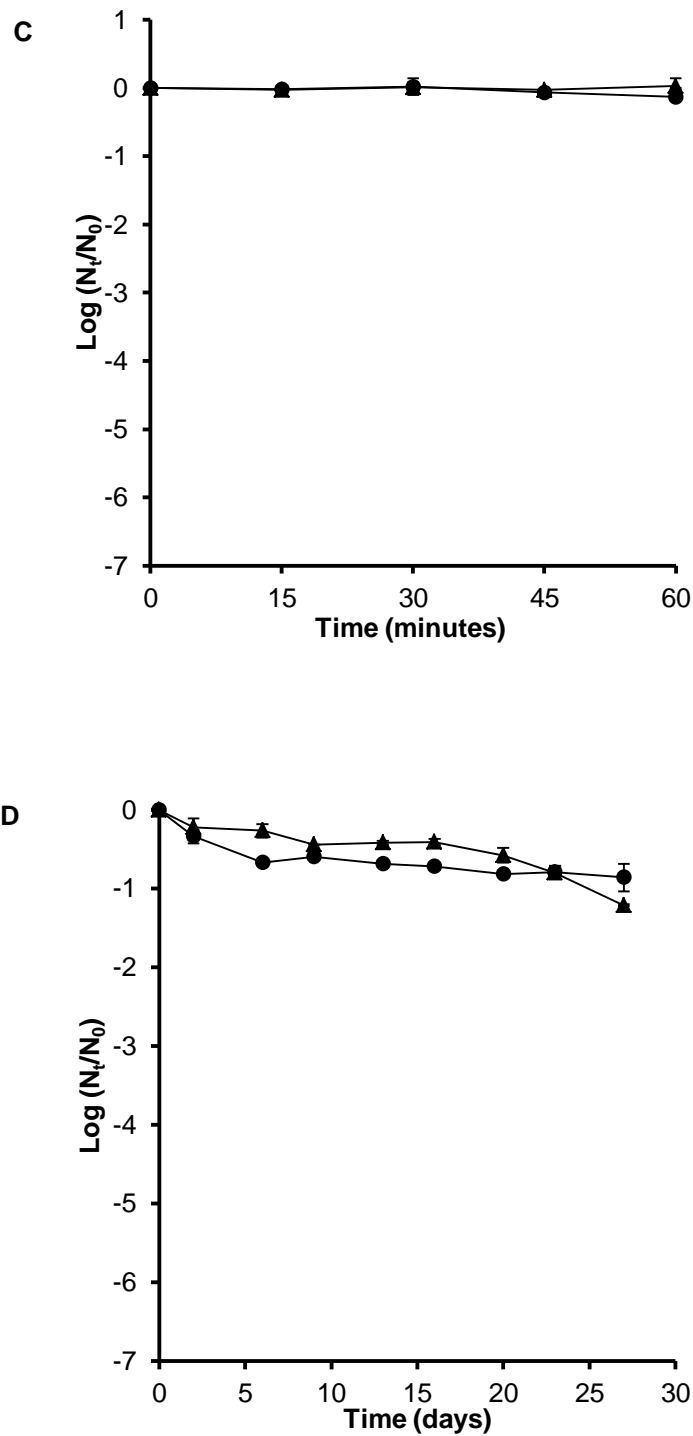


Figure 5. Viability of *L. plantarum* freeze-dried ( $\blacktriangle$ ) and *L. plantarum*-loaded SPC MP ( $\bullet$ ) in different food formulations: (A) Fresh orange juice, (B) fresh milk, (C) infant dairy formula reconstituted in water and, (D) fermented dairy drink treated by HHP.

In all cases, at the end of experiments, food formulations including either free (freeze-dried) or microencapsulated *L. plantarum* displayed similar levels of viable bacteria ( $p < 0.05$ ). Moreover, the probiotic concentration remained in all the formulations tested at the end of the storage period. Additionally, the use of HHP allows inactivating the endogenous microflora of a specific food to favour the viability of a custom-added probiotic.

For instance, Figure 5D shows how fermented dairy drink treated by HHP showed a significant decrease in the viability of *L. plantarum* over time ( $p = 0.0069$ ) (Figure 5D). LAB and mold counts in the negative control (HHP-treated fermented dairy drink with no *L. plantarum* added) were below of the limit of the detection of the analytical method all along the time of study (data not shown). The reduction of viability of *L. plantarum* was not significantly different for both, freeze-dried and microencapsulated bacteria samples. Although no significant differences were observed between the types of samples, it is noteworthy that the cell count for the MP remained at probiotic concentration ( $1.6 \times 10^7$  CFU/mL) whereas the fermented dairy drink formulated with freeze-dried *L. plantarum* showed a LAB concentration slightly below of the probiotic range ( $6.6 \times 10^6$  CFU/mL). This behaviour was similar for the other tested formulations (Figures 5A, 5B and 5C).

Finally, Figure 6 shows an example of the viability of *L. plantarum*-loaded SPC MP into a food formulation (fermented dairy drink treated by HHP) all along a theoretical complete process including probiotic processing (PP), probiotic storage (PS), food processing (FP), and food storage (FS).

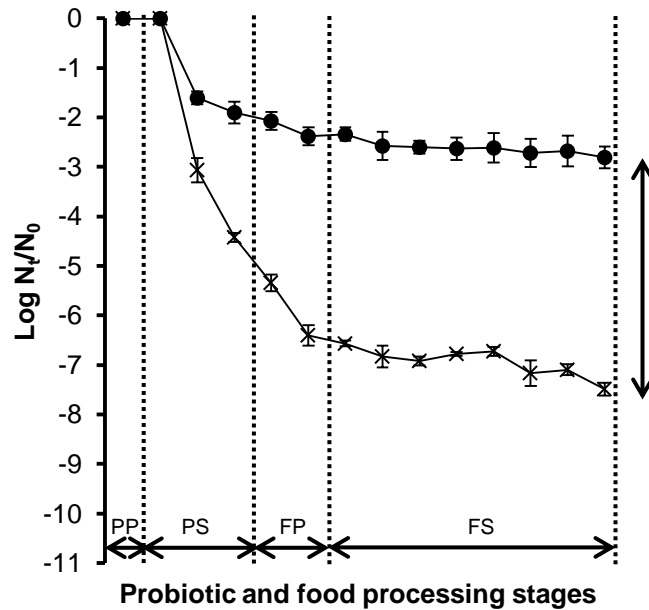


Figure 6. Example of viability of *L. plantarum*-loaded SPC MP (—●—) and freeze-dried *L. plantarum* (—×—) during probiotic processing (PP); probiotic storage, after 105 days at 25 °C and 60% (PS); food processing (FP), considering a simulated heat treatment at 80 °C for 1 min.; and food storage (FS), in a fermented dairy drink treated by HPP and stored at 4 °C for a month.

According to the global results, the microencapsulation of *L. plantarum* using SPC MP preserves almost five logarithmic cycles the viability of the bacteria at the end of the FS with respect to the freeze-dried LAB. In a similar way, this conclusion might be applied to the rest of the studied food models as the stability during the FS of the different formulations did not show significant differences. Thus, the use of SP-based MP for the stabilization of *L. plantarum* is capable of maintaining the probiotic concentration up to the time of the consumption whereas non-encapsulated bacteria will not reach such concentration at the moment of intake. Moreover, in previous studies, the authors reported that SPC MP of *L. plantarum* under simulated gastrointestinal fluids showed a loss of viability of about one logarithmic cycle whereas the freeze-dried *L. plantarum* displayed a reduction of more than 4 logarithmic cycles at the end of the assay (33). Considering this result as the final stage in the probiotic food value chain, the use of SP-based MP in probiotic microencapsulation might ensure the probiotic concentration not only from the PP up to the end of the FS but also after the intake.

#### **4. CONCLUSIONS**

In conclusion, the microencapsulation of *L. plantarum* into SPC MP enhances significantly the stability of the LAB from the probiotic processing or probiotic production up to the end of the food shelf-life, taking into account the intermediate stages as PS and FP in the probiotic food value chain. Considering the sum of all the stages studied individually as a complete process, the loss of the viability of *L. plantarum*-loaded MP is 2.8 logarithmic cycles whereas the freeze-dried *L. plantarum* shows a loss of viability of 7.5 logarithmic cycles. Therefore, the freeze-dried *L. plantarum* might lose the probiotic concentration at the end of the food storage, and thus before the consumption.

Additionally, in view of the authors' previous studies (33), in which the SP-based MP showed an improvement of the *L. plantarum* tolerance under simulated gastrointestinal conditions in a mean of 3-4 logarithmic cycles, the SPC MP might reach probiotic concentrations even after intake.

Finally, the use of HHP as an alternative non-thermal pasteurization and the later addition of LAB microencapsulated might offer the possibility of designing *ad hoc* foods with a defined profile of probiotics.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by Fundación Obra Social La Caixa (Proyecto "Desarrollo de tecnologías para la incorporación eficiente de probióticos en alimentos – BIPRO").

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interests.



## REFERENCES

1. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *Embo Reports*. 2006;7(7):688-93.
2. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 2017;3(1):71-82.
3. Miyoshi J, Chang EB. The gut microbiota and inflammatory bowel diseases. *Translational Research*. 2017;179:38-48.
4. Morowitz MJ, Carlisle EM, Alverdy JC. Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill. *Surgical Clinics of North America*. 2011;91(4):771-85.
5. Kang Z, Zhang J, Zhou J, Qi Q, Du G, Chen J. Recent advances in microbial production of  $\delta$ -aminolevulinic acid and vitamin B12. *Biotechnology Advances*. 2012;30(6):1533-42.
6. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2016;22(5):1137-50.
7. Parseus A, Sommer N, Sommer F, Caesar R, Molinaro A, Stahlman M, *et al*. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut*. 2017;66(3):429-37.
8. Li J, Zhao FQ, Wang YD, Chen JR, Tao JE, Tian G, *et al*. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017;5.
9. Dinan TG, Cryan JF. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2017;46(1):77-89.
10. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, *et al*. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-U119.
11. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, *et al*. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *Embo Reports*. 2012;13(5):440-7.
12. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circulation Research*. 2017;120(7):1183-96.

13. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, *et al.* Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013;499(7456):97-101.
14. Vallianou NG, Stratigou T, Tsagarakis S. Microbiome and diabetes: Where are we now? *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2018.
15. Wong ML, Inserra A, Lewis MD, Mastronardi CA, Leong L, Choo J, *et al.* Inflammasome signaling affects anxiety- and depressive-like behavior and gut microbiome composition. *Molecular Psychiatry*. 2016;21(6):797-805.
16. Vuong HE, Hsiao EY. Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*. 2017;81(5):411-23.
17. Alkasir R, Li J, Li XD, Jin M, Zhu BL. Human gut microbiota: the links with dementia development. *Protein & Cell*. 2017;8(2):90-102.
18. Provasi S, Ferrari C, Festari C, Boccardi M, Frisoni G, Cattaneo A. Gut bacteria and Alzheimer's disease: from dysbiosis to beta-amyloid plaques. *European Neuropsychopharmacology*. 2017;27:S1027-S.
19. Byndloss MX, Baumler AJ. The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nature reviews Microbiology*. 2018.
20. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *International journal of food microbiology*. 1998;39(3):237-8.
21. Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(1):66-90.
22. FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina; 2001.
23. Martin J.M, Villoslada L., Ruiz A., Morales E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2015;27:15-25.
24. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 2011;104(4):467-83.

25. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(3):171-84.
26. FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada; 2002.
27. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014;9:225-41.
28. Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *Jornal de pediatria*. 2015;91(1):6-21.
29. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012;162(1):56-67.
30. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 2004;14(8):737-43.
31. Dianawati D, Mishra V, Shah NP. Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food Research International*. 2013;51(2):503-9.
32. González-Ferrero C, Sáiz-Abajo M-J. Characterization and stability studies of bioactive compounds and food matrices as evidence in support of health claims. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2015;66(sup1):S4-S12.
33. González-Ferrero C, Irache JM, González-Navarro CJ. Soybean protein-based microparticles for oral delivery of probiotics with improved stability during storage and gut resistance. *Food Chemistry*. 2018;239:879-88.
34. Murphy R, Cho Y-H, Farkas B, Jones OG. Control of thermal fabrication and size of  $\beta$ -lactoglobulin-based microgels and their potential applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015;447:182-90.
35. Moslehi-Jenabian S, Gori K, Jespersen L. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;135(3):295-302.

36. Kashket ER. Bioenergetics of lactic-acid bacteria - cytoplasmic pH and osmotolerance. *Fems Microbiology Letters*. 1987;46(3):233-44.
37. Chen M-J, Chen K-N, Kuo Y-T. Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan–alginate microparticles. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007;98(2):411-9.
38. Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(5):240-51.

## **CAPÍTULO 5**

### **DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

---



## DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad de las proteínas de soja, obtenidas a partir de un subproducto de la industria alimentaria, como material para la microencapsulación de probióticos. Para ello, las micropartículas (MP) se prepararon por coacervación simple mediante la adición de iones de calcio, estudiando dos relaciones  $\text{Ca}^{2+}/\text{SPC}$  (concentrado de proteínas de soja) en peso. Posteriormente, las MP se secaron mediante atomización utilizando dos tipos de materiales y sus mezclas como coadyuvantes tecnológicos: maltodextrina (MD) e inulina enriquecida con oligofructosa (OEI). Para la evaluación de las formulaciones resultantes, se determinó la viabilidad de los microorganismos durante el proceso de encapsulación, así como durante su almacenamiento a temperatura ambiente, el procesado de diferentes matrices alimentarias (zumo de naranja fresco, leche fresca, fórmula infantil en polvo y yogur líquido tratado mediante alta presión hidrostática, HHP) y la vida útil de las mismas. Adicionalmente, se evaluó la resistencia de las MP frente a condiciones adversas (pH ácido, alta temperatura, simulante gástrico (SG) y simulante gastrointestinal (SGI)). Para evaluar la potencial mejora proporcionada mediante la encapsulación, se realizaron respectivos controles con microorganismos sin encapsular.

### 1. ¿POR QUÉ MICROENCAPSULAR UTILIZANDO PROTEÍNAS?

Los materiales de recubrimiento utilizados para la microencapsulación de ingredientes (incluidos los probióticos) permitidos en la industria alimentaria son: (i) las proteínas; (ii) los polisacáridos; (iii) los lípidos, incluidas las ceras; (iv) algunos polímeros y co-polímeros de origen sintético como p. ej., polivinilpirrolidona (E 1201); y (v) algunos materiales inorgánicos que se utilizan como coadyuvantes tecnológicos durante, p. ej., el proceso de secado mediante atomización o durante el almacenamiento, como el dióxido de silicio, que se utiliza como antiaglomerante (1). Así, algunos polímeros derivados del petróleo utilizados en la formulación de medicamentos (p. ej., poliésteres y poliácridatos) no están permitidos como aditivos alimentarios (2). Las mayores ventajas que presentan los polisacáridos como materiales de encapsulación son su solubilidad en agua, estabilidad y precio (1). Sin embargo, esta alta solubilidad en agua limita su aplicación en alimentos con alto contenido en humedad, además de no conferir efecto protector en el tracto gastrointestinal (GI). Con respecto a los lípidos, estos confieren una buena barrera frente a la humedad y permiten el transporte de activos liposolubles en medios

acuosos (1, 3). Sin embargo, los lípidos no soportan temperaturas altas debido a su bajo punto de fusión, por lo que su efecto protector se perdería a temperaturas superiores a la ambiente (p. ej., durante el procesado de alimentos si estos se someten a tratamiento térmico o durante el almacenamiento).

Aunque todos estos materiales son biocompatibles y biodegradables, las proteínas reúnen una serie de ventajas adicionales como son: carácter anfifílico, lo que les permite encapsular con eficiencia tanto moléculas hidrofílicas como lipofílicas; capacidad emulsificante; y buenas propiedades nutricionales (1). Además, no presentan ninguno de los inconvenientes citados anteriormente para el resto de los materiales permitidos para su uso en alimentos y son de origen natural, por lo que tienen una mayor aceptación por parte del consumidor. Por último, las proteínas pueden obtenerse a partir de subproductos de la industria agroalimentaria, lo que contribuiría al aprovechamiento de los recursos, la valorización de los residuos y la sostenibilidad del planeta.

### **2. ¿POR QUÉ SE HAN SELECCIONADO LAS PROTEÍNAS DE SOJA COMO MATERIAL DE ENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS?**

El uso de proteínas vegetales como materiales de encapsulación en alimentación frente a las proteínas de origen animal presenta dos ventajas fundamentales: (i) son, por lo general, menos alergénicas (4, 5), y (ii) son aptas para dietas vegetarianas y veganas, cuya tendencia está incrementando en las últimas décadas (6).

Por otra parte, la proteína de soja presenta una serie de propiedades funcionales adecuadas para su uso como agente encapsulante como son: (i) solubilidad acuosa dependiente del pH, (ii) capacidad de absorción de agua y grasa, (iii) capacidad para estabilizar emulsiones, (iv) capacidad gelificante, (v) capacidad para la formación de películas, y (vi) buenas propiedades organolépticas (7, 8). Además, la transformación de las proteínas de soja en MP puede realizarse sin recurrir al uso de disolventes orgánicos (1, 9, 10), lo que permite trabajar con procesos respetuosos con el medioambiente. Por último, la soja es uno de los cultivos mayoritarios a nivel mundial (11, 12), lo que garantiza el suministro de subproductos para la producción de proteínas de soja derivadas de ellos. Todas estas ventajas (aprovechamiento de recursos, garantía de suministro de subproductos, buenas propiedades para el desarrollo de encapsulados, sencillez y respeto por el medioambiente de los procesos de encapsulación) permitirían la aplicación de las



proteínas de soja como agentes encapsulantes a nivel industrial tanto desde el punto de vista técnico como económico. De esta forma, se salvaría así una de las grandes barreras a las que se enfrenta la encapsulación de probióticos para su aplicación en el sector de la alimentación, su escalado a nivel industrial (13).

### **3. ¿POR QUÉ SE HA TRABAJADO TANTO CON PROTEÍNAS DE SOJA OBTENIDAS A PARTIR DE UN SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA COMO CON PROTEÍNAS DE SOJA COMERCIALES?**

En este trabajo se ha evaluado un proceso completo, desde la obtención de un material de encapsulación a partir de un subproducto derivado de la producción de leche de soja hasta su potencial valorización mediante su uso como agente encapsulante de probióticos. Todo ello, con el fin de poder ofrecer a las empresas una alternativa global a la explotación de esos subproductos, normalmente destinados a consumo animal (14). De esta forma, estas empresas podrían llegar a plantear nuevas líneas de negocio como la producción de nuevos ingredientes, mediante la comercialización de las proteínas de soja o mediante el desarrollo de probióticos microencapsulados. Estos ingredientes podrían comercializarse a terceras empresas o podrían ser aplicados en productos propios, con el fin de fabricar productos diferenciales frente a la actual oferta del mercado de bebidas vegetales y productos aptos para vegetarianos y veganos.

Para ello, ha sido necesario producir las proteínas a partir de un subproducto de la industria para evaluar sus características físico-químicas que puedan servir como parámetros de calidad que garanticen la reproducibilidad entre lotes, así como comparar dichas características con las de las proteínas de soja comerciales. Entre los lotes analizados, no se han encontrado diferencias sustanciales en cuanto al contenido proteico, el perfil de aminoácidos y la capacidad para formar MP a partir de las proteínas de soja extraídas.

Inicialmente, uno de los mayores retos ha sido la obtención de proteínas de soja con una carga microbiana (mohos y levaduras) inferior al límite de detección, que no interfiriera en la microencapsulación de los probióticos y en su posterior conservación. Para ello, se ha establecido un proceso de esterilización de la harina de soja mediante el autoclavado en húmedo de la materia prima, tal y como se describe en el *Anexo* del presente trabajo, que preserva la capacidad de las proteínas de soja para formar MP.

#### **4. ¿SE HAN ENCONTRADO CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS O FUNCIONALES DIFERENTES ENTRE AMBOS TIPOS DE PROTEÍNAS?**

Las proteínas de soja, obtenidas a partir del subproducto derivado de la producción de bebida de soja y derivados, tienen un contenido total proteico superior al 70% e inferior al 90% en peso, por lo que pueden considerarse un SPC (15). El perfil de aminoácidos de las mismas es similar al descrito en otros estudios (16, 17) y al reportado en las fichas de especificados de las proteínas comerciales utilizadas en este trabajo (aislado de proteína de soja (SPI), Pro-Fam® 646 de Archer Daniels Midland). También ambos tipos de proteínas han sido capaces de encapsular probióticos, mejorando la estabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento. Sin embargo, a pesar de estas similitudes, las MP formuladas con el SPC obtenido a partir de la harina de soja han proporcionado una viabilidad a *L. plantarum* superior a 5 meses, mientras que en la formulación análoga fabricada con el SPI comercial, la viabilidad fue algo superior a los 3 meses. Esta variabilidad en los resultados podría ser debida a una diferencia en la estructura de las proteínas de soja extraídas ya que ésta puede alterarse de forma significativa dependiendo de la composición, el tipo de productos a partir de los cuales se han extraído, las condiciones de procesado llevadas a cabo para su extracción e incluso de las condiciones de almacenamiento (10). Para confirmar esta hipótesis, sería necesario analizar las diferentes fracciones proteicas de las proteínas de soja comerciales y compararlas con las fracciones identificadas en el SPC obtenido en este proyecto.

#### **5. ¿POR QUÉ SE HA SELECCIONADO LA COACERVACIÓN SIMPLE MEDIANTE ADICIÓN DE SALES DE CALCIO COMO TECNOLOGÍA DE ENCAPSULACIÓN Y EL SECADO MEDIANTE ATOMIZACIÓN COMO POSTERIOR ETAPA DE ESTABILIZACIÓN?**

Se ha buscado un proceso diferenciador que, al mismo tiempo, sea sencillo, fácilmente escalable, requiera poca inversión de equipamiento en caso de ser industrializable y que consiga tamaños de MP que no afecten a la palatabilidad del producto final donde se adicionen. La coacervación simple de las proteínas mediante la adición de iones  $\text{Ca}^{2+}$  frente a la coacervación por cambio de pH podría proporcionar, *a priori*, mayor estabilidad a las MP como consecuencia de la reticulación del recubrimiento y el establecimiento de interacciones no covalentes locales entre las proteínas y los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , dando lugar a estructuras de tipo matricial (18). Además, este método no incluye el uso de emulsificantes, polímeros sintéticos o

reactivos cuyo uso no está permitido como aditivo alimentario. Las MP resultantes son dispersables, pero no solubles en medio acuoso, lo que permitiría conferir protección a los microorganismos en este tipo de medios.

Con respecto a la selección del secado mediante atomización, se ha realizado en base al menor coste energético asociado a este proceso frente a otras tecnologías de deshidratación utilizadas en la industria alimentaria como la liofilización, el secado a vacío o el lecho fluido; así como la posibilidad que ofrece de trabajar en continuo y la ausencia de procesos adicionales para conseguir las MP en formato polvo (19).

## 6. ¿CÓMO AFECTA LA RELACIÓN $\text{Ca}^{2+}$ /SPC A LAS MP DE SPC?

La selección de la relación  $\text{Ca}^{2+}$ /SPC ha resultado ser un factor que afecta no sólo a la morfología de las MP sino también a la estabilidad que éstas confieren a la protección de *L. plantarum* durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Se han ensayado dos relaciones  $\text{Ca}^{2+}$ /SPC en peso, 1:122 y 1:35. En el primer caso, se han formado MP con una morfología alargada o fusiforme con una longitud media de 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente, observándose, en algunos casos, agregados de mayor tamaño. Estas partículas almacenadas a temperatura ambiente (25 °C/60% HR, humedad relativa) han mantenido la concentración probiótica del microorganismo modelo (*L. plantarum*) menos de 75 días. Por el contrario, al aumentar la concentración de iones calcio con respecto a la concentración de SPC (relación  $\text{Ca}^{2+}$ /SPC 1:35), la dispersión formada ha sido uniforme y las MP resultantes han sido esféricas, con un diámetro medio aproximado de 10  $\mu\text{m}$ . Además, estas MP han conseguido mantener, en las mismas condiciones de almacenamiento, una viabilidad superior a  $10^7$  UFC/g durante más de 90 días. Estos resultados están en línea con los reportados por Murphy *et al.* (2015) en relación a la microencapsulación con  $\beta$ -lactoglobulina. En este trabajo se observó que al aumentar la fuerza iónica del medio acuoso, se formaban menos agregados de proteína como consecuencia de una reducción de las interacciones electrostáticas efectivas producidas entre las moléculas de las proteínas (20). Sin embargo, en el presente trabajo, se ensayaron concentraciones superiores de  $\text{Ca}^{2+}$ , observándose agregados macroscópicos que impedían el posterior secado mediante atomización. Por ello, no se pudo evaluar relaciones  $\text{Ca}^{2+}$ /SPC superiores a 1:35.

## **7. ¿CÓMO AFECTA EL TIPO DE COADYUVANTE TECNOLÓGICO UTILIZADO DURANTE LA ETAPA DE SECADO MEDIANTE ATOMIZACIÓN?**

Se han evaluado dos tipos de coadyuvantes tecnológicos: un tipo de MD y OEI con el objetivo de mejorar el rendimiento del proceso de secado mediante atomización. Estos coadyuvantes incrementan el tamaño de las MP durante el secado, favoreciendo su recuperación en el recipiente de recogida del equipo y, por tanto, permitiendo que las MP se separen en el ciclón y no finalicen en el depósito de recogida de finos (filtro). La MD se ha seleccionado por ser un material con un coste bajo y ampliamente utilizado a nivel industrial en alimentos e ingredientes alimentarios. La OEI, por el contrario, es un material cuyo uso está menos extendido y resulta más caro, pero que por su contenido en polisacáridos con potencial actividad prebiótica (inulina y oligofructosa), podrían aportar un efecto sinérgico junto con los probióticos (efecto simbiótico) (21, 22).

Se ha observado que las MP formuladas con OEI o con mezclas OEI/MD como coadyuvante tecnológico han presentado una viabilidad mayor que las formuladas solo con MD. De acuerdo a Rajam *et al.* (2015) (23), los polisacáridos como los fructooligosacáridos podrían prevenir el exceso de deshidratación de las células durante el secado mediante atomización debido a la capacidad de retención de humedad que tienen las moléculas de inulina y oligosacáridos, mejorando así su viabilidad durante el almacenamiento.

## **8. ¿CUÁLES SON LAS CARACTERÍSTICAS QUE DEBEN CUMPLIR UNAS MP PARA SABER SI SON APTAS PARA LA PROTECCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS?**

Las características que deben cumplir unas MP para saber si son aptas para la protección de los probióticos son: mejorar en, al menos una de las etapas, la viabilidad celular de los microorganismos con respecto a no estar encapsulados, de tal forma que permitan administrar una dosis diaria de  $10^6$ - $10^9$  de células vivas (24) y mantener su viabilidad a nivel intestinal. Aunque existen estudios en los que se ha demostrado efectos positivos sobre la respuesta inmunitaria derivados de la presencia de algunos probióticos no viables o de sus metabolitos (25), la definición de probióticos de la Organización Mundial de la Salud y la legislación de los países en los que se regula el uso de los mismos exigen el aseguramiento de la viabilidad celular en el momento de su consumo, siendo ésta indispensable para cualquier declaración de propiedades

saludables relativa a los probióticos (26-29). Por lo tanto, es imprescindible asegurar la viabilidad de los probióticos durante su producción, el procesado del alimento, el almacenamiento (preferiblemente eliminando la cadena de frío) y después de su consumo, con el fin de garantizar la potencial actividad biológica de los microorganismos frente a las autoridades que regulan la aprobación de su uso.

## **9. ¿LAS PROTEÍNAS DE SOJA SON APTAS PARA CONFERIR MEJORAS TECNOLÓGICAS A LOS PROBIÓTICOS?**

Sí, las proteínas de soja son aptas para conferir mejoras tecnológicas a los probióticos debido a las siguientes características: (i) forman MP con un tamaño apenas perceptible en boca (30); (ii) buenas propiedades sensoriales (1); (iii) mantienen la viabilidad celular durante el procesado de los probióticos a niveles de  $10^{10} - 10^{11}$  UFC/g; (iv) mejoran la conservación de los probióticos a temperatura ambiente, manteniendo una concentración superior a  $10^7$  UFC/g durante más tiempo que el líofilo y en envases no totalmente impermeables a la humedad; (v) mejoran la viabilidad celular, manteniendo la concentración probiótica después de un tratamiento térmico y posterior tratamiento en SG; (vi) incrementan la estabilidad de los probióticos con respecto a los controles en medios ácidos orgánicos e inorgánicos; (vii) incrementan la viabilidad en SGI, manteniendo la concentración probiótica hasta el final del ensayo; y (viii) mantienen la concentración probiótica en los alimentos durante su almacenamiento. Por lo tanto, consiguen una mejora global en la estabilidad de los probióticos desde el momento de su procesado hasta el punto final del consumo del alimento, como se muestra, de manera resumida, en la Figura 1.

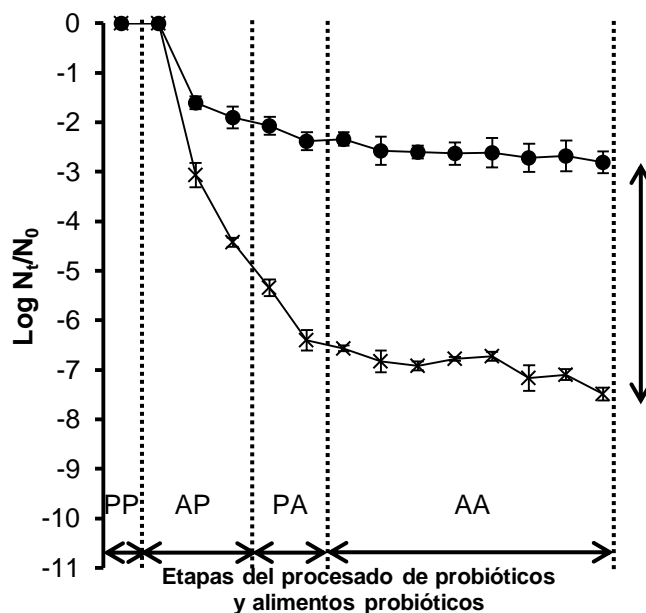


Figura 1. Ejemplo de viabilidad de *L. plantarum* microencapsulado en SPC (●) y *L. plantarum* liofilizado (×) durante el procesamiento del probiótico (PP); el almacenamiento del probiótico durante 105 días a 25 °C y 60% HR (AP); el procesamiento del alimento (PA), considerando un tratamiento térmico a 80 °C durante 1 min; y el almacenamiento del alimento (AA), en una bebida láctea fermentada tratada mediante HHP, a 4 °C durante un mes.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

### 1. MEJORA DE LA PROTECCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS EN PROTEÍNAS DE SOJA

Existen estudios en los que se han modificado la estructura de las proteínas de soja mediante métodos químicos, enzimáticos y físico-químicos con el fin de aportar nuevas funcionalidades (1, 8). Así, p. ej., los hidrolizados de proteína han mostrado una mayor solubilidad y mayor capacidad espumante y emulsionante en comparación con las proteínas nativas (31), mientras que la N-acilación permite aumentar el carácter hidrofóbico de las proteínas, mejorando sus propiedades anfífilas, confiriendo una mayor capacidad para la encapsulación de activos lipófilos (8, 32). Éstas y otras modificaciones podrían ser evaluadas desde el punto de vista de la estabilidad de los probióticos en comparación con las proteínas nativas utilizadas en este trabajo. Por otra parte, la coacervación compleja con otros polímeros de carga opuesta a las proteínas de soja podría también mejorar su capacidad protectora en la microencapsulación de probióticos. Esta mejora se debe al entrecruzamiento que se

produce entre ambos tipos de materiales, reduciendo la porosidad de las proteínas. Además de la coencapsulación, otra de las estrategias de interés es el recubrimiento de las MP con otro material que permita mejorar todavía más la resistencia GI, así como impermeabilizar las MP frente a medios acuosos. Dicha estrategia podría conseguirse p. ej., mediante la aplicación de un segundo recubrimiento con un lípido mediante tecnología de *spray-chilling* o mediante tecnología de lecho fluido. Por último, otra de las mejoras que podrían evaluarse para incrementar la vida útil de los probióticos durante su almacenamiento estaría relacionada con el tipo de envase y atmósfera utilizados. En el caso de su aplicación como nutracéutico, un material impermeable a la humedad y el oxígeno, una atmósfera modificada sin oxígeno y un envase tipo monodosis podrían incrementar la estabilidad de los probióticos durante su almacenamiento por más tiempo.

## **2. ESTUDIO DE LA REDUCCIÓN DE LA ALERGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE SOJA Y EVALUACIÓN DE SU EFICACIA EN LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS**

Aunque las proteínas vegetales, por lo general, son menos alergénicas que las de origen animal, las de soja contienen diferentes fracciones alergénicas (33, 34). Aproximadamente, el 6% de los niños presenta algún tipo de alergia alimentaria, de los cuales el 0,4% corresponde a alérgicos a la soja (34). En el caso de la población adulta, el porcentaje que padece alguna alergia alimentaria es algo inferior (3-4%) (35). Aunque la mayoría de los niños alérgicos a la soja pueden llegar a ser tolerantes a ella en la edad adulta (34), en países occidentales como Europa, el 0,3% de la población adulta sigue siendo alérgico a este alimento (36).

En los últimos años, se han estudiado diferentes tecnologías para reducir la alergenicidad de las proteínas como la aplicación de HHP (5) o el plasma frío (37). Los cambios conformacionales en la estructura de las proteínas podrían explicar esta reducción de la alergenicidad. Además, estas modificaciones pueden alterar las propiedades funcionales de las proteínas como su solubilidad acuosa y la capacidad para formar agregados y gelificar, entre otras (38, 39). Por ello, sería interesante evaluar cómo afecta este tipo de tratamientos no solo a la alergenicidad de las proteínas de soja sino también a su capacidad para conferir protección a los probióticos.

### **3. EVALUACIÓN DE LAS MP PARA LA ENCAPSULACIÓN DE OTRAS ESPECIES SENSIBLES AL OXÍGENO**

Los microorganismos seleccionados en el presente trabajo como modelos de probióticos para la evaluación de su encapsulación en proteínas de soja son especies que pertenecen al mismo género, *Lactobacillus*. Los *Lactobacilli* son anaerobios facultativos (40, 41). Es decir, pueden desarrollar su metabolismo y por tanto, ser viables, tanto en presencia de oxígeno (condiciones de aerobiosis) como en ausencia de oxígeno (condiciones de anaerobiosis). Sin embargo, p. ej., las *Bifidobacteria* son microorganismos anaerobios estrictos. Es decir, sólo son viables en ausencia de oxígeno (40, 41). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la viabilidad celular de las *Bifidobacteria* microencapsuladas en SPC y con la metodología de encapsulación descrita en este trabajo se vea disminuida. En caso de que esta hipótesis se confirmara, podrían plantearse diferentes vías de trabajo para solucionar este problema: (i) realizar el proceso de coacervación, al igual que el secado mediante atomización, en ausencia de oxígeno; (ii) adaptar previamente a las bacterias a niveles bajos de oxígeno en condiciones de microaerobiosis (42); e (iii) incorporar antioxidantes a la formulación (43-45).

### **4. EVALUACIÓN DE LA MEJORA GI EN ENSAYOS *IN VIVO***

Aunque en este trabajo se ha evaluado la resistencia GI a nivel *in vitro*, sería necesaria una confirmación de los resultados obtenidos hasta el momento en condiciones *in vivo*, así como la evaluación de la misma de los probióticos encapsulados una vez ya incorporados en las matrices alimentarias. Para ello, se podrían realizar ensayos de biodistribución con el fin de estudiar la capacidad de los probióticos microencapsulados para alcanzar zonas distales del organismo. Igualmente, se podrían realizar ensayos de eficacia, evaluando la capacidad de las bacterias probióticas para estimular y/o modular el sistema inmunitario u otras funciones fisiológicas.

### **5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS MP SOBRE LA MICROBIOTA DE INDIVIDUOS SANOS VS LA MICROBIOTA DE INDIVIDUOS ENFERMOS**

Dado que en este estudio se han evaluado las propiedades tecnológicas de las MP de proteínas de soja conteniendo microorganismos probióticos, una posible vía para continuar con este trabajo sería su evaluación sobre las propiedades funcionales.



Teniendo en cuenta la importancia de la microbiota intestinal en el mantenimiento de la salud, se podría estudiar si existe un efecto diferente entre los microorganismos encapsulados en proteínas de soja sobre la composición cualitativa y/o cuantitativa de la microbiota o sobre la actividad metabólica de los mismos en comparación con los microorganismos sin microencapsular. Por otro lado, sería interesante ensayar si las MP formuladas con polisacáridos con potencial carácter prebiótico aportan una mejora adicional sobre la microbiota frente a las MP que no contengan este tipo de componentes o sobre las MP vacías. Estos ensayos podrían realizarse mediante la comparación de su efecto sobre la microbiota tanto de individuos sanos como de individuos con alguna patología. Es decir, se evaluaría si realmente se conseguiría un efecto simbiótico. La introducción de este último control (MP vacías) estaría justificada por el efecto modulador sobre la microbiota intestinal atribuido a la inulina y otros tipos de fructooligosacáridos (46, 47), entre otros.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*. 2013;42:469-79.
2. Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios, (2008).
3. Reksamunandar RP, Edikresnha D, Munir MM, Damayanti S, Khairurrijal. Encapsulation of  $\beta$ -carotene in poly(vinylpyrrolidone) (PVP) by Electrospinning Technique. *Procedia Engineering*. 2017;170:19-23.
4. Jenkins JA, Breiteneder H, Mills EN. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1399-405.
5. Li H, Zhu K, Zhou H, Peng W. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. *Food Chemistry*. 2012;132(2):808-14.
6. Radnitz C, Beezhold B, DiMatteo J. Investigation of lifestyle choices of individuals following a vegan diet for health and ethical reasons. *Appetite*. 2015;90:31-6.
7. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 2007;40(9):1107-21.
8. Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties:  $\alpha$ -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*. 2012;48(2):387-96.
9. Can Karaca A, Low NH, Nickerson MT. Potential use of plant proteins in the microencapsulation of lipophilic materials in foods. *Trends in Food Science & Technology*. 2015;42(1):5-12.
10. Tang C-H. Nanostructured soy proteins: Fabrication and applications as delivery systems for bioactives (a review). *Food Hydrocolloids*. 2019;91:92-116.
11. de Luna Jiménez A. Valor Nutritivo de la Proteína de Soya. *Investigación y Ciencia [Internet]*. 2006;14(36):29-34.
12. SOPA. World Soybean Production 2019 [Available from: <http://www.sopa.org/statistics/world-soybean-production/>].

13. Jose Martin M, Lara-Villoslada F, Adolfini Ruiz M, Encarnacion Morales M. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2015;27:15-25.
14. Poinern GEJ, Fawcett D. Food Waste Valorization: New Manufacturing Processes for Long-Term Sustainability. In: Ferranti P, Berry EM, Anderson JR, editors. *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*. Oxford: Elsevier; 2019. p. 429-33.
15. Berk Z. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. 1992.
16. Samoto M, Maebuchi M, Miyazaki C, Kugitani H, Kohno M, Hirotsuka M, et al. Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chemistry*. 2007;102(1):317-22.
17. Chen N, Zhao M, Chassenieux C, Nicolai T. Data on the characterization of native soy globulin by SDS-Page, light scattering and titration. *Data in Brief*. 2016;9:749-52.
18. Agüeros Bazo M, Esparza Catalán I, Gamazo de la Rasilla C, González Ferrero C, González Navarro CJ, Irache Garreta JM, et al. Microparticles for the encapsulation of probiotics, preparation and uses thereof, 2014.
19. Broeckx G, Vandenneuvel D, Claes IJJ, Lebeer S, Kiekens F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;505(1):303-18.
20. Murphy R, Cho Y-H, Farkas B, Jones OG. Control of thermal fabrication and size of  $\beta$ -lactoglobulin-based microgels and their potential applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015;447:182-90.
21. Mitmesser S, Combs M. Chapter 23 - Prebiotics: Inulin and Other Oligosaccharides. In: Floch MH, Ringel Y, Allan Walker W, editors. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Boston: Academic Press; 2017. p. 201-8.
22. Ashwini A, Ramya HN, Ramkumar C, Reddy KR, Kulkarni RV, Abinaya V, et al. Reactive mechanism and the applications of bioactive prebiotics for human health: Review. *Journal of Microbiological Methods*. 2019;159:128-37.
23. Rajam R, Anandharamakrishnan C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;60(2, Part 1):773-80.

24. Lee Y-K, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 1995;6(7):241-5.
25. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(3):171-84.
26. FAO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para su evaluación. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, 85.; 2006 27/12/2017.
27. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *International journal of food microbiology*. 1998;39(3):237-8.
28. Awaisheh SS. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. In: Rigobelo E, editor. *Probiotics2012*. p. 551-82.
29. Food for Specified Health Uses (FOSHU): Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; [Available from: <https://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>].
30. Guinard J-X, Mazzucchelli R. The sensory perception of texture and mouthfeel. *Trends in Food Science & Technology*. 1996;7(7):213-9.
31. Kong X, Guo M, Hua Y, Cao D, Zhang C. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresour Technol*. 2008;99(18):8873-9.
32. Lazko J, Popineau Y, Legrand J. Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2004;37(1-2):1-8.
33. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;113(5):821-30.
34. Savage JH, Kaeding AJ, Matsui EC, Wood RA. The natural history of soy allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(3):683-6.
35. Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2 Suppl Mini-Primer):S470-5.
36. Loh W, Tang MLK. The Epidemiology of Food Allergy in the Global Context. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(9):2043.
37. Tolouie H, Mohammadifar MA, Ghomi H, Hashemi M. Cold atmospheric plasma manipulation of proteins in food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(15):2583-97.

38. Xu Y, Wang G, Wang X, Yu J, Wang J, Zhang Z, et al. Effects of homogenization on the molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate. *Food Sci Biotechnol.* 2018;27(5):1293-9.
39. Yang J, Liu G, Zeng H, Chen L. Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. *Food Hydrocolloids.* 2018;83:275-86.
40. Arboleya S, Solís G, Fernández N, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: a target for intervention? *Gut microbes.* 2012;3(6):583-8.
41. Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ. Comparison of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2016;172:72-84.
42. Ahn JB, Hwang HJ, Park JH. Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2001;11(3):443-51.
43. Ghandi A, Powell IB, Howes T, Chen XD, Adhikari B. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: A laboratory and pilot scale study. *Journal of Food Engineering.* 2012;113(2):194-200.
44. Kurtmann L, Carlsen CU, Risbo J, Skibsted LH. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology.* 2009;58(2):175-80.
45. Nag A, Das S. Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of Functional Foods.* 2013;5(1):170-7.
46. Zhang S, Yang J, Henning SM, Lee R, Hsu M, Grojean E, et al. Dietary pomegranate extract and inulin affect gut microbiome differentially in mice fed an obesogenic diet. *Anaerobe.* 2017;48:184-93.
47. Choque Delgado GT, Tamashiro WMdSC. Role of prebiotics in regulation of microbiota and prevention of obesity. *Food Research International.* 2018;113:183-8.



**CAPÍTULO 6**  
**CONCLUSIONES**

---





## CONCLUSIONES

1. El extracto de proteína de soja obtenido a partir de un subproducto producido por la industria productora de bebidas vegetales y derivados de la soja, presenta una concentración proteica del 75%, así como un perfil de aminoácidos y una composición de fracciones proteicas similares a las descritas en bibliografía y a las disponibles en el mercado.
2. Las proteínas de soja tienen la capacidad de formar MP conteniendo microorganismos probióticos mediante la adición de iones calcio y posterior secado mediante atomización. Las MP resultantes son esféricas y presentan una estructura de tipo matricial con un diámetro promedio de 11  $\mu\text{m}$  en las que las bacterias se encuentran distribuidas en la matriz proteica.
3. La microencapsulación de bacterias probióticas en proteínas de soja mejora la estabilidad de los microorganismos durante su almacenamiento en condiciones controladas de temperatura y humedad (25 °C/60% HR) frente a las bacterias liofilizadas en presencia de un crioprotector. Esta estabilidad depende, además, de los coadyuvantes tecnológicos adicionados durante el proceso de atomización, presentando mejores resultados las MP deshidratadas en presencia de OEI. Concretamente, la viabilidad de *L. plantarum* CECT 220 microencapsulado en proteínas de soja utilizando OEI como agente de carga mejora la estabilidad de los microorganismos durante su almacenamiento un 52,4% con respecto a su control. Esta mejora de la estabilidad permitiría eliminar la cadena de frío durante el almacenamiento de los probióticos.
4. Las MP de soja aumentan significativamente la resistencia GI *in vitro* de *L. plantarum* CECT 220 y *L. casei* CECT 475 con respecto a sus respectivos líofilos, incrementando la viabilidad en cuatro y tres unidades logarítmicas, respectivamente.
5. La morfología, el tamaño y la estabilidad de las MP depende de la relación en masa entre las proteínas de soja y los iones calcio, siendo 1:35 un ratio adecuado  $\text{Ca}^{2+}/\text{SPC}$  para conferir la estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente.
6. Las MP de proteína de soja conteniendo *L. plantarum* CECT 220 mejoran la viabilidad celular a 4 °C en medios ácidos con respecto a las células libres en suspensión y liofilizadas. Concretamente, tras tres meses, la estabilidad en ácido láctico pH = 4 se mantiene durante un periodo cuatro veces superior con respecto al control.

7. *L. plantarum* CECT 220 microencapsulado en proteínas de soja presenta una estabilidad térmica (80 °C, 1 min) y una resistencia en SG (2 h) tras el tratamiento térmico significativamente superiores respecto a su liófilo.

8. La microencapsulación de *L. plantarum* CECT 220 no presenta diferencias significativas de viabilidad durante el almacenamiento en las matrices alimentarias ensayadas respecto a la incorporación de las bacterias liofilizadas. Sin embargo, considerando el conjunto de todos los procesos de la cadena de producción: almacenamiento, distribución e ingesta estudiados de forma individual en este trabajo, la microencapsulación de los probióticos incrementa la viabilidad celular en 270%, aproximadamente, con respecto a los probióticos liofilizados. Este hecho, garantiza el mantenimiento de la concentración aceptada como probiótica desde el momento de la microencapsulación hasta el de su ingesta.

**ANEXO**

***Microparticles for encapsulating probiotics, obtaining said  
microparticles and uses thereof***

---

**PATENT APPLICATION**

**Inventors**

**González Ferrero, Carolina; González Navarro, Carlos Javier; Irache Garreta,  
Juan Manuel; Marín Calvo, Beatriz; Romo Hualde, Ana; Virto Resano, Raquel**

**Priority Number: EP15382634.2**

**Priority Date: 17 December 2015**

**Patent Licensed to NUCAPS NANOTECHNOLOGY, S.L.**



## **MICROPARTICLES FOR ENCAPSULATING PROBIOTICS, OBTAINING SAID MICROPARTICLES AND USES THEREOF**

### **FIELD OF THE INVENTION**

The present invention is comprised in the scope of food, nutraceutical, cosmeceutical and pharmaceutical technology. Particularly, it relates to microparticles comprising a solid matrix of soybean protein and probiotic bacteria, to a method for obtaining the microparticles and to their applications.

### **BACKGROUND OF THE INVENTION**

The intestinal microbiota of a healthy adult is relatively stable and contains various beneficial bacterial populations made up primarily of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species playing an important role in host health. Beneficial colonic microbiota imbalance can contribute to the development of different disorders, such as gastrointestinal tract infections, constipation, irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease, allergies, heart diseases and colon cancer. The World Health Organization (WHO) has recommended the use of the therapeutic and prophylactic potential of beneficial microorganisms or probiotics to prevent these risks.

Probiotics are defined as live microorganisms which provide health benefit on the host when administered in adequate amounts (FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Córdoba, Argentina 2001). Several studies have reported the beneficial effects of probiotics on human health, including reduction of lactose intolerance, resistance to enteric pathogens, prevention of cancer, cardiovascular diseases and gastrointestinal disorders, and modulation of host immune response. Additionally, the possible role of probiotics in dental caries prevention is under research.

Probiotics exhibit their beneficial effects when they are alive and contain an adequate number of bacteria. A daily dose of at least  $10^6$ - $10^7$  living cells has been suggested to assure health-relevant effects following the consumption of probiotic products.

There are four basic ways for consuming probiotics: as a concentrated culture added to a drink (e.g., fruit juice, etc.), inoculated in prebiotic fibers, as a dietary supplement in

lyophilized cell dosage forms (e.g., powder, capsules, tablets, etc.) and inoculated in milk-based foods.

However, probiotics, such as those belonging to the genus of *Lactobacillus*, face challenges from the extreme gastrointestinal environment which reduces the survival rate of the probiotics reaching the small intestine. To overcome these problems, many methods have been developed to protect the probiotics from being destroyed, such as drying techniques or microencapsulation.

Spray-drying has been used for the preservation of probiotic bacteria due to the easy availability of the process as well as to low cost, however, it gives rise to a high bacterial mortality rate as a result of the simultaneous dehydration and thermal inactivation process of the microorganisms.

Microencapsulation is considered the preferred method as it allows bacteria to be entrapped or contained in microcapsules, protecting them from the acidic environment of the stomach and from the destructive effects of bile fluid in the upper part of the intestine. In consideration of these conditions, bowel soluble microcapsules must be resistant to pH levels in the range of 1.0 to 3.0 in the gastric fluid and then disintegrate in the duodenum or the first half of the small intestine.

Methods of encapsulation include chemical, physical and mechanical processes, such as interfacial polymerization, in situ polymerization, chemical radiation, coacervation and extrusion.

The materials used for microencapsulation are typically natural polysaccharides and proteins because they often lack cytotoxicity and have safe biodegradation products and they do not require the use of organic solvents for preparing microcapsules.

Alginate-based microencapsulation has been widely described to test the bacterial survival in acidic and bile conditions, but some studies revealed that alginate was not always successful as a protectant of probiotic bacteria (Dianawati, D. et al, *Journal of Food Science*, 2011, 76(9), M592-599; Krasaekoopt, W. et al., *International Dairy Journal*, 2004, 14(8), 737-743).

The use of carbohydrates, such as guar gum, locust beam gum or waxy maize starch was also not effective in protecting probiotic bacteria upon exposure to very low pH (Ding, W.K. et al., *Journal of Food Science*, 2009, 74(2), M100-M107; O'Riordan, K. et al., *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91, 1059-1066).

Over the past few years, proteins, as novel wall materials, have become a popular choice for the encapsulation of probiotics.

One of the proteins used for encapsulating probiotic bacteria is casein, a conjugated protein making up about 80% of total milk proteins. Studies have been developed using this protein alone or in combination with other polymers, including polysaccharides, for encapsulating probiotic bacteria (Heidebach, T. et al., *International Dairy Journal*, 2009, 19, 77-84; Heidebach et al., *Journal of Food Engineering*, 2010, 98, 309-316; Oliveira et al., *Journal of Microencapsulation*, 2007, 24, 673-81). Good encapsulation efficiency results were being obtained without compromising bacterial viability. Studies on the resistance to acidic pH conducted in the three identified papers clearly show that the microcapsules protect the bacteria from acidity. However, none of said papers conducts the study using pepsin to reproduce the actual gastric conditions which are more aggressive than mere acidic pH (the enzyme may degrade the protein and increase the bacterial exposure to the medium). Only a significant improvement in the protection of the probiotic bacteria from being inactivated by external agents during processing and storage and from the acidic-peptidic conditions of the upper gastrointestinal tract has been obtained when combining casein with chitosan as microparticles-forming material (WO2014/006261).

Soybean protein has also been used to encapsulate probiotics. Dianawati, D. et al. (*Food Research International*, 2013, 51, 503-509) describes the microencapsulation of *Bifidobacterium longum* by means of a w/o emulsion followed by pasteurization, incorporation of bacteria and freeze-drying. A combination of a protein, such as sodium caseinate, whey protein concentrate, soybean protein isolate or skim milk with sugars (glycerol, mannitol or maltodextrin) was used as microcapsule-forming materials, stating that milk proteins are more effective than soybean protein isolate.

The protecting mechanism of soybean protein isolate (SPI) on *Bifidobacterium* has been studied by Pan et al. (*Food Research International*, 2014, 64, 323-328) in a system wherein *Bifidobacterium longum* is localized in the microcapsule core and SPI acts as a wall-coating material. The use of SPI is postulated as a food ingredient in protecting probiotics but no data regarding the stability under storage or gastrointestinal resistance have been provided.

Sun et al. (*Food Science & Technology*, 2014, 49, 1287-1293) describe the use of SPI with high methoxy pectin (HMP) as encapsulating materials for probiotic bacteria stating that the complex SPI:HMP with a particular volume ratio 7:1 can increase the number of alive bacteria when compared to naked bacteria.

Document WO2008/076975 discloses the preparation of a cross-linked gel based on a polysaccharide and a protein, such as soybean protein, which is further lyophilized, ground and sieved to form a dried microsized structure to protect probiotic bacteria from high temperatures and humidity conditions.

WO2005/032568 describes a powdery fermented product obtained by fermenting soy milk in the presence of lactic acid bacteria and yeast, neutralizing the fermented liquid product obtained with a calcium compound, and subsequent drying and pulverization to give the fermented product in powder form.

Cold-set particulate hydrogels made from soy protein have also been described in the prior art to incorporate heat-labile compounds or probiotics during the gelation step (Speroni, F. et al., *Food Hydrocolloids*, 2013, 33, 85-91) and as controlled delivery devices for nutraceutical compounds such as riboflavin (Maltais, A., *Food Hydrocolloids*, 2009, 23, 1647-53). These hydrogels are obtained by denaturing the soy protein and subsequent re-arrangement in a three-dimensional network stabilized by non-covalent interactions, with calcium ions interspersed within the denatured protein structure. However, it should be pointed out that said hydrogels may not be considered in any case as comprising individual microparticles of a solid self-assembling soybean-containing matrix.

In spite of the encapsulating systems described in the prior art, the benefits obtained can still be improved and therefore, there is still a need to develop systems which enhance the protection of the probiotic bacteria through the gastrointestinal tract that can be obtained by means of easily available processes and thus be implemented at industrial scale.

## **SUMMARY OF THE INVENTION**

The inventors of the present invention have discovered microparticles having the capacity of encapsulating probiotic bacteria by means of an entrapment mechanism, for their subsequent incorporation into foods and nutraceutical, cosmeceutical and pharmaceutical products. These microparticles protect the probiotic bacteria from being inactivated by external agents when processing the food or nutraceutical, cosmeceutical or pharmaceutical product in which they are incorporated, but also during storage over long periods under environmental or controlled conditions, increasing the shelf life of these products when compared, for example, to lyophilized or spray-dried bacteria. Furthermore, after being administered to the human or animal



body, they facilitate probiotic bacteria release in the desired location, and improve their protection from the “acidic-peptic” conditions of the upper gastrointestinal tract, particularly of the stomach, when compared to naked or lyophilized probiotic bacteria as pointed out in the experimental part of this document.

These microparticles are stable and inert in the food or in the nutraceutical, cosmeceutical or pharmaceutical formulation in which they are incorporated, preventing the food, nutraceutical, cosmeceutical or pharmaceutical matrix from compromising the bacterial viability.

The microparticles have the additional advantage of being safe for people having milk protein allergy, thus offering a commercial alternative to other microparticles, such as those made with casein.

Furthermore, the inventors have developed a method for obtaining these microparticles in a simple manner, particularly by a method of simple coacervation, which is applicable at industrial scale. This method does not include the use of surfactants or emulsifiers, synthetic polymers, or any reagent which is not approved as food additive. Furthermore, this process allows microparticles to be spontaneously formed in the medium in which they are obtained by means of local interactions of the different components thereof, thus leading to a uniform dispersion of self-assembling microparticles having a matrix-type structure wherein probiotic are distributed.

The microparticles can be resuspended, but not dissolved, easily in an aqueous medium, protecting the probiotic bacteria they contain from the medium. The microparticles of the invention remain stable in the product in which they are incorporated, so a significant decrease in the viable bacteria count after long storage periods under environmental and/or controlled conditions is prevented. Furthermore, these microparticles are applicable to different types of foods, from drinks and dairy products to solid foods, and in nutraceutical products. Likewise, said microparticles can be formulated into cosmeceutical and pharmaceutical formulations.

The microparticles of the invention provide a new system for entrapping and stabilizing probiotic microorganisms. According to the present invention, a solid matrix comprising soybean protein in combination with a di- or tri-valent metal is used as a vehicle for protecting the probiotic bacteria from the environmental conditions during long storage periods and from the gastric conditions, thus increasing the lifetime and facilitating release into the intestine and improving their probiotic effect. Furthermore, the soybean

protein *per se* has significant nutritional properties complementing the beneficial effects of the entrapped probiotic bacteria itself.

Therefore, a first aspect of the present invention relates to self-assembling microparticles comprising a solid matrix and probiotic bacteria, wherein the solid matrix comprises soybean protein and a di- or tri-valent metal cation, and wherein the probiotic bacteria are distributed throughout the solid matrix. Preferably, the probiotic bacteria are homogeneously distributed throughout said solid matrix.

In another aspect, the invention relates to a method for obtaining the self-assembling microparticles provided by this invention, which comprises:

- a) preparing a dispersion of soybean protein in an alkaline aqueous solution;
- b) preparing a suspension of probiotic bacteria;
- c) mixing the suspension of the probiotic bacteria prepared in step b) with the dispersion of soybean protein prepared in step a);
- d) adding to the resulting mixture obtained in step c) a di-valent or tri-valent metal cation.

In another aspect, the invention also relates to self-assembling microparticles obtainable by the process as described above.

Another aspect of the invention relates to a composition comprising at least one self-assembling microparticle provided by this invention, or at least one self-assembling microparticle obtainable by the process provided by this invention.

In another aspect, the invention relates to a food, nutraceutical, cosmeceutical or pharmaceutical product comprising i) at least one self-assembling microparticle provided by this invention and/or a self-assembling microparticle obtained by means of the method of the invention, or ii) a composition provided by this invention.

### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figure 1 is a graph of the heat treatment of sterilization applied to soybean flour in a rotary autoclave, where diamond graph shows the environment temperature sensor, horizontal rectangles show the product temperature sensor and triangles indicate the amount of heat treatment delivered at 121 °C per minute over ten minutes ( $F_{121}^{10}$ ).

Figure 2 shows photographs of the soybean flour from the soybean milk manufacturing before the extraction protein processing (a), and photographs of the soybean protein

concentrate after drying and milling (b).

Figure 3 shows a confocal microscopy image of soybean protein and calcium microparticles after spray-drying with encapsulated *L. plantarum* (x 100). The scale in the lower right part represents 10  $\mu\text{m}$ .

Figure 4 is a histogram of the size distribution of the soybean and calcium microparticles containing *L. plantarum*. Mean was calculated from the measure of the diameter of 100 microparticles using the software imaging system coupled the microscope.

Figure 5 shows the transmission electron microscopy images showing empty soybean protein and calcium microparticles (a, b, x 2520) and with encapsulated *L. plantarum* (c, x 2520; d, x2000). The scale in the lower right part represents 2000 nm for images a), c) and d) and 1000 nm for image b). All images were captured using an energy filtering Zeiss LIBRA 120 transmission electron microscope (TEM) with a Gatan Ultrascan 1000 2k x 2k CCD camera (accelerating voltage = 80 kV).

Figure 6 is a graph showing the viability of *L. plantarum* under controlled conditions (25 °C/60% RH) over time: *L. plantarum* encapsulated in soybean protein with calcium microparticles (Sp formulation); variations of this composition (Sp 250, Sp 500, Sp 750); non-encapsulated lyophilized *L. plantarum*; non-encapsulated spray-dried *L. plantarum*; fresh concentrated suspension of *L. plantarum* in MRS culture medium and fresh concentrated suspension of *L. plantarum* in 2% sucrose (w/v) solution.

Figure 7 is a graph showing the survival of *L. plantarum* in simulated gastrointestinal medium (0 to 2 hours: simulated gastric medium; 2.1 to 8 hours: simulated intestinal medium): non-encapsulated lyophilized *L. plantarum*; non-encapsulated spray-dried *L. plantarum* and *L. plantarum* encapsulated in soybean protein and calcium microparticles (Sp, Sp 250, Sp 500, Sp 750).

Figure 8 shows the viability of *L. plantarum* in acidic conditions (HCl pH 3) for different forms: microparticles of soybean protein with calcium in the presence of a protecting agent (Sp), lyophile and suspension in 2% sucrose (w/v).

Figure 9 shows the viability of *L. plantarum* in fresh milk (a) and fresh orange juice (b) for microparticles of soybean protein with calcium in the presence of a protecting agent (Sp) and lyophile.

Figure 10 is a graph showing the viability of *L. casei* under controlled conditions (25 °C/60% RH) over time: *L. casei* encapsulated in soybean protein with calcium

microparticles in the presence of a protecting agent (Sc formulation); non-encapsulated lyophilized *L. casei*; non-encapsulated spray-dried *L. casei*; fresh concentrated suspension of *L. casei* in MRS culture medium and fresh concentrated suspension of *L. casei* in 2% sucrose (w/v) solution.

Figure 11 is a graph showing the survival of *L. casei* in simulated gastrointestinal medium (0 to 2 hours: simulated gastric medium; 2.1 to 8 hours: simulated intestinal medium): non-encapsulated lyophilized *L. casei*; non-encapsulated spray-dried *L. casei* and *L. casei* encapsulated in soybean protein and calcium microparticles in the presence of a protecting agent (Sc).

Figure 12 shows optical microscopy images of particles obtained using a weight ratio (soybean protein)/Ca<sup>2+</sup> of: (a) 122:1 (w/w) (before drying); (b) 35:1 (w/w) (before drying); (c) 122:1 (w/w) (after drying); (d) 35:1 (w/w) (after drying).

Figure 13 is a photograph of the gel obtained following the process of WO2008/076975 but using a weight ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> of 35:1 (w/w) according to the invention, and using (a) alginate; (b) chitosan; before lyophilization, ground and sieved.

Figure 14 is a photograph of the gel obtained following the process of WO2008/076975 but using a weight ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> of 35:1 (w/w) according to the invention, using (a) alginate; (b) chitosan; after lyophilization and before ground and sieved.

Figure 15 shows different optical microscopy images of dried, ground and sieved gel obtained following the process of WO2008/076975 but using a weight ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> of 35:1 (w/w) according to the invention.

## **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The present invention relates to the production of microparticles for encapsulating or entrapping probiotic bacteria, for the purpose of preventing their inactivation after incorporation into food, nutraceutical, pharmaceutical or cosmeceutical matrices and of protecting them from the “acidic-peptic” conditions during transit through the gastrointestinal tract once they have been administered.

### **Microparticles of the invention**

A first aspect of the present invention relates to self-assembling microparticles, hereinafter “microparticles of the invention”, comprising a solid matrix and probiotic bacteria, wherein the solid matrix comprises soybean protein and a di- or tri-valent metal cation, and wherein the probiotic bacteria are distributed throughout the solid

matrix. More preferably, the probiotic bacteria are homogeneously distributed throughout the solid matrix.

As used herein, the term “microparticles” is used to designate colloidal systems having spherical or quasi-spherical shape and having a mean size less than 1 millimeter (mm), generally ranging from 0.5 to 999 micrometers ( $\mu\text{m}$ ), typically ranging from 1 to 900  $\mu\text{m}$ . In a particular embodiment, the microparticles of the invention have a size less than 1 mm, generally comprised between 0.1 and 999  $\mu\text{m}$ , typically between 0.2 and 900  $\mu\text{m}$ , advantageously between 0.3 and 500  $\mu\text{m}$ , preferably between 0.4 and 250  $\mu\text{m}$ , more preferably between 0.5 and 125  $\mu\text{m}$ , even more preferably between 0.7 and 50  $\mu\text{m}$ , still more preferably between 1 and 30  $\mu\text{m}$ , even still more preferably between 5 and 15  $\mu\text{m}$ .

“Mean size” is understood as the average diameter of the microparticle population, moving together in an aqueous medium. The mean size of these systems can be measured by standard methods known by the person skilled in the art and are described, for example, in the experimental part below.

In contrast to other microparticles containing soybean protein, metal cation and probiotic bacteria, such as those described in WO2008/076975, which basically correspond to irregular crystals obtained from lyophilization, grinding and sieving a gel previously formed, the microparticles of the invention are further characterized for being self-assembling microparticles, understanding as such microparticles as defined above having an organized structure or pattern resulting from the local interactions among the components of microparticles themselves.

Thus, in the scope of the present invention, the microparticles of the present invention can be considered as comprising building blocks re-engineered from natural soybean protein which, in the presence of di- or tri-valent metal cation, self-assemble to form solid matrix systems. During the assembly process, bacteria are captured by means of an entrapment mechanism, being distributed throughout the entire matrix.

Therefore, the term “solid matrix” refers to a solid microsphere having a matrix-type structure in which the soybean protein and the di- or tri-valent metal cation form a continuous structure and wherein the probiotic bacteria are distributed, preferably homogeneously distributed, throughout the entire matrix.

Thus, contrary to the term “capsule” or “microcapsule”, the solid matrix of the microparticles of the invention has not differentiated external and internal structures and, therefore, the probiotic bacteria are distributed, more preferably homogeneously

distributed, throughout the entire matrix forming the microparticle and not encapsulated or confined within a central cavity thereof.

As used herein, the term "soybean protein" includes whole soy milk, defatted concentrated soy milk, concentrated soybean protein, extracted soybean protein, isolated soybean protein, soybean protein fractions, etc. Such soybean proteins are different from each other in the contents of proteins, form, properties and functions for each of products.

Soybean milk can be produced as a first soybean protein by subjecting soybeans to solvent extraction to separate them into rind and soybean oil, pulverizing the residual skimmed soybeans under heating to prepare powdered skimmed soybeans, and removing fibrous non-soluble products. Alternatively, soybean milk can be produced as a first soybean protein by subjecting soybeans to solvent extraction to separate them into rind and soybean oil, boiling the residual skimmed soybeans to prepare a water solution containing swollen soybeans through water-extraction and removing fibrous non-soluble products.

Soybean proteins can also be produced by sterilizing soybean milk under drying to prepare dried soybean milk.

The soybean protein used in the present invention may be a powdery soybean protein product prepared from defatted soybean flour by a variety of art-recognized methods, which can increase the protein content. Specific examples thereof include extracted soybean protein having a soybean protein content ranging from 50 to 60 wt%, concentrated soybean protein having a soybean protein content ranging from 60 to 70 wt%, soybean protein fraction having a soybean protein content ranging from 70 to 80 wt%, and isolated soybean protein having a soybean protein content of not less than 90 wt%.

In a particular embodiment, isolated soybean protein products are preferred because of their high soybean protein contents. Alternatively, it is also possible to use the foregoing soybean protein products slightly hydrolyzed to such an extent that they do not have extreme bitterness and rough taste.

In another particular embodiment, the soybean protein used in the present invention is preferably a soybean protein fraction obtained from soybean flour, a by-product in the production of soybean milk. More particularly, the soybean protein fraction has a soybean protein content ranging from 70 to 80 wt%. The soybean protein obtained

from the residue of soy flour not only improves the viability of probiotic microorganisms, but also provides a value to the by-product originated in the soybean milk processing.

The conventional procedure for the production of isolated soybean protein and soybean protein fractions is based on protein solubilization at neutral or slightly alkaline pH, and precipitation by acidification to the isoelectric region, near pH 4.5. The resulting isoelectric product is subsequently subjected to spray-drying or freeze-drying to obtain the product in powder form.

The soybean protein may also be in form of soybean proteinates which can be produced by resuspending the resulting isoelectric product as that mentioned above in water, neutralizing with different bases and spray-drying or freeze-drying the resulting solution or suspension. Depending on the base used for neutralization, sodium, potassium, ammonium or calcium soybean proteinates can be produced.

Since spray-drying or freeze-drying are the common drying methods in the production of concentrated soybean protein, extracted soybean protein, isolated soybean protein and soybean protein fractions, the primary physical form thereof is that of fine powders. However, the soybean protein can be in the form of soybean protein curds, particle-like separated soybean proteins, particle-like concentrated soybean proteins, spun fiber-like soybean proteins, structural fiber-like soybean proteins, particle-like soybean proteins, hunk-like soybean proteins, flake-like soybean proteins, bar-like soybean proteins, dice-like soybean proteins, which are made by further processing.

Soybean protein curds can be produced by separating proteins from the soybean milk by acid. Particle-like separated soybean proteins can be produced by sterilizing soybean protein curds, neutralizing them, and subjecting them to spray drying. Soybean protein curds can be produced by washing the above-described skimmed soybeans with acid or alcohol. Particle-like concentrated soybean proteins can be produced by sterilizing soybean protein curds, neutralizing them, and subjecting them to spray drying. Soybean protein curds, particle-like separated soybean proteins, particle-like concentrated soybean proteins produced in such a manner as described above are processed by means of a single-screw extruder, nozzle spraying, or double-screw extruder to form spun fiber-like soybean proteins, structural fiber-like soybean proteins, particle-like soybean proteins, hunk-like soybean proteins, flake-like soybean proteins, bar-like soybean proteins, dice-like soybean proteins.

The solid matrix comprised in the microparticles of the invention also contains at least a divalent metal cation, at least a trivalent metal cation or a combination thereof.

As used herein, the term “divalent metal cation” refers to a cation originating from any metal element the valence of which is 2, for example, an alkaline earth-metal, e.g., calcium, magnesium, zinc, etc., or if it has several valences, one of them is 2, for example, iron, etc., provided that said cation is pharmaceutically acceptable or suitable for use in food. In a preferred embodiment, the divalent metal is selected from  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$ , more preferably is  $\text{Ca}^{2+}$ .

As used herein, the term “trivalent metal cation” refers to a cation originating from any metal element the valence of which is 3, or if it has several valences, one of them is 3, for example, iron, etc., provided that said cation is pharmaceutically acceptable or suitable for use in human or animal food.

As will be understood by the person skilled in the art, the di-valent or tri-valent metal can be provided by any suitable source of said metal cation, such as a compound which gives rise to said di- or tri-valent metal cation in an aqueous solution. For example, in the case of using  $\text{Ca}^{2+}$ , this divalent metal cation can be obtained from calcium chloride, calcium acetate, calcium gluconate, calcium lactate, calcium sorbate, calcium ascorbate, calcium citrate, calcium propionate, calcium sulfate, etc., or mixtures of said compounds.

In a particular embodiment of the invention, the by weight ratio of the soybean protein and the di- or tri-valent metal cation varies within a wide range from 1:1 to 100:1 which confers microparticles with a regular morphology, namely a uniform and spherical shape, in contrast to a fusiform morphology obtained when higher ratios are used, as pointed out in the experimental part below. More preferably, the by weight ratio of the soybean protein and the di- or tri-valent metal cation varies from 2:1 to 80:1, even more preferably from 5:1 to 60:1, most preferably from 10:1 to 40:1.

In another preferred embodiment, the metal cation is a divalent metal cation, more preferably  $\text{Ca}^{2+}$ .

More particularly, the by weight ratio of the soybean protein and calcium cation ( $\text{Ca}^{2+}$ ) varies within a wide range from 5:1 to 60:1, more preferably from 10:1 to 40:1.

As mentioned herein before, the microparticle of the invention comprises probiotic bacteria which are distributed, more preferably homogeneously distributed, throughout the entire solid matrix formed by the soybean protein and the di- or tri-valent metal cation. Thus, said probiotic bacteria are not encapsulated or confined in the central cavity of the microparticle as the solid matrix is formed by a solid microsphere in which the soybean protein and the di- or tri-valent metal form a solid continuous structure.



As used herein, the term “probiotic” is defined as a live microorganism which exerts a beneficial physiological action on host health when administered in suitable amounts (FAO/WHO 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, London). The probiotics used in the present invention are “probiotic bacteria”, i.e., live bacteria which exert a beneficial physiological action on host health when administered in suitable amounts. In a particular embodiment, said probiotic bacteria are bacteria of the genus *Bifidobacterium* or *Lactobacillus*. In a more particular embodiment, said probiotic bacteria are selected from *L. plantarum* and *L. casei*. In a specific embodiment, the probiotic bacteria are *L. plantarum* CECT 220 and *L. casei* CECT 475 isolated from corn silage and cheese, respectively. In another particular embodiment, said probiotic bacteria are a strain of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, such as those marketed under the trademark BB-12®.

The amount of probiotic bacteria per unit of weight of the matrix that may be present in the microparticles of the invention can vary within a wide range, nevertheless, in a particular embodiment, the microparticles of the invention comprise at least  $10^6$  colony forming units per gram (CFU/g) of matrix, generally between  $10^6$  CFU/g and  $5 \times 10^{13}$  CFU/g, preferably between  $10^7$  CFU/g and  $10^{12}$  CFU/g.

In another particular and optional embodiment, the microparticles of the invention further comprise a compound protecting the matrix and the probiotic bacteria during the process of drying the microparticles, or of drying the suspension containing the microparticles of the invention by means of conventional methods, for example, by means of spray drying, hereinafter, “protecting agent”. Said protecting agent does not form part of the solid matrix of the microparticles but acts as a bulking agent to facilitate the drying of microparticles in an efficient way, so as the structure thereof is maintained and the probiotic bacteria withstand the thermal conditions. Virtually, any compound complying with those characteristics can be used as a protecting agent. In a particular embodiment, said protecting agent is a saccharide or generally a suitable food additive which, in addition to the protective role, acts as a prebiotic. As used herein, the term “prebiotic” refers to a non-digestible food ingredient which stimulates probiotic growth and/or activity. Non-limiting, illustrative examples of protecting agents which can be used within the context of the present invention include lactose, mannitol, sucrose, maltodextrin, glucose, sorbitol, etc., as well as substances with prebiotic characteristics, such as for example, oligofructose, pectin, inulin, oligosaccharides (e.g. galacto-oligosaccharides, human milk oligosaccharides), lactulose, dietary fiber, etc., and any combination thereof. In a particular embodiment, the protecting agent is

selected from maltodextrin, inulin, fructooligosaccharides and combinations thereof. If the microparticles of the invention include a protecting agent, the by weight ratio of the matrix and the protecting agent can vary within a wide range; nevertheless, in a particular embodiment, the soybean protein:protecting agent by weight ratio is 1:0.1-5, typically 1:0.5-4, preferably about 1:1.

In another particular embodiment, the microparticles of the invention are devoid of any coating material. Thus, said microparticles comprise the solid matrix as described above and probiotic bacteria and no coating layer/material coats or encases the solid matrix. In this particular embodiment, the solid matrix comprises soybean protein and a di- or tri-valent metal cation and the probiotic bacteria are distributed, more preferably homogeneously distributed, throughout the solid matrix.

In another particular embodiment, the self-assembling microparticles of the invention consist of a solid matrix and probiotic bacteria, wherein the solid matrix comprises soybean protein and a di- or tri-valent metal cation, and wherein the probiotic bacteria are distributed throughout the solid matrix. More preferably, the probiotic bacteria are homogeneously distributed throughout the solid matrix.

In this particular embodiment, it is preferred that the weight ratio of the soybean protein and the di- or tri-valent metal cation varies within a range from 1:1 to 100:1, more preferably from 2:1 to 80:1, even more preferably from 5:1 to 60:1, most preferably from 10:1 to 40:1.

It is also preferred that the metal cation is a divalent metal cation, more preferably  $\text{Ca}^{2+}$ . More particularly, the by weight ratio of the soybean protein and calcium cation ( $\text{Ca}^{2+}$ ) varies within a wide range from 5:1 to 60:1, more preferably from 10:1 to 40:1.

In another particular embodiment, the self-assembling microparticles of the invention consist of a solid matrix and probiotic bacteria, wherein the solid matrix consists of soybean protein and a di- or tri-valent metal cation, and wherein the probiotic bacteria are distributed throughout the solid matrix. More preferably, the probiotic bacteria are homogeneously distributed throughout the solid matrix.

In this particular embodiment, it is preferred that the weight ratio of the soybean protein and the di- or tri-valent metal cation varies within a range from 1:1 to 100:1, more preferably from 2:1 to 80:1, even more preferably from 5:1 to 60:1, most preferably from 10:1 to 40:1.

It is also preferred that the metal cation is a divalent metal cation, more preferably  $\text{Ca}^{2+}$ . More particularly, the by weight ratio of the soybean protein and calcium cation ( $\text{Ca}^{2+}$ ) varies within a wide range from 5:1 to 60:1, more preferably from 10:1 to 40:1.

#### Method for obtaining the microparticles of the invention

Another aspect of the present invention refers to a process, hereinafter “process of the invention”, for obtaining the self-assembling microparticles as those described above.

Said process comprises:

- a) preparing a dispersion of soybean protein in an alkaline aqueous solution;
- b) preparing a suspension of probiotic bacteria;
- c) mixing the suspension of the probiotic bacteria prepared in step b) with the dispersion of soybean protein prepared in step a);
- d) adding to the resulting mixture obtained in step c) a di-valent or tri-valent metal cation.

Step a) of the process of the invention provides a dispersion of soybean protein in an alkaline aqueous solution.

The soybean protein may have different origin, for example it may be a concentrated soybean protein, extracted soybean protein, isolated soybean protein, soybean protein fractions, etc. Methods for obtaining soybean protein are described herein above.

In a preferred embodiment, the soybean protein is isolated soybean protein or a soybean protein fraction obtained from soybean flour by means of any of the methods described herein above.

In a particular embodiment, the soybean protein is in the form of proteinates, for example sodium, potassium, ammonium or calcium soybean proteinates.

The dispersion of the soybean protein in the alkaline aqueous solution can be obtained by conventional methods known by those skilled in the art, for example by adding the soybean protein to the alkaline aqueous solution.

In a particular embodiment, the alkaline aqueous solution is a buffered solution having a pH ranging from 9 to 12, more preferably about 10. Preferably, said alkaline buffered solution is an aqueous carbonate solution.

The amount of soybean protein that can be added to the alkaline aqueous solution can vary within a wide range, nevertheless, in a particular embodiment, the amount dispersed in said alkaline aqueous solution is comprised between 0.5% and 15% (w/v), preferably between 1% and 10% (w/v), even more preferably between 1% and 5% (w/v). Said dispersion of soybean protein preferably does not contain any organic solvent.

In a preferred embodiment, the dispersion of soybean protein is subjected to homogenization by means, for example, of stirring, and to a subsequent centrifugal process in order to collect the supernatant.

The process of the invention further comprises the preparation of a suspension of probiotic bacteria. Although virtually any probiotic bacteria can be used, in a particular embodiment, said probiotic bacteria are bacteria of the genus *Bifidobacterium* or *Lactobacillus*. In a more particular embodiment, said probiotic bacteria are *L. plantarum* or *L. casei*. In a specific embodiment, the probiotic bacteria are *L. plantarum* CECT 220 and *L. casei* CECT 475. In another particular embodiment, said probiotic bacteria are a strain of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, such as that marketed under the trademark BB-12®.

The bacterial suspension comprises, in addition to the probiotic bacteria, a medium suitable for the corresponding probiotic bacteria. Said media are known by the persons skilled in the art. In a particular embodiment, when said probiotics are bacteria of the genus *Lactobacillus*, for example, *L. plantarum* or *L. casei*, said medium comprises broth for *Lactobacillus* according to De Man, Rogosa and Sharpe, such as that identified as 110661 MRS broth (Merck) [MRS broth]; said medium allows lactobacilli and other lactic acid bacteria to grow well and is commonly used for culturing and enriching lactobacilli from clinical samples and foods, particularly dairy products. Generally, the MRS medium comprises (in g/L): 10 g polypeptone; 10 g meat extract, 5 g yeast extract, 20 g glucose, 1.08 ml Tween® 80 (polyethoxylated sorbitan monooleate or polysorbate 80), 2 g potassium phosphate, 5 g sodium acetate, 2 g ammonium citrate, 0.2 g magnesium sulfate, 0.05 g manganese sulfate. The pH of the medium at a temperature of 25 °C is 6.4± 0.2. This culture medium allows abundant development of all lactobacillus species. Peptone and glucose are the source of nitrogen, carbon and other elements necessary for bacterial growth. The polyethoxylated sorbitan monooleate, magnesium, manganese and acetate provide co-factors and can inhibit the development of some microorganisms. Ammonium citrate acts as an inhibitory agent inhibiting the growth of Gram negative bacteria.

The amount of probiotic bacteria which may present in the bacterial suspension can vary within a wide range; nevertheless, in a particular embodiment, the amount of probiotic bacteria present in the bacterial suspension is at least  $10^6$  CFU/ml, generally between  $10^6$  and  $5 \times 10^{12}$  CFU/ml, preferably between  $10^7$  and  $10^{12}$  CFU/ml.

In a particular embodiment, once the bacteria have been cultured in the culture medium until early stationary phase growth, the bacterial suspension is subjected to centrifugation in order to eliminate the culture medium. Then, the bacteria are washed to remove any metabolite that would have been formed as well as residues of the culture medium. The washed bacteria are resuspended in an aqueous solution containing a saccharide, such as sucrose, sucralose or other suitable disaccharide, such as for example, maltose or trehalose. If said bacterial suspension contains a disaccharide, for example, a sucrose, the amount of disaccharide (e.g., sucrose) present in said bacterial suspension will be comprised between 0.1% and 10% (w/v) of disaccharide (e.g., sucrose), preferably between 1% and 3% (w/v).

Once the dispersion of soybean protein and the suspension of probiotic bacteria are prepared, they are mixed according to step c) of the process of the invention. When the dispersion of soybean protein prepared according to step a) is subjected to homogenization and centrifugal process, it is the supernatant which is mixed with the suspension of probiotic bacteria.

The soybean protein and the probiotic bacteria are preferably mixed at room temperature, i.e., at a temperature comprised between 18 °C and 25 °C, preferably between 20 °C and 22 °C, so as to not affect the viability of the probiotic bacteria, advantageously under stirring.

As mentioned before, the matrix comprised in the nanoparticles of the invention further comprises a di- or tri-valent metal cation which is pharmaceutically acceptable or suitable for use in human or animal food.

Thus, the process of the invention further comprises the addition of a di- or tri-valent metal cation to the mixture containing soybean protein and probiotic bacteria. In a particular embodiment, the di- or tri-valent metal cation can be added to said mixture in the form of an aqueous solution. The di- or tri-valent metal cation can be provided by any suitable source of said cation, such as a compound which gives rise to said di- or tri-valent cation in an aqueous solution. In a preferred embodiment, the cation is a di-valent metal cation, more preferably said cation is selected from  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$ , even more preferably the cation is  $\text{Ca}^{2+}$ . The calcium cation can be provided by

an aqueous solution of calcium chloride, calcium acetate, calcium gluconate, calcium lactate, calcium sorbate, calcium ascorbate, calcium citrate, calcium propionate, calcium sulfate, etc., or mixtures of said compounds.

In a particular embodiment, the amount of di- or tri-valent cation added to the mixture is such to obtain a weight ratio soybean protein/metal cation ranging from 1:1 to 100:1, preferably from 2:1 to 80:1, even more preferably from 5:1 to 60:1, most preferably from 10:1 to 40:1.

More preferably, the soybean protein and the metal cation are added in the process of the invention in a weight ratio ranging from 1:1 to 100:1. This weight ratio allows obtaining a uniform dispersion of microparticles in the medium where they are formed, without the formation of precipitates or aggregates. Furthermore, it confers microparticles with a regular morphology, namely a uniform and spherical shape, in contrast to a fusiform morphology obtained when higher ratios are used (see comparative example 1).

More preferably, the soybean protein and the metal cation are added in the process of the invention in a weight ratio ranging from 2:1 to 80:1, even more preferably from 5:1 to 60:1, most preferably from 10:1 to 40:1.

Actually, after mixing the soybean protein, the probiotic bacteria and the di- or tri-valent metal cation under the aforementioned conditions, i.e., at room temperature and under stirring, the microparticles of the invention are spontaneously formed. In a particular embodiment, said microparticles are in suspension in the medium in which they have been obtained.

Thus, contrary to other processes described in the prior art, such as the process described in WO2008/076975 where a gel is previously formed after mixing the different components and additional steps of lyophilization, grinding and sieving are required to obtain micro-sized structures, the process of the invention allows the formation of a uniform dispersion of microparticles by means of simple coacervation, leading to solid microspheres having a matrix-type structure wherein the probiotic bacteria is distributed, more preferably homogeneously distributed, within the whole matrix structure.

Therefore, the microparticles obtained by the process of the invention can be considered as self-assembling microparticles which are spontaneously formed by means of local interactions upon mixture of the bacteria suspension with the soybean protein dispersion in the presence of the metal cation. On the contrary, the

microstructures described in WO2008/076975 correspond to irregular crystals or little pieces of gel obtained as a consequence of the additional steps, such as lyophilization, grounding and sieving, to which the gel previously formed is subjected, thus leading to microsized systems having different rearrangement.

Thus, the present invention also refers to self-assembling microparticles obtainable by the process of the present invention. More particularly, the invention refers to a self-assembling microparticles suspension obtainable by the process as defined above.

In a preferred embodiment, the suspension resulting from the mixing of soybean protein, probiotic bacteria and di- or tri-valent metal cation which contains the microparticles of the invention is subjected to a drying treatment by conventional methods, for example vacuum drying or, advantageously by means of spray drying or by means of lyophilization, in order to dry the microparticles of the invention. This drying treatment allows obtaining the microparticles of the invention in the form of powder, which contributes to increase the stability thereof.

In a particular embodiment, this drying treatment, particularly when it is performed by means of spray drying or by means of lyophilization, comprises adding a protecting agent to the microparticles of the invention once they are formed. This protecting agent protects the matrix and the probiotic bacteria during the drying process thereof, such as for example, a saccharide or generally a suitable food additive, which in addition to the protective role, acts as a prebiotic. Non-limiting, illustrative examples of saccharides which can be used as protecting agents within the context of the present invention include lactose, mannitol, sucrose, maltodextrin, glucose, sorbitol, etc., as well as polysaccharides with prebiotic characteristics, such as for example, oligofructose, pectin, inulin, oligosaccharides (e.g. galacto-oligosaccharides, human milk oligosaccharides), lactulose, dietary fiber, etc. and mixtures thereof. In a particular embodiment, the protecting agent is selected from maltodextrin, inulin, fructooligosaccharides (FOS) and combinations thereof. If the microparticles of the invention include a protecting agent, this is added in the suitable amount; even though the by weight ratio of the matrix of microparticles and the protecting agent can vary within a wide range, in a particular embodiment, the matrix soybean protein:protecting agent by weight ratio is 1:0.1-5, typically 1:0.5-4, preferably about 1:1.

In a particular embodiment in which the method of the invention comprises drying the suspension of microparticles of the invention, said suspension of microparticles of the invention are dried by means of spray drying. To that end, the suspension containing the microparticles of the invention and the protecting agent is introduced in a spray-

dryer and the processing conditions [air inlet temperature, air outlet temperature, air pressure, sample pumping rate, suction, and airflow] are controlled. The person skilled in the art can set the processing conditions that are most suitable for each case.

The method of the invention allows obtaining the microparticles of the invention in the form of a dry powder, which contributes to the stability of the microparticles of the invention during long storage periods under controlled or environmental conditions and it can also be easily incorporated in different intended solid and liquid products (e.g., foods, etc.).

Since the microparticles are formed previously to the addition of the protecting agent, this does not form any conjugate or complex with the soybean protein.

The microparticles obtainable after conducting said drying process thus constitute an additional aspect of the present invention. Accordingly, the invention also refers to self-assembling microparticles obtainable by the process of the invention which includes the drying treatment mentioned above.

More particularly, the invention refers to a dry powder of self-assembling microparticles obtainable by the process of the invention which includes the drying treatment mentioned above.

### Applications

The microparticles of the invention have the capacity to encapsulate or entrap probiotic bacteria and to protect them during processing and from the “acidic-peptic” conditions during transit through the gastrointestinal tract once administered. The inactivation of the probiotic bacteria after incorporation in the different intended products (e.g., foods, etc.) is thus prevented or substantially reduced.

Therefore, in another aspect, the invention relates to a composition, hereinafter “composition of the invention” comprising at least one self-assembling microparticle as defined above, or at least one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, either in the form of a suspension or in dry powder form.

In a particular embodiment, said composition is selected from:

- (a) a composition consisting in a plurality of self-assembling microparticles of the invention, or in a plurality of self-assembling microparticles obtainable by means of the method of the invention, or in a plurality of self-assembling



microparticles of the invention and of self-assembling microparticles obtainable by means of the method of the invention; and

(b) a composition comprising at least one self-assembling microparticle of the invention, and/or a self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, and a food, nutraceutical, cosmeceutical or pharmaceutical acceptable vehicle.

The characteristics of the self-assembling microparticles of the invention have already been defined above and are incorporated herein by reference.

In a particular embodiment, the self-assembling microparticles of the invention are in the form of a dry powder in the composition of the invention.

In the first case, the composition of the invention (a) is made up only and exclusively of self-assembling microparticles of the invention and/or of self-assembling microparticles obtainable by means of the method of the invention.

In the second case, the composition of the invention (b) comprises at least one self-assembling microparticle of the invention and/or a self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, and a food, nutraceutical, cosmeceutical or pharmaceutical acceptable vehicle or carrier.

The person skilled in the art will understand that the microparticles of the invention or the compositions containing them can be part of a food or feed, or of a nutraceutical, pharmaceutical, or cosmeceutical product, which constitutes an additional aspect of the present invention.

Thus, a further aspect of the present invention relates to a food, pharmaceutical, cosmeceutical or nutraceutical product comprising i) at least one self-assembling microparticle of the invention and/or a self-assembling microparticle obtained by means of the method of the invention, or ii) a composition comprising at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, whatever composition (a) or composition (b). Said product can be in a liquid, semi-solid or solid form.

In a particular embodiment, the product of the invention is a food or feed comprising i) at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, or ii) a composition comprising at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-

assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, and a food acceptable vehicle or carrier.

As used herein, the term “food” is any substance or product of any nature, solid or liquid, natural or processed which due to its characteristics, applications, components, preparation and state of preservation, can usually or ideally be used for some of the following purposes: a) as normal nutrition for human beings or animals or as pleasurable foods; or b) as dietetic products, in special cases of human or animal food. The term “feed” includes all the natural materials and finished products of any origin which, separately or conveniently mixed with one another, are suitable as animal food. Examples include cattle feed, chicken feed, horse feed, poultry feed.

A ready-to-eat food is that which does not need to be diluted by means of an aqueous solution suitable for consumption for example. In principle, the ingredients present in a ready-to-eat food are balanced and there is no need to add additional ingredients to the food to make it ready to eat, such considered by a person skilled in the art. A concentrated food is that in which one or more ingredients are present at a higher concentration than in a ready-to-eat food, therefore for use it is necessary to dilute it by means of an aqueous solution suitable for consumption for example. Non-limiting, illustrative examples of foods provided by this invention include both dairy products and derivatives, for example, fermented milks, yoghurt, kephir, curd, cheeses, butters, ice creams, milk-based desserts, etc., and non-dairy products, such as baked products, cakes and pastries, cereals, chocolates, jams, juices, other fruit derivatives, oils and margarines, prepared dishes, etc.

In another particular embodiment, the product of the invention is a nutraceutical product comprising i) at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, or ii) a composition comprising at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, and a nutraceutical acceptable carrier. As used herein, the term “nutraceutical product” refers to a product suitable for use in human beings or animals, comprising one or more natural products with therapeutic action which provide a health benefit or have been associated with disease prevention or reduction, for example, probiotic bacteria, etc., and it includes dietary supplements presented in a non-food matrix (e.g., capsules, powder, etc.) of a concentrated natural bioactive product usually present (or not) in the foods and which, when taken in a dose higher than that existing in those foods, exerts a favorable effect on health which is greater than effect which the

normal food may have. Therefore, the term “nutraceutical product” includes isolated or purified food products as well as additives or food supplements which are generally presented in dosage forms normally used orally, for example, capsules, tablets, sachets, drinkable phials, etc.; such products provide a physiological benefit or protection against diseases, generally against chronic diseases. If desired, the nutraceutical product provided by the invention can contain, in addition to the probiotic bacteria, one or more nutraceuticals (products or substances associated with disease prevention or reduction), for example, flavonoids, omega-3 fatty acids, etc., and/or one or more prebiotics (non-digestible food ingredients which stimulate probiotic activity and/or growth), for example, oligofructose, pectin, inulin, galacto-oligosaccharides, lactulose, human milk oligosaccharides, dietary fiber, etc.

In another particular embodiment, the product of the invention is a pharmaceutical product comprising i) at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, or ii) a composition comprising at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, and a vehicle or carrier suitable for oral, topical, rectal or vaginal administration; to that end, said product comprises a pharmaceutically acceptable vehicle or carrier comprising one or more excipients suitable for oral administration, for example, in the form of capsule, powder, granulate, tablet (coated or non-coated), sachet, matrix, suspension, etc., or a pharmaceutically acceptable vehicle or carrier comprising one or more excipients suitable for topical administration, for example, in the form of cream, ointment, salve, etc., or a pharmaceutically acceptable vehicle or carrier comprising one or more excipients suitable for rectal administration, for example, in the form of suppository, etc., or a pharmaceutically acceptable vehicle or carrier comprising one or more excipients suitable for vaginal administration, for example, in the form of bolus, suppository, etc.

In another particular embodiment, the product of the invention is a cosmeceutical product comprising i) at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, or ii) a composition comprising at least one self-assembling microparticle of the invention and/or one self-assembling microparticle obtainable by means of the method of the invention, and a cosmeceutical acceptable vehicle or carrier. As used herein, the term “cosmeceutical product” refers to a product suitable for use in the body or animal body comprising one or more cosmeceutical products (functional cosmetics,

dermaceuticals or active cosmetics), i.e., topical hybrid products with cosmetic-pharmaceutical characteristics containing active ingredients having effect on user's skin, hair and/or nails, at higher and more effective concentrations, therefore they are located in an intermediate level between cosmetic and drug. Illustrative examples of cosmeceutical products include essential oils, ceramides, enzymes, minerals, peptides, vitamins, etc. The following examples illustrate the invention and must not be considered as limiting the same.

## **EXAMPLES**

The following examples describe the method for the production of self-assembling microparticles comprising a solid matrix and probiotic bacteria, wherein the solid matrix comprises soybean protein and a divalent metal cation, and wherein the probiotic bacteria are distributed throughout the solid matrix. Unless otherwise indicated, the general methods used are described below for carrying out these examples.

### **General Methods**

#### **I. Soybean flour characterization**

The soybean flour [Figure 2a] was kindly provided from food industry where the soybean flour is generated as a residue during the soybean milk processing. The soybean flour was characterized in relation to its nutritive value in order to determine the homogeneity of different batches from the soybean milk production, especially with respect the total protein content. For this purpose, the following parameters were determined: humidity, protein, fat, total dietary fiber, ash, carbohydrate, energy value, sugar profile, fatty acid profile, and sodium content. The humidity was determined by gravimetric analysis in an oven heated at  $105 \pm 3$  °C for 24 h up to constant weight. Protein content is obtained by Kjeldhal method according to the protocol described in *Análisis de alimentos: métodos oficiales y recomendados por el Centro de Investigación y Control de la Calidad* (Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo. Servicio de Publicaciones, 1985, p. 469). The total lipid content was determined following the method described by Bligh and Dyer (1959) and the fatty acid profile was determined by GC-FID (Gas Chromatography-Flame Ionization Detector) according the Regulation (EU) N° 1348/2013 of 16 December 2013, where the preparation of fatty acid methyl esters (FAME) and GC analysis of FAME are described. The total dietary fibre was analyzed according the method described by AOAC International (991.43; J. AOAC Int.

75, 395, 1992). Ash content was determined by gravimetric analysis after the incineration of samples at  $550 \pm 50$  °C for at least 8 hours. Sugar profile was analyzed by HPLC-RI (High Performance Liquid Chromatography-Refractive Index). Carbohydrate content was calculated by difference. Energy value was calculated according to FAO recommendations.

The following table shows the results of the characterization of three different soybean flour batches produced as by-products from soybean milk processing.

**Table 1. Nutritive value correspond to three different soybean flour batches**

<b>PHYSICAL-CHEMICAL PARAMETERS</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Nutritive Value (Group II)</b>			
<b>Humidity (g/100 g)</b>	11,9	10,7	11,4
<b>Proteins (g/100 g)</b>	<b>35,28</b>	<b>32,41</b>	<b>32,67</b>
<b>Fats (g/100 g)</b>	13,90	15,04	16,02
<b>Total dietary fibre (g/100 g)</b>	19,94	21,55	30,79
<b>Ashes (g/100 g)</b>	4,92	4,56	4,35
<b>Carbohydrates (g/100 g)</b>	14,06	15,74	4,77
<b>Energy value (kJ/100 g)</b>	1512,60	1547,43	1475,54
<b>Sugar profile</b>			
<b>Fructose (g/100 g)</b>	1,72	1,34	1,19
<b>Glucose (g/100 g)</b>	1,45	1,37	0,76
<b>Sucrose (g/100 g)</b>	2,40	3,17	3,03
<b>Maltose (g/100 g)</b>	<0,50	<1,00	<0,50
<b>Lactose (g/100 g)</b>	<0,50	<1,00	<0,50

<b>PHYSICAL-CHEMICAL PARAMETERS</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Fatty acids profile</b>			
<b>Caproic acid (g/100 g fat)</b>	<0,03	<0,03	<0,03
<b>Caprylic acid (g/100 g fat)</b>	<0,02	<0,02	<0,02
<b>Capric acid (g/100 g fat)</b>	<0,02	<0,02	<0,02
<b>Lauric acid (g/100 g fat)</b>	<0,02	0,04	<0,02
<b>Myristic acid (g/100 g fat)</b>	0,12	0,13	0,11
<b>Myristoleic acid (g/100 g fat)</b>	<0,02	<0,02	<0,02
<b>Palmitic acid (g/100 g fat)</b>	11,89	12,60	13,69
<b>Palmitoleic acid (g/100 g fat)</b>	0,08	0,09	0,07
<b>Heptadecanoic acid (g/100 g fat)</b>	0,14	0,11	0,10
<b>Cis-10-heptadecanoic acid (g/100 g fat)</b>	0,04	0,04	0,04
<b>Elaidic acid (g/100 g fat)</b>	<0,02	<0,02	<0,02
<b>Stearic acid (g/100 g fat)</b>	5,16	4,50	5,72
<b>Oleic acid (g/100 g fat)</b>	18,28	15,94	15,12
<b>Linolelaidic acid (g/100 g fat)</b>	<0,02	<0,02	<0,02
<b>Linoleic acid (g/100 g fat)</b>	53,31	52,61	52,25
<b>Linolenic acid (g/100 g fat)</b>	9,14	13,11	11,77
<b>Arachidic acid (g/100 g fat)</b>	0,39	0,22	0,26
<b>Cis-11-eicosanoic acid (g/100 g fat)</b>	0,20	0,16	0,13
<b>Arachidonic acid (g/100 g fat)</b>	0,03	<0,02	<0,02
<b>Cis-11-eicosapentanoic acid (g/100 g)</b>	0,16	<0,02	<0,02

---

PHYSICAL-CHEMICAL PARAMETERS	A	B	C
<b>fat)</b>			
<b>Behenic acid (g/100 g fat)</b>	0,55	0,24	0,16
<b>Erucic acid (g/100 g fat)</b>	0,33	0,12	0,42
<b>Lignoceric acid (g/100 g fat)</b>	0,18	<0,04	<0,04
<b>Docosahexanoic acid (g/100 g fat)</b>	<0,04	<0,02	<0,02
<b>Nervonic acid (g/100 g fat)</b>	<0,02	0,09	0,14
<b>Total saturated fats (g/100 g fat)</b>	18,25	17,84	20,06
<b>Total monounsaturated fats (g/100 g fat)</b>	18,94	16,44	15,93
<b>fat)</b>			
<b>Total poyunsaturated fats (g/100 g fat)</b>	62,81	65,72	64,02
<b>Total trans fats (g/100 g fat)</b>	<0,02	<0,02	<0,02
<b>Sodium (mg/kg)</b>	61,8	24,4	<20

The physical-chemical parameters barely changed between batches. The small differences observed did not influence the amino acid profile of the extracted proteins as discussed in Section III.

## II. General method for extracting soybean protein from soybean flour

Firstly, the soybean flour was defatted with hexane (mixture of isomers) (by weight ratio soybean flour/hexane 1/10 p/p). Once the solvent was removed by centrifugation (10 min, 10,000 rpm) and by evaporation at room temperature, the soybean flour was moistened with water and sterilized in a rotary autoclave (Ferlo, model RF42J1P, San Adrián, España) at 121 °C for 15 minutes, according the treatment showed in Figure 1. This heat treatment was necessary to eliminate the endogenous moulds, yeasts and bacteria from the soybean flour. Secondly, the protein was extracted using a pH 10 carbonate buffer solution (by weight ratio soybean flour/buffer 1/10 p/p) at 80 °C for 30

minutes (the extraction conditions were selected by design of experiments). The mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes. Finally, the protein was recovery from supernatant by isoelectric precipitation (pH 4.5) with a 10% HCl solution (v/v), filtered, dried by lyophilization and homogenized using a milling cutter. The resulting powder was cream coloured and fine (Figure 2b).

### III. Soybean protein characterization

Once the soybean protein was obtained, total protein content was determined by Kjeldahl method:  $74.77 \pm 4.06$  g/100 g (n=3, from different soybean flour batches produced throughout one year approximately).

Taking into account literature data, a soybean protein isolate (SPI) is characterized for having a protein concentration between 90% and 95%, whereas a soybean protein concentrate (SPC) is considered when the protein content is between 65% and 70%.

The soybean protein used in the examples herein provided for producing microparticles containing probiotic bacteria had a total protein concentration between a SPC and a SPI.

Additionally, the amino acid profile (except tryptophan) was carried out by acid hydrolysis according to the method ISO 13903:2005, using HPLC with ion exchange column, device for ninhydrin, post column derivatisation and photometric detector (Commission Regulation (EC) N° 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed). Particularly, cysteine and methionine were analyzed following the same method but from hydrolysates of oxidized samples.

For the determination of the total tryptophan, the soybean protein was hydrolysed under alkaline conditions with saturated barium hydroxide solution and heated to 100 °C for 20 hours. After hydrolysis internal standard ( $\alpha$ -methyl-tryptophan) was added. The tryptophan and the internal standard were determined by HPLC with fluorescence detection (method EN ISO 13904).

The following table shows the amino acid profile of the soybean protein:



**Table 2. Amino acid profile correspond to three different soybean flour batches**

AMINO ACID	Aa/TOTAL PROTEIN CONTENT (%)		
	A	B	C
Aspartic Acid (Asp)	11,71	11,59	11,58
Serine (Ser)	5,26	5,29	5,19
Lysine (Lys)	6,43	6,47	6,54
Valine (Val)	4,88	4,94	4,69
Proline (Pro)	5,45	5,48	5,46
Alanine (Ala)	4,20	4,38	4,34
Threonine (Thr)	3,85	3,95	4,03
Phenylalanine (Phe)	5,17	5,14	5,22
Isoleucine (Ile)	4,71	4,73	4,81
Glycine (Gly)	4,20	4,29	4,30
Tyrosine (Tyr)	3,66	3,68	3,61
Arginine (Arg)	7,51	7,35	7,43
Leucine (Leu)	7,85	7,93	7,81
Histidine (His)	2,59	2,63	2,62
Glutamic acid (Glu)	18,41	17,94	18,11
Methionine (Met)	1,37	1,39	1,38
Cystein + Cystine (Cys)	1,46	1,51	1,54
Tryptophan (Total) (Trp)	1,29	1,32	1,36

Table 2 shows that no significant differences were observed in the three batches.

#### **IV. General method for producing empty soybean protein and divalent metal microparticles**

The materials, equipments and reagents were sterilized by heat treatment at 121 °C for 15 min. in an autoclave and/or ultraviolet radiation (20-40 min) and/or, disinfection by washing with 70% (v/v) ethanol and/or using a solution of bleach and soapy water.

The method for the production of soybean protein and a divalent metal cation microparticle comprises dissolving soybean protein in a pH 10 carbonate buffer solution by agitation for 20 minutes. Resultant dispersion was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min., pellet was removed and supernatant was collected. A divalent metal solution such as calcium solution was added over the soybean protein solution to form microparticles of protein-metal coacervate. Once the microparticles were formed, a solution of a protecting agent such as maltodextrin, inulin or fructooligosaccharides (FOS) was added. The dispersion was finally dried by spray-drying.

Unless otherwise indicated, the spray-dryer used in these examples was the Büchi B-290 Mini Spray-Dryer coupled to B-295 Inert Loop accessory (Büchi Switzerland, Flawil, Switzerland).

The maltodextrin used in these examples was Glucidex® from Roquette Frères (Lestrem, France). In particular formulations, a commercial blend of inulin and FOS was used (Orafty® Synergy1) purchased from Beneo GmbH (Mannheim, Germany) was used.

#### **V. Microparticles characterization**

The size of the microparticles was determined by means of confocal microscopy using a Nikon ECLIPSE 55 microscope with Colorview Soft Imaging Systems Camera DS-L2 (Tokyo, Japan).

Morphology analysis was additionally performed with a Transmission Electron Microscopy (TEM) Darwin 208 Philips 6080-100 kV coupled to an AMT camera.

## **VI. General method for preparing the suspensions of probiotic bacteria**

The probiotic bacteria used for carrying out these examples were *Lactobacillus plantarum* CECT 220 and *Lactobacillus casei* CECT 475 isolated from corn silage and cheese, respectively. The freeze-dried products of both microorganisms were revitalized in a MRS broth (Merck, Barcelona) at 37 °C under anaerobic atmosphere (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in anaerobic chamber (MACS 500 AIRLOCK, AES Chemunex, Spain). 500 µl aliquots of stock suspensions which were kept frozen at -85 °C until the time of use were prepared from these revitalized cultures.

Suspensions were prepared as follows: 100 µl of the aliquot of the corresponding microorganism were transferred to 10 ml MRS broth. After incubation for 12 hours/37 °C under anaerobic conditions, the microscopic count was performed in a Thoma chamber in order to calculate the volume of sample that must be transferred to a 50 ml flask containing the MRS broth to reach a count of 10<sup>6</sup> CFU/ml (colony forming units per milliliter). After inoculating that volume, the flasks were incubated in the previously described conditions for 24 hours until reaching the early stationary growth phase. The bacterial population was tracked and counted by means of seeding the corresponding decimal dilutions (0.1% Buffer Peptone Water (BPW) broth (Merck, Barcelona)) in MRS agar (Merck, Barcelona) at each sampling time.

The final working suspensions were prepared by centrifugation of a volume of 2-5 L MRS broth suspension at 10,000 rpm for 10 minutes. MRS broth was removed and the pellet was washed twice and resuspended in a solution of 2% sucrose (w/v).

## **VII. General method for producing soybean protein and divalent metal microparticles containing encapsulated probiotic bacteria**

The general method for producing soybean protein and calcium microparticles containing encapsulated probiotic bacteria comprises the following steps: dissolving soybean protein obtained from soybean flour according to the method described in Section II in a pH 10 carbonate buffer solution, adding a specific volume of working bacteria suspension under stirring and with constant flow followed by the addition of a specific volume of a divalent metal solution. Optionally, a specific volume of a protecting agent was then added once microparticles were obtained.

Finally the microparticles were spray-dried.

### **VIII. General method for quantifying viable bacteria present in the formulation, and determining the bacterial death cycle throughout the process**

In order to determine the viable bacteria in microparticles, 1 ml of a solution of 0.1% BPW broth (w/v) was added to a known weight microparticles (1-2 mg), weighted with accurate precision in an analytical balance (Sartorius, SAR ME 235S, Göttingen, Germany). Microparticles were resuspended using a vortex for a few seconds followed by agitation in an orbital shaker (Eppendorf AG, Mixmate, Hamburg, Germany) at 900 rpm for 1 hour. After the disruption of microparticles which was checked by optical microscopy, the corresponding decimal dilutions were performed in 0.1% BPW broth (w/v) and seeded in MRS plates. After incubation at 37 °C under anaerobic conditions (MACS 500 Airlock chamber, AEX Chemunex, Spain) for 24-48 hours, colony counts were performed.

Taking into account the amount of bacteria initially included in the formulation before spray-drying per each gram of formulation and the counts obtained at the end of the process, the bacterial death cycles were determined by means of the following equation:

$$\text{Bacterial death cycles} = \log (\text{initial CFU/g}) - \log (\text{recovered CFU/g})$$

### **IX. Method for the evaluation of resistance of encapsulated probiotic bacteria and their suspensions in simulated gastrointestinal medium**

The gastrointestinal resistance of *L. plantarum* and *L. casei* assays were carried out according to the method described by Vinderola et al. (*Food Research International*, 2003, 36, 895–904).

For the evaluation of gastrointestinal resistance of bacteria, 10 µl of the bacterial suspension in culture medium or 1-2 mg (weighted with accurate precision) of microparticles were added to PVC tubes with 990 µl of simulated gastric fluid at pH 2.5. As many tubes were used as treatment times planned to be evaluated and taking into account three replicates, specifically 18 tubes (6 times x 3 replicates). Nine of them with simulated gastric fluid corresponding to the times: 0.1, 0.5 and 2 hours (resistance to simulated gastric fluid) and 2.1, 5 and 8 hours (containing for 2 hours simulated gastric fluid and during 0.1, 3 and 6 hours under simulated intestinal fluid).

The simulated gastric fluid was prepared according to pharmacopeia and had the following composition for 1 liter of solution:

- 2 g NaCl (Sigma, Barcelona, Spain)
- 3.2 g pepsin from porcine gastric mucosa (Sigma, Barcelona, Spain)
- 37% HCl (v/v) to adjust the pH at 2.5

Sodium chloride and pepsin were dissolved in almost 1 liter of type I water and the pH was adjusted to 2.5. The solution was made up to 1 litre volume of type I water and filtered by 0.22 µm sterilized filter.

The simulated intestinal fluid was also prepared according to pharmacopeia:

- 6.8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac, Madrid, Spain) dissolved in 750 ml of type I water
- 10 g of pancreatin from porcine pancreas (Sigma, Barcelona, Spain)
- 0.2 N NaOH/0.2 HCl solutions to adjust the pH at 6.8

The samples were kept at 37 °C in an orbital shaker at 150 rpm for the corresponding time. Then the samples were extracted each time for survivor evaluation.

After 2 hours under simulated gastric conditions, samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes and the supernatant was removed. The pellet was washed twice with 1 ml 0.1% BPW (w/v) before adding 990 µl of simulated intestinal fluid. The samples were kept in contact with the simulated intestinal fluid for 0.1, 3 and 6 hours (2.1, 5 and 8 hours after from the start of the assay). After those times were lapsed, the samples were centrifuged; the supernatants were discarded and the pellets were treated according to the method for the microparticle disruption described in Section VIII. The viable bacteria count was performed using the method of counting in a MRS agar plate describe in the same section.

The fraction of surviving bacteria was calculated according to the following equation:

$$\text{Log survivor fraction} = \text{Log} \left( \frac{N_t}{N_0} \right)$$

where  $N_t$  represents the total viable bacteria after each time of treatment, and  $N_0$  represents the initial number of inoculated bacteria (Bao et al., *Food Control*, 2010, 21 (5): 695-701).

#### **X. Method for the evaluation of the stability of microencapsulated lactic bacteria over storage time under controlled storage conditions**

Microparticles containing probiotic bacteria were stored in polypropylene containers under controlled conditions at 25 °C and 60% Relative Humidity (RH) in a climate chamber (Memmert GmbH, HPP108, Schpolywabach, Germany). The following control samples were also performed:

- Freeze-dried bacteria as the commercial format nowadays
- Spray-dried bacteria without forming microparticles from a suspension in a 2% sucrose (w/v) solution
- Bacterial suspension in broth medium
- Bacterial suspension in a 2% sucrose (w/v) solution.

#### **XI. Method for the evaluation of the stability of microencapsulated lactic bacteria in acidic conditions**

An additional experiment of stability of microparticles with respect to commercial non-encapsulated form (generally lyophile or bacterial suspension) was performed in order to demonstrate the protective effect of the microparticles.

For this purpose, one of the soybean protein with calcium microparticles in the presence of a protecting agent (Sp) was chosen as a result of the improvement observed after the experiments performed according to methods described in Section IX and X.

The microparticles, lyophile and suspension were resuspended directly in HCl pH 3 with an initial bacteria count in the medium of  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  CFU/ml approximately and the suspensions were stored at 4 °C.

The viable counts were carried out according to the method described in Section VI in the case of evaluating the lyophile and the suspension. For the analysis of microparticles, an adjustment to a pH of 11 with 1% NaOH (w/v) was necessary to disrupt the microparticles.

## **XII. Method for the evaluation of the stability of microencapsulated lactic bacteria in food**

The microparticles of soybean protein and calcium in the presence of a protecting agent, Sp, were selected for the evaluation of the stability of bacteria in two different food products as aforementioned.

In this assay, lyophile was chosen as control sample because, nowadays, it is the most usual form for the commercialization of probiotics.

Both the microparticles and the lyophile were resuspended in two commercial food products (fresh milk and fresh orange juice), weighting the enough quantity for having a final product with a probiotic concentration ( $\geq 10^7$  CFU/g). The resultant foods were stored at 4 °C for a period corresponds to the shelf-life of each product.

For the quantitation of bacteria counts, the method followed was similar to that described for the survival of *L. plantarum* in simulated gastrointestinal conditions (Section IX) but instead of being the bacteria in simulated GI fluids, were suspended in food fresh milk or fresh orange juice.

### **Examples**

#### **Example 1. Preparation and characterization of soybean protein and a divalent metal microparticles containing encapsulated probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus plantarum* (Sp).**

750 mg of soybean protein extracted from the soybean flour were dissolved in 25 ml of carbonate buffer solution adjusted to pH 10. The dispersion was stirred for 20 minutes and then centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes.

Over the supernatant under stirring, 2 ml of working bacterial solution (washed bacteria twice and resuspended in a solution of 2 % sucrose (w/v):  $1.9 \times 10^{11}$  CFU/ml) were added.

After five minutes, 30 ml of 0.2% CaCl<sub>2</sub> (w/v) (weight ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> cation 35:1) were added and the mixture was incubated for 20 minutes under stirring. 750 mg of mannitol or maltodextrin were added to the mixture and the suspension was then dried by spray-drying.

The parameters of this process were:

- Air inlet temperature: 85 °C

- Air outlet temperature: 67 °C (approximately)
- Suction: 100%
- Sample pumping rate: 3.5 ml/min
- Air pressure: -60 mbar
- Airflow: 600 L/h (40-50 mm)

The microparticles collected in the form of cream colour powder, were characterized respect to their size and shape by confocal microscopy and transmission electron microscope (TEM). Figure 3 shows the optical microscopy image obtained for the microparticles containing *L. plantarum* where the bacteria were entrapped within the soybean protein with calcium matrix. Figure 4 is the histogram which represents the size distribution of the soybean particles with *L. plantarum* encapsulated, which was  $11\pm 5$   $\mu\text{m}$ . In Figure 5 TEM images are observed both without bacteria (a, b) and containing *L. plantarum* (c, d), where probiotics are clearly seen in black, trapped and homogeneously distributed in the matrix of the microparticle. Therefore, this image demonstrate that the self-assembling microparticles provided by this invention, and/or the self-assembling microparticles obtainable by the process provided by this invention comprise a solid matrix and a probiotic bacteria, wherein the solid matrix comprises soybean protein and a divalent metal cation, and wherein the probiotic bacteria is distributed throughout the solid matrix.

In particular formulations, mannitol or maltodextrin was substituted by a commercial blend of inulin and FOS, partially or totally as follows:

**Table 3. Sp microparticle composition**

<b>SAMPLE</b>	<b>MALTODEXTRIN (mg)</b>	<b>INULIN +OS (mg)</b>
<b>Sp</b>	750	-
<b>Sp 250</b>	500	250
<b>Sp 500</b>	250	500
<b>Sp 750</b>	-	750



**Example 2. Evaluation of the stability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* over storage under controlled conditions of temperature and relative humidity (25 °C/60% RH).**

The formulations Sp, Sp 250, Sp 500 and Sp 750 described in Example 1 were used to evaluate the survival of the bacteria under controlled conditions of temperature and relative humidity. The microparticles were stored in 50 ml polypropylene containers in a climate chamber at 25 °C and 60% RH.

In order to compare the viability of *L. plantarum* in different formulations, the study was carried out for the following products: different microparticles of soybean protein and calcium in the presence of a protecting agent, non-encapsulated lyophilized *L. plantarum*, non-encapsulated spray-dried *L. plantarum*, fresh suspension of *L. plantarum* in MRS culture medium and fresh suspension of *L. plantarum* in 2% sucrose (w/v).

The graph in Figure 6 shows that in the first month of study was a loss of between 4 and 5 logarithmic units in the counts of both fresh suspensions. In the fourth month, losses of 7 logarithmic units were in the case of bacteria in lyophilized form having a probiotic concentration ( $\geq 10^7$  CFU/g) for three months. In the case of non-encapsulated spray-dried *L. plantarum*, the probiotic concentration lasted three months, similar to the lyophile and Sp formulation. However, when *L. plantarum* is encapsulated in soybean protein and calcium microparticles in the presence of an adjuvant, mixture of maltodextrin, inulin and oligosaccharides the probiotic concentration was remained between 2-6 weeks more, having the best results for Sp 750 formulation.

These results confirm that the encapsulation of *L. plantarum* in soybean protein and calcium microparticles in the presence of a protecting agent allowed enhance the viability of bacteria up to 6 weeks more with respect to the lyophile. Therefore, the probiotic concentration for the best formulation (Sp 750) lasted four and a half months.

**Example 3. Evaluation of the resistance of the encapsulated probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus plantarum* to simulated gastrointestinal medium.**

The formulations Sp, Sp 250, Sp 500 and Sp 750 described in Example 1 were selected to evaluate the resistance of the encapsulated bacteria in a simulated gastrointestinal medium following the method described in Section IX.

Figure 7 shows the results obtained for these microparticles in addition to the data for non-encapsulated lyophilized and spray-dried *L. plantarum*. In the case of non-encapsulated lyophilized and spray-dried *L. plantarum*, the number of viable counts decreased gradually throughout the study ending with a mean loss of 4 logarithmic units. In the case of microparticles, the counts for Sp 250, Sp 500 and Sp 750 were kept virtually constant throughout the entire assay, being significantly higher than the non-encapsulated *L. plantarum* formulations from the end of the assay in simulated gastric fluid (2 h) up to the end of the assay in simulated intestinal fluid (8 h). Although for the Sp formulation a reduction of a mean of one logarithmic unit was observed at the end of the entire assay, its number of viable counts was also significantly higher than the non-encapsulated *L. plantarum* forms from the end of the assay in simulated gastric fluid (2 h) up to the end of the assay in simulated intestinal fluid (8 h).

In conclusion, this study demonstrated that the microparticles selected significantly enhanced the tolerance of *L. plantarum* to simulated gastrointestinal fluids in a mean of 3-4 logarithmic cycles with respect to the non-encapsulated forms.

#### **Example 4. Evaluation of the survival of encapsulated *Lactobacillus plantarum* in acidic conditions (HCl pH 3).**

The microparticles Sp formulated as described in Example 1, which improved the survival of *L. plantarum* under simulated gastrointestinal fluids, were selected to perform an additional experiment in acidic conditions.

The assay was carried out according to the method described in Section XI. Figure 8 shows an improvement of the survival of the probiotics for the encapsulated *L. plantarum*. The bacteria counts fell almost 3 logarithmic units in a week for the suspension form and decreased to < 10 CFU/ml (detection limit) in two weeks.

It is remarkable that the viable counts for the lyophile were reduced dramatically (2 logarithmic units) at the beginning of the experiment whereas the same reduction was observed in the case of the microparticles but one month later. At the end of the experiments (approximately 3 months), both of formulations had similar bacteria counts.

**Example 5. Evaluation of the survival of encapsulated *Lactobacillus plantarum* in food.**

As additional evaluation of the survival of microorganisms, and in a similar way that described in Example 4, Sp microparticles were chosen for food formulation.

The microparticles and lyophile were added to fresh milk and fresh orange juice in a probiotic concentration. The viable bacteria were count throughout the shelf-life of each product according to the same protocol described in Section XI.

Figure 9 shows that virtually were not differences between adding microparticles or lyophile for both food products.

**Example 6. Preparation and characterization of soybean protein and a divalent metal microparticles containing encapsulated probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus casei* (Sc).**

750 mg of soybean protein extracted from the soybean flour were dissolved in 25 ml of carbonate buffer solution adjusted to pH 10. The dispersion was stirred for 20 minutes and then centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes.

Over the supernatant under stirring, 2 ml of working bacterial solution (washed bacteria twice and resuspended in a solution of 2 % sucrose (w/v):  $1.7 \times 10^{10}$  CFU/ml) were added.

After five minutes, 18 ml of 1% CaCl<sub>2</sub> (w/v) (weight ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> cation 12:1) were added and the mixture was incubated for 20 minutes under stirring. 750 mg of mannitol or maltodextrin were added to the mixture and the suspension was then dried by spray-drying.

The parameters of this process were:

- Air inlet temperature: 85 °C
- Air outlet temperature: 67 °C (approximately)
- Suction: 100%
- Sample pumping rate: 3.5 ml/min
- Air pressure: -60 mbar
- Airflow: 600 L/h (40-50 mm)

The microparticles collected in the form of cream colour powder were analysed respecting their viable count which was of  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/g after the spray-drying.

**Example 7. Evaluation of the stability of encapsulated *Lactobacillus casei* over storage under controlled conditions of temperature and relative humidity (25 °C/60% RH).**

The formulation Sc described in Example 6 was used to evaluate the survival of the bacteria under controlled conditions of temperature and relative humidity. The microparticles were stored in 50 ml polypropylene containers in a climate chamber at 25 °C and 60% RH.

In a similar way to Example 2, in order to compare the viability of *L. casei* in different formulations, the study was carried out for the following products: microparticle of soybean protein and calcium in the presence of a protecting agent, non-encapsulated lyophilized *L. casei*, non-encapsulated spray-dried *L. casei*, fresh suspension of *L. casei* in MRS culture medium and fresh suspension of *L. casei* in 2% sucrose (w/v).

The graph in Figure 10 shows that in the first month of study was a loss of between 4 and 5 logarithmic units in the counts of fresh MRS suspension whereas for 2% sucrose (w/v) the decreased was only in one logarithmic unit. However, after two months, the viable counts were of  $10^4$  CFU/ml. In the third month, losses of 3 logarithmic units were in the case of bacteria in lyophilized form and loss of 5 logarithmic units were reaching in the fifth month. In the case of non-encapsulated spray-dried *L. casei*, the probiotic concentration lasted two months, similar to the lyophile. However, when *L. casei* is encapsulated in soybean protein and calcium microparticles in the presence of a protecting agent (maltodextrin) the probiotic concentration was remained one month more.

These results confirm that the encapsulation of *L. casei* in soybean protein and calcium microparticles in the presence of a protecting agent allowed enhance the viability of bacteria up to 4 weeks more with respect to the lyophile.

**Example 8. Evaluation of the resistance of the encapsulated probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus casei* to simulated gastrointestinal medium.**

The formulation Sc described in Example 6 was selected to evaluate the resistance of the encapsulated bacteria in a simulated gastrointestinal medium following the method described in Section IX.

Figure 11 shows the results obtained for these microparticles in addition to the data for non-encapsulated lyophilized and spray-dried *L. casei*. In the case of non-encapsulated lyophilized *L. casei*, the number of viable counts decreased throughout the study ending with a mean loss of 4 logarithmic units whereas the survival counts for the spray-dried form fell up to 5 logarithmic units. In the case of microparticles, the counts for Sc were kept virtually constant during the assay in simulated gastric fluid. At 2.1 h after the start of the experiment, a loss of one logarithmic unit was observed, ending the study with a mean loss of 1.6 logarithmic units. Therefore, the survival throughout the assay was significantly higher for the encapsulated *L. casei* than the non-encapsulated formulations.

In conclusion, this study demonstrated that the microparticles selected significantly enhanced the tolerance of *L. casei* to simulated gastrointestinal fluids with respect to the non-encapsulated forms.

Comparative Example 1. Evaluation of the influence of the ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> in the formation of microparticles.

For comparative purposes, example 1 was reproduced but using a smaller amount of the divalent metal, so as weight ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> was 122:1.

750 mg of soybean protein extracted from the soybean flour were dissolved in 25 ml of carbonate buffer solution adjusted to pH 10. The dispersion was stirred for 20 minutes and then centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes.

Over the supernatant under stirring, 2 ml of working bacterial solution (washed bacteria twice and resuspended in a solution of 2 % sucrose (w/v): 3 x 10<sup>10</sup> CFU/ml) were added.

After five minutes, 8.5 ml of 0.2% CaCl<sub>2</sub> (w/v) (weight ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> cation 122:1) were added and the mixture was incubated for 20 minutes under stirring.

A comparison between the suspension obtained according to example 1 and that obtained according to comparative example 1 showed that the weight ratio 35:1

(example 1) allowed the coagulation process to better proceed, obtaining a uniform dispersion of microparticles without formation of precipitates or aggregates.

750 mg of mannitol or maltodextrin were added to the mixture and the suspension was then dried by spray-drying.

The parameters of this process were:

- Air inlet temperature: 85 °C
- Air outlet temperature: 67 °C (approximately)
- Suction: 100%
- Sample pumping rate: 3.5 ml/min
- Air pressure: -60 mbar
- Airflow: 600 L/h (40-50 mm)

The yield of this process was 16% lower than the observed in the Example 1.

The microparticles were characterized by confocal microscopy and comparing the morphology with respect to that microparticles obtained in the Example 1.

As shown in Figure 12, a weight ratio of soybean protein/Ca<sup>2+</sup> of 35:1 conferred microparticles with a uniform spherical morphology, in contrast to a fusiform morphology obtained when a ratio 122:1 is used, both before and after the drying process.

According to the method described in section VIII, the microparticles were collected in the form of cream colour powder and they were analyzed respecting their viable count which was of  $3.5 \times 10^{10}$  CFU/g after the spray-drying.

Comparative Example 2. Reproduction of the process described in WO2008/076975 using a soybean protein/Ca<sup>2+</sup> ratio according to the present invention.

Example 1 of the application WO2008/076975 was reproduced in a similar way but using a ratio soybean protein/Ca<sup>2+</sup> of 35:1 (w/w) according to the present invention.

#### **A. Alginate as constituent of the hydrogel composition**

30 g of sucrose (Scharlau, Mas D'en Cisa, Spain) was added to 100 ml water and allowed to completely dissolve. Soy protein isolate (3 g, ProFam® 646, ADM, USA). was added under vigorous mixing using an Ultraturrax®. Sodium alginate (1 g, Sigma,

Barcelona, Spain) was then mixed into the slurry and allowed to cool down to room temperature. *Lactobacillus plantarum* CECT 220 (10 g concentrated from fermentation harvest) was then added to the slurry under vigorous mixing until a smooth and uniform gel achieved.

The basic formulation was then extruded into a 100 ml bath (held at 0-5 °C) containing 0.24 g CaCl<sub>2</sub> and 30 g sucrose using a syringe equipped with 20 G needle. The CaCl<sub>2</sub> bath was gently stirred while injecting the slurry. The matrix strings or drops were allowed to cross-link for 30 minutes and then harvested and bottled on paper towel. The strings or drops were first dried in a convection oven at 35 °C until water activity was reduced to 0.6. Then, they were frozen at 80 °C and freeze-dried for about 24 hours. The dry strings or drops were then ground to fine powder using standard coffee grinder and sieved through 50-200 micron screens.

The viability of resultant microparticles was analyzed and the viable cell was lower than 2.5 CFU/g.

#### **B. Chitosan as constituent of the gel composition**

The process followed in this section was similar to that described in Section A but replacing completely the alginate by the same amount of chitosan (Guinama, Valencia, Spain).

The viability of resultant microparticles was analysed and the viable cell was lower than 5.7 CFU/g.

According to this method, the mixture of the different components provides a firmly texture gel, either using alginate or chitosan as constituent of the gel composition (see figures 13 and 14).

Thus, contrary to the method of the present invention where microparticles are spontaneously formed upon mixture of the different components, the process described in WO2008/076975 requires additional steps to obtain a microsized structures from the gel previously formed. In fact, the gel needs to be subjected to a lyophilization process and subsequently to grind and sieve in order to obtain solid microsized structures containing soybean protein, bacteria and Ca<sup>2+</sup>.

Moreover, as derivable from Figure 15, the solid structures are not spherical particles as the microparticles obtained from the process of the invention, but irregular crystals or little pieces of gel with a different molecular rearrangement. These microsized

structures cannot be considered in any case as self-assembling microparticles such as those obtained from the process of the invention which are spontaneously formed by means of local interactions upon mixture of the bacteria suspension with the soybean protein dispersion in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

Finally, the microparticles obtained after the drying process in both sections showed cell viabilities under the LOQ (Limit of Quantification) for the plate count method, far from those obtained from the process of the present invention.



### **CLAIMS**

1. A self-assembling microparticle comprising a solid matrix and probiotic bacteria, wherein the solid matrix comprises soybean protein and a di- or tri-valent metal cation, and wherein the probiotic bacteria are distributed throughout the solid matrix.
2. The self-assembling microparticle according to claim 1, wherein the solid matrix is devoid of any coating material.
3. The self-assembling microparticle according to claim 1 or 2, consisting of a solid matrix and probiotic bacteria, wherein the solid matrix comprises soybean protein and a di- or tri-valent metal cation, and wherein the probiotic bacteria are distributed throughout the solid matrix.
4. The self-assembling microparticle according to anyone of claims 1 to 3, wherein its mean size ranges from 1 to 30  $\mu\text{m}$ .
5. The self-assembling microparticle according to anyone of claims 1 to 4, wherein the weight ratio (soybean protein)/(metal cation) ranges from 1:1 to 100:1.
6. The self-assembling microparticle according to anyone of claims 1 to 5, wherein the soybean protein is obtained from soybean flour.
7. The self-assembling microparticle according to anyone of claims 1 to 6, wherein the divalent metal cation is selected from  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  and combinations thereof.
8. The self-assembling microparticle according to anyone of claims 1 to 7, wherein the probiotic bacteria are bacteria of the genus *Bifidobacterium* or *Lactobacillus*.
9. A process for preparing a self-assembling microparticle as defined in any of claims 1 to 8, said process comprises:
  - a) preparing a dispersion of soybean protein in an alkaline aqueous solution;
  - b) preparing a suspension of probiotic bacteria;
  - c) mixing the suspension of the probiotic bacteria prepared in step b) with the dispersion of soybean protein prepared in step a);
  - d) adding to the resulting mixture obtained in step c) a di-valent or tri-valent metal cation.

10. The process according to claim 9, which further comprises drying the microparticles once they are formed.
11. A self-assembling microparticle obtainable by means of the process as defined in anyone of claims 9 to 10.
12. A composition comprising at least one self-assembling microparticle as defined in anyone of claims 1 to 8, or as defined in claim 11.
13. The composition according to claim 12 further comprising a food, pharmaceutical, cosmeceutical or nutraceutical acceptable carrier.
14. The composition according to any one of claims 12 or 13, wherein the microparticles are in the form of a dry powder.
15. A food, pharmaceutical, cosmeceutical or nutraceutical product comprising at least one self-assembling microparticle as defined in anyone of claims 1 to 8 or as defined in claim 11, or a composition as defined in anyone of claims 12 to 14.

**ABSTRACT**

The invention relates to self-assembling microparticles comprising a solid matrix and probiotic bacteria, wherein the solid matrix comprises soybean protein and a divalent or trivalent metal, and wherein the probiotic bacteria are distributed throughout the solid matrix; said matrix protects said probiotic bacteria during processing, storage, as well as during transit through the gastrointestinal tract, thus prolonging their lifetime and facilitating release into the intestine and improving their probiotic effect. The present invention also relates to the method for obtaining the self-assembling microparticles and to the products and compositions incorporating them.

**DRAWINGS**

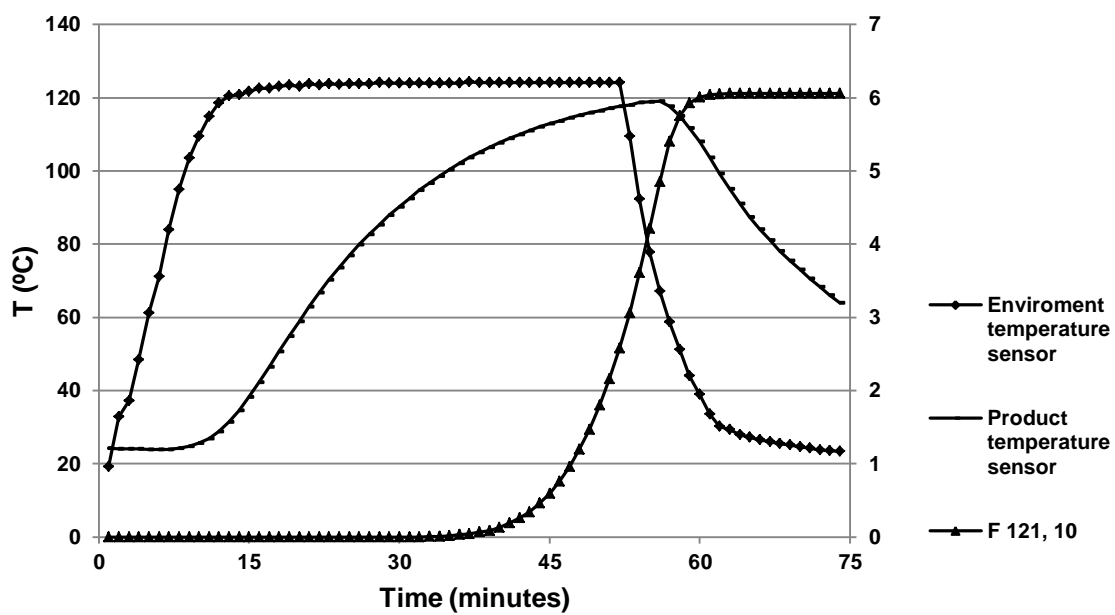


Figure 1

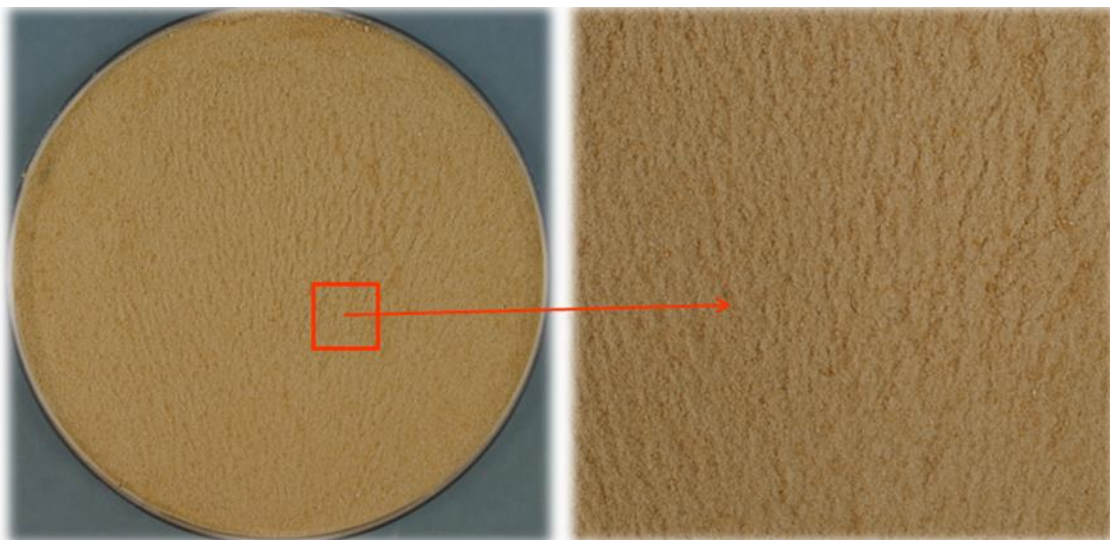


Figure 2(a)

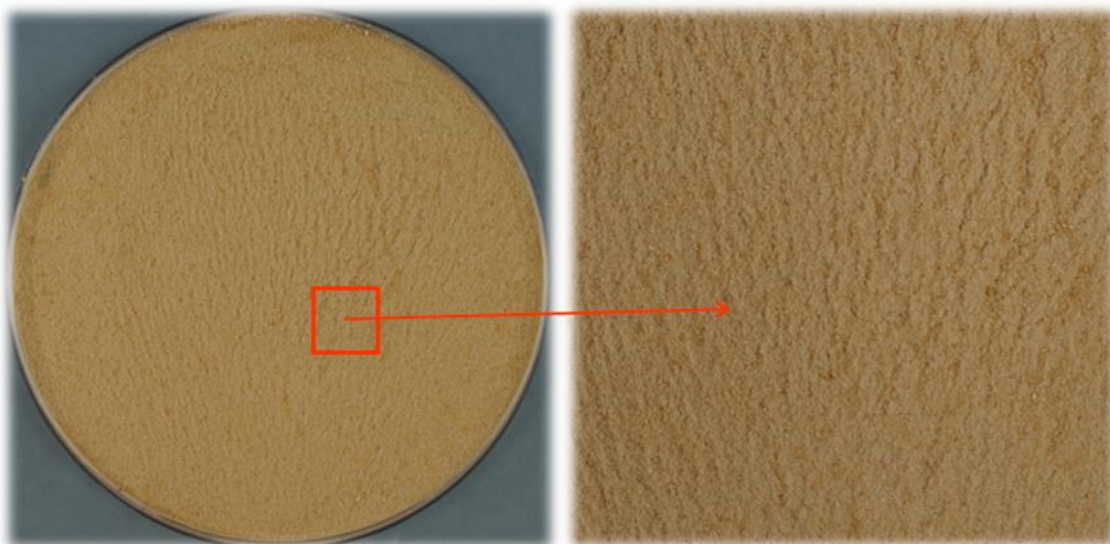


Figure 2(b)

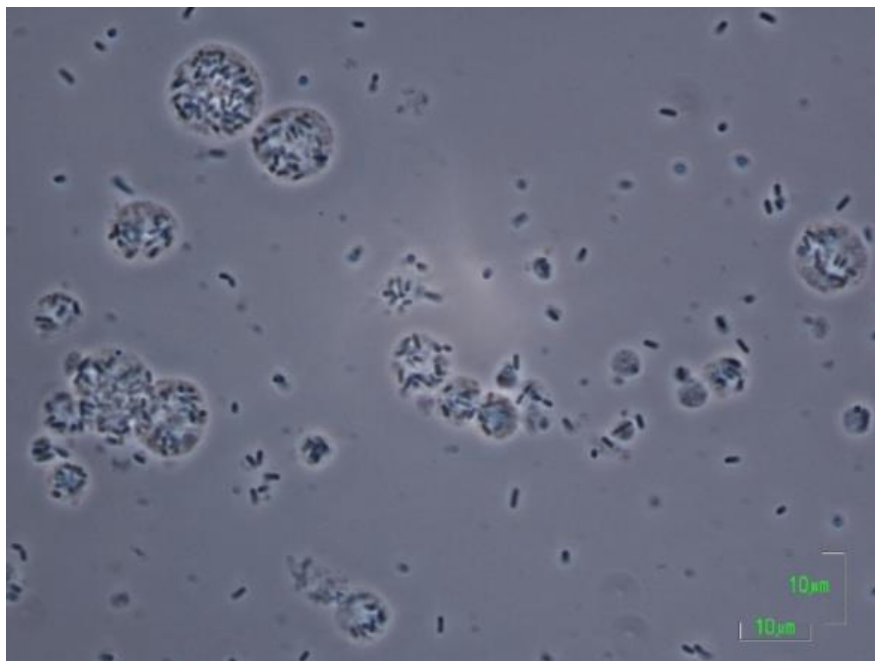


Figure 3

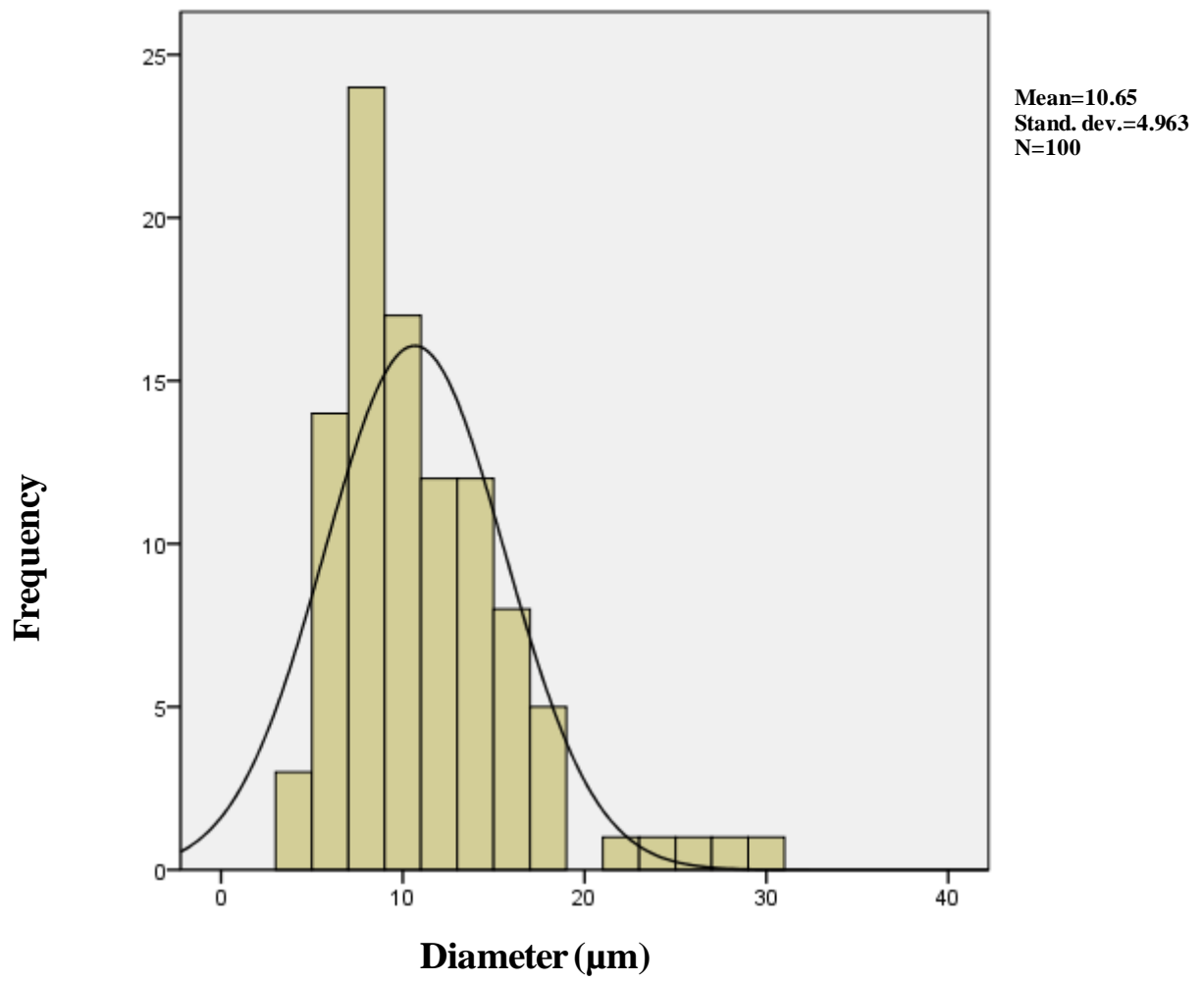


Figure 4

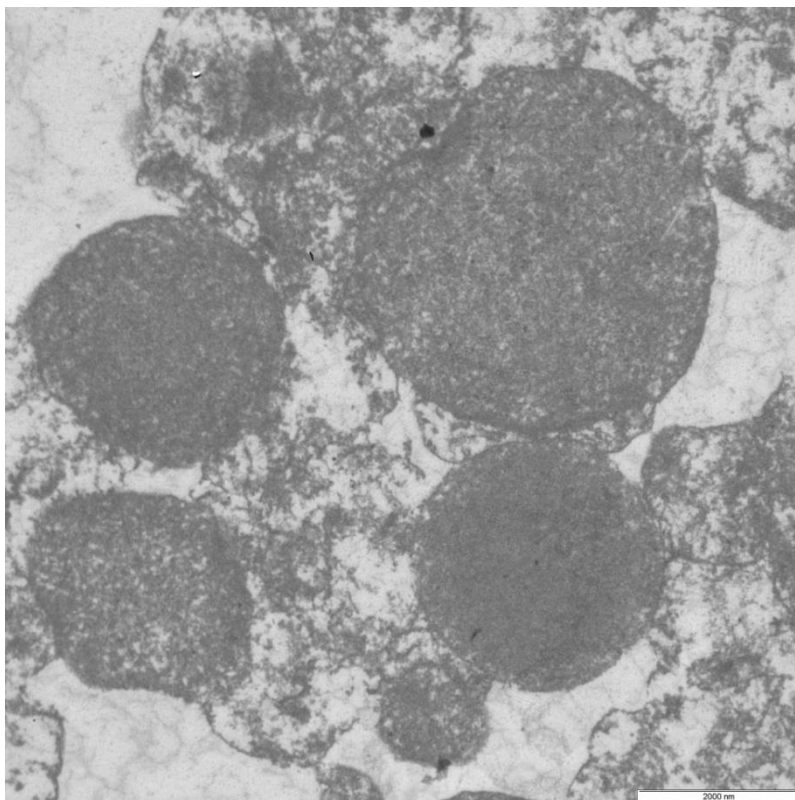


Figure 5(a)

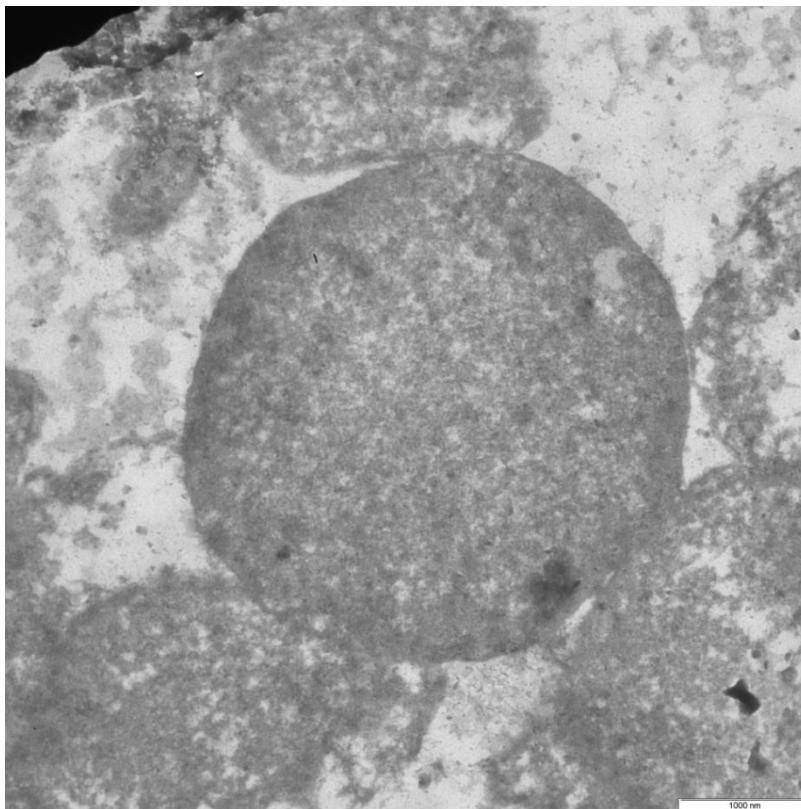


Figure 5(b)



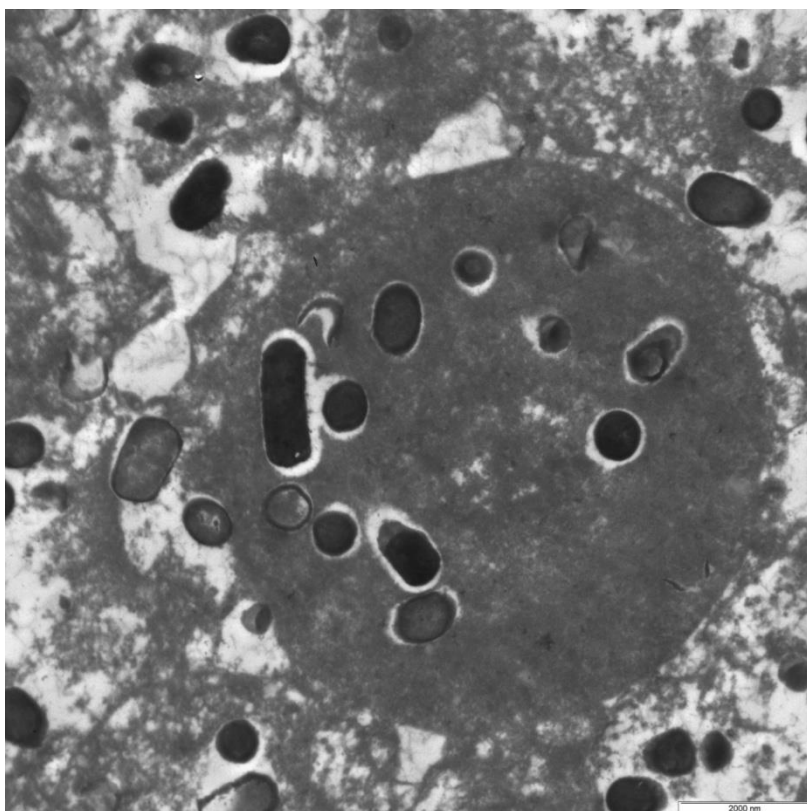


Figure 5(c)

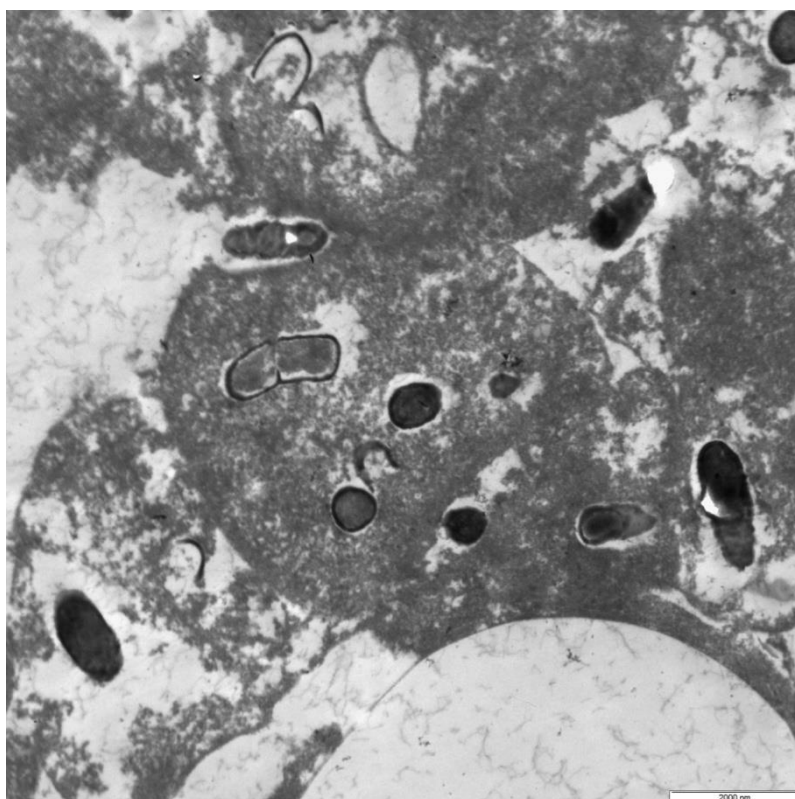


Figure 5(d)

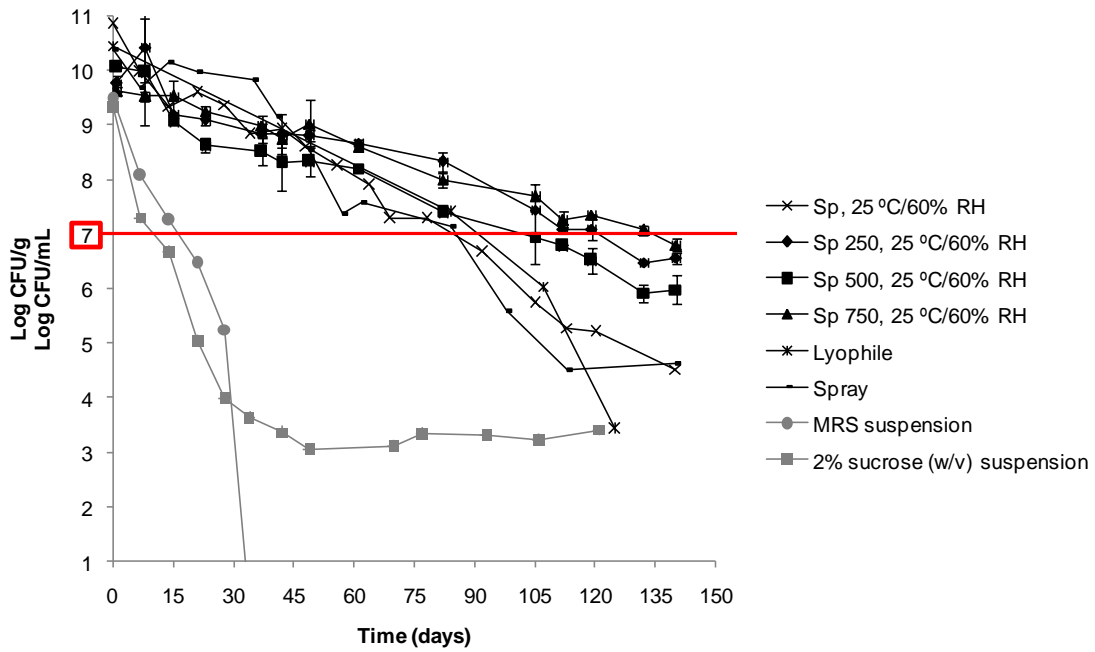


Figure 6

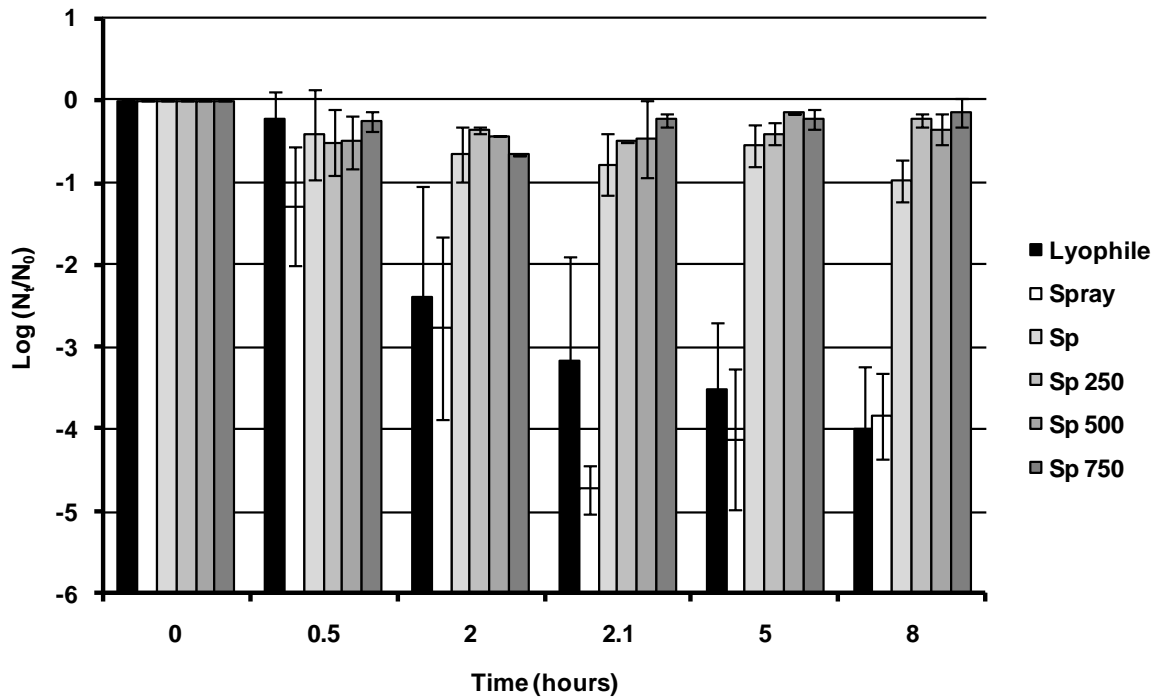


Figure 7

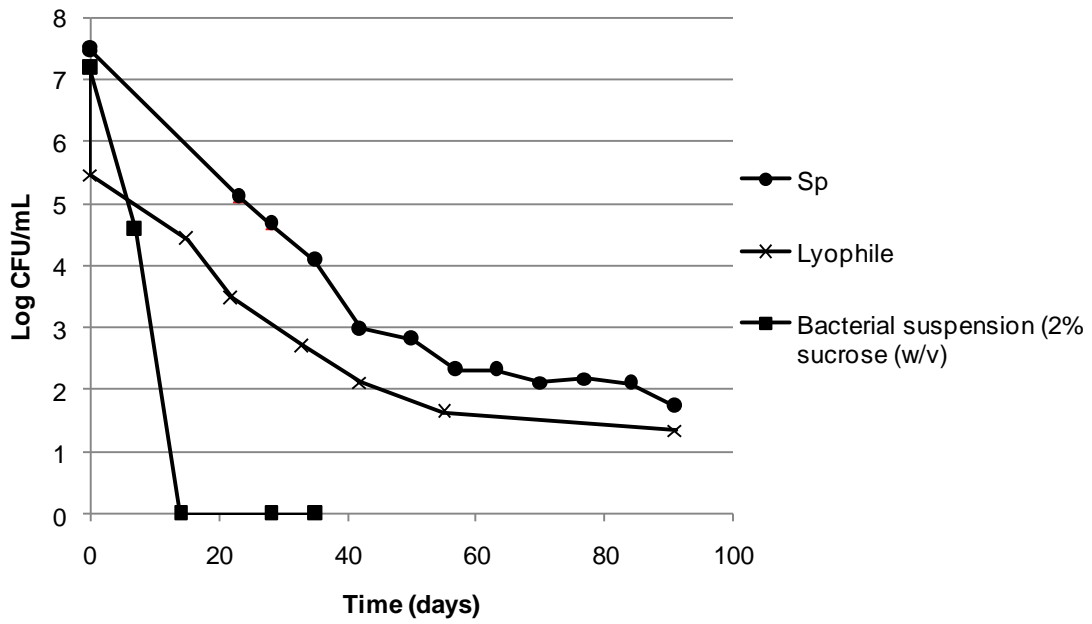


Figure 8

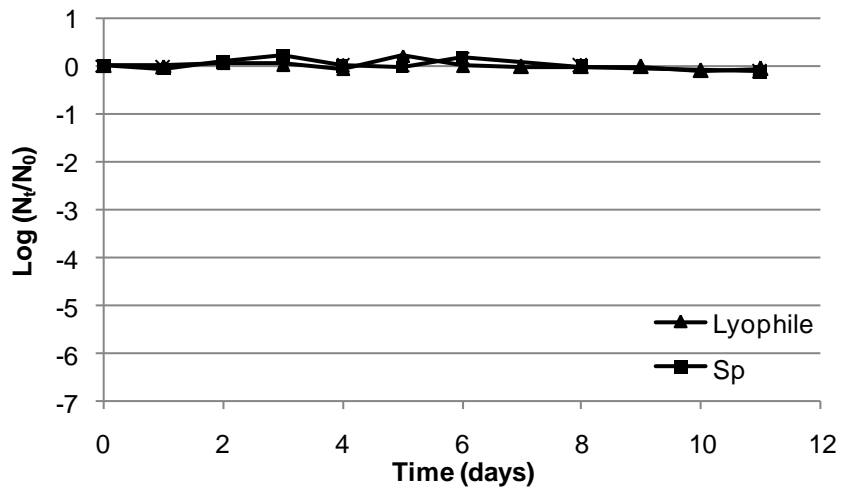


Figure 9(a)

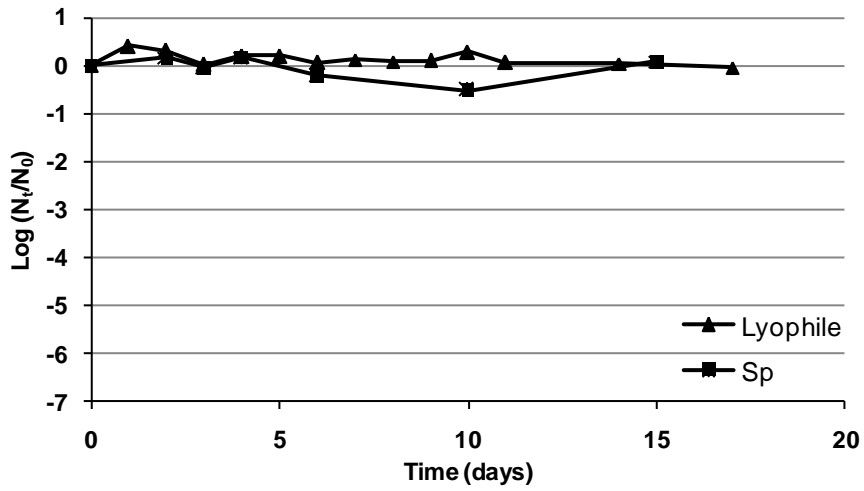


Figure 9(b)

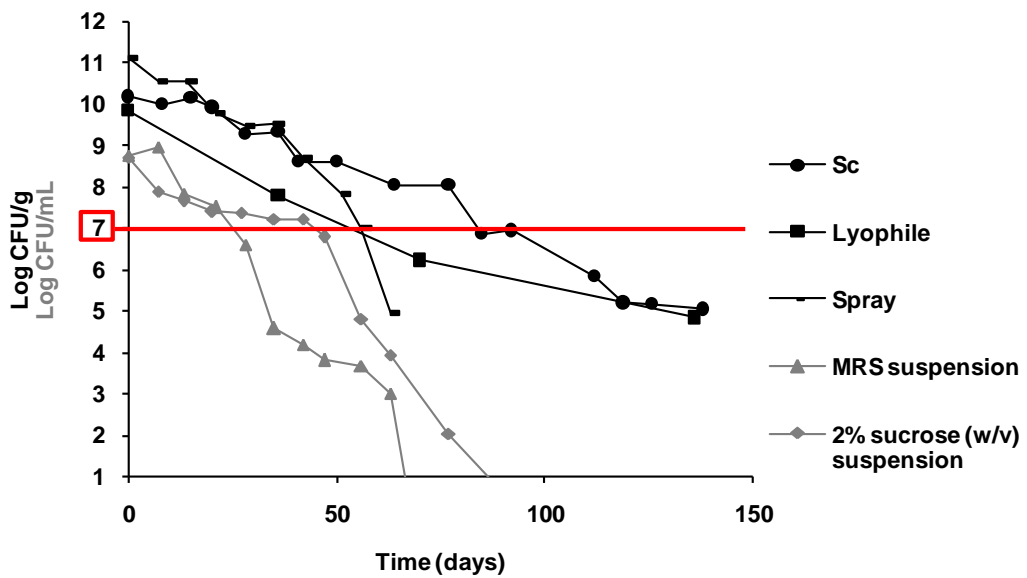


Figure 10

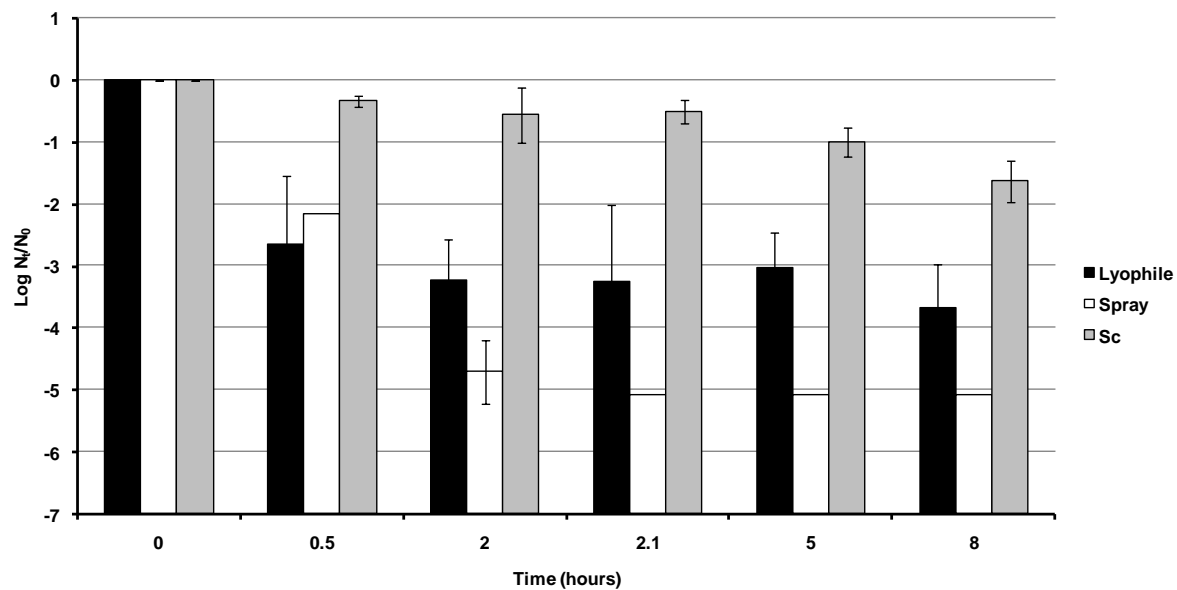
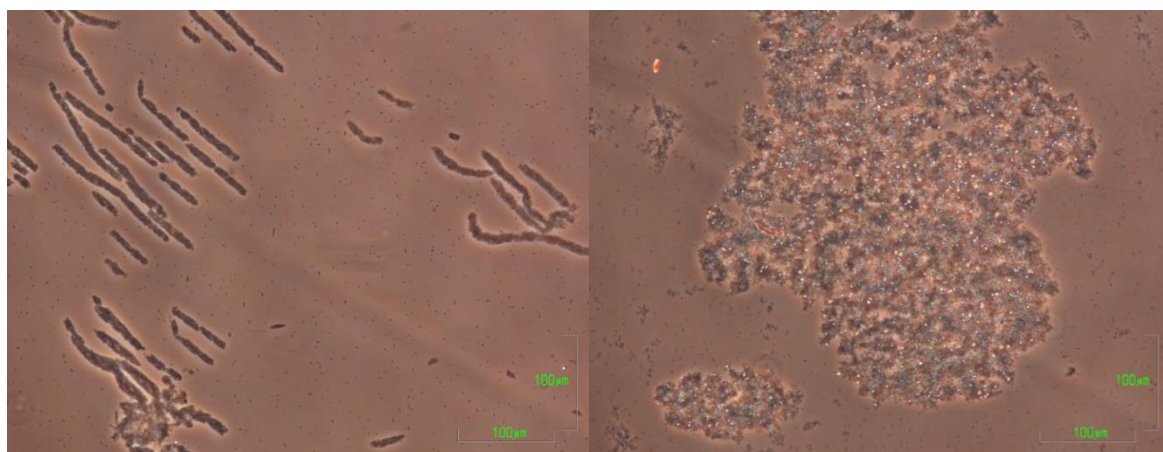
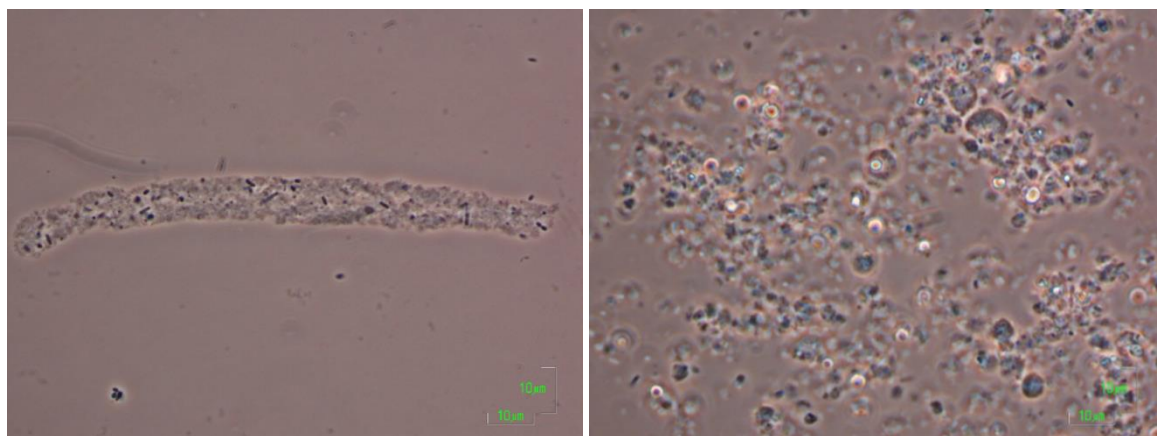


Figure 11



(a)

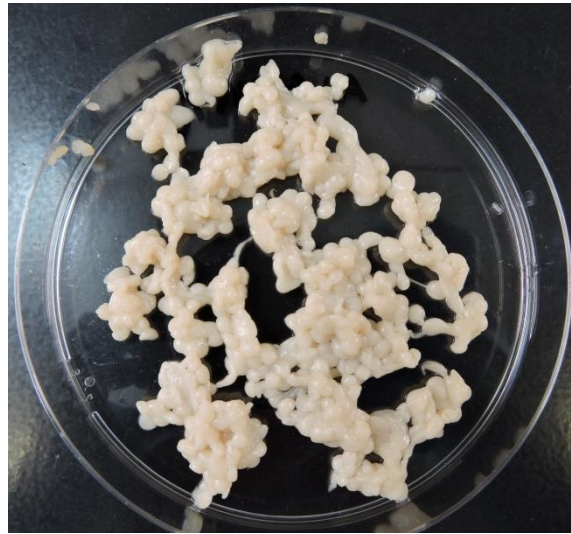
(b)



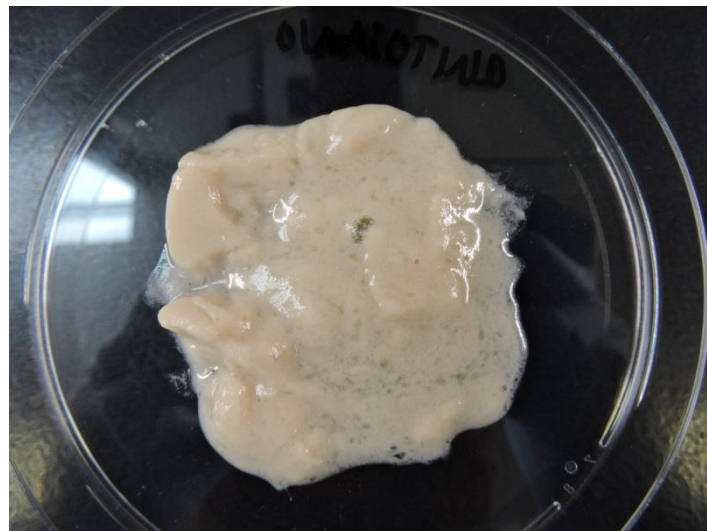
(c)

(d)

Figure 12

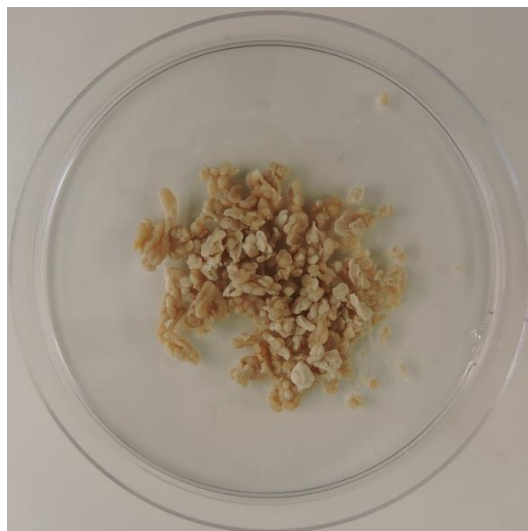


(a)



(b)

Figure 13



(a)



(b)

Figure 14



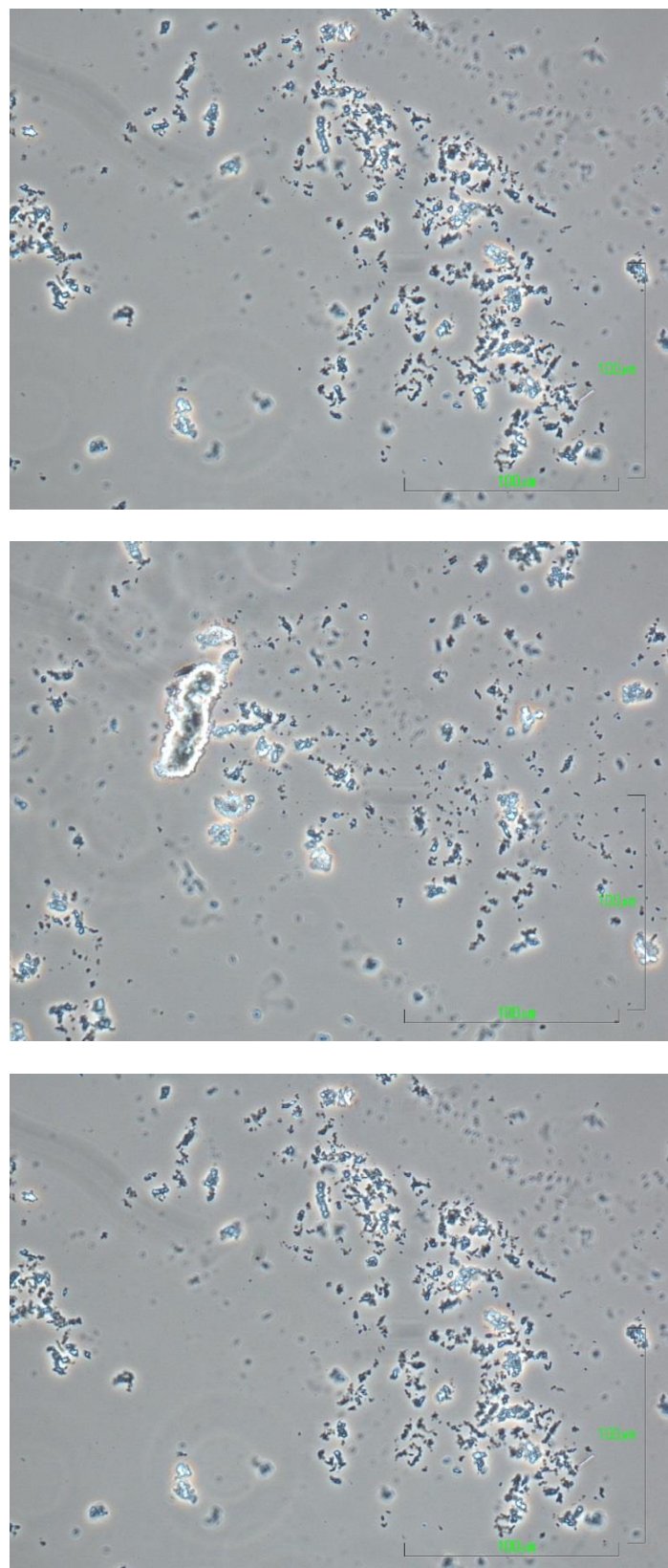


Figure 15