



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

EVOLUCIÓN Y AVANCES EN LA SELECCIÓN DE LOS CULTIVOS INICIADORES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS.

EVOLUTION AND ADVANCES IN THE SELECTION OF STARTERS USED IN MANUFACTURE OF DAIRY PRODUCTS

Autor/es

SERGIO MARTÍNEZ ARIZA

Director/es

M^a LOURDES SÁNCHEZ PANIAGUA

Facultad de Veterinaria

2017

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT.....	3
2. INTROCUCCIÓN.....	5
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	6
4. METODOLOGÍA.....	7
5. DESARROLLO.....	8
a) Antecedentes.....	8
b) Tipos de cultivos iniciadores.....	13
b.1. Cultivos mesófilos.....	13
b.2. Cultivos termófilos.....	14
b.3. Otros tipos de cultivos.....	16
b.3.1. Cultivos naturales del suero.....	16
b.3.2. Selección de bacterias intestinales.....	16
b.4. Cepas en desarrollo.....	17
b.4.1. Cultivos adjuntos.....	17
b.4.2. Cepas productoras de bacteriocinas.....	17
b.4.3. Cepas productoras de exopolisacárido.....	18
b.4.4. Cepas proteolíticas.....	18
b.4.5. Cepas productoras de lactato.....	19
b.4.6. Cepas productoras de diacetilo, acetato y CO ₂	19
b.4.7. Cepas productoras de acetaldehído.....	19
c) Funciones.....	20
c.1. Producción de ácido láctico.....	21
c.2. Potencial redox.....	22
c.3. Control de microorganismos.....	22
c.4. Producción de CO ₂	23
c.5. Producción de sabor.....	23
c.6. Actividad de agua.....	25
d) Producción, selección, preservación y comercialización de cultivos iniciadores...25	25
d.1. Cultivos líquidos y desecados por aire.....	26
d.2. Cultivos congelados.....	26
d.3. Cultivos liofilizados.....	27
d.4. Cultivos concentrados.....	27
e) Perspectivas de futuro.....	28
6. CONCLUSIONES.....	35
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	36

8. BIBLIOGRAFÍA.....	37
9. ANEXO.....	40

1. RESUMEN

Los cultivos iniciadores o starters son de gran importancia industrial, ya que desempeñan un papel esencial en la fabricación de los productos lácteos fermentados, y en el desarrollo de sus características organolépticas, como el sabor y la textura de los mismos. Además, el mercado mundial de alimentos fermentados ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años, debido al incremento en la demanda de dietas saludables por parte de los consumidores. Todo ello, se ha visto influenciado por las diversas publicaciones que han ido generándose sobre los beneficios potenciales para la salud asociados con la ingestión de alimentos lácteos fermentados y con los microorganismos clasificados como probióticos, y en particular, el papel que parecen desempeñar éstos en la modulación de la función intestinal.

Hoy en día, los cultivos iniciadores empleados en los alimentos fermentados se desarrollan principalmente por métodos de diseño experimental, en lugar de por los métodos tradicionales de detección, ensayo y error. Los avances en los conocimientos de genética y biología molecular han proporcionado interesantes oportunidades para poder llevar a cabo los estudios genómicos de aquellos microorganismos económicamente significativos, centrándose la ingeniería genética de los cultivos en la mejora de las cepas útiles industrialmente. Estos avances han permitido que las queserías y demás empresas alimentarias productoras de alimentos fermentados, tengan a su disposición en el mercado, una amplia gama de cultivos iniciadores de cepas seleccionadas. De tal manera, se logra que los procesos de producción sean más efectivos y que las características organolépticas de los productos obtenidos sean más estables y diferenciadas, debido a la selección de las cepas microbianas de los cultivos iniciadores.

Actualmente, los últimos estudios se centran en la mejora y selección de las cepas con efecto probiótico para los consumidores, y en el enriquecimiento de diversos productos fermentados con dichas cepas (*Cogan, Beresford, Steele, Broadbent, Shah, y Ustunol; 2007*).

ABSTRACT

The starter cultures are of great industrial importance as they play a vital role in the manufacture of fermented dairy products and in the development of organoleptic characteristics, such as taste and texture. In addition, the world market for fermented foods has experienced a significant growth in recent years due to the increased demand from

consumers for healthy diets. All of this has been influenced by the various publications that have been generated on the potential health benefits associated with the ingestion of fermented dairy foods and microorganisms classified as probiotics, and in particular, the role they play in the modulation of the intestinal function.

Nowadays, the starter cultures used in fermented foods are primarily developed by experimental design methods rather than by traditional methods of detection, trial and error. Advances in genetics and molecular biology have provided interesting opportunities for genomic studies of economically significant microorganisms, by focusing the genetic engineering of cultures on the rational enhancement of industrially useful strains. These advances have allowed that dairies and other food companies producing fermented foods have a wide range of starter cultures of selected strains available on the market. In this way, it has been possible to make the production processes more effective and the organoleptic characteristics of the products obtained more stable and defined, due to the selection of the microbial strains of the starter cultures.

Currently, the latest studies focus on the improvement and selection of strains with a probiotic effect for consumers, and the enrichment of various products fermented with such preselected probiotic strains.

2. INTRODUCCIÓN

El uso de cultivos iniciadores implicados en el proceso de la fermentación se ha llevado a cabo desde hace más de 6000 años como un medio para prolongar la vida útil de los alimentos. De tal manera, que los alimentos y bebidas fermentados han jugado un papel importante en las dietas de casi todas las sociedades del mundo, siendo de esta manera un patrimonio cultural en la mayoría de las civilizaciones. Aunque inicialmente se utilizó la fermentación para la conservación de los alimentos aumentando su vida útil, la fermentación tiene numerosos beneficios que incluyen la mejora en las características sensoriales y la aceptabilidad, el aumento del valor nutricional y de la seguridad de los alimentos, proporcionando también una mayor diversificación en la dieta. El número de productos alimentarios fermentados que existe en el mundo es casi ilimitado.

El metabolismo anaeróbico de los carbohidratos que realizan determinados microorganismos es lo que da lugar a la fermentación de la materia prima (**Figura 1**). La producción de muchos alimentos y bebidas que se consumen frecuentemente como el pan, queso, yogur, chucrut, cerveza y vino implican que se dé un proceso de fermentación en su elaboración (*Malo y Urquhart; 2016*).

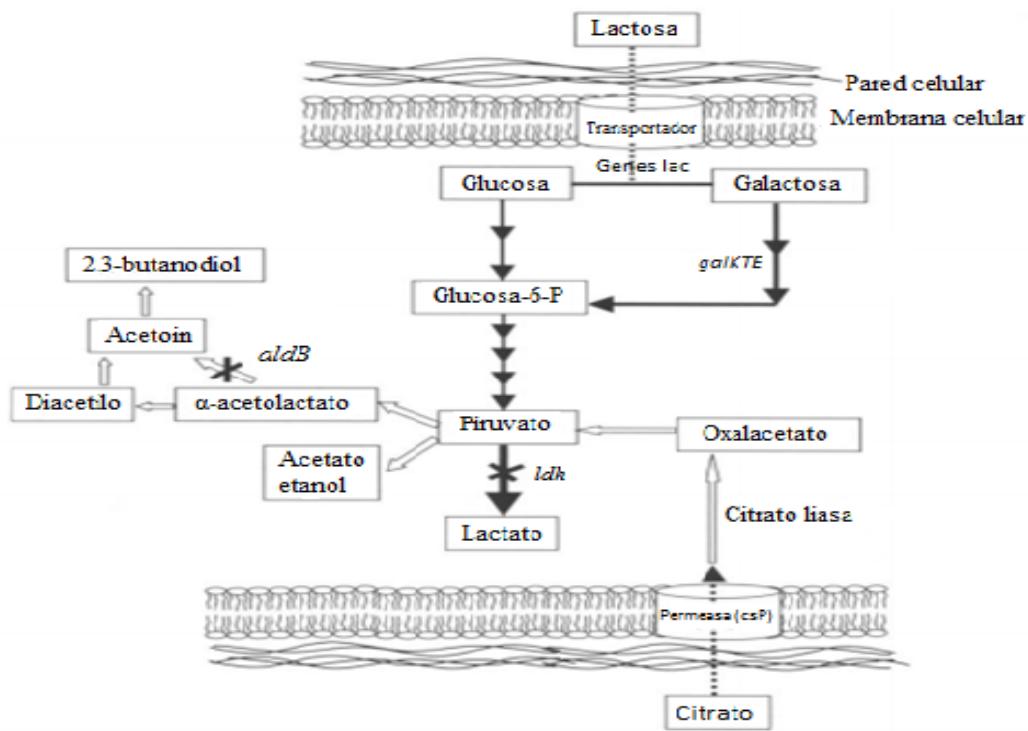


Figura 1. Esquema adaptado del metabolismo de la lactosa (flechas negras) y citrato (flechas blancas) que llevan a cabo las bacterias ácido lácticas (BAL). En este esquema se indican los genes inactivados, (lactato deshidrogenasa “ldh” y acetolactato decarboxilasa “aldB”), como parte de las estrategias de la ingeniería metabólica para la sobreproducción de diacetilo (*Callanan y Ross; 2004*).

Las formas de actuación de los microorganismos son diversas, de tal manera que pueden producirse algunos productos lácteos (por ejemplo, yogurt) con un número reducido de cepas definidas, y por el contrario, otros productos responden con frecuencia a una sucesión compleja de bacterias de especies y cepas no definidas para su producción (por ejemplo, en la producción de quesos artesanales).

Dentro de los cultivos iniciadores más empleados frecuentemente, se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL) y las levaduras. La mayoría de los cultivos iniciadores de BAL en uso hoy en día se originaron a partir de BAL que formaban parte de la microbiota contaminante de la leche. Estas bacterias procedían probablemente de la vegetación ingerida por los animales, en el caso de *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Otros géneros, como por ejemplo, *Enterococcus*, y algunos lactobacilos como *Lactobacillus acidophilus*, se originaron a partir del intestino de animales y humanos.

La demanda tecnológica de cultivos iniciadores en los procesos de fermentación de los alimentos es significativa. No obstante, todos los cultivos iniciadores utilizados deben ser seguros y deben tener por lo menos, un estado generalmente considerado seguro e inocuo, o una evaluación de presunción de seguridad alimentaria certificada por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (*Mullan et al.; 2014*).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los datos acerca del número de publicaciones sobre los cultivos iniciadores en la bibliografía científica disponible, demuestran que la investigación, desarrollo y utilización de los mismos en la industria alimentaria ha ido aumentando con el transcurso del tiempo, llegando a ser uno de los temas de investigación más relevantes en los últimos años.

Además los datos históricos sobre los orígenes, el desarrollo de dichos cultivos y el elevado número de investigaciones y avances científicos que se han llevado a cabo en la biotecnología de aislamiento, mejora y cultivo de las cepas de interés industrial, hacen que la información disponible sea muy densa. Es por ello que el objetivo de este trabajo es la realización de una revisión de dicha bibliografía, mediante la cual obtener un esquema detallado en el que queden reflejados los avances más importantes que han experimentado los cultivos iniciadores y que les ha llevado hasta su situación actual en la industria alimentaria.

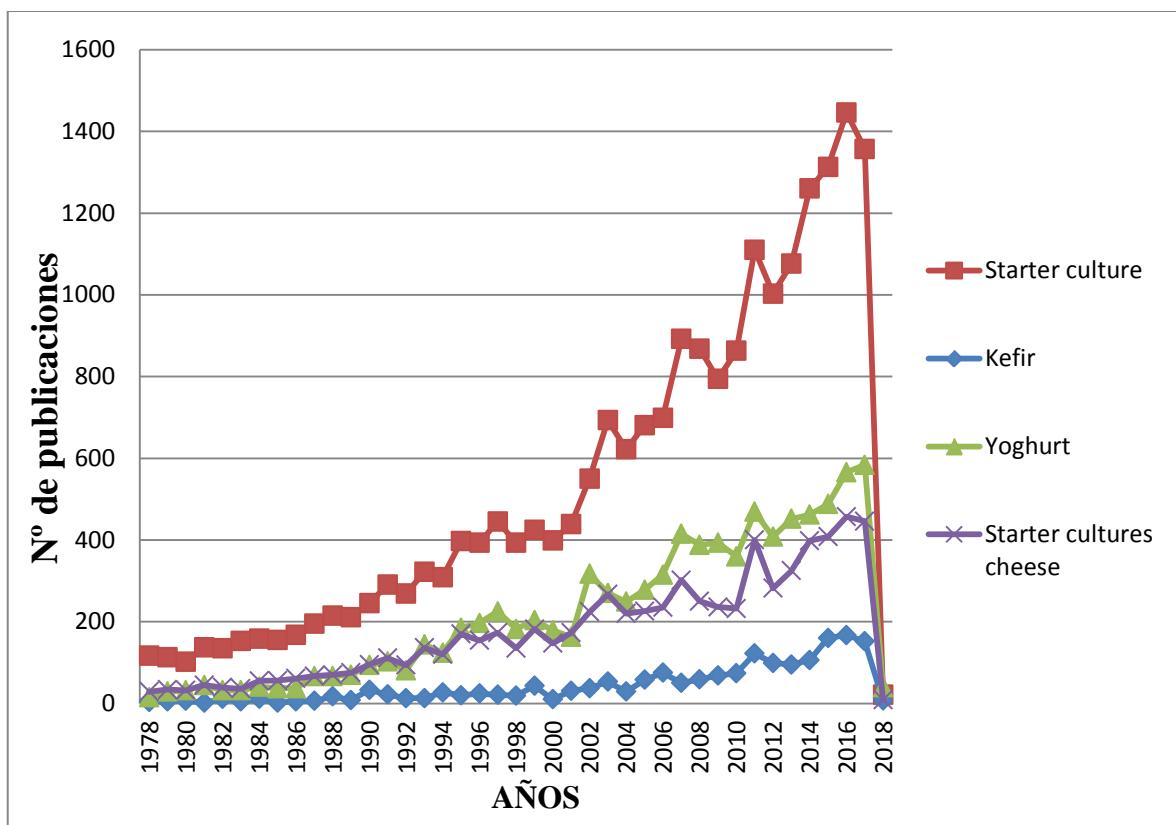


Figura 2. Número de publicaciones sobre los cultivos iniciadores en general, cultivos del kéfir, cultivos del yoghurt y del queso. Fuente: Science Direct; Fecha de acceso: 13/09/17.

4. METODOLOGÍA

Se ha llevado a cabo un estudio de tipo descriptivo mediante la revisión de la literatura sobre los orígenes y la evolución de los cultivos iniciadores. En concreto, se ha revisado la literatura disponible acerca de los cultivos iniciadores en los derivados lácteos.

Se ha empleado como buscador principal de dicha bibliografía la base de datos de Science Direct, empleando como palabras claves para la realización de dicha búsqueda las siguientes; “starter cultures”, “innovation starter cultures”, “starter cultures function”, “starter cultures dairy products”, “dairy products”, “fermented foods”, “food microbiology”, “fermented milks”, “yogurt”, “use starter cultures”, “lactic acid bacteria (LAB)”, “probiotics”, entre otras.

También se han consultado otras publicaciones contempladas en libros y enciclopedias, que han servido como base para el desarrollo del cuerpo de este trabajo.

Consultada toda la literatura, se ha procedido a la selección de aquella que se consideró importante para dar respuesta al objetivo del trabajo. Posteriormente, se realizó la redacción del trabajo, empleando para ello los datos más relevantes de cada fuente escogida.

5. DESARROLLO

a) ANTECEDENTES

Nuestros antepasados ya consumían alimentos que habían sido sometidos a un proceso de fermentación; sin embargo, no conocían el papel que jugaban los microorganismos implicados en dicho proceso. No obstante, sí reconocían las cualidades conservadoras y nutricionales de los alimentos fermentados. Por esto, se presupone que el propósito inicial era la prolongación de la vida útil de los alimentos, es decir, prolongar la conservación de los mismos para poder almacenarlos y transportarlos. No sabemos con certeza en qué momento los seres humanos comenzaron a usar la fermentación intencionadamente, pero los datos arqueológicos sugieren una fermentación intencionada de la miel, de algunos tipos de frutas y del arroz hace unos 10.000 años. Por otra parte, tenemos algunas pruebas de la fabricación de pan y de queso, así como de la fermentación de la uva, alrededor del 6000-7000 A.C.

Una de las primeras descripciones de un alimento fermentado es el “Himno a Ninkasi” (**Figura 3**), llevado a cabo por los sumerios, que se remonta a 1900 años antes de Cristo y en él se describe la producción de cerveza. Los alimentos fermentados se extendieron por todas las civilizaciones antiguas y hay un documento importante que detalla la producción de alimentos fermentados escrito en la India antigua: el libro sagrado “Rig Veda” que describe la producción de una bebida fermentada con la que ganar la inmortalidad. A lo largo de los siglos, la fermentación fue un proceso empírico hasta que Louis Pasteur describió el papel de los microorganismos en 1857 (*Bevilacqua, Sinigaglia, y Corbo; 2016*).

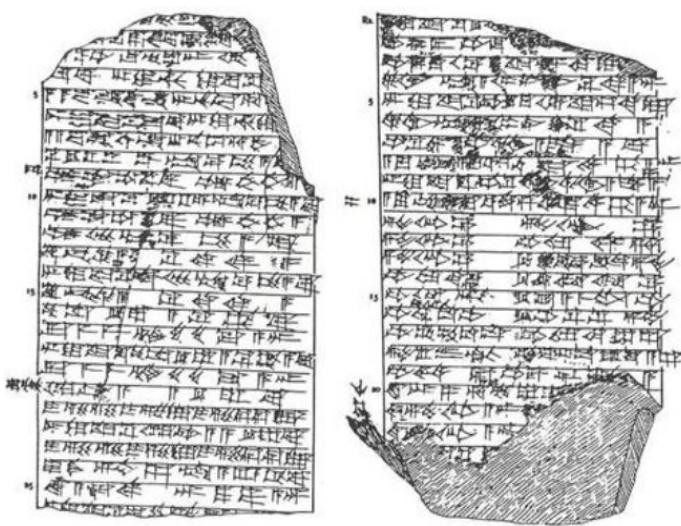


Figura 3. Himno a Ninkasi, tablillas escritas por los sumerios que detallan la elaboración de cerveza.

En la mayoría de las diferentes regiones del mundo en las que aparecieron alimentos fermentados, se originaron cuando los microorganismos se introdujeron accidentalmente en

los alimentos locales. Estas regiones las que se mencionan a continuación.

Oriente Medio y África:

Se cree que una de las primeras transiciones al cultivo y producción de alimentos organizados ocurrió en Oriente Medio, en los valles de los ríos Tigris y Eufrates, hace más de 10 milenios. Fue aquí donde el pan, fermentado por levaduras y masa madre, procedentes del cereal básico, el trigo, evolucionaron hacia la producción diaria de alimentos fermentados y horneados.

También se descubrió en Oriente Medio, que la leche mantenida y transportada en pieles de animales producía bebidas fermentadas y yogures apetecibles para su consumo, como por ejemplo el “labneh”. A su vez, también se descubrió que un incremento en la extracción de suero de las cuajadas obtenidas por fermentación originaba nuevos productos, de esta forma se dieron los primeros quesos, que eran más duraderos y en los que la prolongación la vida útil era debida a la fermentación (*Bevilacqua, Sinigaglia y Corbo; 2016*).

En África existe el “kule naoto”, una leche tradicional de fermentación láctica de la comunidad Maasai en Kenia, se produce a partir de leche entera no pasteurizada de vacas de la raza cebú. La leche se introduce en una calabaza de la variedad *Lagenaria siceraria* que es especialmente tratada, el fruto se seca y se ahueca. La microbiota láctica del producto está compuesta por lactobacilos (principalmente, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei* y *L. acidophilus* a bajas concentraciones), enterococos y lactococos.

Otro tipo de leche fermentada tradicional es el “suusac” de Kenia que se hace de la leche del camello (*Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis; 2014*).

Norte de Europa:

En el norte de Europa, el consumo de yogurt es actualmente mucho mayor que el de otros productos lácteos fermentados. No obstante, existen también diversos productos lácteos producidos en los países nórdicos desde hace siglos, entre ellos, la crema agria y el suero de mantequilla. La leche se fermenta por un starter compuesto por *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (inóculo 1-2%) a 20°C durante 16-20 h (*Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis; 2014*).

También existen unos fermentados lácteos obtenidos a partir de las denominadas cepas “ropy”, que son cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* y *cremoris*. Éstas son capaces de producir exopolisacárido extracelular (EPS) cuando se cultivan en leche, que originan un producto

que tiene una consistencia “ropy”, filamentosa, produciendo de tal manera una leche que se puede estirar dada la consistencia viscosa que presenta. La leche “ropy”, nombre genérico que recibe cualquier tipo de leche fermentada elaborada con cocos mesófilos productores de EPS, es una leche viscosa y no es especialmente adecuada para beber. Se utiliza tradicionalmente como acompañamiento junto con granos de cereal o pan sin levadura. Estos productos son tradicionales en el norte de Noruega, en Suecia y en Finlandia. Otro fermentado característico de las poblaciones nórdicas es el “viili”, producto finlandés popular que también tiene una consistencia “ropy”, pero además tiene una capa de crecimiento superficial de *Geotrichum candidum* (Narvhus et al.; 2014).



Figura 4. Imagen que ilustra la viscosidad del viili.



Figura 5. Viili con *Geotrichum candidum*.



Este de Europa y Asia:

De entre los diversos productos fermentados que han surgido en el este de Europa y Asia, cabe destacar los productos de fermentación láctica procedentes de Asia Central entre las montañas del Cáucaso y Mongolia, que son populares en muchos países, entre ellos la ex Unión Soviética, Polonia, República Checa, Eslovaquia, Hungría, Bulgaria, Turquía y algunos países escandinavos. Los ejemplos más conocidos de esta clase de leches fermentadas son el “kéfir”, el “koumis” y la “leche acidófila” fermentada por *Lactobacillus acidophilus*.

Se cree que el “kéfir” fue producido por primera vez por las tribus de la región montañosa del Cáucaso del Norte en la antigua Unión Soviética y se ha consumido durante miles de años. Originalmente, el “kéfir” se fermentaba naturalmente en bolsas hechas de pieles de animales, por lo que es justo suponer que el primer “kéfir” se produjo accidentalmente por la fermentación de la leche, almacenada a temperatura ambiente. En el siglo XXI, el “kéfir” se produce industrialmente en diferentes regiones del mundo y se comercializa bajo diferentes

nombres locales, tales como “kephir”, “kefer”, “kiaphur”, “kefyr”, “knapon”, “kepi” y “kippi”.



Figura 6. Gránulos de kéfir

El “koumis” es una bebida con orígenes antiguos, y es común en Europa del Este y Asia Central. Se produce tradicionalmente a partir de leche de yegua mediante una fermentación combinada láctica y alcohólica, y sus características altamente nutritivas y curativas son bien conocidas. En Mongolia, la leche de camello también se utiliza para preparar el “koumis” tradicional. Un producto de leche fermentada tipo “koumis” se fabrica a partir de leche de vaca (desnatada o entera) en algunos países europeos y en los Estados Unidos.

Además de estos dos productos, otro producto tradicional y popular en los Balcanes, Turquía y Europa Central es el “tarhana”, un producto fermentado que consiste en yogurt, tomates y pimientos rojos. El “tarhana” es pues un alimento fermentado hecho por la fermentación combinada del yogurt con el trigo triturado o la harina. Las prácticas de producción del “tarhana” pueden mostrar una variación regional. En la mayoría de los casos, el “tarhana” se hace del yogurt cocido. Sin embargo, en algunas regiones, también se utiliza leche agria (*Özer y Kirmaci; 2014*).

Tabla 1. Adaptada de leches fermentadas tradicionales y productos derivados, fabricados en diversas partes del mundo (*Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis; 2014*).

Producto	País	Tipo de leche
Amasi	Zimbabue	Bovina
Ayib	Etiopia	Vaca, cabra, camello
Brano milako	Bulgaria	Oveja
Dahi	India	Búfala, cabra
Ergo	Etiopia	Vaca, cabra
Koumis (Airag)	Mongolia	Yegua, camella
Kule naoto	Kenya	Vaca

Laban Khad	Egipto	Todo tipo
Labneh	Oriente Medio	Todo tipo
Matsun	Armenia	Todo tipo
Roba	Iraq, Sudan, Egipto	Vaca, búfala, cabra
Shubat	Kazajstán	Camella
Tarag	Mongolia	Todo tipo
Torba	Turquía	Mezcla de vaca y oveja
Xynogalo	Grecia	Oveja
Yiaourti	Grecia	Oveja, cabra, vaca

Tras la aparición de esta gran variedad de productos fermentados que se han mencionado y otros muchos que surgieron en las diversas poblaciones, hay que resaltar que durante la industrialización de las fermentaciones de alimentos, el control de las condiciones de fermentación se hizo cada vez más importante para asegurar las propiedades del producto tales como el sabor y la textura.

El uso de cultivos iniciadores es un sello distintivo de la fermentación industrial de alimentos y su introducción ha ido seguida por una búsqueda continua para mejorarlos. Algunas de las propiedades deseadas en los cultivos iniciadores incluyen su resistencia durante los procesos de fabricación, un alto rendimiento de la biomasa y un alto rendimiento del producto con unas propiedades organolépticas específicas. Inicialmente, el desarrollo de los cultivos y su mejora se centraron en encontrar cepas con propiedades deseables en las colecciones existentes, o aislarlas de la naturaleza. Desde la década de 1950, los nuevos programas de mejora de las cepas y la aparición de las herramientas de biología molecular en los años ochenta condujo a un cambio en el enfoque de la investigación hacia la ingeniería genética. Sin embargo, la mala aceptación por parte del consumidor de los organismos genéticamente modificados en los productos alimentarios ha estimulado una reaparición de los métodos de laboratorio tradicionales, como la selección de cepas y el cultivo de los microorganismos presentes en la materia prima (*Bachmann, Pronk, Kleerebezem y Teusink; 2015*).

Por su parte, la fabricación moderna de quesos hace uso de la ingeniería avanzada, la biotecnología y la ciencia de los alimentos. Aun así, la fabricación de queso es fundamentalmente un proceso antiguo y muchos de los procedimientos estándar de fabricación de quesos se basan en las prácticas tradicionales. No fue hasta 1873 que Lister aisló los primeros cultivos iniciadores puros y confirmó así la participación bacteriana en la

fabricación de quesos. El manejo y manipulación de cultivos bacterianos surgió como una tecnología en la década de 1890, a través de Conn en los Estados Unidos, Storch en Dinamarca y Weigmann en Alemania. Los avances en la selección, propagación y manejo de los cultivos starters fueron esenciales para permitir que la elaboración de queso se industrializara. La creciente comprensión de la bioquímica, la fisiología y la genética de las bacterias lácticas ha permitido un uso más concreto de los cultivos específicos logrando a su vez un mayor control sobre el rendimiento del cultivo y el sabor de los quesos (*Powell, Broome y Limsowtin; 2011*).

b) TIPOS DE CULTIVOS INICIADORES

Un cultivo iniciador o starter es un preparado de cultivos microbiológicos que realiza o inicia la fermentación de un medio o sustrato. Los cultivos iniciadores generalmente se preparan en un medio de cultivo rico en nutrientes, como pueden ser granos, semillas o líquidos, colonizados por los microorganismos que constituyen dichos cultivos. Inicialmente, los cultivos iniciadores debían prepararse justo antes de su uso; hoy en día, pueden congelarse, liofilizarse o secarse y prepararse a escala industrial.

La elección de un cultivo starter depende del sustrato o de la materia prima que se vaya a fermentar. Este cultivo puede estar compuesto por bacterias, mohos, levaduras o una combinación de los mismos. Dentro de los cultivos empleados habitualmente en las fermentaciones las bacterias ácido lácticas son las que poseen mayor relevancia. Las propiedades deseables de los cultivos iniciadores incluyen una acidificación rápida, que los procesos de fermentación sean predecibles, que las características sensoriales sean deseables (incluyendo sabor, textura, aroma y consistencia) y que se produzca una reducción de la microbiota contaminante y patógena (*Malo y Urquhart; 2016*).

Los cultivos iniciadores pueden clasificarse en cultivos mesófilos, con un desarrollo óptimo a 25-30 °C, y cultivos termófilos, que crecen a temperaturas más altas de 37-45 °C.

- **b.1. Cultivos mesófilos:**

Los cultivos mesófilos son ampliamente utilizados en la industria de fermentación de la leche y en la fabricación de productos tales como “filmjölk” y “lactofil” (en Suecia) e “ymer” (en Dinamarca). Los cultivos iniciadores mesófilos contienen en su mayoría *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, pero rara vez se utiliza esta especie sola, es por ello que a los cultivos mesófilos se les denomina también cultivos mesófilos mixtos. El “suero de mantequilla”, “langfil” y “viili”, que son populares en Noruega, Suecia y Finlandia, combinan *Lc. lactis*

subsp. cremoris con especies de *Leuconostoc*. Otros productos lácteos fermentados hechos con starters mesófilos incluyen la “crema agria”, el “suero de leche cultivado” y el “kéfir” (*Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis; 2014*).

Los cultivos mixtos mesófilos, como se ha dicho anteriormente, consisten en un número desconocido de cepas principalmente de *Lc. lactis subsp. cremoris*, pero también pueden contener *Lc. lactis subsp. lactis* y *Leuconostoc spp.* También se les ha llamado cultivos indefinidos, dada la variabilidad de especies microbianas que presentan (*Surono y Hosono; 2011*).

En la industria quesera se les denomina cultivos primarios, y participan tanto en la elaboración como en la maduración de los quesos. Estos cultivos son invariablemente diferentes, especies de varios géneros de bacterias ácido lácticas (BAL), entre las que se incluyen, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis* y *Lactobacillus helveticus* (*Cogan et al.; 2014*).

- **b.2. Cultivos termófilos:**

Los cultivos iniciadores termófilos se utilizan para la fabricación de yogurt, el suero de mantequilla búlgaro, y toda la gama de productos hechos con bacterias de origen intestinal, principalmente lactobacilos y bifidobacterias. Los cultivos termófilos se clasifican en dos tipos principales: starters artesanales que consisten en cepas indefinidas y los starters definidos. Ejemplos de los sistemas termófilos de cultivos iniciadores definidos son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, cuyo crecimiento y la producción de ácido se incrementan debido a la relación protocooperativa entre estas dos especies; *Lb. acidophilus* se emplea en la elaboración de leche acidofila, y *Lb. paracasei subsp. paracasei* para la producción de yakult (*Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis; 2014*).

En quesería, se les denomina cultivos secundarios, y sólo participan en la maduración. Dentro de los cultivos secundarios se incluyen diferentes combinaciones de bacterias, levaduras y mohos, como por ejemplo, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Pseudoclavibacter helvolus* (anteriormente *Brevibacterium helvolum*), *Propionibacterium freudenreichii*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida utilis*, *Penicillium camemberti* y *Penicillium roqueforti*, en función del tipo de queso que se esté elaborando (*Cogan et al.; 2014*).

Tabla 2. Cultivos iniciadores primarios utilizados para la fermentación de la leche (*Surono* y *Hosono*; 2011)

<i>Mesophilic</i>	<i>Thermophilic</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Lb. helveticus</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.

Siempre se ha considerado que los cultivos mixtos, tanto mesófilos como termófilos, contienen varias cepas de cada especie. Sin embargo, análisis recientes han demostrado mediante la aplicación de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) a moléculas de ADN restringido extraídas de varios aislados de cada cultivo, que muchos cultivos termófilos son cultivos puros que contienen sólo una cepa, mientras que los cultivos mesófilos contienen varias cepas, pudiendo encontrarse la misma cepa en diferentes cultivos. Por otra parte, se ha descrito que algunos cultivos termófilos son mezclas de dos cepas (*Cogan et al.*; 2014).

Algunas de las características distintivas de las diversas bacterias encontradas en los cultivos iniciadores se encuentran en la (Tabla 3).

Tabla 3. Uso de cultivos iniciadores en diferentes tipos de quesos (adaptada de *Cogan et al.*; 2014).

Quesos	Cultivos primarios	Cultivos secundarios	Otros compuestos importantes distintos del ácido láctico
Emmental	<i>S. thermophilus</i> <i>Lb. Helveticus</i> y <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> también puede utilizarse	<i>P. freudenreichii</i>	CO ₂ , propionato y acetato
Mozzarella y Cheddar	<i>S. thermophilus</i> y <i>Lb. helveticus</i> . Cepas definidas de <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> y <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> o cultivos mixtos mesófilos. A veces se incluyen cultivos termófilos		
Edam y Gouda	Principalmente cultivos mixtos mesófilos.	<i>P. camemberti</i> , <i>G. candidum</i> , <i>C. utilis</i> .	CO ₂ y acetato
Camembert y Brie	Cultivos mixtos mesófilos	<i>B. linens</i> , <i>G. candidum</i> , <i>C. utilis</i>	Compuestos azufrados
Yogurt	Principalmente cultivos mixtos termófilos. Cepas definidas de		Acetaldehído

	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> también puede utilizarse		
Queso fresco y quarg	Cultivos mixtos mesófilos		Diacetilo y acetato

- **b.3. Otros tipos de cultivos:**

- b.3.1. Cultivos naturales del suero

En algunos países, especialmente en Francia e Italia, se practica con frecuencia el retroceso de los starters. El suero (o a veces la propia leche) del día anterior, se incuba bajo condiciones cuidadosamente controladas para su uso en la elaboración del queso del día siguiente. Este sistema generalmente se usa donde hay una larga tradición de fabricación de queso. Estos son los llamados cultivos de suero de leche natural (o artesanal) y por lo general contienen tanto los organismos iniciadores mesófilos y termófilos como diversos *Lactobacillus* y *Enterococcus spp.* (Cogan et al.; 2014).

- b.3.2. Selección de bacterias intestinales

Las cepas bacterianas de origen intestinal empleadas como starters son lactobacilos, bifidobacterias y enterococos (*Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*), denominados probióticos. Los probióticos se definen como “cultivos, monocultivos o mixtos, de microorganismos vivos que, cuando se aplican a animales o al hombre, afectan de manera beneficiosa al huésped mejorando las propiedades de la microbiota intestinal autóctona”. En relación con los alimentos, se considera que los probióticos son "preparados viables en alimentos o suplementos dietéticos para mejorar la salud de los seres humanos y los animales".

Lactobacillus acidophilus y las bifidobacterias pueden prevenir el crecimiento y desarrollo de muchos microorganismos gastrointestinales, y la leche fermentada por estos microorganismos puede ejercer propiedades terapéuticas o profilácticas para el consumidor.

Algunos de los productos elaborados mediante el uso de estos starters son; el yogur de leche acidófila, la Gefilac y Gefilus (nombres comerciales de las leches fermentadas fabricadas en Finlandia utilizando *Lactobacillus GG* que es una cepa de “*Lactobacillus rhamnosus*”); el Yakult un producto de Japón y el hemisferio oriental, hecho con *L. paracasei* subsp. *paracasei* (cepa Shirota); 'Biokys' es el nombre comercial de un producto de la antigua Checoslovaquia, que se elabora a partir de leche de vaca. Es una mezcla de dos leches

fermentadas por starters diferentes, una inoculada con *B. bifidum* y *Pediococcus acidilactici* y la otra leche se inocula con *L. acidophilus*, y después se mezclan los productos fermentados obtenidos (*Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis; 2014*).

- **b.4. Cepas en desarrollo:**

- b.4.1. Cultivos adjuntos

Hoy en día, muchos quesos como el Cheddar, que hasta ahora se han hecho sólo con cultivos mesófilos, se considera que carecen de sabor. Es por ello, que se utilizan cada vez más mezclas de cultivos mesófilos y termófilos, principalmente cepas de *S. thermophilus*, en la fabricación de estos quesos. Se utilizan también lactobacilos facultativamente heterofermentativos (mesófilos) cuidadosamente seleccionados, tales como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum*. La principal razón por la que se están investigando estos microrganismos es que estas especies invariablemente alcanzan niveles elevados al principio de la maduración del queso y por lo tanto, deben desempeñar algún papel en la formación de sabor. Su papel exacto no está claro, y por ello, son objeto de un considerable número de investigaciones actuales. Estos cultivos se denominan cultivos adjuntos y están dirigidos a dar un carácter más redondeado, menos amargo y más dulce, aumentando el sabor de los quesos. Estos cultivos también ralentizan la fermentación propiónica en el queso Emmental, dando ojos más redondos y un queso de mejor calidad (*Cogan et al.; 2014*).

- b.4.2. Cepas productoras de bacteriocinas:

Casi todas las bacterias son capaces de producir proteínas, llamadas bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de otras bacterias. Las bacteriocinas de las BAL están siendo estudiadas intensivamente porque muchas de ellas inhiben microorganismos patógenos (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*). Dicha acción inhibitoria radica en la capacidad de éstas para formar poros en la membrana celular, o la inhibición de la biosíntesis de componentes de la pared celular, así como el efecto sobre la actividad de las enzimas autolíticas, o la inhibición del desarrollo de esporas bacterianas (*Karpinski y Szkaradkiewicz; 2016*).

La nisin es la bacteriocina de las BAL más intensamente estudiada. Es un péptido pequeño, termoestable producido por algunas cepas de *Lc. lactis* que se aisló inicialmente en 1945. Inhibe numerosas bacterias, incluyendo varios microorganismos Gram positivos causantes de intoxicación alimentaria como *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus* y también las

bacterias de la descomposición del queso. Se utiliza en el queso procesado para evitar el crecimiento y posterior formación de gases por *Clostridium tyrobutyricum* y *Clostridium butyricum*. Otras bacteriocinas producidas por las BAL, como la pediocina producida por *Pediococcus pentosaceus* y la lactocina producida por *Lc. Lactis* están adquiriendo también una gran importancia comercial (Cogan et al.; 2014).

- **b.4.3. Cepas productoras de exopolisacáridos:**

Muchos starters producen expolisacáridos, que mejoran la textura y la sensación en boca de las leches fermentadas como el yogurt y el suero de mantequilla o buttermilk. También se cree que mejoran el rendimiento del queso y son especialmente útiles en quesos bajos en grasa debido a sus capacidades de unión al agua. Los exopolisacáridos, están compuestos, generalmente, de diferentes proporciones y combinaciones de glucosa, ramnosa y galactosa (Cogan et al.; 2014).

- **b.4.4. Cepas proteolíticas:**

La proteólisis producida por las BAL es importante para su crecimiento en la leche y en la maduración del queso. Los starters BAL son auxotróficos y requieren varios aminoácidos para el crecimiento. El nivel de aminoácidos libres en la leche es bajo y suficiente para sostener sólo el 20% del crecimiento normal de BAL en la leche. Por lo tanto, las bacterias iniciadoras deben tener un sistema de proteinasas para hidrolizar las caseínas a aminoácidos y péptidos, que luego se transportan a la célula.

La proteinasa de *Lactococcus* ha sido estudiada intensivamente. Es una molécula grande y la secuencia de aminoácidos en todas las cepas estudiadas es similar. Se cree que las ligeras diferencias que se producen son responsables de las diferentes especificidades proteolíticas que se han observado con la caseína. Este enzima es una serina proteinasa que hidroliza las diferentes caseínas en numerosos oligopéptidos y aminoácidos, que luego son distribuidos por varios sistemas de transporte primario y secundario dentro de la célula. Sólo se pueden transportar péptidos que contengan menos de ocho residuos de aminoácidos. Las peptidasas intracelulares hidrolizan los péptidos en los aminoácidos constituyentes para la síntesis de proteínas. Se han identificado en las BAL numerosas peptidasas, incluyendo aminopeptidasas, endopeptidasas y peptidasas capaces de hidrolizar péptidos que contienen prolina.

Las relaciones simbióticas ocurren tanto en los cultivos mesófilos como en los termófilos. En cultivos termófilos, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* es más proteolítico que *S. thermophilus*

e hidroliza las caseínas a aminoácidos, particularmente histidina, glicina, valina e isoleucina, que estimulan el crecimiento de *S. thermophilus* (Cogan et al.; 2014).

- **b.4.5. Cepas productoras de lactato**

La lactosa es el principal azúcar que se encuentra en la leche y es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa. *Lactococcus lactis* y *Lb. helveticus* fermentan lactosa por la vía glicolítica (homofermentativa) casi completamente al ácido láctico, mientras que *S. thermophilus* y la mayoría de las cepas de *Lb. delbrueckii* sólo fermentan el resto de glucosa y excretan galactosa en proporción a la cantidad de lactosa transportada. Esto se traduce en una acumulación de galactosa, que podría actuar como una fuente de energía potencial para los microrganismos de alteración. *Lactobacillus helveticus* fermenta ambos azúcares, y, por esta razón, se utiliza en la elaboración de los quesos suizos; más recientemente, las cepas positivas a la galactosa de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* han comenzado a reemplazar a *Lb. helveticus* porque son menos proteolíticas. *Leuconostoc* y los lactobacilos heterofermentativos obligados fermentan la lactosa por la ruta de la fosfocetolasa (heterofermentativa) a concentraciones equimolares de lactato, etanol y CO₂ (Cogan et al.; 2014).

- **b.4.6. Cepas productoras de diacetilo, acetato y CO₂**

El diacetilo y el acetato son importantes para determinar el sabor de muchos productos fermentados, no madurados, como el queso Cottage, queso fresco, Quarg y mantequilla producida a partir de nata sometida previamente a fermentación láctica; mientras que el CO₂ es responsable del pequeño número de hoyos u ojos encontrados en los quesos Edam y Gouda. El citrato, que está presente en bajas concentraciones (10 mM) en la leche, es el precursor de estos compuestos. Todavía hay un debate considerable sobre cuál es el precursor inmediato del diacetilo. Algunos investigadores creen que la enzima diacetil sintasa está involucrada. No obstante, esta enzima no se ha encontrado en las BAL. Sin embargo, la opinión mayoritaria es que el diacetilo se sintetiza químicamente a partir de 2-acetolactato (AL), que se forma por condensación de acetaldehído pirofosfato-TPP con una molécula de piruvato (Cogan et al.; 2014).

- **b.4.7 Cepas productoras de acetaldehído**

El acetaldehído es producido en pequeñas cantidades por las BAL y es sintetizado más por los starters termófilos que por los mesófilos. Es un componente importante del sabor en el yogur. Generalmente, es aceptado que se forma a partir del azúcar (piruvato), pero en *Lc.*

lactis, se forma a partir de treonina en una reacción catalizada por la treonina aldolasa:



Se cree que la función fisiológica de esta reacción es proporcionar glicina para el crecimiento de las BAL (Cogan et al.; 2014).

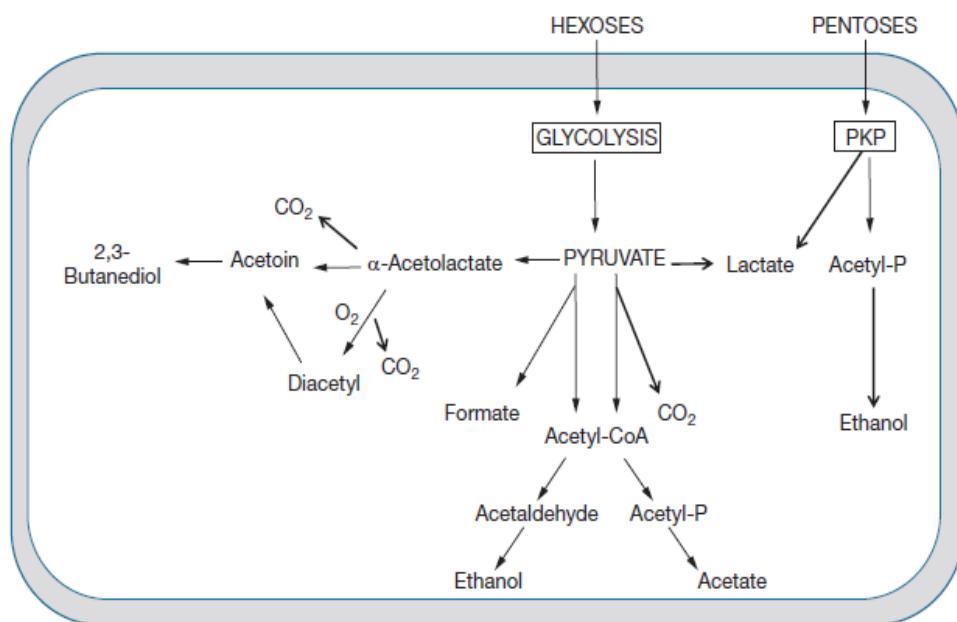


Figura 7. Metabolismo de los azúcares por las BAL (Mozzi, 2016).

c) FUNCIONES

Los cultivos iniciadores de los productos lácteos están bien caracterizados en lo que se refiere a las funciones que desempeñan en los procesos de fermentación, y ello hace que se puedan usar para lograr unas características específicas en los alimentos fermentados por dichos cultivos.

Las funciones principales de los cultivos iniciadores en las fermentaciones lácteas se muestran en la (Tabla 4). Aunque la producción de ácido es el objetivo principal requerido de los cultivos iniciadores en muchas de las fermentaciones de leche, los cultivos iniciadores tienen otras funciones igualmente importantes. También es evidente que son múltiples los mecanismos responsables de su capacidad para preservar o extender la vida útil de los alimentos fermentados (Powell y Broome; 2011).

Tabla 4. Principales funciones de los iniciadores en las fermentaciones de la leche (adaptado de Mullan et al.; 2014).

FUNCIÓN	Resultado/ Mecanismo
Producción de ácido	-Formación de gel -Expulsión de suero (sinéresis) -Conservación -Desarrollo del sabor
Producción de compuestos del sabor	-Formación de diacetilo y acetaldehído.
Conservación	-Disminución del pH y potencial redox -Producción de bacteriocinas tales como nisin -Producción de peróxido de hidrógeno. -Formación de D-leucina -Producción de lactato / ácido láctico -Formación de acetato
Formación de gas	-Formación de ojos -Producción de aperturas para facilitar la "veta azul"
Estabilizador de formación	-Mejora del cuerpo y la viscosidad -Uso reducido de leche en polvo en la fabricación de yogurt
Uso de lactosa	- Reducir el potencial de desarrollo de gas y mal sabor -Hacer productos más aceptables para los intolerantes a la lactosa
Disminución del potencial redox	-Conservación -Ayuda al desarrollo del sabor

Dichas funciones son:

- c.1. Producción de ácido láctico

Aunque el ácido láctico es el ácido más significativo de los que se producen en las fermentaciones lácteas, y es crítico para la conservación, también se puede producir ácido acético y ácido propiónico. Mientras que el pH, que normalmente se encuentra por debajo de 5,2, ya es limitante por sí solo, del crecimiento de bacterias que puedan producir algún deterioro y de bacterias patógenas, el ácido orgánico no disociado tiene un efecto

antimicrobiano importante, por sí mismo. Por otro lado, el ácido propiónico tiene también una actividad antimicrobiana significativa. El mecanismo de actuación antimicrobiana que llevan a cabo dichos ácidos no es otro que el colapso del gradiente electroquímico de la cadena transporte de protones, es decir, dichos ácidos interaccionan con la membrana celular de los otros grupos microbianos, neutralizando el potencial electroquímico, lo cual ejerce unos efectos bacteriostáticos y la muerte de las bacterias más susceptibles (Calvo; milksci.unizar.es).

Los cultivos iniciadores empleados en la elaboración de queso se componen predominantemente de BAL, aunque también pueden estar implicadas otras bacterias y levaduras. En la fabricación de queso, el papel primario de los cultivos iniciadores es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa a una velocidad predecible y controlada. Esto causa la consiguiente disminución del pH que afecta por consiguiente a una serie de aspectos del proceso de fabricación de queso y en última instancia a su composición y calidad (Powell, Broome y Limsowtin; 2011).

- c.2 Potencial redox

Los cultivos iniciadores de las BAL, especialmente los productores de ácidos orgánicos fuertes, tienen como característica importante la reducción significativa del potencial de oxidación-reducción (E_h) en los productos lácteos, particularmente en queso o en productos líquidos. El E_h de leche cruda es de unos 150 mV, mientras que el queso Cheddar tiene un E_h de 104 mV inicialmente, disminuyendo hasta aproximadamente los 250 mV. Esta disminución del E_h durante la maduración, parece ser un proceso necesario para el desarrollo del buen sabor característico de este tipo de queso (Powell, Broome y Limsowtin, 2011); (Mullan et al.; 2014).

- c.3 Control de microrganismos contaminantes

La producción de bacteriocinas también puede ser un importante factor de conservación. Muchas BAL producen bacteriocinas, que son péptidos sintetizados en los ribosomas. La nisin es un conservante bastante efectivo contra las bacterias Gram positivas, ya que se une a sus membranas interfiriendo en sus sistemas de transferencia de protones. En particular, se podría utilizar para combatir varios microrganismos patógenos, como *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus*, que forman endoesporas que resisten mejor el calentamiento que las células vegetativas, y también *Listeria monocytogenes*. La nisin es también muy eficaz en la prevención de alteraciones del queso, especialmente en quesos fundidos, producidas por

Clostridia (Mullan et al.; 2014).

Algunos estudios también indican que algunas BAL producen péptidos antifúngicos y ácidos grasos hidroxilados que inhiben el crecimiento de mohos.

Algunas BAL pueden producir concentraciones micromolares de peróxido de hidrógeno en la leche, que actúa como un potente inhibidor antimicrobiano. Para algunas bacterias, el efecto es bacteriostático y reversible, para otras, el efecto es bactericida. Se eliminan bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, y *Salmonella spp.*

El crecimiento de muchos microrganismos patógenos, sensibles a los ácidos del queso, es inhibido en cierta medida por el bajo pH, así como por las moléculas de ácido láctico no disociadas. Sin embargo, como muchos patógenos todavía pueden crecer en el pH del queso, este actúa como una parte de un sistema de obstáculos que sirve para inhibir su crecimiento. Así, el bajo pH contribuye a controlar el crecimiento de patógenos junto con la baja temperatura, la baja actividad de agua, la concentración de sal, de ácidos orgánicos distintos de los lácticos (por ejemplo, ácido acético), y la baja disponibilidad de oxígeno (Powell, Broome y Limsowtin; 2011).

- c.4. Producción de CO₂

El crecimiento de mohos es característico de algunos productos fermentados y a menudo requiere de una apertura mecánica de la cuajada o masa para permitir el intercambio gaseoso y la penetración del micelio. Aunque se utiliza un equipo especial para facilitar dicho crecimiento del moho, esto se puede lograr mediante el uso de starters que contienen cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetilactis* o *Leuconostoc* que producen dióxido de carbono y permiten dicha apertura de la cuajada. Este proceso es importante en algunas variedades de queso de veta azul, tales como Cambozola o Blue Brie (Mullan et al.; 2014).

- c.5. Producción de sabor y compuestos aromáticos:

El desarrollo del sabor en el queso depende en gran medida de la actividad proteolítica combinada de varios agentes proteolíticos, incluyendo proteinasas naturales de la leche, agentes coagulantes, bacterias starters, bacterias adventicias no starters y microorganismos adjuntos. Los cultivos iniciadores poseen una serie de peptidasas predominantemente intracelulares que degradan los péptidos formados por agentes proteolíticos a aminoácidos, los cuales actúan entonces como precursores para una gama de compuestos volátiles del sabor. Cuando las células del cultivo starter se lisan en el queso, las peptidasas intracelulares quedan también disponibles para actuar sobre los péptidos de la propia matriz de queso

(Powell, Broome y Limsowtin; 2011).

El metabolismo de los cultivos iniciadores también puede afectar directamente al desarrollo del sabor de algunos quesos formando diversos compuestos derivados de lactosa y citrato. Uno de los principales metabolitos de ramificación en el metabolismo de la lactosa es el piruvato, la gran mayoría de estos metabolitos se convierten, en condiciones normales de crecimiento, al ácido láctico por la enzima lactato deshidrogenasa. Sin embargo, cuando las bacterias starters fermentan galactosa o fermentan glucosa o lactosa a velocidades de crecimiento limitantes, pueden formarse productos distintos del ácido láctico a partir de piruvato. Una serie de cepas de bacterias starters también pueden metabolizar el citrato, que está presente a bajas concentraciones en la leche y el queso, para formar piruvato y acetato. El piruvato puede entonces convertirse en diversos compuestos de sabor. Por ejemplo, la producción de diacetilo y CO₂ es responsable del aroma y los ojos característicos del queso Gouda.

Algunos starters producen materiales complejos de tipo polisacárido que pueden ser utilizados por los tecnólogos para mejorar el cuerpo o la viscosidad de productos tales como yogur o para producir las características esenciales del producto (*ropiness* o filamentosidad) como es el caso de la leche finlandesa fermentada viili (Mullan et al.; 2014).

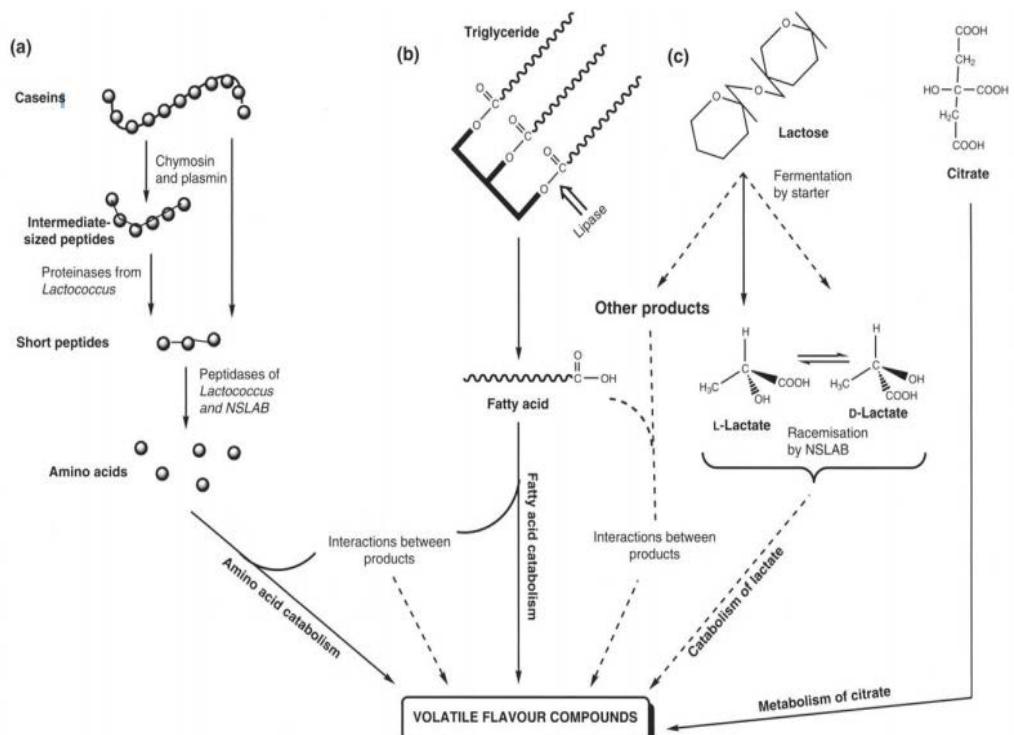


Figura 8. Visión general de las vías bioquímicas que operan en el queso durante la maduración (McSweeney et al.; 2004).

- c.6. Actividad de agua

La producción de ácido láctico contribuye a la disminución de la actividad del agua en el queso de manera directa mediante la formación de solutos (por ejemplo, ácido láctico) o indirectamente mediante un aumento de la disolución del fosfato de calcio coloidal que se produce con la disminución del pH. La influencia de la producción de ácido láctico sobre el contenido de humedad del queso también afecta significativamente a la actividad del agua. En el queso Cheddar, se ha demostrado que la disminución de la actividad del agua inhibe la formación de lactato y el crecimiento bacteriano mientras que hay un aumento en la producción del compuesto aromático diacetilo (*Powell, Broome y Limsowtin; 2011*).

d) PRODUCCIÓN, SELECCIÓN, PRESERVACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES

La producción de cultivos iniciadores o starters se ha realizado tradicionalmente mediante el cultivo y propagación de los mismos, obteniéndolos a partir de cultivos madre, medios en los que hay presencia de una gran variedad de microorganismos. Este método sigue siendo ampliamente utilizado, aunque el procedimiento de propagación requiere de mucho tiempo, de personal especializado y puede haber una exposición del cultivo a la infección por bacteriófagos, que es uno de los principales peligros en la industria de los productos lácteos. Además de los inconvenientes anteriores, la necesidad de aumentar el número de células para tener siempre un stock disponible de cultivos iniciadores y a su vez mejorar la actividad y la estabilidad de los cultivos, han llevado al desarrollo de cultivos iniciadores especialmente diseñados. Es esencial pues, que los iniciadores conserven sus funciones para asegurar el mantenimiento de dicho stock y que siempre estén disponibles en caso de fallo en el proceso. Además, el subcultivo sucesivo puede conducir a la aparición de cepas mutantes, lo que puede alterar el comportamiento general y las características generales del cultivo iniciador. De tal forma, que la producción de cultivos iniciadores implica una selección cuidadosa de los medios y de las condiciones operativas para poder obtener unos resultados óptimos en términos del número de células finales viables, de la actividad (crecimiento rápido, fase de latencia reducida, producción de ácido adecuada, producción de aroma, capacidad proteolítica), estabilidad al almacenamiento y composición del cultivo. Estos, a su vez, están influenciados por varios factores, incluyendo la presencia de fagos, composición del medio y condiciones de fermentación (tratamiento térmico, control de temperatura y pH durante la fermentación, duración de la incubación, temperatura de almacenamiento, etc.).

La evolución en el cultivo y selección de iniciadores tiene un claro reflejo en la industria quesera en la que la leche era el medio tradicional para el crecimiento de los iniciadores, pero ésta ha sido sustituida por la leche desnatada reconstituida sin antibióticos (RSM, del inglés *reconstituted skim milk*) y por cultivos iniciadores especialmente diseñados, disponibles en laboratorios de cultivo de iniciadores. La disponibilidad de esta leche RSM permite un mejor control del crecimiento antes de su inoculación en la cuba quesera. Puede ser reconstituida a un nivel de sólidos más alto que el de la leche fresca, mejorando así la capacidad tamponadora y por lo tanto el crecimiento y la actividad del cultivo.

Los cultivos iniciadores presentan diversas formas de conservación y comercialización, mientras que los cultivos madre se almacenan normalmente en la planta quesera durante un tiempo limitado. La producción y distribución de cultivos iniciadores de forma comercial requiere de medios adecuados para la conservación y distribución de cultivos en un estado altamente activo. Los cultivos pueden ser conservados por diversos medios (refrigeración de cultivos líquidos, secado, congelación, liofilización). Históricamente, los cultivos se han producido y distribuido en forma líquida, en polvo desecado por aire (secado por pulverización), como cultivos congelados y cultivos liofilizados. Los dos últimos medios de conservación son los más ampliamente utilizados hoy en día en la industria de cultivos iniciadores (*Parente y Cogan; 2004*).

- d.1. Cultivos líquidos y desecados por aire

El enfriamiento de los cultivos líquidos es el método más antiguo de conservación y distribución de cultivos. Suele añadirse a la leche CaCO_3 (6 g /L) para mantener un pH alto y estos cultivos se almacenan a baja temperatura (2-5°C). La estabilidad no excede de 1 ó 2 semanas. Aunque la refrigeración se utiliza todavía para la distribución diaria de algunos cultivos mixtos para la producción de queso, ha sido reemplazada por la congelación y la liofilización.

El secado por aire o por vacío de los cultivos se utilizó en el pasado para producir cultivos en forma de polvo, pero debido a su pobre vitalidad y actividad, este medio de conservación no se usa más. El secado por pulverización es un método rápido y económico para eliminar el agua, pero los cultivos están expuestos a un estrés severo (calor, desecación, oxidación) y la supervivencia y la actividad son generalmente, bajas.

- d.2. Cultivos congelados

La congelación a una temperatura muy baja (-80°C, -196°C) en presencia de agentes crioprotectores es la mejor manera de preservar la vitalidad y la actividad de las bacterias.

Varios factores afectan a la supervivencia de las BAL durante la congelación y su actividad después de la descongelación, por ejemplo, la especie, la cepa, la composición del medio de crecimiento, las condiciones de cultivo, la fase de crecimiento, la composición del medio utilizado para mantener las células durante la congelación, el tipo y la concentración del agente crioprotector, la temperatura y la velocidad de congelación, la temperatura de almacenamiento, la temperatura y la velocidad de descongelación. Es por todo esto, por lo que para obtener altas densidades celulares, antes de la congelación, las células se cultivan bajo un control del pH. Las células estacionarias son más resistentes a la congelación que las células que se encuentran en fase de crecimiento exponencial.

La necesidad de mantener el cultivo congelado en todo momento hace que los cultivos congelados sean menos prácticos que los cultivos liofilizados para ser enviados a la industria. Sin embargo, debido a su alta actividad, algunas industrias todavía prefieren utilizar cultivos concentrados congelados.

- d.3. Cultivos liofilizados

Mientras que la eliminación del agua a temperatura ambiente es perjudicial para la supervivencia y la actividad de los cultivos iniciadores, la liofilización, es decir, la eliminación del agua de un cultivo congelado por sublimación en vacío, da como resultado altos niveles de supervivencia. La liofilización se ha utilizado para la preparación de cultivos lácteos durante aproximadamente un siglo.

El procedimiento para la preparación de cultivos liofilizados es similar al utilizado para la preparación de cultivos congelados hasta la etapa de congelación, aunque la adición de antioxidantes como ácido ascórbico, junto con agentes crioprotectores, es común. Los cultivos se congelan rápidamente y se desecan a vacío (<10 Pa) durante 12-24 h, hasta una a_w final de 0,1. Los cultivos liofilizados pueden ser enviados y almacenados a temperatura ambiente, aunque la supervivencia y la actividad se mejoran por un almacenamiento a 4°C ó -20°C.

- d.4. Cultivos concentrados

Los cultivos convencionales congelados y liofilizados no contienen suficientes células para la inoculación directa en los tanques de fermentación o cuajado de la masa. Los starters concentrados congelados y liofilizados reúnen las condiciones idóneas para la inoculación del starter en masa o directamente a la leche empleada para producir queso (cultivos de adición directa en cuba o DVS, del inglés *direct vat set*), los cuales ya están fácilmente disponibles en las empresas de starters y son ampliamente utilizados tanto en plantas

pequeñas como grandes. Aunque los starters concentrados son más caros, el uso de estos mejora la flexibilidad de las plantas productivas (debido a la reducción o eliminación del tiempo necesario para producir el starter a granel propio), reduce o elimina la necesidad de personal y reduce el riesgo de contaminación por fagos en la fábrica. Es por ello, que los cultivos de starters concentrados son ahora la forma preferida para la distribución y uso de cultivos y hay disponible una amplia selección de especies, cepas y combinaciones (*Surono y Hosono; 2011*).

e) Perspectivas de futuro:

Los impresionantes avances científicos y tecnológicos que se han llevado a cabo con las BAL en los últimos años servirán para asegurar un proceso eficiente en la fermentación de alimentos en un futuro cercano. No obstante, existe la necesidad de garantizar que haya beneficios claros para el consumidor derivados de la manipulación de estas bacterias, puesto que dicha secuenciación y manipulación genética no es aceptada por la totalidad de los consumidores, especialmente en Europa.

Sin embargo, el desarrollo de probióticos eficaces para la aplicación humana sí que está siendo bastante investigado, aunque se encuentre todavía en una etapa inicial (*Koutinas et al.; 2017*).

Los probióticos se definen como microorganismos vivos, que confieren un beneficio para la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas. Pueden producir efectos beneficiosos en el cuerpo humano manteniendo la microbiota intestinal saludable, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas, aliviando el estreñimiento, estimulando el sistema immune, sintetizando vitaminas y agentes antimicrobianos, y mejorando la absorción de calcio. Sin embargo, para que los probióticos ejerzan estos efectos beneficiosos, su alta viabilidad debe conservarse en el intestino después de su paso a través del tracto gastrointestinal superior. Debido a los numerosos beneficios para la salud de los probióticos, es urgente desarrollar nuevos métodos para preservar su viabilidad. Además, para el desarrollo de alimentos funcionales que tengan cantidades adecuadas de células viables, la supervivencia de los probióticos durante el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos también es esencial (*Kumar y Salminen; 2016*).

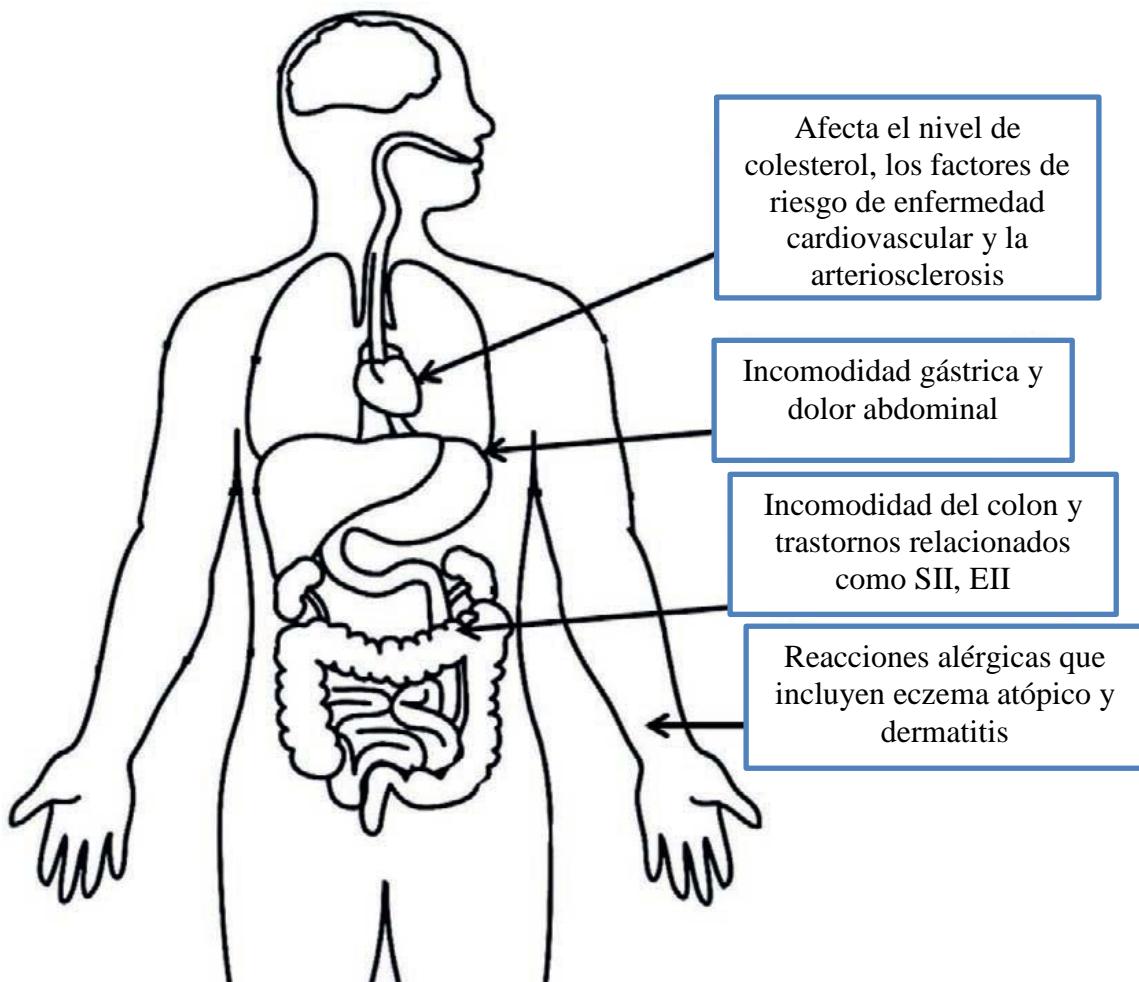


Figura 9. Principales áreas de estudio sobre los efectos para la salud humana de los probióticos: reducción de los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y alergias; alivio de la incomodidad gástrica, malestar colónico y síndromes relacionados que incluyen SII, EII (síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal) y enfermedad de Crohn (*Kumar y Salminen; 2016*).

En relación a todo lo expuesto anteriormente acerca de la importancia que tienen los probióticos por los diversos efectos beneficiosos que ejercen en la salud y el interés que existe en lograr la supervivencia de los mismos en su paso por el tracto digestivo, se va a analizar un estudio sobre el uso de almidón de arroz como agente encapsulante.

Estudio sobre la producción de RS4 a partir de almidón de arroz y su utilización como agente encapsulante para la administración dirigida de probióticos.

Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics . (*Bilal Ahmad Ashwar , Asir Gani , Adil Gani, Asima Shah , Farooq Ahmad Masoodi; 2018*)

- a) La microencapsulación es una técnica prometedora para la protección de células bacterianas y son varios los estudios que han investigado el papel protector de esta técnica frente a las condiciones adversas a las que pueden estar expuestos los probióticos. Recientemente, se ha

descubierto que la microencapsulación es una técnica útil para la estabilización de probióticos en aplicaciones de alimentos funcionales. Se han desarrollado varias tecnologías de encapsulación, como la emulsión, la extrusión, el secado por pulverización y la coacervación. Sin embargo, considerando el coste, la simplicidad y las condiciones de formulación para la retención de la viabilidad celular, la técnica de emulsificación es la que más ampliamente se utiliza. La tecnología de emulsión tiene un potencial para la producción a gran escala de microesferas en menos tiempo que las otras tecnologías, lo que es esencial para la aplicación comercial. Para la tecnología de emulsificación, una solución acuosa de polisacárido se dispersa en fase oleosa para formar una emulsión W/O, y luego se agrega una solución de CaCl_2 con agitación continua para la emulsificación y encapsulación de los probióticos.

Los materiales para crear la pared de recubrimiento bacteriano empleados comúnmente para la encapsulación son biopolímeros de calidad alimentaria, como el alginato, la ciclodextrina, el quitosano, la goma de xantana, las proteínas de suero de leche, la gelatina y el almidón. El almidón a menudo se ha usado en combinación con alginato como un encapsulante para probióticos.

El almidón resistente “AR”, en inglés resistant starch (RS), es la porción de almidón que escapa a la digestión en el intestino delgado y, por lo tanto, puede fermentarse en el colon. La capacidad del almidón resistente para escapar de la digestión en el intestino delgado refleja su potencial como material de pared para la administración dirigida de probióticos en el colon. Debido a estos beneficios para la salud del almidón resistente, se han empleado diferentes técnicas para su preparación. Estos incluyen tratamientos hidrotérmicos, recocido, gelatinización parcial y recristalización, autoclave, retrogradación ciclada, fosforilación, hidroxipropilación, acetilación, oxidación y modificación del ácido cítrico. *Sang, Seib, Herrera, Prakash y Shi* (2010) desarrollaron la producción de almidón resistente (AR4) mediante la fosforilación del almidón. *Chuang, Panyoyai, Katopo, Shanks y Kasapis* (2016), descubrieron que las interacciones de los iones de calcio con los grupos fosfato e hidroxilo del almidón producen estructuras densas. Las estructuras densas se pueden usar como material encapsulante para la administración dirigida de probióticos.

Hasta donde sabemos, no se han publicado datos sobre la caracterización del almidón resistente tipo 4 (AR4) como agente encapsulante y prebiótico para la administración dirigida de probióticos. Por lo tanto, este estudio se diseñó para desarrollar AR4, que luego se utilizó para encapsular tres cultivos de bacterias probioticas, siendo estas, *Lactobacillus*

plantarum, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus brevis*. La microestructura y la estabilidad térmica de las microcápsulas, la supervivencia de los probióticos encapsulados en condiciones gastrointestinales simuladas y su viabilidad durante el almacenamiento también se investigaron con el objetivo de producir suficientes bacterias probioticas viables para su posible aplicación en industrias biotecnológicas o alimentarias.

b) Materiales:

El presente estudio empleo como cepas de cultivos probioticos: *Lactobacillus brevis* (MTCC 01), *Lactobacillus casei* (MTCC 297) y *Lactobacillus plantarum* (MTCC 021) se obtuvieron del National Dairy Research Institute, Karnal, India (NDRI) .

El almidón de arroz se extrajo de acuerdo con el método de empapado de álcalis descrito por Ashwar et al. (2016). El almidón extraído se analizó para determinar la humedad (925.10), la proteína (920.87), la grasa (920.85) y la ceniza (923.03) de acuerdo con los métodos de AOAC (1990).

c) Resultados y discusión:

1. Análisis de composición del almidón de arroz:

Los resultados del análisis de la humedad, proteína, ceniza y grasa del almidón fueron de 8.01 ± 0.58 , 0.48 ± 0.03 , 0.66 ± 0.04 y $0.28 \pm 0.05\%$, respectivamente. Los bajos contenidos de proteína, grasa y ceniza indican que el almidón era extremadamente puro y libre de proteína residual.

2. Contenido de almidón resistente:

El contenido de almidón resistente del almidón de arroz nativo fue de $4.42 \pm 0.81\%$ y aumentó significativamente a $45.35 \pm 1.40\%$ por el proceso de fosforilación. Evidentemente, este aumento de 10 veces en el contenido de almidón resistente podría deberse a la reticulación del almidón por la mezcla de trimetafosfato de sodio y tripolifosfato de sodio (STMP / STPP) (Singh, Kaur, y Mc Carthy; 2007). Estudios previos también hablan de una mejora significativa en el contenido de almidón resistente mediante la fosforilación del almidón (Sang et al.; 2010). Se han propuesto diferentes razones para la mejora de AR por fosforilación. Huber y BeMiller (2000) afirmaron que el aumento del contenido de AR de los almidones fosforilados o reticulados podría deberse a la prevención de que la enzima amilasa ingrese al interior de los gránulos de almidón a través de canales y poros. Conway y Hood (1976) informaron que la reducción del poder de “hinchamiento” del almidón reticulado y/o

la obstrucción de la formación del complejo almidón-amilasa debido al impedimento estérico de los grupos fosfato en la cadena de almidón o la falta de flexibilidad de la cadena en el almidón reticulado podrían ser responsables del aumento del contenido de AR .

3. Estudio de confirmación mediante el uso de ATR-FTIR:

La variación en la estructura helicoidal, la conformación de la cadena y la forma cristalina del almidón altera su absorción de energía infrarroja. Por lo tanto, la técnica de espectroscopía infrarroja de Fourier transformada con reflectancia total atenuada ATR-FTIR se utilizó para explorar más a fondo la organización estructural de las microcápsulas AR4. Los espectros FTIR del almidón de arroz nativo y las microcápsulas de probióticos AR4 se muestran en la **Figura 10**.

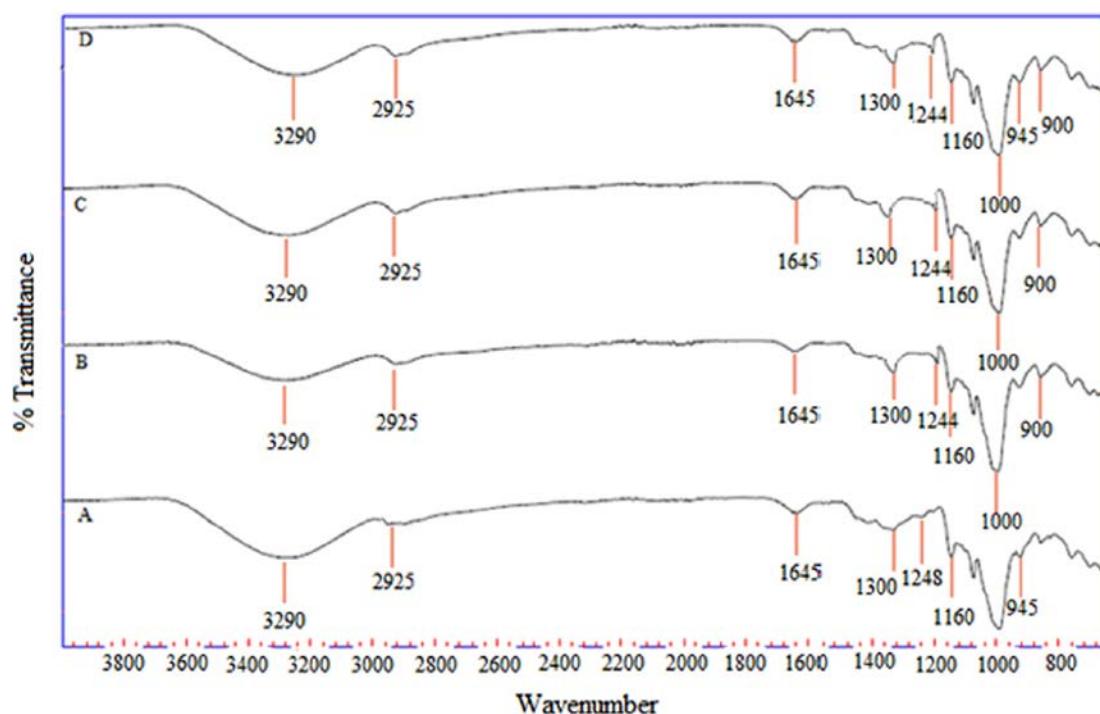


Figura 10. Los espectros FTIR de (A) almidón de arroz nativo, (B) microcápsulas AR4 de *L. brevis*, (C) microcápsulas AR4 de *L. plantarum*, y (D) microcápsulas AR4 de *L. casei*.

4. Propiedades térmicas:

La **Figura 12**, muestra los termogramas del almidón de arroz nativo y de las microcápsulas de probióticos AR4. Las microcápsulas AR4 presentaron un aumento significativo ($p < 0.05$) en las temperaturas de transición y la entalpía de gelatinización en comparación con el almidón de arroz nativo. Estas son las temperaturas de fusión a las que tiene lugar la fusión de los microcristalinos de estos almidones. El aumento en el pico de punto de fusión de las microcápsulas de AR4 indica que la aplicación de STMP / STPP como reticulante puede

mejorar la integridad y la estabilidad del almidón.

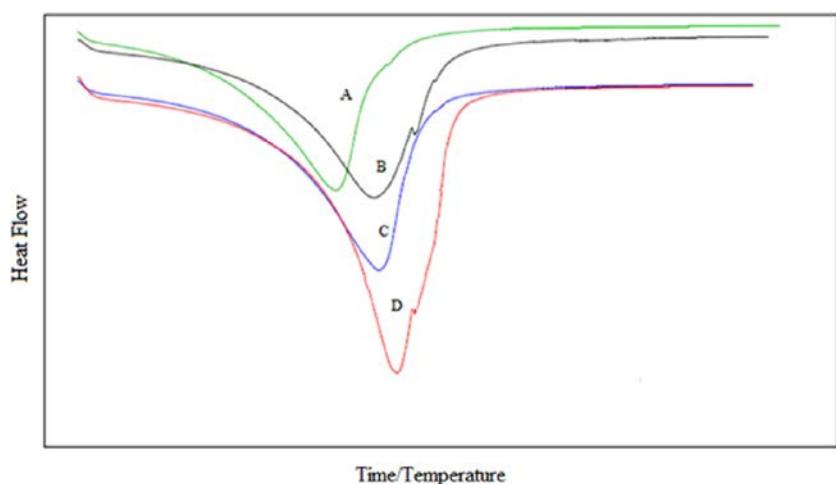


Figura 12. Termogramas de (A) almidón de arroz nativo, (B) microcápsulas AR4 de *L. casei* (C) microcápsulas AR4 de *L. brevis*, y (D) microcápsulas AR4 de *L. plantarum*.

5. Morfología y distribución de tamaño de las microcápsulas:

Como se muestra en la **Figura 13**, las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las micropartículas liofilizadas mostraron diferentes tipos de perlas, sin embargo, la forma esférica fue más abundante. Las microcápsulas también mostraron algunos poros. En la liofilización, las microcápsulas se someten primero a baja temperatura, lo que da como resultado la formación de cristales de hielo a partir del agua residual presente. La sublimación de cristales de hielo a vacío da como resultado la formación de microcápsulas secas porosas. La existencia de estos poros en las micropartículas muestra la capacidad de absorber otras partículas, como los probióticos. muestra los diámetros medios del volumen y los factores de amplitud de las microcápsulas.

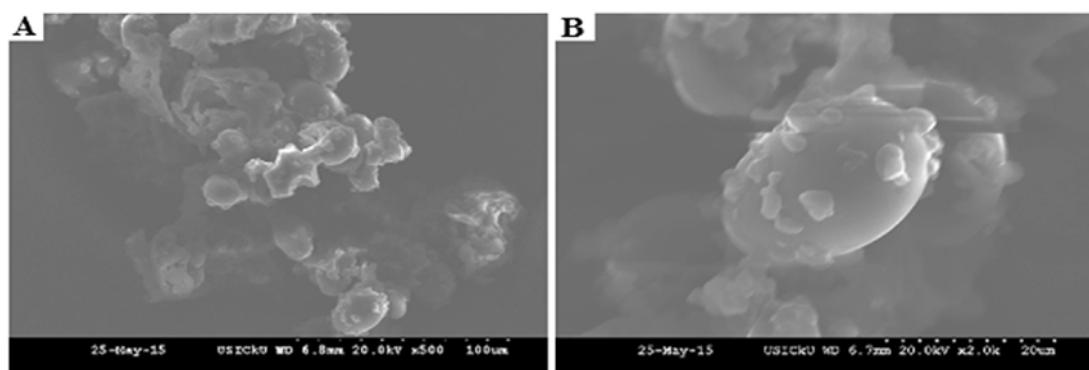


Figura 13. Imágenes SEM de microcápsulas de Lactobacilli (A) 500x y (B) 2000 x.

6. Rendimiento de encapsulación y estabilidad de almacenamiento:

Los rendimientos de encapsulación en (%) de microesferas de almidón resistentes que contienen *L. casei*, *L. brevis* y *L. plantarum* resultaron ser 48.46 ± 0.98 , 43.01 ± 0.99 y 43.85 ± 1.37 , respectivamente.

Las cápsulas liofilizadas y las células de *Lactobacillus* libres se almacenaron a 4°C que simulaban las condiciones de almacenamiento comunes (refrigerador) en la vida real. La viabilidad de los lactobacilos libres y los lactobacilos microencapsulados se analizaron cada 15 días durante un período total de 2 meses.

Los resultados mostraron que las células probióticas microencapsuladas tenían una pérdida de viabilidad significativamente más baja en comparación con las células libres.

7. Supervivencia de probióticos libres y encapsulados en JGS (jugos gástricos simulados):

Para determinar la probabilidad de que las bacterias probióticas microencapsuladas y libres sobrevivieran a través del estómago después de la administración oral, se probó la estabilidad de las bacterias probióticas microencapsuladas y libres en el fluido gástrico simulado.

Se encontraron diferencias significativas en las tasas de supervivencia de las células encapsuladas en comparación con las células libres. El atrapamiento de *Lactobacilli* en AR4 por encapsulación proporcionó una barrera física contra las tensiones ambientales, reduciendo así la pérdida inevitable de la viabilidad de estos lactobacilos durante la digestión gástrica.

8. Supervivencia de probióticos libres y microencapsulados en tratamientos térmicos:

La supervivencia de *Lactobacillus* libres y microencapsulados expuestos a temperaturas de 55, 65 y 75°C se muestra en la **Tabla 5**. Se observaron diferencias significativas entre la reducción en los recuentos de las células libres y las microencapsuladas. Las células libres de las tres cepas de *Lactobacilli* eran sensibles a los tratamientos térmicos.

La alta tasa de supervivencia de los *Lactobacilli* encapsulados se puede atribuir a la protección ofrecida por AR4 que proporcionó una barrera entre los *Lactobacilli* y el ambiente externo. Sin embargo, a 75°C , todas las microcápsulas mostraron una reducción en los recuentos de células viables similares a los de las células libres. Estos resultados indican que AR4 ofreció poca protección para los *Lactobacilli* después de esta combinación de temperatura / tiempo.

Tabla 5. Tasa de supervivencia de células libres y encapsuladas durante condiciones de calor adversas.

Temperature (°C)	Time (min)	Viability (log cfu g ⁻¹)					
		Free cells			Microencapsulated cells		
		<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>
55 °C	0 min	9.48 ± 1.04 ^{aq}	9.45 ± 1.43 ^{aq}	8.86 ± 0.99 ^{dcpq}	8.60 ± 1.00 ^{cpq}	8.41 ± 0.87 ^{cpg}	7.91 ± 1.21 ^{cp}
	1 min	4.16 ± 0.55 ^{dp}	4.74 ± 0.85 ^{dp}	4.30 ± 0.67 ^{cp}	8.57 ± 1.12 ^{cq}	8.30 ± 1.87 ^{cq}	7.62 ± 1.08 ^{cq}
	10 min	3.55 ± 0.75 ^{cqp}	3.39 ± 0.59 ^{cp}	3.25 ± 0.71 ^{bcp}	8.48 ± 1.45 ^{cq}	8.23 ± 1.76 ^{cq}	7.61 ± 2.27 ^{cq}
65 °C	1 min	3.02 ± 0.86 ^{bcp}	3.16 ± 0.25 ^{bcp}	2.79 ± 0.31 ^{abp}	5.90 ± 0.31 ^{bq}	6.17 ± 1.62 ^{bq}	5.65 ± 1.29 ^{bq}
	10 min	2.03 ± 0.36 ^{abp}	2.67 ± 0.30 ^{bcp}	2.30 ± 0.39 ^{abp}	3.56 ± 1.04 ^{aq}	4.06 ± 1.03 ^{aq}	3.32 ± 1.05 ^{aq}
75 °C	1 min	1.94 ± 0.07 ^{abp}	2.30 ± 0.19 ^{abp}	1.83 ± 0.27 ^{ap}	2.99 ± 1.11 ^{aq}	3.39 ± 1.10 ^{aq}	3.88 ± 1.11 ^{aq}
	10 min	1.05 ± 0.54 ^{ap}	1.41 ± 0.47 ^{ap}	1.85 ± 0.91 ^{ap}	2.49 ± 0.81 ^{aq}	2.23 ± 0.76 ^{aq}	2.26 ± 0.79 ^{aq}

Los valores expresados son media ± desviación estándar (n = 3).

Los promedios en la columna y la fila dentro de un parámetro particular con diferentes superíndices son significativamente diferentes en p ≤ 0.05.

d) Conclusión

Los lactobacilos se encapsularon con éxito en microesferas AR4 preparadas por el método de la emulsión. Las células viables de Lactobacilli encapsulado en microesferas mostraron una mayor capacidad de supervivencia que la de las células libres en condiciones gastrointestinales simuladas, tratamientos térmicos adversos y almacenamiento a largo plazo (2 meses). La encapsulación ha demostrado ser un buen método para proteger a los probióticos en entornos gastrointestinales. AR4 muestra el potencial como un nuevo transportador de administración oral de probióticos. Estas microcápsulas pueden ser comercializadas ya que se usa una fuente muy económica como material de pared bacteriana como es el almidón y, por lo tanto, se puede usar en la aplicación de alimentos funcionales.

6. CONCLUSIONES:

En este trabajo se ha intentado dar una visión global acerca del amplio campo que abarcan los cultivos iniciadores en cuanto a su uso y funciones en los fermentados lácteos. Como la utilización de los mismos modifica las características de la leche para lograr unos productos cuyas características organolépticas son origen del computo de reacciones llevadas a cabo por dichos cultivos, y además se consigue prolongar la vida útil en los fermentados.

Queda claro también, que la actividad de los cultivos iniciadores no solo tiene consecuencias en cuanto a las características de los productos obtenidos, sino que tambien modifica la microbiota de dichos productos. Estas modificaciones son tan relevantes, que están siendo investigadas en la actualidad por sus múltiples beneficios para la salud del ser humano. Por ello, se están desarrollando estudios para la suplementación y creación de compuestos que

logren aislar y prolongar la durabilidad de los microorganismos denominados como probióticos.

No obstante, y a pesar de todo lo expuesto en este trabajo, queda claro que los cultivos iniciadores tienen infinidad de posibilidades de aplicación en la industria alimentaria para la obtención de diversidad de productos con características dirigidas a la prevención de enfermedades y trastornos de la salud humana.

Conclusions:

In this work, an attempt has been made to give a global vision about the wide field that starter cultures cover in terms of their use and functions in fermented dairy products. How their use modifies the characteristics of milk to achieve products whose organoleptic characteristics are the origin of the computation of reactions that are carried out by these cultures, and also how to prolong the shelf life in the fermented products.

It is also clear that the activity of the starter cultures not only has consequences in terms of the characteristics of the products obtained, but also the microbiota of those products is modified. These modifications are so relevant that they are being investigated at present for their multiple benefits for the health of human being. Therefore, studies are being developed for the supplementation and creation of compounds that manage to isolate and prolong the durability of microorganisms called probiotics.

However, and despite all the information in this work, it is clear that the starter cultures have infinity of possibilities of application in the food industry to obtain a diversity of products with characteristics in prevention of diseases and human health disorders.

7. VALORACIÓN PERSONAL:

La realización de este trabajo me ha servido para ampliar y reforzar los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera y descubrir cómo está el panorama científico actual en lo que se refiere a la investigación de los cultivos iniciadores. Me ha servido también para aprender a trabajar de forma autónoma y para poder practicar un idioma como el inglés.

Considero desde mi punto de vista, que el TFG es muy apropiado para culminar la carrera, ya sea tanto un trabajo de tipo bibliográfico o de laboratorio, ambos son dos buenas experiencias de cara a estar preparado para un futuro laboral.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. *Ashwar. B A., Gani A., Gani A., Shah A., Masoodi F A.*; (2018), Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics; *Food Chemistry*; 239, 287–294.
2. *Bachmann Herwi , Kleerebezem Michiel, Teusink Bas y T Pronk Jack*; (2015), Evolutionary engineering to improve the yield of the starter culture in food fermentations; *Current Opinion in Biotechnology*; 32, 1-7.
3. *Beresford T. P, Broadbent J., Cogan T. M., Shah N. P., Steele J., and Ustunol Z.*, (2007), Invited Review: Advances in Starter Cultures and Cultured Foods, *Journal of Dairy Science*, 90, 4005-4021.
4. *Bevilacqua A., Corbo MR. y Sinigaglia M.*, (2016), Fermented Foods: Origins and Applications, Encyclopedia Food and health, Editores: Benjamin Caballero, Paul M. Finglas y Fidel Toldra, Waltham, Massachusetts, 675–680.
5. *Broome M C., Limsowtin G.K.Y. y Powell I B.*; (2011), Starter Cultures: General Aspects; Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition); Editor en jefe: John W. Fuquay, Editores: Patrick F. Fox, Paul L. H. McSweeney, San Diego, California, 552-558.
6. *Callanan M.J. y Ross R.P.*, (2004), Starter Cultures: Genetics; Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology; Editores: Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee; London, 1, 149-161.
7. *Calvo Miguel*; milksci.unizar.es/bioquimica/temas/aditivos/conservantes.html
8. *Chuang, L., Panyoyai, N., Katopo, L., Shanks, R., y Kasapis, S.* (2016). Calcium chloride effects on the glass transition of condensed systems of potato starch. *Food Chemistry*, 199, 791–798.
9. *Cogan T.M. y Parente E.*; (2004), Starter Cultures: General Aspects; Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology; Editores: Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee, 1; 123-147.
10. *Cogan TM*, (2014), Starter Cultures: Employed in Cheesemaking, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, San Diego, California, 508–514.
11. *Cogan TM*, (2014), Starter Cultures: Employed in Cheesemaking, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, San Diego, California, 509.
12. Conway, R. L., y Hood, L. F. (1976). Pancreatic α-amylase hydrolysis product of modified

- and unmodified tapioca starches. *Starch/Starke*, 28, 341–343.
13. *Conway, R. L., y Hood, L. F. (1976)*. Pancreatic a-amylase hydrolysis product of modified and unmodified tapioca starches. *Starch/Starke*, 28, 341–343.
14. *Hosono A y Surono S; (2011)*, Fermented Milks: Starter Cultures; Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Editor en jefe: John W. Fuquay, Editores: Patrick F. Fox, Paul L. H. McSweeney, San Diego, California, 477–482.
15. *Hosono A y Surono S; (2011)*, Fermented Milks: Starter Cultures; Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), Editor en jefe: John W. Fuquay, Editores: Patrick F. Fox, Paul L. H. McSweeney, San Diego, California, 478.
16. *Kirmaci HA y Özer B; (2014)*, Fermented Milks: Products of Eastern Europe and Asia; Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition); Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, San Diego, California, 900–907.
17. *Koutinas A.A.; (2017)*, Fermented Dairy Products; Current Developments in Biotechnology and Bioengineering; 3–24.
18. *Kumar H y Salminen S; (2016)*, Probiotics; Encyclopedia Food and Health; Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, Waltham, Massachusetts, 512.
19. *Litopoulou-Tzanetaki E y Tzanetakis N, (2014)*, Fermented Milks: Range of Products; Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, San Diego, California, 884–894.
20. *Litopoulou-Tzanetaki E y Tzanetakis N, (2014)*, Fermented Milks: Range of Products; Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, San Diego, California, 884–886.
21. *Litopoulou-Tzanetaki E y Tzanetakis N; (2014)*, Fermented Milks: Range of Products, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, San Diego, California, 884–894.
22. *Malo PM y Urquhart EA, (2016)*, Fermented Foods: Use of Starter Cultures, Encyclopedia Food and Health, Editores: Benjamin Caballero, Paul M. Finglas y Fidel Toldra, Waltham, Massachusetts, 681–685.
23. *McSweeney P.L.H.; (2004)*, Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview; Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology; Editores: Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee, London, 1; 348.
24. *Mozzi F; (2016)* Lactic Acid Bacteria; Encyclopedia Food and health; Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, Waltham, Massachusetts, 502.

- 25.** *Mullan WMA*, (2014), Starter Cultures: Importance of Selected Genera, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, 515–521.
- 26.** *Mullan WMA*; (2014), Starter Cultures: Importance of Selected Genera, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, London,521.
- 27.** *Narvhus JA*; (2014), Fermented Milks: Northern European Fermented Milks; Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition); Editor en jefe: Richard Robinson, Editores: Carl Batt Carl A. Batt, London, 895–899.
- 28.** *Sang, Y., Seib, P. A., Herrera, A. I., Prakash, O., y Shi, Y.* (2010). Effects of alkaline treatment on the structure of phosphorylated wheat starch and its digestibility. *Food Chemistry*, 118, 323–327.
- 29.** *Singh, J., Kaur, L., y Mc Carthy, O. J.* (2007). Factors influencing the physicochemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications - A review. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 1–22.



Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics

Bilal Ahmad Ashwar ^a, Asir Gani ^b, Adil Gani ^{a,*}, Asima Shah ^a, Farooq Ahmad Masoodi ^a

^a Department of Food Science and Technology, University of Kashmir, Srinagar 190006, India

^b Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2016

Received in revised form 3 May 2017

Accepted 20 June 2017

Available online 21 June 2017

Keywords:

Probiotics

RS4

Microencapsulation

Emulsification

Targeted delivery

ABSTRACT

The research reported in this article is based on the hypothesis that crosslinking of starch can make it a potential wall material for targeted delivery of probiotics by altering its digestion. Three probiotic strains namely *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum* were microencapsulated with resistant starch. Encapsulation yield (%) of resistant starch microspheres was in the range of 43.01–48.46. The average diameter of resistant starch microparticles was in the range of 45.53–49.29 µm. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of microcapsules showed peaks in the region of 900–1300 cm⁻¹ and 2918–2925 cm⁻¹ which corresponds to the presence of bacteria. Differential Scanning Calorimeter (DSC) showed better thermal stability of resistant starch microcapsules. Microencapsulated probiotics survived well in simulated gastrointestinal conditions and adverse heat conditions. The viability of the microencapsulated lactobacilli also remained high (>7 log cfu g⁻¹) for 2 months at 4 °C. The results revealed that resistant starch is the potential new delivery carrier for oral administration of probiotics.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Probiotics are defined as live microorganisms, which confer a health benefit on the host when administered in adequate amounts (FAO/WHO, 2001; Homayouni, 2009). They can provide beneficial effects on the human body by keeping the healthy gut microbiota, inhibiting the growth of pathogenic bacteria, relieving constipation, stimulating the immune system, synthesizing vitamins and antimicrobial agents, and improving the absorption of calcium (Rokka & Rantamaki, 2010; Homayouni Rad, Torab, Ghalibaf, Norouzi, & Mehrabany, 2013). However, in order for probiotics to exert these beneficial effects, their high viability should be preserved in the gut after their passing through the upper gastrointestinal tract. The acidic conditions of the stomach and the bile salts secreted into the duodenum are the main obstacles for the survival of the ingested bacteria (DeCastro-Cislaghi, Silva, Fritzen-Freire, Lorenz, & Anna, 2012; Sultana et al., 2000). Recently microencapsulation has also been found to be a useful technique for stabilization of probiotics in functional food applications (Sathyabama, Kumar, Devi, Vijayabharathi, & Priyadharisini, 2014). Several encapsulation technologies, such as emulsion, extrusion, spray drying and coacervation have been reported (Heidebach, Forst, & Kulozik, 2012). However considering the cost, simplicity and gentle formulation conditions for retention of cell viability, emulsification technique is widely used (Homayouni, Azizi, Ehsani, Yarmand, & Razavi, 2008; Homayouni, Ehsani, Azizi, Yarmand, & Razavi, 2007). Emulsion technology has a potential for large-scale production of the microspheres in shorter time (Takei, Yoshida, Hatake, Shiomori, & Kiyoyama, 2009), which is essential for commercial application. For emulsification technology, polysaccharide aqueous solution is dispersed in oil phase to form W/O emulsion, and CaCl₂ solution is then added with continuous stirring for emulsification and encapsulation of probiotics (Mokarram, Mortazavi, Najafi, & Shahidi, 2009).

processing and storage of food is also essential (Homayouni, Azizi, Javadi, Mahdipour, & Ejtahed, 2012).

Microencapsulation is a promising technique for bacterial cell protection and several studies have investigated the protective role of this technique against adverse conditions to which probiotics can be exposed (De Castro-Cislaghi, Silva, Fritzen-Freire, Lorenz, & Anna, 2012; Sultana et al., 2000). Recently microencapsulation has also been found to be a useful technique for stabilization of probiotics in functional food applications (Sathyabama, Kumar, Devi, Vijayabharathi, & Priyadharisini, 2014). Several encapsulation technologies, such as emulsion, extrusion, spray drying and coacervation have been reported (Heidebach, Forst, & Kulozik, 2012). However considering the cost, simplicity and gentle formulation conditions for retention of cell viability, emulsification technique is widely used (Homayouni, Azizi, Ehsani, Yarmand, & Razavi, 2008; Homayouni, Ehsani, Azizi, Yarmand, & Razavi, 2007). Emulsion technology has a potential for large-scale production of the microspheres in shorter time (Takei, Yoshida, Hatake, Shiomori, & Kiyoyama, 2009), which is essential for commercial application. For emulsification technology, polysaccharide aqueous solution is dispersed in oil phase to form W/O emulsion, and CaCl₂ solution is then added with continuous stirring for emulsification and encapsulation of probiotics (Mokarram, Mortazavi, Najafi, & Shahidi, 2009).

* Corresponding author.

E-mail address: adil.gani@gmail.com (A. Gani).

The most common wall materials used for encapsulation are food grade biopolymers, such as alginate, cyclodextrin, chitosan, xanthan gum, whey proteins, gelatin and starch (Homayouni et al., 2014; Wani et al., 2016). Starch has often been used in combination with alginate as an encapsulant for probiotics (Mirzaei, Pourjafar, & Homayouni, 2012; Sultana et al., 2000). A majority of these reports used high-amylose starch to take advantage of its prebiotic properties, besides its non-specific encapsulant capability.

Resistant starch (RS) is that portion of starch, which escapes digestion in the small intestine and thus may be fermented in the colon (Ashwar, Gani, Shah, Wani, & Masoodi, 2015). The ability of resistant starch to escape digestion in the small intestine reflects its potential as a wall material for targeted delivery of probiotics into the colon (Ashwar et al., 2015). Because of these health benefits of resistant starch, different techniques have been employed for its preparation. These include hydrothermal treatments, annealing, partial gelatinization and recrystallization, autoclaving, pullulanase debranching, temperature-cycled retrogradation, phosphorylation, hydroxypropylation, acetylation, oxidation, and citric acid modification (Ashwar, Gani, Shah, & Masoodi, 2017; Ashwar et al., 2016). Sang, Seib, Herrera, Prakash, and Shi (2010) reported production of resistant starch (RS4) by the phosphorylation of starch. Chuang, Panyoyai, Katopo, Shanks, and Kasapis (2016) reported that the interactions of calcium ions with the phosphate and hydroxyl groups of starch produce dense structures. The dense structures can be used as an encapsulating material for targeted delivery of probiotics.

To our knowledge no data on characterization of resistant starch type 4 (RS4) as an encapsulating agent and prebiotic for targeted delivery of probiotics has been published. This work was therefore intended to develop RS4, which was then used to encapsulate three probiotic bacterial cultures namely *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus brevis*. The microstructure and thermal stability of microcapsules, survival of encapsulated probiotics in simulated gastrointestinal conditions and their viability during storage were also investigated with the objective of producing enough viable probiotic bacteria for potential application in biotechnological or food industries.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The probiotic cultures viz. *Lactobacillus brevis* (MTCC 01), *Lactobacillus casei* (MTCC 297) and *Lactobacillus plantarum* (MTCC 021) were procured from National Dairy Research Institute, Karnal, India (NDRI). These probiotic cultures were activated in sterile MRS broth (HiMedia Laboratories Pvt Ltd, Mumbai, India) and incubated at 37 °C for 24 h. Afterwards, the cells were harvested as per the method of Rajam, Karthik, Parthasarathi, Joseph, and Anandharamakrishnan (2012). All the chemical reagents used in the present study were of analytical grade.

2.2. Extraction of starch

Rice starch was extracted according to the alkali steeping method described by Ashwar et al. (2016). The extracted starch was analyzed for moisture (925.10), protein (920.87), fat (920.85) and ash (923.03) according to the methods of AOAC (1990).

2.3. Preparation of cross-linked phosphorylated rice starch

Phosphorylated rice starch was prepared according to the method described by Woo and Seib (2002).

2.4. Resistant starch content

Resistant starch content was determined using the Megazyme Assay Kit (Megazyme International, Wicklow, Ireland), following the approved AACC method 32-40 (AACC, 2000). Briefly 100 mg sample and 4 mL of enzyme mixture (pancreatic α -amylase and amyloglucosidase) were added to each test tube, mixture vortexed and then incubated in a shaking water bath for 16 h at 37 °C (200 strokes/min) to hydrolyze digestible starch. At the end of the incubation period suspension was mixed with 4 mL absolute ethanol and vortexed to deactivate the enzymes and RS was recovered as a pellet by centrifugation (1500g, 10 min). Pellet was washed with 50% ethanol twice to remove the digested starch. The sediment was dissolved in 2 mL of 2 M KOH by vigorously stirring for 20 min in an ice bath. This solution was neutralized with 8 mL sodium acetate buffer (1.2 M). Solution was mixed with amyloglucosidase (0.1 mL, 3300 U/mL) and then incubated in a water bath at 50 °C for 30 min, then the samples were centrifuged at 3000g for 10 min. Three mL of glucose-oxidase-peroxidase-aminoantipyrine (GPOD) was added to aliquots (0.1 mL) of the supernatant, and the mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Absorbance was measured using a spectrophotometer at 510 nm. Resistant starch was calculated as the amount of glucose \times 0.9. Each sample was analyzed in triplicate.

2.5. Encapsulation

A slightly modified method of Sultana et al. (2000) was used. The slurry was prepared by mixing 2 g/100 mL of resistant starch and 1 mL of the three cultures separately. The mixture was dropped into oil in the ratio of 1:1. To this mixture 0.02 mL/100 mL of Tween 80 was added. After that the mixture was homogenized at 1500 rpm for 10 min till it was emulsified and appeared creamy. Then the mixture was dropped into 0.1 mol/L calcium chloride solution. The beads were left for 30 min, separated by centrifugation and washed with 0.9 g/100 mL saline containing 5 mL/100 mL glycerol, freeze dried and stored at 4 °C.

2.6. Confirmational study by using ATR-FTIR

Spectra of the samples were recorded using FTIR spectrometer system (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies, USA), coupled to an ATR accessory. Analysis was carried out at room temperature, and spectra were acquired in the range of 400–4000 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} , using Resolution Pro software version 2.5.5 (Agilent Technologies, USA).

2.7. Thermal analysis

The thermal characteristics of RS4 microcapsules like melting temperature and enthalpy of melting were studied with a Differential Scanning Calorimeter (DSC-1STAR^e System, Mettler-Toledo). The 3.5 mg sample was weighed into platinum pan and distilled water (8.0 μL) was added. The pan was kept at room temperature for one hour before analysis. The samples were heated at 10 °C/min from 20 to 200 °C. An empty platinum pan was used as a reference.

2.8. Morphological characterization of the microcapsules

Morphology of the microcapsules was investigated using a scanning electron microscope (SEM) (Hitachi S-300H-Tokyo, Japan). The freeze-dried microcapsules were placed on an adhesive tape attached to a circular aluminum specimen stub. After coating vertically with gold-palladium, the samples were photographed at an accelerator potential of 5 kV.

2.9. Evaluation of size distribution of the microcapsules

Size distribution of the microcapsules was measured by Laser diffraction particle size analyzer (Shimadzu SALD-2300) using water as the measurement solvent. The results were expressed as volume weighted mean diameter. The particle size distribution was represented by span factor (Elversson, Millqvist-Fureby, Alderborn, & Elofsson, 2003), which is defined as

$$\text{Span} = d_{(v,90)} - d_{(v,10)}/d_{(v,50)}$$

Where $d_{(v,10)}$, $d_{(v,50)}$, $d_{(v,90)}$ corresponds to the diameters at which the cumulative sample volumes were under 10%, 50% and 90% respectively.

2.10. Water activity

Water activity was measured using Pre water activity analyser (Aqua lab, Decagon Devices, INC, USA) after the samples were stabilized at 25 °C for 30 min.

2.11. Encapsulation yield and storage stability

To determine the encapsulation yield, One gram of microencapsulated probiotics was re-suspended in sterile phosphate buffer (9 mL, 0.1 mol/L, pH 7.0). Afterwards it was homogenized for 15 min at 250 rpm by using a homogenizer (Witeg Labortechnik GmbH). The colony forming units (cfu g^{-1}) of cultures were determined by plating them on MRS agar plates and incubating for 48 h at 37 °C. Encapsulation yield (EY) (%) was calculated by using the equation of Picot and Lacroix (2004)

$$\text{EY} = N/\text{No} \times 100$$

Where N is the log cell number (cfu) of viable entrapped cells released from the microspheres, and No is the log cell number (cfu) of free cells added to the biopolymer mix during the production of microspheres.

For the determination of storage stability of the encapsulated probiotics at 4 °C, the log cell count (cfu) was calculated for a period of 2 months after every 15 days of interval.

2.12. Survival in simulated gastric juice (SGJ)

For the preparation of simulated gastric juice 3 g/L pepsin was suspended in sterile saline (9 g/L) and the pH was adjusted to 3.0 with 1.0 mol/L HCl (Shah, Gani, Ahmad, Ashwar, & Masoodi, 2016). Then 0.2 g of encapsulated probiotic cells (4 °C stored) and free cells were resuspended in simulated gastric juice (10 mL) and incubated for 5, 30, 60, and 120 min at 37 °C with continuous agitation at 50 rpm. The viable count of encapsulated as well as free cells in SGJ was determined as $\log \text{cfu g}^{-1}$.

2.13. Survival in simulated intestinal juice (SIJ)

Simulated intestinal fluid was prepared by mixing 1 mg/mL pancreatin (Sigma aldrich) and 7 mL (v/v) fresh chicken bile and the pH was adjusted to 8.0 with 0.1 M NaOH (Shah, Gani, Ahmad, et al., 2016). Then 0.2 g of encapsulated probiotic cells and free cells were harvested and resuspended in simulated intestinal fluid. After incubation for 6 h at 37 °C, the viable count was determined as $\log \text{cfu g}^{-1}$.

2.14. Survival of microencapsulated cells under heat treatments

The microencapsulated and free probiotic cells were subjected to heat treatments as suggested by Shah, Gani, Ahmad,

et al. (2016), Shah, Gani, Ashwar, et al. (2016). One gram of microencapsulated and free probiotic cells were transferred into test tubes containing 10 mL of sterile distilled water and subjected to heat treatments at 55 °C, 65 °C and 75 °C for 1 min and 10 min.

2.15. Statistical analyses

The data reported are averages of triplicate observations. An analysis of variance with a significance level of 5% was done and Duncan's test applied to determine differences between means using the commercial statistical package (IBM SPSS statistics 21. Ink).

3. Results and discussion

3.1. Compositional analysis of rice starch

Analysis of starch revealed moisture, protein, ash and fat were 8.01 ± 0.58 , 0.48 ± 0.03 , 0.66 ± 0.04 and $0.28 \pm 0.05\%$, respectively. The low protein, fat and ash contents indicate that the starch was extremely pure and free from residual protein.

3.2. Resistant starch content

Resistant starch content of native rice starch was $4.42 \pm 0.81\%$ and it increased significantly to $45.35 \pm 1.40\%$ by the phosphorylation process. Evidently this 10-fold increase in the resistant starch content might be due to the crosslinking of starch by the mixture of STMP/STPP. Previous studies have also reported significant improvement in resistant starch content by the phosphorylation of starch (Sang et al., 2010). Different reasons have been reported for the improvement of RS by phosphorylation. Huber and BeMiller (2000) claimed that increased RS content of phosphorylated or crosslinked starches could be caused by prevention of amylase enzyme from entering the inside of starch granules via channels and pores. Conway and Hood (1976) reported that reduced swelling power of crosslinked starch, and /or the obstruction of the formation of starch-amylase complex due to steric hindrance of phosphate groups on the starch chain or lack of chain flexibility in the crosslinked starch might be responsible for the increased RS content.

3.3. Confirmational study by using ATR-FTIR

The variation in helical structure, chain conformation and the crystal form of starch alters its absorption of infrared energy (Wu & Seib, 1990). Hence, the ATR-FTIR technique was used to further explore the structural organization of RS4 microcapsules. The FTIR spectra of the native rice starch and RS4 microcapsules of probiotics are shown in Fig. 1. The presence of O-H is confirmed by the presence of stretching vibration at 3290 cm^{-1} . The IR band at 1248 cm^{-1} is due to the bending vibrations of O-H. The absorption bands in the region of $1365\text{--}1413 \text{ cm}^{-1}$ corresponds to the C-H bending vibrations. The absorption band at 2926 cm^{-1} is contributed by C-H stretching vibration. The absorption peak at 1160 cm^{-1} is due to C-O bending vibration (Ashwar et al., 2016; Shah, Gani, Ashwar, et al., 2016). The peak at 1645 cm^{-1} is due to the bound water present in the starch. It is clear from Fig. 1 that there is no distinct difference among the vibration bands of O-H, C-H, and C-O in native starch and RS4 microcapsules. This might be due to the fact that the basic chemical structures of native starch and RS4 microcapsules are similar which is reflected in their similar absorption peaks. Intensity of OH stretching band in the native starch, decreased after reaction with STMP/STPP. A new

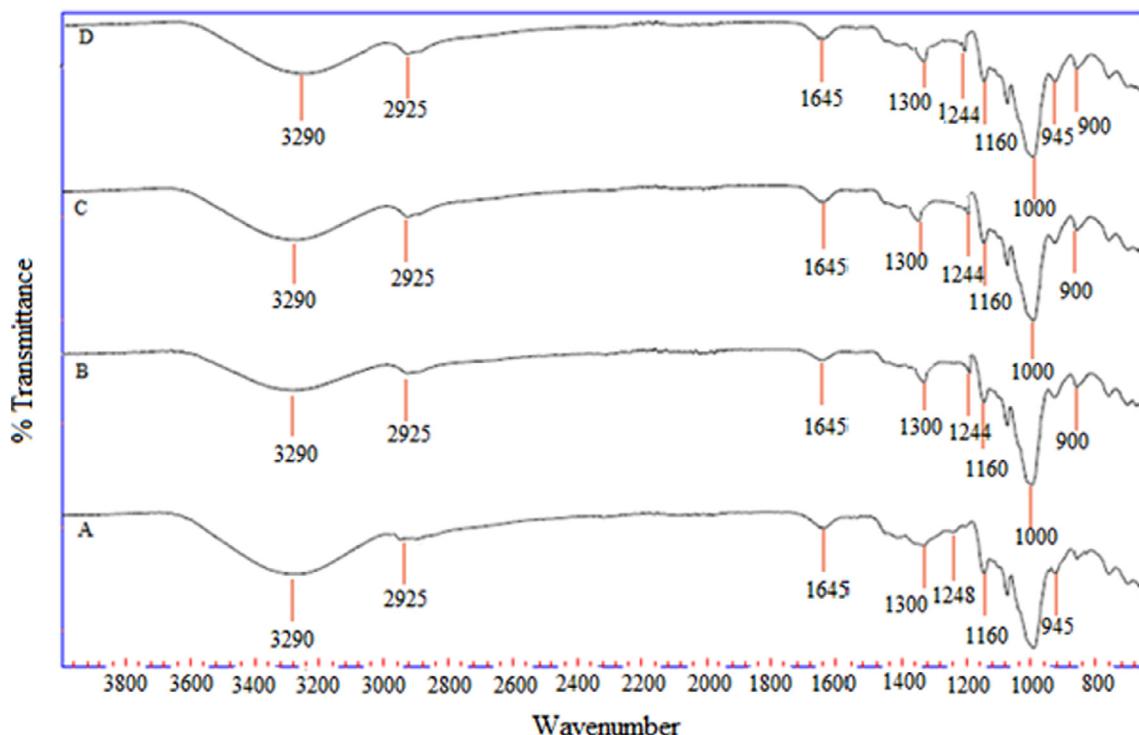


Fig. 1. The FTIR spectra of (A) native rice starch, (B) RS4 microcapsules of *L. brevis*, (C) RS4 microcapsules of *L. plantarum*, and (D) RS4 microcapsules of *L. casei*.

peak at 1244 cm^{-1} appeared in RS4 microcapsules which is characteristic of $\text{P}=\text{O}$ bonds in crosslinked starch. Reaction of starch with STMP/STPP takes place at $-\text{OH}$ groups (Shalviri, Liu, Abdekhodaie, & Wu, 2010). Hence the reduction of $-\text{OH}$ stretching band at 3290 cm^{-1} and the appearance of $\text{P}=\text{O}$ at 1244 cm^{-1} confirms that starch have reacted with STMP/STPP. The increased peak intensity at 945 cm^{-1} and 1155 cm^{-1} in RS4 microcapsules shows the effect of calcium chloride, and its interactions with starch molecules (Chuang et al., 2016). The peaks between 900 and 1300 cm^{-1} in RS4 microcapsules corresponds to nucleic acids and proteins of bacterial cells (Vodnar, Socaciu, Rotar, & Stanila, 2010). Also a peak at 2925 cm^{-1} corresponds to small amount of lipids in the starch (Schmitt & Flemming, 1998). The peak at 2925 cm^{-1} of the RS4 probiotic microcapsules had a greater intensity than that of native starch. The increased peak intensity of RS4 microcapsules might be due to asymmetric stretching of methylene and methyl groups of bacterial cell lipid membranes (Schmitt & Flemming, 1998).

3.4. Thermal properties

Fig. 2 shows the thermograms of native rice starch and RS4 microcapsules of probiotics. RS4 microcapsules presented significant ($p \leq 0.05$) increase in the transition temperatures and gelatinization enthalpy as compared to native rice starch. These are the melting temperatures at which the melting of micro-crystallites of these starches takes place. Increase in peak melting point of the RS4 microcapsules indicates that the application of STMP/STPP as a crosslinker can improve the integrality and stability of starch. Also increase in melting enthalpy (ΔH) of RS4 microcapsules was observed. Gao, Li, Bi, Mao, and Adhikari (2014) claimed that crosslinking of starch increases its molecular mass and improves the strength of chemical bonds engaged in intermolecular crosslinking. These factors make the starch granules stronger and hence favor the increase in enthalpy of melting.

Previous studies also reported increase in melting temperature and enthalpy of starch by crosslinking with STMP and STPP (Singh, Kaur, & Mc Carthy, 2007). These observations indicate that RS4 microcapsules possess better thermal stability compared to the native rice starch.

3.5. Morphology and size distribution of the microcapsules

As shown in Fig. 3, SEM images of freeze dried microparticles showed different types of beads, however spherical shape was more abundant. The microcapsules also showed some pores. In freeze-drying, the microcapsules are first subjected to low temperature, which results in the formation of ice crystals from the residual water present. Sublimation of ice crystals under vacuum results in the formation of porous dried microcapsules (Rathore, Desai, Liew, Chan, and Heng (2013)). Existence of these pores in the microparticles shows the ability to absorb other particles, such as probiotics. Table 1 shows the volume mean diameters and span factors of microcapsules. The average volume mean diameters (μm) of *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum* microcapsules were 45.53 ± 0.42 , 49.29 ± 1.00 and 47.12 ± 0.98 , respectively. Our results are in agreement with those of Matos, Timgren, Sjö, Dejmek, and Rayner (2013), who reported that emulsion stabilized starch particles were in the range $23\text{--}43\text{ }\mu\text{m}$. Mirzaei et al. (2012) reported that mean diameter of alginate-resistant starch beads produced by extrusion was in the range of $50\text{--}80\text{ }\mu\text{m}$. Slight differences in particle size are mainly due to differences in the techniques used for microencapsulation like emulsification speed. Heidebach et al. (2012) claimed that microcapsules containing probiotics must be smaller than $100\text{ }\mu\text{m}$ to avoid gritty sensation when consumed. The span factors of RS4 microparticles of *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum* were 1.30 ± 0.09 , 0.97 ± 0.08 and 1.25 ± 0.12 , respectively. The low span factors of microcapsules shows narrow range of particle size distribution and more homogeneity in size.

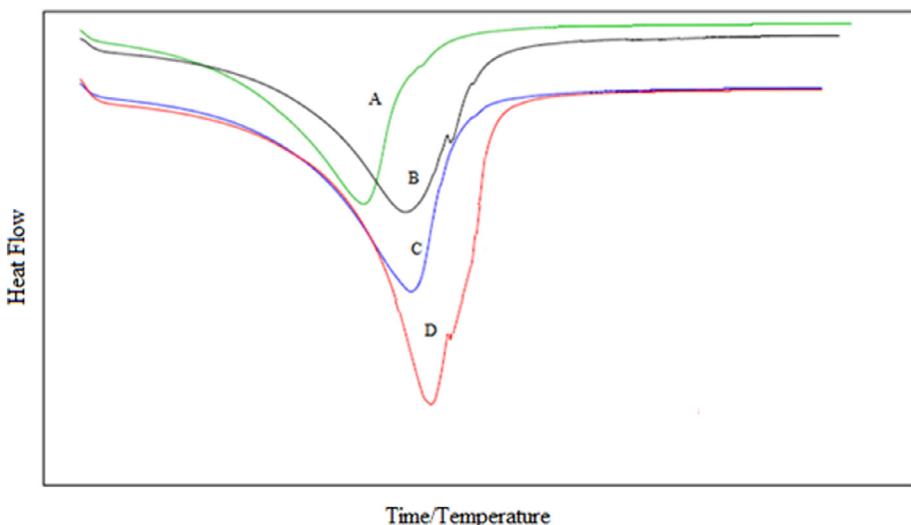


Fig. 2. Thermograms of (A) native rice starch, (B) RS4 microcapsules of *L. casei* (C) RS4 microcapsules of *L. brevis*, and (D) RS4 microcapsules of *L. plantarum*.

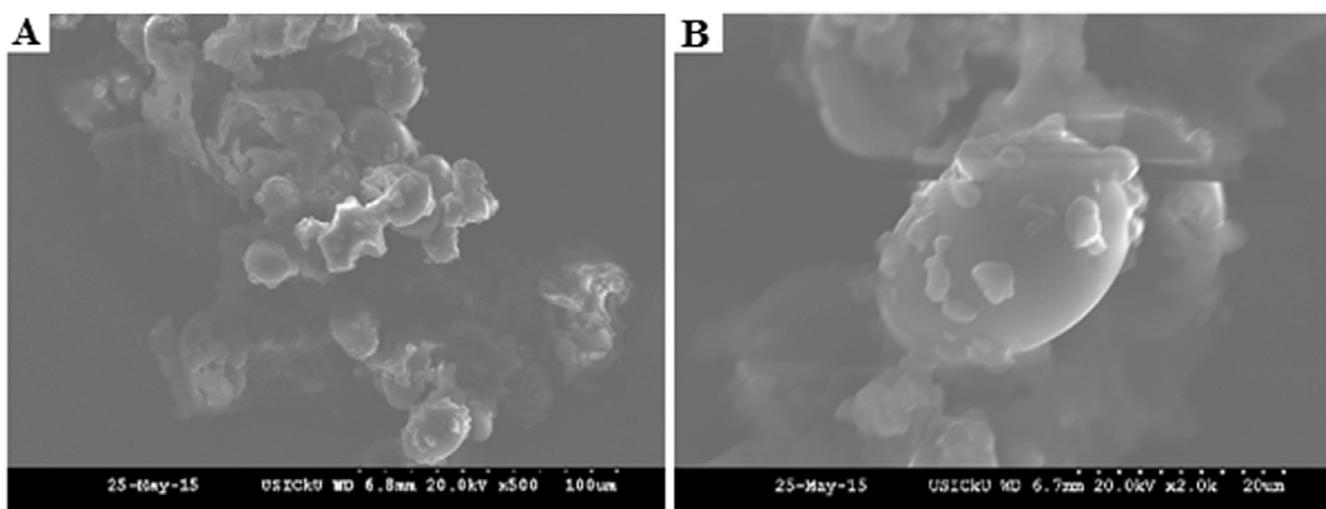


Fig. 3. SEM images of microcapsules of Lactobacilli (A) 500 \times and (B) 2000 \times .

Table 1
Encapsulation yield, water activity and particle size analysis of microcapsules.

Parameter	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>
Encapsulation yield (%)	48.46 ± 0.98 ^b	43.01 ± 0.99 ^a	43.85 ± 1.37 ^a
Water activity	0.42 ± 0.04 ^a	0.35 ± 0.03 ^a	0.34 ± 0.03 ^a
<i>Particles size analysis</i>			
Average volume mean diameter (μm)	45.53 ± 0.42 ^a	49.29 ± 1.00 ^c	47.12 ± 0.98 ^b
Span	1.30 ± 0.09 ^c	0.97 ± 0.08 ^a	1.25 ± 0.12 ^b

Values expressed are mean ± standard deviation (n = 3).

Means in the row within a particular parameter with different superscripts are significantly different at p ≤ 0.05.

3.6. Water activity

The water activity of the freeze dried microcapsules is in the range of 0.34–0.42 (Table 1) and is within the recommended limit (<0.6) to ensure microbiological stability (Favaro-Trindade, Santana, Monterrey-Quintero, Trindade, & Netto, 2010). The moisture content in probiotic powders is a crucial factor that had a great impact on the viability of probiotic cells during storage (Chan et al.,

2011). This low water activity is very important for the stability of the probiotic powders, since less free water is available for biochemical reactions, and thereby enhancing shelf life (Tonon, Brabet, Pallet, Brat, & Hubinger, 2009). Li, Chenb, Suna, Parkc, and Chac (2011) also claimed that microorganisms survive best with low water activity. The water activity of the RS4 microcapsules of Lactobacilli is suitable for long term storage.

3.7. Encapsulation yield and storage stability

Encapsulation yields (%) of resistant starch microspheres containing *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum* were found to be 48.46 ± 0.98, 43.01 ± 0.99 and 43.85 ± 1.37, respectively.

The freeze-dried capsules and free Lactobacillus cells were stored at 4 °C which simulated the common storage conditions (fridge) in real life. Viability of free Lactobacilli and microencapsulated Lactobacilli were tested every 15 days for the total period of 2 months (Table 2). Results showed that microencapsulated probiotic cells had significantly lowest loss of viability compared with free cells. The viabilities of free *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum* were reduced from 9.48 ± 1.25, 9.47 ± 1.08 and 8.84 ± 1.18 log

Table 2

Survival rate of free and encapsulated cells during 60 days storage and in simulated gastrointestinal conditions.

Parameter	Free cells			Microencapsulated		
	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>Storage stability (log cfu/g)</i>						
1st day	9.48 ± 1.25 b ^p	9.47 ± 1.08 b ^p	8.84 ± 1.18 b ^p	8.57 ± 1.30 ^{aP}	8.68 ± 1.18 ^{aP}	7.96 ± 1.54 ^{aP}
15th day	6.18 ± 1.20 ^{aP}	5.68 ± 1.59 ^{aP}	6.37 ± 0.92 ^{aP}	8.37 ± 0.79 ^{aP}	8.63 ± 1.15 ^{aP}	7.66 ± 1.90 ^{aP}
30th day	5.11 ± 2.02 ^{aP}	4.42 ± 2.20 ^{aP}	3.55 ± 1.67 ^{aP}	8.24 ± 1.15 ^{aQ}	8.56 ± 0.73 ^{aQ}	8.20 ± 1.88 ^{aQ}
60th day	3.75 ± 1.35 ^{aP}	2.89 ± 1.36 ^{aP}	3.59 ± 1.30 ^{aP}	8.27 ± 1.30 ^{aQ}	8.46 ± 0.71 ^{aQ}	7.65 ± 0.78 ^{aQ}
<i>SGJ (log cfu/g)</i>						
5 min incubation	5.77 ± 0.85 ^{cP}	5.26 ± 0.95 ^{cP}	4.51 ± 0.84 ^{cP}	8.22 ± 0.83 ^{aQ}	8.21 ± 0.81 ^{aQ}	8.42 ± 1.17 ^{aQ}
30 min incubation	3.64 ± 1.68 b ^P	2.86 ± 0.73 b ^P	2.84 ± 0.58 b ^P	7.29 ± 0.84 ^{aQ}	7.43 ± 1.04 ^{aQ}	7.88 ± 0.96 ^{aQ}
60 min incubation	1.80 ± 0.48 ^{aP}	1.69 ± 0.59 ^{aP}	1.53 ± 0.47 ^{aP}	6.93 ± 0.91 ^{aQ}	7.43 ± 0.81 ^{aQ}	7.34 ± 0.98 ^{aQ}
120 min incubation	0.92 ± 0.34 ^{aP}	0.73 ± 0.31 ^{aP}	0.58 ± 0.22 ^{aP}	6.93 ± 0.92 ^{aQ}	7.34 ± 0.54 ^{aQ}	7.53 ± 0.99 ^{aQ}
<i>SIJ (log cfu/g)</i>	3.67 ± 0.75 ^a	3.08 ± 0.78 ^a	3.43 ± 1.04 ^a	8.42 ± 0.58 ^b	8.61 ± 1.07 ^b	7.29 ± 0.25 ^b

Values expressed are mean ± standard deviation (n = 3).

Means in the column and row within a particular parameter with different superscripts are significantly different at p ≤ 0.05.

cfu g⁻¹ to 3.75 ± 1.35, 2.89 ± 1.36 and 3.59 ± 1.30 log cfu g⁻¹, respectively after 2 months storage. Whereas the viabilities of microencapsulated *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum* remained high and constant for 2 months (8.27 ± 1.30, 8.46 ± 0.71 and 7.65 ± 0.78 log cfu g⁻¹, respectively). Resistant starch is a potential prebiotic. Encapsulating probiotics in such a wall material could prove beneficial by promoting the growth of probiotics. Similar results were obtained by Mirzaei et al. (2012), who microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* in calcium alginate gel and resistant starch. In another study by Sultana et al. (2000), encapsulation of probiotics by emulsification with Himaize starch -alginate increased the storage stability of encapsulated bacteria.

3.6. Survival of free and encapsulated probiotics in SGJ

To determinate the likelihood of microencapsulated and free probiotic bacteria surviving passage through the stomach following oral administration, microencapsulated and free probiotic bacteria were tested for stability in simulated gastric fluid (Table 2). Significant differences were found in the survival rates of encapsulated cells compared to free cells. After 5 min incubation in SGJ, the total viable counts of 8.22 ± 0.83 log cfu g⁻¹, 8.21 ± 0.81 log cfu g⁻¹ and 8.42 ± 1.17 log cfu g⁻¹ were observed in microencapsulated *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum*, respectively, and during further incubation for 2 h no significant decrease (p > 0.05) in their viable counts was noted. Free *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum* cells showed 5.77 ± 0.85 log cfu g⁻¹, 5.26 ± 0.95 log cfu g⁻¹ and 4.51 ± 0.84 log cfu g⁻¹, respectively after 5 min incubation and these were further reduced during 2 h incubation. The entrapment of Lactobacilli in RS4 by encapsulation provided a physical barrier against environmental stresses, thereby reduced the unavoidable loss of viability of these lactobacilli during gastric digestion. Previous studies have also shown that microencapsulated probiotics were better able to maintain viability in gastro-intestinal conditions (Mokarram et al., 2009). De Castro-Cislaghi et al. (2012) studied survival of free and encapsulated *Bifidobacterium* at the pH of 3.0 and 2.0. They reported that there was no significant difference between the decrease in the counts of encapsulated and free cells at pH 3.0. However, at pH 2.0 there was a greater decrease in the viability of the free *Bifidobacterium* (1.51 log cfu g⁻¹) in comparison to the microencapsulated cells (0.73 log cfu g⁻¹). Ying et al. (2013) reported that whey protein isolate in combination with resistant starch provided protection to *Lactobacillus rhamnosus* in apple juice or citrate buffer. They suggested that the protection afforded is due to the ability of whey protein isolate to create a buffered microenvironment within the hydrated colloid particle surrounding the bacteria, thus isolating the probiotic cells from the stresses of the external low pH environment.

3.7. Survival of free and encapsulated probiotics in SIJ

Table 2 shows the survival of free and microencapsulated Lactobacilli by emulsion with resistant starch in simulated intestinal fluid. After 6 h incubation in SIJ, the total viable counts of 8.42 ± 0.58 log cfu g⁻¹, 8.61 ± 1.07 log cfu g⁻¹ and 7.29 ± 0.25 log cfu g⁻¹ were observed in microencapsulated *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum*, respectively. This was significantly higher (P < 0.05) than that of the free cells which were 3.67 ± 0.75 log cfu g⁻¹, 3.08 ± 0.78 cfu g⁻¹ and 3.43 ± 1.04 cfu g⁻¹ respectively. Similar results were reported by Li et al. (2011), who found decreases from 0.77 to 2 log in 0.5% bile and from 1.27 to 3 log in 1% bile after 6 h of incubation of microencapsulated *L. casei*. Previous studies reported that the survival of microencapsulated probiotics in bile is highly dependent on the concentration of the encapsulating agent and on the species that is being microencapsulated (Sohail, Turner, Coombes, Bostrom, & Bhandari, 2011). Valero-Cases and Frutos (2015) claimed that total viable counts of *L. plantarum* microencapsulated by emulsion technique remained above 10⁶ cfu g⁻¹ after being subjected to gastro-intestinal digestion even after the storage period of 30 days. However Sultana et al. (2000) reported that microencapsulation of probiotics in alginate and starch did not improve their survival in bile. In future further research is needed to confirm the resistance of encapsulated probiotics to gastrointestinal digestion.

3.8. Survival of free and microencapsulated probiotics under heat treatments

The survival of free and microencapsulated Lactobacilli exposed to temperatures of 55, 65, and 75 °C are shown in Table 3. Significant differences between the reduction in the counts of the free and of the microencapsulated cells (P < 0.05) were observed. The free cells of all the three strains of Lactobacilli were sensitive to heat treatments. Viable counts of *L. casei* decreased from 9.48 ± 1.04 log cycles to 3.55 ± 0.75 log at 55 °C, 2.03 ± 0.36 log at 65 °C and 1.05 ± 0.54 at 75 °C, after 10 min. Similarly total numbers of *L. brevis* and *L. plantarum* decreased from 9.45 ± 1.43 and 8.86 ± 0.99 to 3.39 ± 0.59 and 3.25 ± 0.71 log at 55 °C, 2.67 ± 0.30 and 2.30 ± 0.39 log at 65 °C, and 1.41 ± 0.47 and 1.85 ± 0.91 at 75 °C, respectively after 10 min. The microcapsules of *L. casei*, *L. brevis* and *L. plantarum* survived well at 55 °C for 10 min, with an average loss of only 0.12, 0.18 and 0.30 log cfu g⁻¹ respectively. At 65 °C for 10 min their average losses were 5.04, 4.35 and 4.59 log cfu g⁻¹ respectively. The high survival rate of the encapsulated Lactobacilli can be attributed to the protection offered by RS4 which provided a barrier between the Lactobacilli and the external environment. However, at 75 °C, all microcapsules showed a

Table 3

Survival rate of free and encapsulated cells during adverse heat conditions.

Temperature (°C)	Time (min)	Viability (log cfu g ⁻¹)			Microencapsulated cells		
		Free cells			Microencapsulated cells		
		<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>
55 °C	0 min	9.48 ± 1.04 e ^q	9.45 ± 1.43 e ^q	8.86 ± 0.99 ^{d,p,q}	8.60 ± 1.00 ^{c,p,q}	8.41 ± 0.87 ^{c,p,q}	7.91 ± 1.21 ^{c,p}
	1 min	4.16 ± 0.55 ^{d,p}	4.74 ± 0.85 ^{d,p}	4.30 ± 0.67 ^{c,p}	8.57 ± 1.12 ^{c,q}	8.30 ± 1.87 ^{c,q}	7.62 ± 1.08 ^{c,q}
	10 min	3.55 ± 0.75 ^{c,d,p}	3.39 ± 0.59 ^{c,p}	3.25 ± 0.71 ^{b,c,p}	8.48 ± 1.45 ^{c,q}	8.23 ± 1.76 ^{c,q}	7.61 ± 2.27 ^{c,q}
65 °C	1 min	3.02 ± 0.86 ^{b,c,p}	3.16 ± 0.25 ^{b,c,p}	2.79 ± 0.31 ^{a,b,p}	5.90 ± 0.31 b ^q	6.17 ± 1.62 b ^q	5.65 ± 1.29 b ^{b,q}
	10 min	2.03 ± 0.36 ^{a,b,p}	2.67 ± 0.30 ^{b,c,p}	2.30 ± 0.39 ^{a,b,p}	3.56 ± 1.04 ^{a,q}	4.06 ± 1.03 ^{a,q}	3.32 ± 1.05 b ^{a,q}
75 °C	1 min	1.94 ± 0.07 ^{a,b,p}	2.30 ± 0.19 ^{a,b,p}	1.83 ± 0.27 ^{a,p}	2.99 ± 1.11 ^{a,q}	3.39 ± 1.10 ^{a,q}	3.88 ± 1.11 ^{a,q}
	10 min	1.05 ± 0.54 ^{a,p}	1.41 ± 0.47 ^{a,p}	1.85 ± 0.91 ^{a,p}	2.49 ± 0.81 ^{a,q}	2.23 ± 0.76 ^{a,q}	2.26 ± 0.79 ^{a,q}

Values expressed are mean ± standard deviation (n = 3).

Means in the column and row within a particular parameter with different superscripts are significantly different at p ≤ 0.05.

reduction in viable cell counts similar to those of free cells (P < 0.05). These results indicate that RS4 offered little protection for the Lactobacilli after this temperature/time combination. Previously, Corcoran, Stanton, Fitzgerald, and Ross (2008) reported that excessive heat unfolds the structural order of macromolecules such as nucleic acid and protein of bacterial cells, breaks the linkages between monomers, and thereby causes destruction of the monomeric units, leading to death of bacterial cells. The results of present study revealed that microencapsulation using resistant starch may enhance thermal resistance of Lactobacillus.

4. Conclusion

Lactobacilli were successfully encapsulated in RS4 microspheres prepared by emulsion method. The viable cells of encapsulated Lactobacilli in microspheres showed better survival ability than that of free cells in simulated gastrointestinal conditions, adverse heat treatments and long time storage (2 month). Encapsulation has proved to be a good method to protect of probiotics in gastrointestinal environments. RS4 show the potential as a new delivery carrier for oral administration of probiotics. These microcapsules can meet the commercialization as economically inexpensive source of wall material is used and hence can be used in functional food application.

Acknowledgement

Authors are thankful to Science and Engineering Research Board (SERB)/Ministry of Food Processing Industries (MOFPI), Government of India, for their financial support.

References

- AACC (2000). *Approved methods of the AACC international, methods 44–17, 76–13, 08–16, 32–40 and 35–05* (10th ed.). St. Paul, MN: The Association AACC.
- AOAC (1990). *Official methods of analysis*. Airlington: Association of official Analytical chemistry.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Shah, A., & Masoodi, F. A. (2017). Production of RS4 from rice by acetylation: Physico-chemical, thermal, and structural characterization. *Starch/Stärke*, 69, 1–10.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Shah, A., Wani, I. A., & Masoodi, F. A. (2015). Preparation, health benefits and applications of resistant starch—a review. *Starch/Stärke*, 67, 1–15.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Wani, I. A., Shah, A., Masoodi, F. A., & Saxena, D. C. (2016). Production of resistant starch from rice by dual autoclaving–retrogradation treatment: *In vitro* digestibility, thermal and structural characterization. *Food Hydrocolloids*, 56, 108–117.
- Chan, E. S., Wong, S. L., Lee, P. P., Lee, J. S., Ti, T. B., Zhang, Z., et al. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83, 225–232.
- Chuang, L., Panyoyai, N., Katopo, L., Shanks, R., & Kasapis, S. (2016). Calcium chloride effects on the glass transition of condensed systems of potato starch. *Food Chemistry*, 199, 791–798.
- Conway, R. L., & Hood, L. F. (1976). Pancreatic α -amylase hydrolysis product of modified and unmodified tapioca starches. *Starch/Stärke*, 28, 341–343.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. (2008). Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 1382–1399.
- De Castro-Cislagli, F. P., Silva, C. D. R. E., Fritzen-Freire, C. D., Lorenz, J. G. S., & Anna, E. S. (2012). *Bifidobacterium Bb-12* microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, 113, 186–193.
- Elversson, J., Millqvist-Fureby, A., Alderborn, G., & Elofsson, U. (2003). Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(4), 900–910.
- FAO/WHO (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. ftp://ftp.fao.org/esn/food/probioreport_en.pdf.
- Favaro-Trindade, C. S., Santana, A. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., & Netto, F. M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24, 336–340.
- Gao, F., Li, D., Bi, C., Mao, Z., & Adhikari, B. (2014). Preparation and characterization of starch crosslinked with sodium trimetaphosphate and hydrolyzed by enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 103, 310–318.
- Heidebach, T., Forst, P., & Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical Reviews in Food Science and Technology*, 52, 291–311.
- Homayouni Rad, A., Torab, R., Ghalibaf, M., Norouzi, S., & Mehrabany, E. V. (2013). Might patients with immune-related diseases benefit from probiotics. *Nutrition*, 29, 583–586.
- Homayouni, A. (2009). Letter to the editor. *Food Chemistry*, 114, 1073.
- Homayouni, A., Amini, A., Keshtiban, A. K., Mortazavian, A. M., Esazadeh, K., & Pourmoradian, S. (2014). Resistant starch in food industry: A changing outlook for consumer and producer. *Starch/Stärke*, 66, 102–114.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111, 50–55.
- Homayouni, A., Azizi, A., Javadi, M., Mahdipour, S., & Ejtahed, H. (2012). Factors influencing probiotic survival. *International Journal of Dairy Science*, 7, 1–10.
- Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2007). Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. *Iranian Polymer Journal*, 16, 597–606.
- Huber, K. C., & BeMiller, J. N. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 41, 269–276.
- Li, X. Y., Chenb, X. G., Suna, Z. H., Parkc, H. J., & Chac, D. S. (2011). Preparation of alginate/ chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1479–1485.
- Matos, M., Timgren, A., Sjoo, M., Dejmek, P., & Rayner, M. (2013). Preparation and encapsulation properties of double Pickering emulsions stabilized by quinoa starch granules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 423, 147–153.
- Mirzaei, H., Pourjafar, H., & Homayouni, A. (2012). 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*, 132, 1966–1970.
- Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Najafi, M. B., & Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, 42, 1040–1045.
- 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, 505–515.
- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., & Anandhamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein-alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4, 891–898.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116, 369–381.

- Rokka, S., & Rantamaki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231, 1–12.
- Sang, Y., Seib, P. A., Herrera, A. I., Prakash, O., & Shi, Y. (2010). Effects of alkaline treatment on the structure of phosphorylated wheat starch and its digestibility. *Food Chemistry*, 118, 323–327.
- Sathyabama, S., Kumar, M. R., Devi, P. B., Vijayabharathi, R., & Priyadharisini, V. B. (2014). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 419–425.
- Schmitt, J., & Flemming, H. C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodegradation and Biodegradation*, 41, 1–11.
- Shah, A., Gani, A., Ahmad, M., Ashwar, B. A., & Masoodi, F. A. (2016). B- Glucan as an encapsulating agent: Effect on probiotic survival in simulated gastrointestinal tract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 217–222.
- Shah, U., Gani, A., Ashwar, B. A., Shah, A., Wani, I. A., & Masoodi, F. A. (2016). Effect of infrared and microwave radiations on properties of Indian horse chestnut starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 166–173.
- Shalviri, A., Liu, Q., Abdekhodaie, M. J., & Wu, X. Y. (2010). Novel modified starch-xanthan gum hydrogels for controlled drug delivery: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 79, 898–907.
- Singh, J., Kaur, L., & Mc Carthy, O. J. (2007). Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications - A review. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 1–22.
- Sohail, A., Turner, M., Coombes, A., Bostrom, T., & Bhandari, B. (2011). Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 162–168.
- 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 gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47–55.
- Takei, T., Yoshida, M., Hatate, Y., Shiomori, K., & Kiyoyama, S. (2009). Preparation of lactic acid bacteria-enclosing alginate beads in emulsion system: effect of preparation parameters on bead characteristics. *Polymer Bulletin*, 63, 599–607.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1950–1958.
- Valero-Cases, E., & Frutos, M. J. (2015). Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 824–828.
- Vodnar, D. C., Socaciu, C., Rotar, A. M., & Stanila, A. (2010). Morphology, FTIR fingerprint and survivability of encapsulated lactic bacteria (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) in simulated gastric juice and intestinal juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 2345–2351.
- Wani, T. A., Gani, A., Wani, S. M., Wani, I. A., Masoodi, F. A., Nissar, N., et al. (2016). Suitability of different food grade materials for the encapsulation of some functional foods well reported for their advantages and susceptibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2431–2454.
- Woo, K., & Seib, P. A. (2002). Cross-linked resistant starch: Preparation and properties. *Cereal Chemistry*, 79, 819–825.
- Wu, Y., & Seib, P. A. (1990). Acetylated and hydroxypropylated distarch phosphates from waxy barley: Paste properties and freeze-thaw stability. *Cereal Chemistry*, 67(2), 202–208.
- Ying, D. Y., Schwanderc, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., & Augustin, M. A. (2013). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of functional foods*, 5, 98–105.