



Effect of the honey from *Agave tequilana* Weber and dextran on the viability of *Lactobacillus plantarum* 299v encapsulated by spray drying

Efecto de la miel de *Agave tequilana* Weber y dextrano en la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* 299v encapsulado por secado por aspersión

Diana Catalina Castro-Rodríguez, Karla Guadalupe Rivas-Villegas, Jorge Yáñez-Fernández*

Laboratorio de Biotecnología Alimentaria. Departamento de Bioingeniería, UPIBI-IPN. Av. Acueducto S/N Col. Barrio La Laguna, Ticoman CP.07340, Cd de México, México.

*Corresponding author.

E-mail address: jyanezfe@ipn.mx (J. Yáñez-Fernández).

Article history:

Received: 9 November 2017 / Received in revised form: 5 January 2018 / Accepted: 8 January 2018 / Published online: 8 January 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.119>

ABSTRACT

Encapsulation technologies are used to keep probiotic cell viable throughout storage, commercialization as well as in food products manufacturing, so that these cells are active during their passage through the gastrointestinal tract. In this study, the honey from *Agave tequilana* Weber and dextran were used as a coating material to improve encapsulation of *Lactobacillus plantarum* 299v. The survival during 14 days at 5 °C storage and an *in vitro* model that reproduces the conditions in the stomach and small intestine (37 °C, pH 2 and 0.5 % of bile salts) were developed to monitor the viability of encapsulated bacteria. The survival during the storage of the encapsulated of *L. plantarum* with Agave honey and dextran were not significantly different ($p > 0.05$). The viability *L. plantarum*, which was encapsulated with dextran and Agave honey was higher than that showed by free cells (15%). The results of this preliminary study showed the effectiveness of *Agave tequilana* Weber honey and dextran to encapsulate *L. plantarum* 299v, allowing the study of strains most sensitive to the encapsulation conditions.

Keywords: *Agave*, Dextran, Encapsulation, *Lactobacillus plantarum*.

RESUMEN

Las tecnologías de encapsulación se utilizan para mantener viable la célula probiótica durante el almacenamiento, la comercialización y el uso en productos alimenticios, de modo que estas células sean activas durante su paso a través del tracto gastrointestinal. En este estudio se utilizaron la miel de *Agave tequilana* Weber y el dextrano como material de recubrimiento para mejorar la encapsulación de la cepa *Lactobacillus plantarum* 299v. La supervivencia al almacenamiento durante 14 días a 5 °C y un modelo *in vitro* que reprodujera las condiciones en el estómago y en el intestino delgado (37 °C, pH 2 y 0.5 % de sales biliares) se desarrollaron para controlar la viabilidad de la bacteria encapsulada. La supervivencia durante el almacenamiento del encapsulado de *L. plantarum* con miel de *Agave* y dextrano no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$). La viabilidad a las condiciones gastrointestinales del encapsulado de *L. plantarum* con dextrano y miel de *Agave* fueron superiores a las células libres. Los resultados preliminares de este estudio mostraron la efectividad de la miel de *Agave tequilana* Weber y el dextrano para encapsular *Lactobacillus plantarum* 299v, permitiendo con esto la evaluación de cepas más sensibles a las condiciones de encapsulación.

Palabras claves: *Agave*, Dextrano, Encapsulación, *Lactobacillus plantarum*.

1. INTRODUCCIÓN

La encapsulación es un método físico que consiste en el atrapamiento de agentes bioactivos (aromas, sabores, vitaminas, enzimas, entre otros) y microorganismos en una matriz que puede ser o no polimérica, de esta manera la encapsulación los protege de las condiciones adversas del entorno al que son sometidas (Shi *et al.*, 2013). Entre la gran variedad de técnicas de encapsulación se encuentran: la coacervación, el secado por aspersión, la extrusión, la polimerización interfacial, entre otras. El método comúnmente utilizado para encapsular ingredientes alimenticios está el secado por aspersión, siendo uno de los más económicos. Como materiales encapsulantes se tienen los biopolímeros, los cuales se clasifican de acuerdo a su origen en naturales y sintéticos. Los de origen natural provienen de cuatro fuentes: animal (colágeno/grenetina), marino (algas/quitosanos), vegetal (lípidos, hidrocoloides, proteínas y polisacáridos) y microbiano (ácido poliláctico y polihidroxialcanoatos) (Yuliani *et al.*, 2004). Los probióticos son microorganismos que ofrecen un beneficio al huésped al ser consumidos en cantidades suficientes ($10^6 - 10^9$ UFC/mL) (FAO/OMS, 2002). Entre los géneros más empleados como probióticos están: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, entre otros. Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos son capaces de sobrevivir al paso por el aparato digestivo y proliferar en el intestino, sin embargo, la encapsulación con hidrocoloides ha demostrado tener efectos significativos en la protección de los probióticos bajo condiciones adversas (Zanjani *et al.*, 2014). Numerosos materiales han sido utilizados como agentes encapsulantes, incluyendo proteínas, gomas y almidones modificados. Pero los procesos de obtención de estos materiales son muy costosos, por lo que es necesario evaluar alternativas. Entre las opciones más evaluadas se encuentran la maltrodextrina e inulina, los cuales presentan excelentes propiedades de encapsulación (Araujo-Díaz *et al.*,

2017; Corralo *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2016). Otras de las alternativas han sido los fructanos de agave y dextrano, polímeros derivados de la sacarosa, cuyos monómeros son la glucosa y fructosa. Estos polisacáridos presentan diferentes grados de polimerización, haciendo que sus estructuras sean complejas, proporcionando diferentes niveles de protección a diferentes productos encapsulados (Arrizon *et al.*, 2010; Mellado-Mojica *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2003; Ortiz-Basurto *et al.*, 2017). Los sistemas de encapsulación son de gran utilidad para proteger micronutrientes o microorganismos probióticos porque reducen la interacción que tienen con el exterior, dándoles estabilidad a pH ácidos y condiciones extremas de humedad (Han *et al.*, 2008). En los procesos de encapsulación es importante estudiar el contenido de humedad residual, ya que es uno de los criterios esenciales para el control de calidad debido a que puede afectar la vida de anaquel, la aceptabilidad del producto y la estabilidad de las capsulas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos materiales de encapsulación: la miel de *Agave tequilana* Weber y el dextrano sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* 299v a las condiciones de almacenamiento y a las condiciones gastrointestinales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo y material de encapsulación

El microorganismo empleado para el proceso de encapsulación fue *Lactobacillus plantarum* 299v de Protransitus® (Laboratorios Salvat, Barcelona, España) cultivada a 37 °C por 24 h de incubación en caldo MRS (Dibico, México). Posteriormente, se centrifugó el medio a 8000 rpm por 20 min a 4°C, desechando el sobrenadante, y el pellet se suspendió en leche al 10% v/v para conservar las bacterias a -60°C. Como se ha reportado en la literatura, la conservación en leche es favorable para la preservación de bacterias ácido lácticas en procesos de liofilización y secado por aspersión (Hunter-Cevera & Belt, 1996). La preparación de los sistemas encapsulantes se realizó de la siguiente manera: se empleó 200 mL de leche en polvo estéril al 20 % p/v en el que se diluyó dextrano a una concentración de 1.5% (p/v) (L-D); el otro sistema de encapsulación fue realizado de la misma manera pero empleando *Agave tequilana* Weber (L-M). Como otro sistema de encapsulación se empleó la leche (L) sin dextrano y sin miel de *Agave*. En los tres sistemas se adicionó 5mL de la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^8 UFC/mL.

La miel de *Agave tequilana* Weber empleado en este estudio fue de la marca PACAR, S.A. de C.V. México. El dextrano empleado fue producido por la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SF3, aislada del aguamiel de *Agave salmiana* (Castro *et al.*, 2015).

2.2. Proceso de encapsulación

Las dispersiones con agente encapsulante y probiótico fueron alimentadas por aspersión en un equipo Buchi B-290 mini spray dryer con una temperatura de entrada de 110°C, una temperatura de salida de 60-70°C y flujo de aire de 35m³/h. La sobrevivencia de las bacterias al final del proceso de secado por aspersión, se realizó por conteo en placa en agar MRS a temperatura de incubación de 37 °C.

2.3. Determinación de humedad

El contenido de humedad de las muestras fue determinado en estufa de secado (60°C) hasta peso constante.

2.4. Morfología las microcápsulas

La morfología de las microcápsulas fueron observadas por microscopia electrónica de barrido (SEM), para esto, una muestra de cada encapsulado (5 mg) se montó sobre una celda de aluminio y se cubrieron con oro en un equipo de bombardeo iónico (modelo SPI) por 15 min, fueron examinadas en un microscopio JEOL JSM-5800LV.

2.5. Viabilidad al almacenamiento

De determino la viabilidad de las bacterias encapsuladas durante el almacenamiento a 5°C a los 7 y 14 días. La viabilidad se realizó por conteo en placa en agar MRS a temperatura de incubación de 37 °C.

2.6. Viabilidad a las condiciones gastrointestinales

La viabilidad de los microorganismos encapsulados y libres se realizó de acuerdo a lo reportado por Castro *et al.*, en 2015, con ligeras modificaciones. Para las condiciones estomacales, 10 g del encapsulado se transfirió a 100 mL de caldo MRS con pH 2 y fue evaluada la viabilidad a las 0, 1 y 2 horas, esto se realizó para cada uno de los encapsulados y para las bacterias libres. Para las condiciones intestinales, una alícuota de 10% (v/v) fue transferido del medio (después de 1 hora de condiciones estomacales) a 100 mL de caldo MRS con una concentración de sales biliares de 5 mg/mL y se midió la viabilidad a las 0, 1.5 y 3 horas, esto se realizó para cada uno de los encapsulados y para las bacterias libres (sin encapsular y concentración de 1×10^8 UFC/mL).

2.7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa comercial SigmaPlot v.12.3 por triplicado y los resultados se presentaron como el promedio \pm EE. Se utilizó ANOVA para determinar la diferencia significativa entre los datos, $p=0.05$.

3. RESULTADOS

En la Figura 1 se observa el porcentaje de viabilidad de la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* 299v en el proceso de secado por aspersión con los dos materiales de encapsulación. El porcentaje de viabilidad al proceso de secado fue alto (99 %) en los dos encapsulados (L, L-M, L-D), habiendo una reducción significativa en los microorganismos encapsulados con dextrano (L-D) de aproximadamente 0.5 unidad logarítmica.

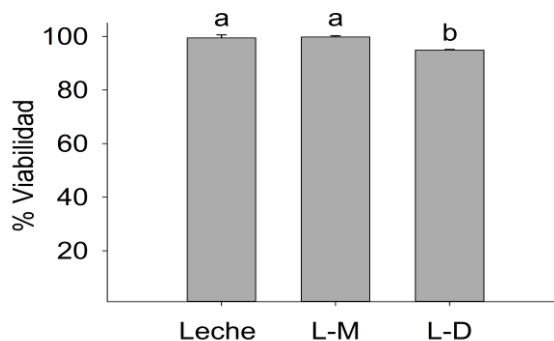


Fig. 1. Porcentaje de viabilidad al proceso de secado de las tres diferentes muestras: Leche; Leche-Miel (L-M); Leche-Dextrano (L-D). Letras iguales, no hay diferencias significativas. Análisis estadístico ANOVA de una vía, $p > 0.05$.

Los resultados de humedad para las matrices evaluadas oscilaron entre 2 y 2.5% como se muestra en la Figura 2. El contenido más alto fue en la mezcla leche-miel (L-M), observándose diferencias ($p > 0.05$) con las otras matrices encapsulantes.

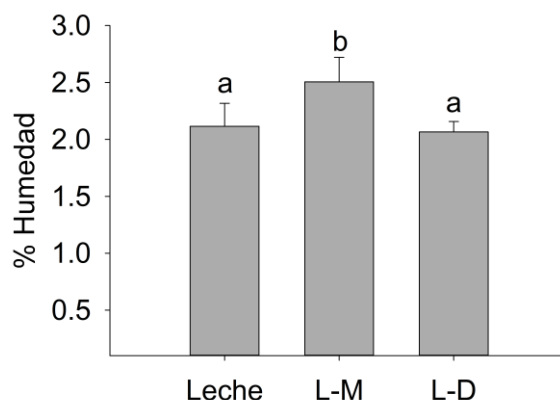


Fig. 2. Humedad residual presente en los tres encapsulados: Leche; Leche-Miel (L-M); Leche-Dextrano (L-D). Letras iguales, no hay diferencias significativas. Análisis estadístico ANOVA de una vía, $p > 0.05$.

Los resultados respecto a microestructura de las diferentes matrices de encapsulación fueron observados por SEM, como se muestra en la Figura 3. Las micrografías por SEM muestran estructuras huecas, con superficies lisas de forma irregular tendiendo a esférica con zonas de colapsamiento. Se observa una coraza con espesor aproximado de $1 \mu\text{m}$ y zonas porosas al interior de la misma. Estas características se observaron en los tres matrices de encapsulación. Cualitativamente se observa que el tamaño de poro es mayor cuando se emplea dextrano como material de encapsulación.

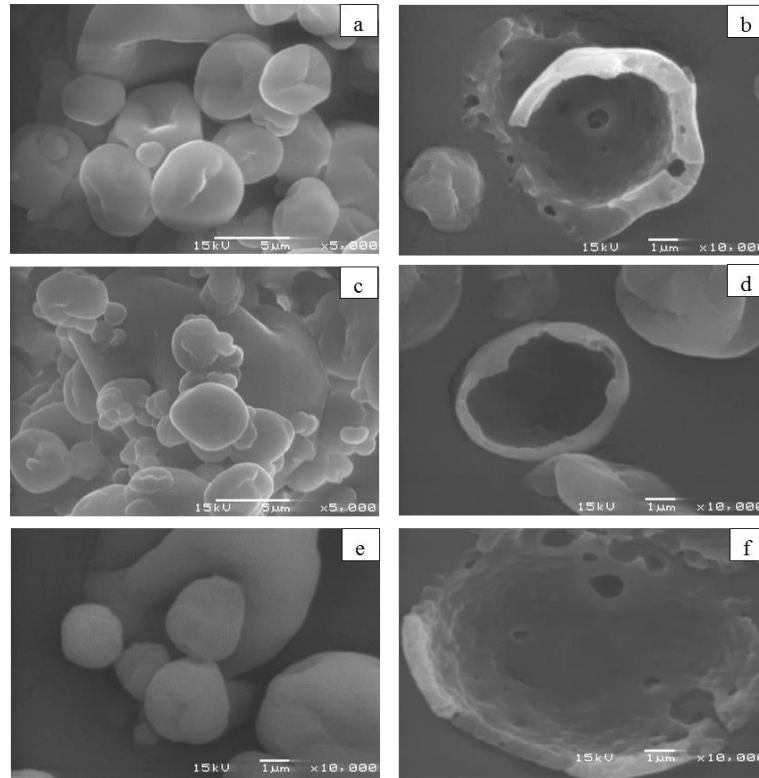


Fig. 3. Micrografías de *Lactobacillus plantarum* 299v por secado por aspersión en diferentes matrices encapsulantes: a) y b) encapsulado de leche con probiótico. c) y d) encapsulado de leche-miel (L-M) con probiótico. e) y f) encapsulado de leche-dextrano (L-D) con probiótico.

El comportamiento de la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* 299v encapsulado en las matrices evaluadas se muestra en la Figura 4. En viabilidad de los encapsulados al almacenamiento a 5°C, no se observa una reducción significativa de la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* 299v en la matriz de leche y de L-D. Sin embargo, en la matriz de L-M hubo un incremento en la viabilidad.

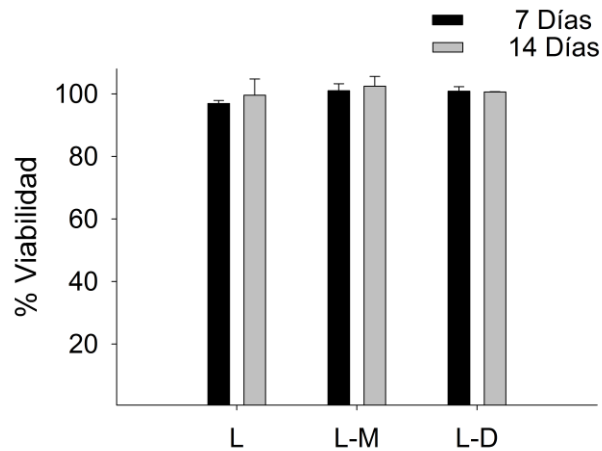


Fig. 4. Porcentaje de viabilidad de los encapsulados a los 7 y 14 días de almacenamiento a 5°C.

Los resultados de los ensayos de viabilidad bajo condiciones gastrointestinales simuladas se presentan en la Figura 5. La viabilidad de *Lactobacillus plantarum* 299v encapsulado en los diferentes matrices cuando es sometido a pH 2 por 2 horas no muestra cambios significativos entre las entre las matrices evaluadas. No obstante, que no se observa una diferencia numéricamente grande entre la viabilidad de los microorganismos libres y encapsulados, el análisis estadístico presenta una disminución significativa de la viabilidad para los microorganismos libres.

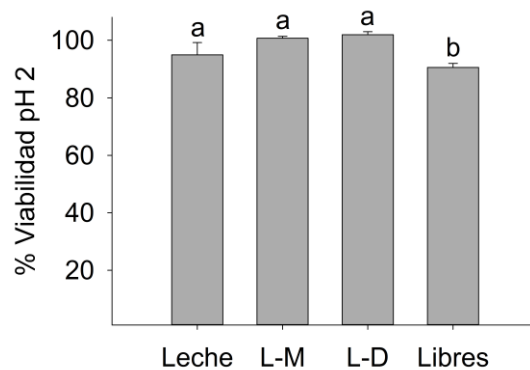


Fig. 5. Porcentaje de viabilidad a las condiciones estomacales (pH 2) de *Lactobacillus plantarum* 299V encapsulado en las 3 formulaciones: Leche; Leche-Miel (L-M); Leche-Dextrano (L-D) y sin encapsular a las dos horas: Libres. Letras iguales, no hay diferencias significativas. Análisis estadístico ANOVA de una vía, $p > 0.05$.

Para los ensayos de viabilidad con sales biliares los resultados se muestran en la Figura 6. Los resultados indican que después de 3 horas de exposición a sales biliares, la viabilidad de los encapsulados con miel y dextrano prácticamente permanecen constantes sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$), pero si con respecto a los microorganismos libres que tienen una disminución de viabilidad de 12%.

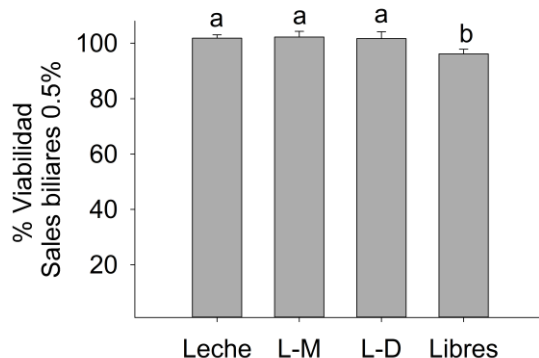


Fig. 6. Porcentaje de viabilidad a las condiciones intestinales (0.5% de sales biliares) de *Lactobacillus plantarum* 299V encapsulado en las 3 formulaciones: Leche; Leche-Miel (L-M); Leche-Dextrano (L-D) y sin encapsular a las tres horas: Libres. Letras iguales, no hay diferencias significativas. Análisis estadístico ANOVA de una vía, $p > 0.05$.

4. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que el efecto de los matrices encapsulantes empleados son efectivos para mejorar la sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum* 299V en al rededor de un 12% con respecto a los que no fueron encapsulados. Por otro lado, dado la naturaleza probiótica de *L. plantarum* y origen de este microorganismos, presenta una alta sobrevivencia y viabilidad a las condiciones gastrointestinales humanas (De Vries *et al.*, 2006). Resultados con elevados porcentajes de sobrevivencia han sido reportados por Lina *et al.* (2014) en matrices de alginato de sodio y quitosano cuando emplean la bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748. El efecto protector de los agentes encapsulantes varía dependiendo de las propiedades de estos (Burgain *et al.*, 2011), así, algunos sistemas de encapsulación basados en maltodextrinas también han minimizado el efecto térmico del proceso (Lapsiri *et al.*, 2012). Ying *et al.* (2012) mencionan que se puede lograr una termoprotección por la adición de radicales libres como, por ejemplo las proteínas de suero de leche, pero en este trabajo se observa una mejor protección cuando se adiciona la miel de *Agave tequilana* Weber. En otras investigaciones se ha incorporado fibra soluble como goma acacia en leche y han observado un incremento en la viabilidad de *L.paracasei* (Desmond *et al.*, 2002). Por otro lado, Darjani *et al.*, (2016) al emplear inulina y oligofruetosacaridos en combinación con alginato de sodio, encuentran una alta viabilidad de *L.casei*. También Ann *et al.* (2007) mencionan que el empleo de prebióticos en encapsulación proporciona una fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento de bacterias probióticas.

El contenido de humedad es uno de los principales factores que se asocian a la estabilidad de los sistemas alimentarios y de manera directa con la actividad del agua, son una de las principales herramientas para el control de los cambios químicos, físicos y biológicos en los alimentos (Damodaran *et al.*, 2017). Los valores de humedad obtenidos para las matrices encapsulantes evaluadas, son consistentes a resultados obtenidos para polvos secados por aspersion por otros autores (Porrás-Saavedra *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2009; Bhandari

2008), quienes reportan valores de humedad menores a 5%. Estadísticamente solo existió diferencia significativa con los valores de humedad para la matriz encapsulante L-M (2.5 %), la cual aparentemente tiene el mayor valor de humedad, sin embargo, desde el punto de vista de estabilidad de los alimentos Fritzen-Freire *et al.*, (2012) menciona que valores de humedad menores a 4% se pueden inhibir reacciones como: oxidación de lípidos, reacciones hidrolíticas, oscurecimiento no enzimático, actividad enzimática y crecimiento de microorganismos, permitiendo obtener una vida útil más larga. De esta manera las tres matrices encapsulantes empleadas pudieran ser utilizadas de forma indistinta, asegurando la estabilidad de los encapsulados. Para el caso de L-M, el valor de humedad obtenido puede ser debido a que la miel está constituida por moléculas de glucosa y fructosa que tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno a través de sus grupos hidróxido y por ende ligar más moléculas de agua (Lopez *et al.*, 2003). Sherry *et al.* (2010), al emplear fructanos de agave como matriz encapsulante observó una alta higroscopicidad, que puede ser atribuida a la habilidad para absorber agua, asociada a la composición del carbohidrato (Ortiz-Bazurto *et al.*, 2017).

Las micrografías obtenidas para las matrices de encapsulación utilizadas, muestran una amplia distribución de tamaños y en todos los casos se presentan partículas de forma esférica (Fig. 3a, 3c, 3e). En general las partículas obtenidas tienen una superficie suave y sin fisuras, lo cual garantiza la protección y baja permeabilidad a los gases (Fritzen-Freire *et al.*, 2012). También se observa que las cápsulas son huecas y con superficie porosa (Fig.3b, 3d, 3f) en donde posiblemente se puedan encontrar embebidas las bacterias.

El secado por aspersión se encuentra dentro de los métodos de encapsulación más sobresalientes y en diferentes trabajos se reporta como un método que resulta exitoso en la encapsulación de bacterias ácido lácticas (Chaipojjana *et al.*, 2014, Peredo *et al.*, 2016; Ying *et al.*, 2016). De igual forma que en otros trabajos reportados, los resultados obtenidos en la presente investigación, muestran valores de supervivencia altos después del proceso de secado por aspersión, siendo superiores a los reportados por Corcoran y colaboradores (2004), quienes evaluaron la supervivencia al secado por aspersión de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus*, empleando concentraciones más altas (>10% p/v) de encapsulantes y temperaturas de salida de 85-90 °C. Goderska & Czarnecki (2008), mencionan que las temperaturas de entrada y salida en el secado por aspersión, tienen un efecto significativo en la supervivencia de las bacterias encapsuladas; resultados semejantes son reportados para *Lactobacillus paracasei* NFBC por Gardier *et al.* (2002). Martín *et al.* (2015), menciona que temperaturas tan altas como 85-90 °C en los procesos de secado por aspersión no son deseables para procesos de encapsulación de microorganismos. Por otro lado, también son varios factores los que pueden afectar la viabilidad de los microorganismos, tal es el caso del tipo de cepa y su tolerancia a las condiciones de estrés, la temperatura y tiempo de exposición al calor durante el proceso de secado, la actividad del agua y el tipo de agente encapsulante (Martín *et al.*, 2015).

Los resultados del comportamiento durante el almacenamiento a 5 °C de *Lactobacillus plantarum* muestran que la mejor viabilidad la presentaron aquellos con la matriz encapsulante LM; este resultado posiblemente se debe a que la miel contiene dentro de su composición química inulina, un polisacárido considerado prebiótico (Kolida *et al.*, 2002),

el cual es empleado como fuente de energía, así como sustrato metabólico y fuente de micronutrientes (Chávarri *et al.*, 2010) que contiene un efecto protector al encapsular bacterias probióticas por secado por aspersión (Lian *et al.*, 2002).

Por otro lado, uno de los mayores obstáculos en la supervivencia de bacterias probióticas, es el ambiente ácido y de enzimas que se encuentra en el estómago, así como las sales biliares secretadas en el duodeno (Del Piano *et al.*, 2011). Al respecto, la encapsulación de los microorganismos se ha empleado para mejorar su viabilidad en productos lácteos en tracto gastrointestinal (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Picot & Lacroix, 2004). En el presente trabajo se presentó una elevada viabilidad de *Lactobacillus plantarum* 299v encapsulado con LM y LD bajo condiciones gastrointestinales (pH 2 y 0.5% de sales biliares). La viabilidad de las células probióticas encapsuladas depende de diversos factores como la concentración del material de revestimiento, el tamaño de partícula, el número de células inicial y las cepas bacterianas (Chen & Chen, 2007). Se reporta que la protección brindada por los biopolímeros es el resultado de la fuerte unión que se presenta por interacciones electrostáticas, de igual forma la interacción de probióticos y prebióticos como inulinas o fructanos, pueden proporcionar un efecto simbiótico que permite una mayor resistencia a las condiciones gastrointestinales (Peredo *et al.*, 2016).

Lee & Heo (2000) y Chandramouli *et al.* (2004) encontraron que la encapsulación de bacterias proporciona una supervivencia ventajosa bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*, respecto a las células libres bajo las mismas condiciones. Por otro lado, en diversas investigaciones se ha reportado que la encapsulación no protege de manera efectiva a las bacterias bajo condiciones ácidas fuertes (Sultana *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2001; Trulestrup-Hansen *et al.*, 2002).

Con los resultados obtenidos en este trabajo se concluyó que la matriz láctea con la adición de miel de *Agave tequilana* Weber y dextrano, mejora la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* 299V durante el proceso de secado por aspersión y mejora la viabilidad durante el almacenamiento, así también bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*, se puede conservar un número mayor de células viables que permitan llevar a cabo la función probiótica del microorganismo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), México, por el apoyo brindado para la realización del proyecto y al Dr. Edgar Oliver López Villegas y María del Rosario Espinoza-Mellado de la Central de Microscopía (CIM) de la ENCB-IPN por el apoyo brindado en el tratamiento de las muestras para microscopía de electrónica barrido.

CONFLICTO DE INTERESES

Diana Catalina Castro-Rodríguez, Karla Guadalupe Rivas-Villegas y Jorge Yáñez-Fernández declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Ann E. Y., Kim Y., Oh S., Imm J. Y., Park D. J. & Han K. S. 2007. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International Journal of Food Science and Technology*. 42 (4): 411-419.

Araujo-Díaz S. B., Leyva-Porras C., Aguirre-Bañuelos P., Álvarez-Salas C. & Saavedra-Leon Z. 2017. Evaluation of the physical properties and conservation of the antioxidants content, employing inulin and maltodextrin in the spray drying of blueberry juice. *Carbohydrate Polymers*. 167: 317-325.

Arrizon J., Morel S., Gschaedler A. & Monsan P. 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry*. 122: 123-130.

Bhandari, B., 2008. Spray drying and food powder properties. In: Hui Y. H., Clairy C. C., Farid M. M., Fosina O. O., Noomhorm A. & Welti-Chanes J. (Eds.), *Food Drying Science and Technology Microbiology, Chemistry, Applications*. Destech Publications Inc., USA.

Burgain J., Gaiani C., Linder M. & Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104(4): 467-483.

Castro-Rodríguez D. C., Hernández-Sánchez H. & Yáñez-Fernández J. 2015. Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and antimicrobial Proteins*. 7 (2): 107-117.

Chaipojjana R., Phosuksirikul S. & Leejeerajumnean A. 2014. Survival of Four Probiotic Strains in Acid, Bile Salt and After Spray Drying. *International Scholarly and Scientific Research and Innovation*. 8(9):1060-1063.

Champagne C. P., Ross R. P., Saarela M. & Hansen K. F., Charalampopoulos D. 2011. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*. 149:185–193.

Chandramouli V., Kailasapathy K., Peiris P. & Jones M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp in simulated gastric conditions. *J Microbiol Methods*. 57:27–35.

Chávarri M., Marañón I., Ares R. & Ibañez F. C. 2010. Microencapsulation of a probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 142: 185-189.

Chen M. J. & Chen K. N. 2007. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*. 83-112.

Corcoran B. M., Ross R. P., Fitzgerald G. F. & Stanton C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*. 96(5): 1024-1039.

Corralo J., Pelayo C., Ferreira L. D. & Tessaro I.C. 2012. Study on the stability of beta-carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*. 89: 1166-1173.

Damodaran S., Parkin K.L., & Fennema O. R. 2017. *Fennema's food chemistry*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis. pp 55-90.

Darjani P., Hosseini Nezhad M., Kadkhodae R. & Milani E. 2016. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT-Food Science and Technology*. 73: 162-167.

De Vries M. C., Vaughan E. E., Kleerebezem M. & De Vos W. M. 2006. *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. 16(9):1018-1028.

Del Piano M., Carmagnola S., Ballare M., Sartori M., Orsello M. & Balzarini M. 2011. Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics. *Gut Microbes*. 2(2): 120-123.

Desmond C., Ross R. P., O'Callaghan E., Fitzgerald G. & Stanton C. 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 1003-1011.

FAO/WHO. 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. April 30 and May 1.

Fritzen-Freire C. B., Prudêncio E. S., Amboni R. D., Pinto S. S., Negrão-Murakami A. N. & Murakami F. S. 2012. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*. 45(1): 306-312.

Gardiner G. E., O'Sullivan E., Kelly J., Auty M. A. E., Fitzgerald G. F. & Collins J. K. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L.salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2605-2612.

Goderska & Czarnecki. 2008. Influence of microencapsulation and spray drying on the viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains. Polish Journal of Microbiology. 57(2): 135-140.

Han J., Guenier A., Salmieri S. & Lacroix M. 2008. Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (56): 2528-2535.

Hunter-Cevera J. C., & Belt A. (Eds.). 1996. *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. Academic Press.

Kolida S., Tuohy K. & Gibson G. R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition. 87(S2): S193-S197.

Koo S. M., Cho Y. H., Huh C. S, Baek Y. J, & Park J. 2001. Improvement of stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. J Microbiol Biotechnol. 11:376–83.

Krasaekoopt W., Bhandari B. & Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal. 13(1): 3-13.

Lee K. & Heo T. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Appl Environ Microbiol. 66: 869–73.

Lian W. C., Hsiao H. C. & Chou C. C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. International journal of food microbiology. 74(1): 79-86.

Lina Y., Han S., Christos S. & Ian F. 2014 Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestio. J Funct Foods. 6(100): 205–214.

Lopez M. G., Mancilla-Margalli N. A. & Mendoza-Diaz G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(27): 7835-7840.

Manojlović V., Nedović V. A., Kailasapathy K. & Zuidam N. J. 2010. Encapsulation of probiotics for use in food products. In Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Springer New York. pp. 269-302.

Martín M.J., Lara-Villoslada F., Ruiz M.A. & Morales M.E. 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. Innovative Food Science and Emerging Technologies 27:15–25.

Mellado-Mojica E., González de la Vara L.E. & López M.G. 2016. Fructan active enzymes (FAZY) activities and biosynthesis of fructooligosaccharides in the vacuoles of *Agave tequilana* Weber Blue variety plants of different age. *Planta*. pp 1-17.

Ortiz-Basurto R. I., Rubio-Ibarra M. E., Ragazzo-Sanchez J. A., Beristain C. I. & Jiménez-Fernández M. 2017. Microencapsulation of *Eugenia uniflora* L. juice by spray drying using fructans with different degrees of polymerization. *Carbohydrate Polymers*. 175: 603-609.

Peredo A.G., Beristain C.I., Pascual L.A., Azuara E. & Jimenez M. 2016. The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. *LWT - Food Science and Technology*. 73: 191-196.

Pereira, R.H., Peixoto, K.S., Jaeger, C.L., Rodrigues, A.L., Pedrosa, C. & Rocha, P.A., 2009. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Res. Int.* 42, 115–121.

Picot A. & Lacroix C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*. 14(6): 505-515.

Porras-Saavedra, J., Palacios-González, E., Lartundo-Rojas, L., Garibay-Flbles V., Yáñez Fernández J., Hernández-Sánchez H., Gutiérrez-López, G. & Alamilla-Beltrán, L. 2015. Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*. 152:105-112.

Sherry M., Li W., Dulin W., Donahue F., Cade D. & Benameur H. 2010. Performance qualification of a new hypromellose capsule: Part I. Comparative evaluation of physical, mechanical and processability quality attributes of Vcaps Plus, Quali-V and gelatin capsules. *International Journal of Pharmaceutics*. 386(1-2): 30–41.

Shi L.E., Li Z.H., Li D.T., Xu M., Chen H. Y., Zhang Z. L. & Tang Z. X. 2013. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*. 117(1): 99-104.

Silva E.K., Zobot G.L., Bargas M.A., & Meireles M.A.A. 2016. Microencapsulation of lipophilic bioactive compounds using prebiotic carbohydrates: Effect of the degree of inulin polymerization. *Carbohydrate Polymers*. 152: 775-783.

Sultana K., Godward G., Reynolds N., Arumugaswamy R., Peiris P. & Kailasapathy K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastro-intestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol*. 62: 47–55.

Thomas M. B., Vaidyanathan M., Radhakrishnan K. & Raichur A. M. 2014. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes. *Journal of Food Engineering*. 136:1-8.

Truelstrup-Hansen L., Allan-Woitas P. M., Jin Y. L. & Paulson A.T. 2002. Survival of **SHORT COMMUNICATION** spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol.* 19: 35–45.

Ying D. Y., Sanguansri L., Weerakkody R., Bull M., Singh T. K. & Augustin M. A. 2016. Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics. *Journal of Functional Foods.* 25: 447–458.

Ying D., Sun J., Sanguansri L., Weerakkody R. & Augustin M.A. 2012. Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. *Journal of Food Engineering.* 109: 597–602.

Yuliani S., Bhandari B., Rutgers R., & D'Arcy B. 2004. Application of microencapsulated flavor to extrusion product. *Food Reviews International.* 20(2): 163-185.

Zanjani M. A. K., Tarzi B. G., Sharifan A., & Mohammadi N. 2014. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research:* 13(3): 843-852.