



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ULTRASONICACIÓN EN  
LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y DE ESTABILIDAD  
DE UNA BEBIDA DE ALMENDRA ADICIONADA DE  
PROBIÓTICOS”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MAGALY MONDRAGÓN UGALDE**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. BENERANDA MURUA PAGOLA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
II.1 Consumo de leche de vaca .....	3
II.2 Problemas de salud y enfermedades por consumo de leche de vaca.....	4
II.3 ¿Qué son los productos análogos vegetales? .....	5
II.3.1 Beneficios de las alternativas de leche vegetales.....	5
II.4 Desarrollo de productos alternativos de lácteos .....	6
II.5 Productos bebibles .....	7
II.5.1 Bebidas a base de almendras .....	8
II.5.1.1 Almendra .....	8
II.5.1.1.1 Características generales .....	8
II.5.1.1.2 Composición química y valor nutricional.....	9
II.6 Alimentos funcionales.....	14
II.7 Probióticos.....	15
II.7.1 Probióticos en productos a base de plantas .....	16
II.7.2 Lactobacilos.....	17
II.7.2.1.1 <i>Lactobacillus casei</i> .....	18
II.8 Fermentación.....	18
II.8.1 Alimentos fermentados a base de plantas .....	20
II.9 Efectos del ultrasonido en alimentos .....	20
II.9.1 Efecto del ultrasonido en bebidas de origen vegetal .....	24

II.10	Microencapsulación .....	25
II.10.1	Microencapsulación de probióticos .....	26
II.10.1.1	Secado por aspersión.....	27
II.10.2	Materiales microencapsulantes para probióticos .....	28
II.10.2.1	Goma de algarrobo.....	28
II.10.2.2	Goma guar .....	29
II.10.2.3	Alginato .....	29
II.10.2.4	Proteína de suero .....	30
II.10.2.5	Almidón .....	31
II.10.2.6	Pectina .....	31
III.	HIPÓTESIS .....	33
IV.	OBJETIVOS .....	34
IV.1	General .....	34
IV.2	Específicos .....	34
V.	METODOLOGÍA.....	35
V.1	Materiales .....	35
V.2	Métodos.....	35
V.2.1	Preparación de materiales encapsulantes .....	35
V.2.2	Microencapsulación de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 mediante secado por aspersión.....	36
V.2.3	Activación y conteo de <i>Lactobacillus casei</i> .....	36
V.2.4	Formulación del fermentado de almendra .....	37
V.2.4.1	Elaboración del extracto de almendra .....	37
V.2.4.2	Elaboración del fermentado de almendra.....	37
V.2.5	Tratamiento ultrasónico .....	37
V.2.6	Propiedades físicas .....	38
V.2.6.1	Medición de grados Brix .....	38
V.2.6.2	Estabilidad física.....	38
V.2.7	Propiedades químicas .....	38
V.2.7.1	Medición de la acidez titulable y el pH.....	38

V.2.8	Viscosidad aparente .....	39
V.2.9	Análisis microbiológico.....	39
V.2.9.1	Cinética de crecimiento .....	39
V.2.9.2	Evaluación de la sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei</i> en muestras de extracto fermentado de almendra almacenadas a 4 °C. ....	39
V.2.10	Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI) <i>in-vitro</i> . ....	40
V.2.11	Análisis bromatológicos .....	41
V.2.12	Actividad de eliminación de radicales .....	41
V.2.12.1	Capacidad antioxidante por el método ABTS .....	41
V.2.12.2	Capacidad antioxidante por el método DPPH .....	42
V.2.13	Diseño experimental .....	43
V.2.14	Análisis estadístico .....	44
VI.	RESULTADOS .....	45
VI.1	Comportamiento del pH y acidez titulable en los ensayos preliminares sobre el efecto del tratamiento ultrasónico en los extractos de almendra.....	45
VI.2	Viabilidad de <i>L. casei</i> ATCC 334 durante el tiempo de fermentación en los tratamientos preliminares de ultrasonificación.....	46
VI.3	Estabilidad física.....	47
VI.4	Comportamiento del pH y acidez titulable durante la fermentación de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud.....	48
VI.5	Comportamiento del pH y acidez titulable durante el almacenamiento de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud. ....	49
VI.6	Evaluación de la viabilidad de las bacterias probióticas e iniciadoras en los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud durante su fermentación y almacenamiento. ....	51
VI.7	Tolerancia de las bacterias a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.....	53
VI.8	Viscosidad aparente .....	55
VI.9	Capacidad antioxidante .....	55
VI.10	Análisis bromatológicos .....	56

VII. DISCUSIÓN .....	58
VII.1 Comportamiento del pH y acidez titulable de los extractos de almendra en los ensayos preliminares después del tratamiento ultrasónico. ....	58
VII.2 Viabilidad de <i>L. casei</i> ATCC 334 durante el tiempo de fermentación en los tratamientos preliminares de ultrasonicación.....	59
VII.3 Estabilidad física.....	60
VII.4 Comportamiento del pH y acidez titulable durante la fermentación de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud.....	62
VII.5 Comportamiento del pH y acidez titulable durante el almacenamiento de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud. ....	63
VII.6 Evaluación de la viabilidad de las bacterias de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud durante su fermentación y almacenamiento.	64
VII.7 Tolerancia de las bacterias en extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. ....	65
VII.8 Viscosidad aparente .....	67
VII.9 Capacidad antioxidante .....	68
VII.10 Análisis bromatológicos .....	70
VIII.CONCLUSIONES.....	71
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	72

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición nutricional de la semilla de almendra en 100 g.....	10
2	Contenido de aminoácidos en 100 g de almendra.....	13
3	Aplicación de ultrasonido en la industria alimentaria.....	23
4	Diseño experimental.....	43
5	pH y % acidez de las muestras preliminares de los extractos de almendra fermentados por <i>L. casei</i> ATCC 334.....	46
6	Viabilidad de <i>L. casei</i> ATCC 334 libre durante el tiempo de fermentación de los tratamientos preliminares de los extractos de almendra.....	47
7	Estabilidad física del extracto de almendra bajo distintas condiciones del tratamiento ultrasónico.....	48
8	Efecto de la fermentación en el pH y la acidez de las muestras de almendra ultrasonificadas.....	49
9	Comportamiento en el pH y la acidez de las muestras de los extractos de almendra ultrasonificados.....	50
10	Viabilidad de las bacterias durante el tiempo de fermentación de los tratamientos con <i>L. casei</i> ATCC 334 libres y encapsuladas en extractos ultrasonificados.....	52
11	Viabilidad de la población bacteriana durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C de los tratamientos con <i>L casei</i> libres y encapsuladas.....	53

12	Viabilidad de las bacterias iniciadoras y <i>L. casei</i> ATCC 334 libre y encapsulado durante la simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal.....	54
13	Actividad de barrido de radicales libres DPPH y ABTS de la bebida fermentada de almendra, muestra control y ultrasonificada.....	56
14	Análisis bromatológicos de la bebida fermentada de almendra formulada.....	57



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 El principio del efecto de cavitación.....	21
2 Sistemas de ultrasonido.....	22
3 Rangos de tamaño de partícula de cápsulas obtenidas con diversas técnicas de microencapsulación.....	27
4 Viscosidad aparente vs velocidad de cizallamiento de la bebida fermentada de almendra ultrasonicada y almacenada a 4 °C.....	55

## RESUMEN

Este estudio se centró en la creciente demanda de opciones lácteas alternativas debido a los problemas asociadas con el consumo de la leche de vaca. Se elaboró un producto fermentado de almendra adicionado con *L. casei* ATCC 334 y se evaluó el efecto de la ultrasonificación en sus propiedades y estabilidad. Se determinó que la ultrasonificación a 20 Hz y 40 % de amplitud fue la más adecuada para mejorar la estabilidad de los extractos. Se llevaron a cabo tres tratamientos: extracto de almendra ultrasonificado con *L. casei* ATCC 334 libre (LCL) y dos con el probiótico encapsulado en aislado de proteína de suero (LCW) y almidón fosfatado/inulina (LCI) mediante secado por aspersión. Durante la fermentación con iniciadores de yogur LCI mostró un aumento significativo en la viabilidad del probiótico de  $0.87 \pm 0.06$  log UFC/mL. Durante el almacenamiento durante 4 semanas a 4 °C el probiótico incrementó en casi 1 ciclo logarítmico. En el ensayo de TGI, las células encapsuladas (LCW y LCI) redujeron su viabilidad  $3.23 \pm 0.0$  log UFC/mL, y las células libres (LCL) mostraron una disminución más pronunciada de  $5.1 \pm 0.0$  log UFC/mL. La capacidad antioxidante, evaluada con el método ABTS, mostró mejoras significativas después de la ultrasonificación con un porcentaje de inhibición del 30.91 % y en conjunto con la fermentación se logró inhibir el radical hasta un 38.46 %. LCW exhibió la mayor viscosidad entre los tratamientos, mientras que LCI mostró una menor viscosidad. En resumen, la bebida fermentada de almendra desarrollada demostró ser una fuente potencial de probióticos y antioxidantes. La ultrasonificación mejoró las propiedades físicas y químicas del producto, elementos esenciales para su aceptación y estabilidad en el mercado de alternativas lácteas.

## I. INTRODUCCIÓN

En la sociedad contemporánea, el aumento de alergias e intolerancias relacionadas con el consumo de leche de vaca ha impulsado la búsqueda de alternativas saludables en productos lácteos. En este contexto, los productos derivados de almendras han surgido como una opción atractiva, no solo por su potencial para sustituir a los lácteos convencionales, sino también por su capacidad para servir como vehículos de probióticos, ofreciendo así beneficios adicionales para la salud gastrointestinal y antioxidante. Este estudio se centra en el desarrollo de una bebida fermentada a base de almendras adicionada con el probiótico *L. casei* ATCC 334, abordando detalladamente el efecto de la ultrasonificación en sus propiedades fisicoquímicas, reológicas y de estabilidad, así como la evaluación de su capacidad antioxidante y la viabilidad del probiótico frente a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI).

La investigación inicial se concentró en optimizar el proceso de ultrasonificación de los extractos de almendra, utilizando frecuencias específicas y amplitudes controladas (20 Hz a 40 % y 80 % de amplitud), con el objetivo de mejorar la estabilidad del producto final. Tras identificar las condiciones óptimas (40 % de amplitud), se procedió a la elaboración de tres tratamientos distintos: extracto de almendra ultrasonificado y adicionado con *L. casei* ATCC 334 en forma libre (LCL), y dos variantes con el probiótico encapsulado utilizando diferentes matrices de encapsulación (LCW con aislado de proteína de suero, y LCI con almidón fosfatado/inulina, ambos obtenidos por secado por aspersión).

La adición de un cultivo iniciador de yogurt permitió llevar a cabo el proceso de fermentación de los extractos, observándose un incremento significativo en la viabilidad del probiótico a lo largo del tiempo de almacenamiento en todos los tratamientos. La microencapsulación mostró un efecto protector sobre el probiótico encapsulado durante la exposición de los tratamientos a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Además de evaluar la viabilidad del probiótico, se analizó la capacidad antioxidante de los extractos de almendra a lo largo de diferentes etapas del proceso, utilizando el método ABTS para determinar el porcentaje de inhibición radical. Los resultados mostraron incrementos notables en la actividad antioxidante tras la ultrasonificación y la fermentación, indicando un potencial significativo para la mejora del perfil nutricional de la bebida. El análisis reológico de las muestras reveló variaciones significativas en la viscosidad entre los diferentes tratamientos, siendo el tratamiento LCW el que mostró la mayor viscosidad y el LCI la menor. Este aspecto no solo es relevante desde el punto de vista de la textura y la aceptación sensorial del producto final, sino que también puede influir en la estabilidad y la funcionalidad del producto durante su vida útil.

En síntesis, este estudio aporta evidencia sustancial sobre el potencial de las bebidas fermentadas de almendra como vehículos efectivos de probióticos y antioxidantes. La aplicación de técnicas como la ultrasonificación no solo mejora las propiedades físicas y químicas del producto, sino que también incrementa su estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento, ofreciendo una alternativa saludable y funcional para consumidores preocupados por su bienestar gastrointestinal y nutricional.

## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1 Consumo de leche de vaca**

Actualmente, el estado actual y el impacto general de la industria láctea en la economía son consideraciones cruciales en un mercado lácteo dinámico. Los investigadores destacan el papel fundamental de la industria láctea dentro de la industria alimentaria. Los datos de Eurostat revelan que el sector lácteo de la Unión Europea constituye el 4 % de toda la industria alimentaria, emplea al 8% de la mano de obra y contribuye con el 10 % del valor añadido y el 13 % de la facturación. Además, el sector lácteo exhibe una innovación significativa, con las empresas lácteas participando en el 6.9 % de la innovación de la industria alimentaria en 2014, asegurando la segunda posición dentro del sector.

Los productos lácteos son alimentos que aportan una gran variedad de nutrientes en la dieta humana en general, ya que contienen varios de los nutrientes necesarios como calcio, potasio, proteínas, grasas y vitamina D, que son fundamentales en una dieta equilibrada. Sin embargo, estos productos se caracterizan por las posibilidades limitadas para el almacenamiento y transporte que la leche tiene por ser un producto inestable que requiere ser mantenido a una temperatura baja (hasta 4 °C), transportado lo más rápido posible y procesado dentro de las 24 h después de la ordeña, para evitar cambios derivados del metabolismo de las bacterias lácticas (Bórawski y col., 2020).

La industria láctea ha permanecido líder por muchos años en el mercado global debido a su fuerte demanda. Sin embargo, es importante reconocer que la producción de productos lácteos de origen animal provoca un mayor impacto sobre el medio ambiente a comparación con otras formas de producción de alimentos. Las investigaciones indican que el consumo y producción de productos sustitutos de leche, han tenido un aumento significativo del 6 % en comparación con productos lácteos tradicionales, lo que ha atraído el interés tanto de empresas emergentes como de alimentos (Paul y col., 2019).

## II.2 Problemas de salud y enfermedades por consumo de leche de vaca

Uno de los principales problemas derivado del consumo de leche es la alergia a la leche de vaca, ya que es una de las alergias más extendidas entre los lactantes y niños. De acuerdo con investigaciones en los últimos años se ha reportado que del 2.2-3.5 % de los lactantes son alérgicos a la leche de vaca, seguidos de los cacahuates y los frutos secos. Sin embargo, estudios recientes realizados a gran escala han demostrado que alrededor del 35 % de estos lactantes con alergia a la leche son a la edad de 5-6 años y esta cifra puede aumentar hasta el 80 % a los 16 años. Otro problema asociado al consumo de leche de vaca es la "intolerancia a la lactosa". Se debe a que la principal fuente de hidratos de carbono en la leche de vaca es la lactosa y la ausencia o deficiencia de la enzima lactasa en el tracto digestivo humano evita que pueda digerirse la lactosa. Esto puede observarse ampliamente en el 15-75 % de los adultos. Algunos estudios han demostrado que el 80 % de las personas de origen africano y el 100 % de las personas de origen indio americano son intolerantes a la lactosa (Vanga & Raghavan, 2017).

Además, la leche puede contener residuos que pueden provenir de animales no saludables y que tienen el potencial de contener patógenos transmitidos por los alimentos. Estas preocupaciones son aún mayores en los países en desarrollo donde existe una supervisión deficiente en el uso de antibióticos en animales, tiempos de retiro de leche y pruebas de residuos de antibióticos. Esto es importante porque la presencia de adulterantes antibióticos en la leche puede tener un impacto profundo en la salud de los bebés y niños en regiones que ya enfrentan altas tasas de enfermedades diarreicas y desnutrición. Los residuos de antibióticos pueden tener un impacto negativo en el microbioma de quienes consumen leche adulterada, lo que provoca disbiosis, un cambio en la microbiota asociado con estados patológicos. La disbiosis puede durar años, lo que genera riesgos para la salud a largo plazo, especialmente en bebés y niños, como retraso en el crecimiento, respuesta inmunitaria comprometida y enfermedad diarreica recurrente (García y col., 2019).

Asimismo, la creciente demanda de dietas vegetarianas y veganas en todo el mundo, la preocupación por la salud y el medio ambiente, así como otros factores como el contenido de grasas saturadas en leche entera, que pueden causar un aumento del colesterol por consumo de leche de bovino, han impulsado al consumidor y a la industria alimentaria a buscar alternativas de productos más saludables y sostenibles. Algunos investigadores también han reportado una relación entre mayor riesgo de cáncer asociado al consumo regular de leche tanto en hombres como en mujeres. Es por esta razón que el aumento de la demanda de productos alternativos a las leches bovinas ha aumentado en las últimas décadas (Vanga & Raghavan, 2017).

### II.3 ¿Qué son los productos análogos vegetales?

En la literatura no existe una definición para "leche" vegetal ni una clasificación de estas alternativas de leche vegetales, aún hay un debate sobre si estos productos deben llamarse "leche" o "bebida/jugo". De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012 se define como leche al producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro el cual debe ser sometido a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede someterse a otras operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación. Esta es una definición que no se ajusta a los productos que se venden actualmente como "alternativas a la leche", sin embargo, en la mayoría de los casos sus usos son similares a la leche de vaca. Son llamadas también "alternativas no lácteas" que incluyen principalmente extractos de soja, de almendras, de arroz, y de coco.

#### II.3.1 Beneficios de las alternativas de leche vegetales

Los productos alternativos de leche, de origen vegetal, suelen ser percibidos como saludables, debido a las percepciones negativas que existen sobre los efectos de alergenicidad de algunos nutrientes de la leche de vaca y las repercusiones en la salud. En los extractos vegetales las propiedades nutricionales varían mucho,

debido a que dependen en gran medida de la materia prima, el procesado, el enriquecimiento y la presencia de otros ingredientes, como edulcorantes y aceites.

Desde el punto de vista nutricional, los macronutrientes y el contenido proteínico de los extractos vegetales suele ser inferior al de la leche de vaca, sin embargo, son más ricas en fibra, ácidos grasos insaturados y no contienen colesterol. Además, algunos compuestos derivados de plantas tienen efectos favorables para la salud, que pueden estar presentes en las bebidas producidas a partir de esa materia prima. Por ejemplo, en varios estudios se ha observado que sustituir la leche de vaca baja en grasa por extracto de avena o de soja reduce las concentraciones plasmáticas de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en personas sanas tras 4 semanas de tratamiento. Los extractos vegetales que contienen soja se han considerado un alimento saludable, ya que, la soja tiene un considerable contenido de isoflavonas, que producen efectos positivos en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer de próstata y osteoporosis (Mäkinen y col., 2015).

#### II.4 Desarrollo de productos alternativos de lácteos

Los seres humanos han consumido productos lácteos desde hace siglos, y una gran parte de la población actualmente sigue consumiendo cantidades considerables de estos productos, debido a que, son considerados una excelente fuente de nutrimentos por su alto contenido de calcio, grasas, carbohidratos y proteínas, todos ellos esenciales para llevar una dieta completa y balanceada que es difícil de encontrar en otros alimentos. No obstante, hay una gran demanda a nivel mundial de productos no lácteos, que se relaciona con la disponibilidad de la leche, y su impacto en el medio ambiente. Asimismo, se han realizado investigaciones de las que han surgido varias preocupaciones y riesgos acerca del consumo excesivo de productos lácteos como los cánceres de ovario y de próstata. Sin embargo, el riesgo más común derivado del consumo de leche o productos lácteos es la intolerancia a la lactosa (LI) que afecta aproximadamente al 75 % de la población mundial. Debido a que la intolerancia a la lactosa suele ser una enfermedad hereditaria que inhabilita la digestión de la lactosa debido a la deficiencia de lactasa, el principal tratamiento para personas intolerantes consiste en evitar consumir los alimentos que contienen



lactosa y sustituir la leche y los productos lácteos por productos sin lactosa. Además, las personas evitan consumir productos lácteos no solo por la intolerancia a la lactosa (LI), sino por cuestiones de salud, como la alergia a algunos componentes de la leche de vaca, el colesterol, fenilcetonuria, así como por opciones de un estilo de vida como una dieta vegetariana/vegana o la preocupación por los residuos de hormonas de crecimiento o antibióticos en la leche de vaca (Mäkinen y col., 2015).

Es por esta razón, que en la actualidad se han desarrollado alternativas a los productos lácteos, con la finalidad de cambiar la dieta moderna a una dieta basada en plantas que pueda mejorar la salud humana, disponible para el consumo de personas intolerantes a la lactosa, que aumente la sostenibilidad alimentaria y reduzca la contaminación, el uso de la tierra y el uso del agua. Hoy en día, se han desarrollado varios productos en el mercado sustitutos de la leche a base de almendras, coco, soja, arroz y avena. Sin embargo, muchos consumidores no están dispuestos a consumir estos productos, ya sea por el sabor, o por la funcionalidad de sus componentes que no se comportan de la misma forma que la leche de vaca. Por lo tanto, es necesario que se comprendan las bases fisicoquímicas de los atributos funcionales de las alternativas de leche, de origen vegetal, para desarrollar productos comerciales más aceptables para obtener un mayor número de consumidores potenciales (McClements y col., 2019).

## II.5 Productos bebibles

Un producto bebible es cualquier sustancia que puede beberse, como jugos, refrescos, leche, yogurt, cerveza, etc. Se clasifican en dos tipos, las bebidas alcohólicas y las no alcohólicas; estas últimas se dividen en carbonatadas y no carbonatadas. Las bebidas se consumen por su valor alimentario como la leche o el yogurt, pero otras se consumen para calmar la sed, por sus efectos estimulantes o porque su consumo es placentero (Potter & Hotchkiss, 1995).

Las bebidas funcionales son bebidas no alcohólicas que contienen ingredientes no tradicionales como minerales, vitaminas, aminoácidos, fibras dietéticas (FD),

probióticos, frutas crudas añadidas, etc., con efectos beneficiosos para el organismo que pueden clasificarse en términos generales como "nutracéuticos" y "alimentos funcionales". Estos alimentos se clasifican como alimentos fortificados, enriquecidos o mejorados que ejercen beneficios positivos para la salud del cuerpo humano. Las bebidas lácteas funcionales ocupan un lugar muy importante dentro del segmento de los alimentos funcionales con más del 40 % del mercado. La mayoría de estos productos lácteos funcionales son fermentados, como el yogurt, los productos bajos en lactosa o sin lactosa y los suplementados con ingredientes funcionales como minerales, vitaminas, y probióticos/prebióticos (Turkmen y col., 2019).

#### II.5.1 Bebidas a base de almendras

Actualmente se han desarrollado varios productos derivados de almendras que están adquiriendo una relevancia significativa en la industria alimentaria, especialmente extracto de almendras, denominado comercialmente como "leche" de almendras y el aceite de almendras. El extracto de almendras constituye una excelente alternativa a la leche de vaca, debido a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados, que ayudan a controlar el peso corporal y a reducir las LDL.

Además, el extracto de almendras se promociona como un alimento saludable, ya que, las almendras tienen una composición equilibrada en proteínas, grasas y otros compuestos vegetales beneficiosos. Es una fuente notable de  $\alpha$ -tocoferol (36.4 %), que desempeña un papel fundamental en la lucha contra las reacciones de los radicales libres y, por tanto, en la prevención del estrés oxidativo. Además, están enriquecidas con minerales como magnesio (19.5 %), cobre (16.0 %), fósforo (13.4 %) y también poseen un alto contenido de fibra (13.2 %) (Barral-Martínez y col., 2021).

##### II.5.1.1 Almendra

###### II.5.1.1.1 Características generales

La almendra (*Prunus dulcis*) es una especie del género *Prunus* y del subgénero *Amygdalus* (*Rosaceae*, subfamilia *Prunoideae*) que se cultiva comercialmente en

todo el mundo en regiones de clima mediterráneo cálido y árido (Hussain y col., 2021).

Las almendras se consideran una fuente rica en nutrientes puesto que contienen lípidos (alrededor del 50 %), proteínas (alrededor del 25 %) e hidratos de carbono (alrededor del 20 %), tienen un bajo contenido de humedad y diversos compuestos bioactivos menores. Los efectos beneficiosos que se han atribuido al consumo de almendras están asociados a su composición en macro y micronutrientes; algunos de estos efectos son la disminución de enfermedades crónicas como las cardiopatías coronarias y la diabetes de tipo 2, así como al mantenimiento y control del peso. Entre los principales compuestos con propiedades beneficiosas para la salud, se puede destacar el perfil lipídico: contienen ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, 60 %), seguidos de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, 30 %), fibra, vitaminas, minerales, fitoesteroles y polifenoles (Barreca y col., 2020).

#### II.5.1.1.2 Composición química y valor nutricional

Las almendras son un alimento rico en nutrientes en una ración estándar de 28 g (como % del valor diario o VD). Son definidas como una excelente fuente de vitamina E y manganeso. Además, son una buena fuente de varios minerales como magnesio, cobre, fósforo, fibra, así como de riboflavina y proteínas, de acuerdo con la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés). Entre los principales compuestos con propiedades beneficiosas para la salud, se puede destacar el perfil lipídico: contienen ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, 60 %), seguidos de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, 30 %), fibra, vitaminas, minerales, fitoesteroles y polifenoles (Barreca y col., 2020). Varios estudios recientes han reportado que las almendras contienen una variada gama de compuestos fenólicos y polifenólicos (Chung-Yen y col., 2006).

El componente principal que contienen las almendras es la grasa, y se ha observado en humanos que una proporción considerable de los lípidos se digiere y absorbe lentamente y otra proporción no se digiere en absoluto, el Cuadro 1 muestra la

composición nutricional por cada 100 g de almendras de acuerdo con lo reportado por la USDA (2018).

Cuadro 1. Composición nutricional de la semilla de almendra en 100 g (USDA, 2018).

Por cada 100 g	
Macronutrientes	
Agua (g)	5.25
Energía (cal)	578
Proteína (g)	21.26
Grasa total (g)	50.64
Carbohidratos (g)	19.74
Fibra dietética (g)	11.80
Minerales, vitaminas, lípidos y aminoácidos	
Calcio (mg)	248
Hierro (mg)	4.30
Magnesio (mg)	275
Fósforo (mg)	474
Potasio (mg)	728
Tiamina (vitamina B1) (mg)	0.24
Riboflavina (vitamina B2) (mg)	0.81
Vitamina B6 (mg)	0.13
Vitamina A (UI)	5.00
Vitamina E (mg)	25.87
Grasas saturadas (g)	3.88
Grasas monoinsaturadas (g)	32.16
Grasas poliinsaturadas (g)	12.21
Lisina (g)	0.60
Arginina (g)	2.47
Total fenólicos (mgb)	418

El contenido de carbohidratos por cada porción de 100 g de almendra se encuentra alrededor de 20-21.6 g, esto constituye alrededor del 22 % del peso de fruto fresco. Aproximadamente 4.4 g de los hidratos de carbono se encuentran en forma de azúcares y forman parte del contenido total de azúcares en las almendras. Se pueden clasificar como un alimento bajo en azúcar de acuerdo con la normativa europea (Parlamento Europeo y Consejo, 2007). Las principales azúcares presentes en las almendras son sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa y galactosa. Además de azúcares, las almendras contienen alrededor de un 0.7 g de almidón por cada porción de 100 g (Hussain y col., 2021). Estos compuestos pueden ser digeridos y metabolizados por el organismo, sin embargo, los polisacáridos insolubles presentes, no pueden ser absorbidos ni digeridos por el organismo, y no proporcionan energía, pero pueden tener otros beneficios fisiológicos en el organismo.

La Asociación Americana de Químicos de Cereales (Association of Cereal Chemists), AACC (2001) define la “fibra dietética como la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso”. Esta fibra dietética está compuesta por polisacáridos insolubles, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de la planta. Una porción de 100 g de almendras aporta 12.5 g de fibra dietética y se clasifican como un alimento rico en fibra dietética de acuerdo con la normativa europea. La principal fuente de fibra está compuesta por celulosa, hemicelulosa y otros componentes no carbohidratos de las células vegetales. La parte de fibra insoluble en las almendras promueve efectos beneficiosos fisiológicos como el laxante, y/o atenúa los niveles de colesterol en sangre y la glucosa en sangre (Ellis y col., 2004).

El contenido total de proteínas por cada porción de 100 g de almendras se encuentra alrededor de 21.2 g lo que equivale al 21.2 % del peso fresco de la almendra, esto las convierte en una excelente fuente de proteínas vegetales, las cuales aportan todos los aminoácidos esenciales lo que las convierte en proteínas de buena calidad. Los aminoácidos que predominan en las almendras son los

aminoácidos cargados negativamente: ácido aspártico y ácido glutámico (Hussain y col., 2021). La principal proteína de almacenamiento de las almendras es la amandina, un tipo de alérgeno que constituye más del 70 % del contenido total de proteínas solubles (Hussain y col., 2021). El Cuadro 2 muestra el contenido de aminoácidos en la proteína de la almendra de acuerdo con lo reportado por la USDA (2008).

Las almendras son una buena fuente de vitaminas, ya que, son naturalmente ricas en vitamina E (25.6 mg/100g) y riboflavina (vitamina B2), sin embargo, carecen de vitaminas C, D y K. El contenido de cenizas en las almendras se encuentra entre los 2-3 g por cada porción de 100 g. Las almendras son una fuente abundante de minerales tales como calcio (264 mg/100 g) y magnesio (268 mg/100 g), a su vez, son ricos en potasio (728 mg/100 g) y bajos en sodio lo que las convierte en un alimento ideal para personas hipertensas, y también contienen trazas de selenio (2.50 µg/100 g) (Richardson y col., 2009).

En cuanto al contenido de lípidos son una fuente abundante, el porcentaje total de grasa de la almendra por cada porción de 100 g es de 50 g. Estos lípidos producen varios efectos beneficiosos a la salud humana, puesto que, el mayor porcentaje de estas grasas corresponde a ácidos grasos monoinsaturados (31.6 g/100 g), seguidos de ácidos grasos poliinsaturados (12.3 g/100 g), mientras que el contenido de grasas saturadas (3.7 g/100 g) es el más bajo. Esto quiere decir, que el contenido de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados es más del 80% y constituyen el contenido graso de las almendras en el grano. El ácido oleico (30.61 mg/100 g) es el ácido graso monoinsaturado predominante mientras que el ácido linoleico (12.06 mg/100 g) es el ácido graso poliinsaturado predominante (Richardson y col., 2009).

Las almendras contienen fitonutrientes, como ácidos fenólicos, fitosteroles y compuestos polifenólicos que producen beneficios al cuerpo humano. Además, las almendras no contienen colesterol, pero sí algunos fitosteroles que limitan la absorción de colesterol manteniendo los niveles de colesterol en la sangre. Entre

los fitosteroles que más abundan en las almendras podemos encontrar el campesterol, el  $\beta$ -sitosterol, el 5-avenasterol y el estigmasterol (Allen, 2008).

Cuadro 2. Contenido de aminoácidos en 100 g de almendra (USDA, 2018).

Aminoácido	Por 100 g
Triptófano (g)	0.211
Treonina (g)	0.601
Isoleucina (g)	0.751
Leucina (g)	1.47
Lisina (g)	0.568
Metionina (g)	0.157
Cistina (g)	0.215
Fenilalanina (g)	1.13
Tirosina (g)	0.45
Valina (g)	0.855
Arginina (g)	2.46
Histidina (g)	0.539
Alanina (g)	0.999
Ácido aspártico (g)	2.64
Ácido glutámico (g)	6.21
Glicina (g)	1.43
Prolina (g)	0.969
Serina (g)	0.912

## II.6 Alimentos funcionales

En los últimos años, se han desarrollado alimentos que además de satisfacer las necesidades humanas, brindan beneficios, son más saludables, y reducen el riesgo de padecer enfermedades crónicas. Estos alimentos se denominan “alimentos funcionales”, son todos aquellos alimentos tradicionales que se modifican para que aporten beneficios al consumidor, en comparación a los alimentos no modificados. Por definición, un alimento funcional es un alimento procesado que ha demostrado con éxito uno o más beneficios en el organismo, además de los efectos nutricionales que aporta, ya sea con una mejora funcional o una reducción del riesgo de enfermedad. Su mejora funcional puede relacionarse con (1) el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación celular; (2) el metabolismo de sustratos; (3) la defensa contra especies oxidativas reactivas; (4) el sistema cardiovascular; (5) la fisiología y función gastrointestinal; y (6) el comportamiento y las funciones psicológicas (Kaur & Das, 2011).

Las características distintivas de los alimentos funcionales consisten principalmente en ser alimentos convencionales, con un valor nutricional que aporta beneficios a la salud. Deben estar elaborados con ingredientes naturales, no sintéticos, que puedan promover condiciones de salud óptima, y reducir el riesgo de varias enfermedades no transmisibles como la dislipidemia, el cáncer, la diabetes de tipo 2, los accidentes cerebrovasculares y las enfermedades cardiovasculares (ECV) (Granato y col., 2020). Para cumplir con los requisitos marcados por la normativa de cada país, los alimentos funcionales deben ser validados mediante ensayos de intervención. Por ejemplo, la Agencia Brasileña de Reglamentación Sanitaria (ANVISA) en Brasil, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en la Unión Europea, y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en los Estados Unidos. Además, para que un alimento sea clasificado como funcional, debe ser de libre acceso sin necesidad de prescripción médica (o consejo médico) y debe tener evidencia de que aporta beneficios a la salud cuando se consume regularmente como parte de una dieta bien balanceada (Lenssen y col., 2018).



## II.7 Probióticos

El término probióticos de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) se define como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped”. Para que un probiótico pueda ser considerado como tal, el microorganismo debe sobrevivir a un entorno ácido y a la exposición a las sales biliares que se encuentran en el cuerpo humano, debe tener una buena capacidad de absorción en el intestino y una marcada relación con algún marcador de salud en los ensayos clínicos (Kaur & Das, 2011).

Los probióticos consisten principalmente en los microorganismos de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero también hay otros muy importantes como las levaduras, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* y *Saccharomyces*. Las bacterias lácticas y las bifidobacterias han sido las más estudiadas y empleadas dentro del campo de los probióticos ya que forman parte de la microbiota intestinal. Estas bacterias probióticas se utilizan en la industria alimentaria para la producción de varios alimentos funcionales, entre los que se encuentran productos lácteos como leche, leches acidificadas, yogures, quesos, cremas y helados, también se han utilizado en productos no lácteos como productos cárnicos, pan, aperitivos de fibra de cereales, zumos etc. El número de células probióticas viables en un alimento necesarias para lograr observar un efecto evidente es de  $10^8 - 10^9$  UFC por día, que varía dependiendo de la cepa y bacteria, así como de las condiciones fisiológicas del huésped (Chugh & Kamal-Eldin, 2020).

Las bacterias probióticas principalmente las ácido lácticas y las bifidobacterias, tienen distintas actividades metabólicas que son catalizadas por enzimas como amilasas, proteasas, esterases y lipasas, de las cuales puede carecer el huésped. Asimismo, pueden producir enzimas como la  $\beta$ -galactosidasa y lactasa que mitigan la intolerancia a la lactosa. Otros beneficios que aportan son: 1) Combaten las bacterias nocivas del tracto gastrointestinal, 2) Mejoran las actividades metabólicas y el valor nutricional, 3) Proveen efectos antioxidantes, antiinflamatorios e inmunomoduladores, 4) Reducen las alergias y mejora la función intestinal, 5)

Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, 6) Reducen el riesgo de cáncer (O'Toole & Cooney, 2008).

Los mecanismos de acción de las bacterias probióticas en el organismo consisten básicamente en la inhibición competitiva de la multiplicación de bacterias patógenas mediante el cambio del pH y la reducción de la disponibilidad de oxígeno, lo que conlleva a condiciones intestinales menos favorables, la inhibición no competitiva mediante la producción de bacteriocinas, la síntesis de micronutrientes esenciales como vitaminas, aminoácidos y enzimas, y la mejora de la biodisponibilidad de los nutrientes de la dieta, la estimulación del sistema inmunitario del huésped y la mejora de la actividad metabólica de los hidratos de carbono (Chugh & Kamal-Eldin, 2020).

#### II.7.1 Probióticos en productos a base de plantas

La viabilidad de los probióticos en los productos alternativos de lácteos, de origen vegetal, es un factor crítico que debe tenerse en cuenta al utilizar estos productos como portadores de probióticos.

Los sustitutos de la leche a base de plantas, como los extractos de almendras, de soya y de avena, generalmente tienen un bajo contenido de proteínas y es posible que no proporcionen un entorno óptimo para la supervivencia de los probióticos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que ciertos sustitutos de la leche a base de plantas pueden ser portadores efectivos de probióticos, y la viabilidad de estos microorganismos puede mantenerse a través de condiciones apropiadas de procesamiento y almacenamiento. Por ejemplo, la adición de prebióticos como la inulina o la oligofructosa a los sustitutos de la leche de origen vegetal puede mejorar la supervivencia de los probióticos al proporcionar un entorno favorable para su crecimiento y metabolismo. Además, el uso de técnicas de fermentación y cultivos iniciadores adecuados también puede mejorar la viabilidad de los probióticos en los productos lácteos de origen vegetal (Rasika y col., 2020).

En general, la viabilidad de los probióticos en los productos alternativos lácteos de origen vegetal se puede mantener mediante condiciones adecuadas de procesamiento y almacenamiento. Esto puede permitir la entrega de estos microorganismos beneficiosos a los consumidores que tal vez no puedan consumir productos probióticos a base de lácteos, al mismo tiempo que brinda beneficios adicionales para la salud debido al perfil nutricional de los sustitutos de la leche a base de plantas.

#### II.7.2 Lactobacilos

Los lactobacilos son bacilos grampositivos que no forman esporas y se caracterizan por formar una parte importante de la flora bacteriana humana normal. Podemos encontrarlas usualmente en la boca, el tracto gastrointestinal (GI) y el tracto genitourinario femenino. Microscópicamente estas bacterias se presentan como bastoncillos no móviles, finas y de longitud variable. La mayoría de las especies de lactobacilos son anaerobios facultativos que crecen en presencia o ausencia de oxígeno. El principal producto metabólico final de los lactobacilos durante la fermentación de la glucosa es el ácido láctico. En la industria de alimentos los productos fermentados por estas bacterias presentan un descenso del pH debido a la producción del ácido láctico que inhibe el crecimiento de bacterias putrefactivas y patógenas. Además, estos organismos también aumentan el valor nutricional de los alimentos fermentados, debido a que las bacterias productoras de ácido láctico contribuyen a la producción de aminoácidos esenciales y vitaminas, así como una mayor biodisponibilidad de minerales (Slover & Danziger, 2008).

Las especies de lactobacilos aisladas del tracto gastrointestinal incluyen a *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. salivarius*. Actualmente, se han identificado más de 70 especies diferentes de *Lactobacillus* (Slover & Danziger, 2008).

#### II.7.2.1.1 *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* pertenece al género *Lactobacillus* que es el género más grande de la familia de las *Lactobacillaceae*, son bacterias grampositivas, con forma de bastoncillos, facultativamente anaerobias o microaerofílicas, no formadoras de esporas, tolerantes a los ácidos y catalasa negativas con un contenido de ADN G+C que suele ser inferior al 50 mol %. El grupo de *Lactobacillus casei* se divide en tres especies heterofermentativas facultativas relacionadas desde el punto de vista genotípico y fenotípico, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, las cuales están estrechamente relacionadas y son heterofermentativas facultativas, tienen un contenido de 45-47 mol % de ADN G+C y tienen tipos de peptidoglicanos idénticos (L-Lys-DAsp). Las cepas probióticas más conocidas de este grupo como, por ejemplo: *L. casei* cepa *Shirota* y *L. rhamnosus* GG se usan en todo el mundo en productos lácteos fermentados, en suplementos alimenticios o como probióticos para mejorar la salud y aportar beneficios al huésped (Huang y col., 2018).

*Lactobacillus casei* actúa como probiótico, es decir, son bacterias con beneficios asociados a la salud, solo si se administran en cantidades adecuadas. Algunas de las aplicaciones más prometedoras para el grupo de *Lactobacillus casei* es la capacidad de algunas cepas que ayudan a mantener una microbiota sana, además de que podrían emplearse con fines profilácticos o terapéuticos en una serie de enfermedades relacionadas con alteraciones de la microbiota intestinal. *Lactobacillus casei* tiene un gran potencial y puede utilizarse en el campo de los nuevos alimentos funcionales y en el desarrollo de fármacos (Hill y col., 2018).

En general, *Lactobacillus casei* es una bacteria con muchas características que pueden ser aplicadas en varios campos de investigación, sin embargo, su uso como probiótico en alimentos provee beneficios importantes en el cuerpo humano como mejorar la microbiota y aumentar la salud intestinal.

### II.8 Fermentación

El término “fermentación” es un proceso que consiste básicamente en la producción de cambios químicos en un sustrato orgánico, esto como resultado de la acción de

enzimas microbianas, obteniéndose como producto burbujas de dióxido de carbono. Sin embargo, la fermentación tiene un significado distinto tanto para la bioquímica como para la microbiología industrial. En bioquímica, se define fermentación como el proceso mediante el cual se obtiene energía a partir del catabolismo de compuestos orgánicos, es decir, un proceso de generación de energía en el que los compuestos orgánicos pueden actuar tanto como donantes de electrones como aceptores terminales de electrones, por ejemplo: en el proceso del catabolismo del azúcar que consiste en un proceso oxidativo en condiciones aerobias, la reoxidación del nucleótido de piridina reducido se produce por transferencia de electrones mientras que en condiciones anaerobias la oxidación del nucleótido de piridina reducido se acopla a la reducción de un compuesto orgánico. Por otro lado, en la microbiología industrial se define fermentación al proceso de producción de cualquier producto mediante el cultivo masivo de un microorganismo, como por ejemplo, la producción de etanol por la acción de levaduras sobre extractos de malta o de frutas que se realiza a gran escala (Stanbury y col., 2017).

Existen cinco grandes grupos de fermentaciones de importancia comercial a nivel mundial que consisten en: 1) Las que producen células microbianas (o biomasa) como producto. 2) Las que producen enzimas microbianas. 3) Los que producen metabolitos microbianos. 4) Las que producen productos recombinantes. 5) Las que modifican un compuesto que se añade a la fermentación (el proceso de transformación) (Stanbury y col., 2017). Sin embargo, los dos procesos de mayor importancia e investigación son la fermentación alcohólica y la fermentación láctica. La fermentación láctica consiste en la transformación del ácido pirúvico de la glucólisis a ácido láctico. En este tipo de fermentación intervienen normalmente un grupo de bacterias conocidas como bacterias ácido lácticas (BAL) que son las responsables de muchas de las transformaciones microbianas que se encuentran en los productos alimenticios fermentados más comunes. Este grupo se compone de varios géneros entre los que se incluyen *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* y son las encargadas de producir ácido láctico como principal producto final (Leroy & De Vuyst, 2004).

Los alimentos fermentados están relacionados con diversos beneficios a la salud, ya que, muchos de estos productos contienen probióticos vivos y tienen propiedades nutricionales mejoradas debido a la síntesis de bioactivos y una mayor biodisponibilidad (Knorr & Augustin, 2021).

Por otro lado, estudios clínicos han demostrado que el consumo de alimentos fermentados puede disminuir el riesgo de enfermedades como diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedades cardíacas, así como mantener un mejor control del peso y de la salud intestinal (Shiferaw & Augustin, 2019).

#### II.8.1 Alimentos fermentados a base de plantas

Los alimentos fermentados son aquellos que han sido alterados fisicoquímicamente por actividades microbianas realizadas en un ambiente regulado. A partir de estas alteraciones, se mejoran las propiedades que promueven la salud que de otro modo sería inaccesible en el alimento en su estado original. Los principales beneficios que aportan los alimentos fermentados van desde un aumento en la biodisponibilidad nutricional, la seguridad, la calidad sensorial y los nutrientes, hasta una disminución en la producción de sustancias nocivas como antinutrientes y toxinas. En los últimos años, debido a la gran demanda por productos alternativos, así como el aumento en la popularidad de los alimentos fermentados debido a los beneficios aportados a la salud, la comercialización de estos productos se ha incrementado a nivel mundial (Rahim y col., 2023).

#### II.9 Efectos del ultrasonido en alimentos

Los principales efectos del ultrasonido en la industria alimentaria van desde lograr la seguridad microbiana, hasta mejorar la calidad nutricional y sensorial del producto final. El ultrasonido tiene un gran impacto sobre las características organolépticas de los productos alimenticios, como el color, olor, textura, así como la retención de compuestos bioactivos, la disminución de residuos de pesticidas o de alérgenos en las frutas, vegetales y leche. Las mejores condiciones para la aplicación de los ultrasonidos se basan en regulación de la frecuencia, la densidad de la energía acústica, el tiempo de tratamiento, la matriz alimentaria y la temperatura, ya que, a

partir de esto pueden surgir efectos adversos o beneficiosos en la calidad y seguridad de los alimentos (Yuan y col., 2021).

El ultrasonido, también se le conoce como cavitación acústica por sus efectos físicos. Debido a que produce cambios en las matrices alimentarias mediante el crecimiento y colapso de microburbujas como se observa en la Figura 1, que a su vez causan temperaturas incrementales localizadas, turbulencias, ondas de choque y presiones (Sarangapany y col., 2022).

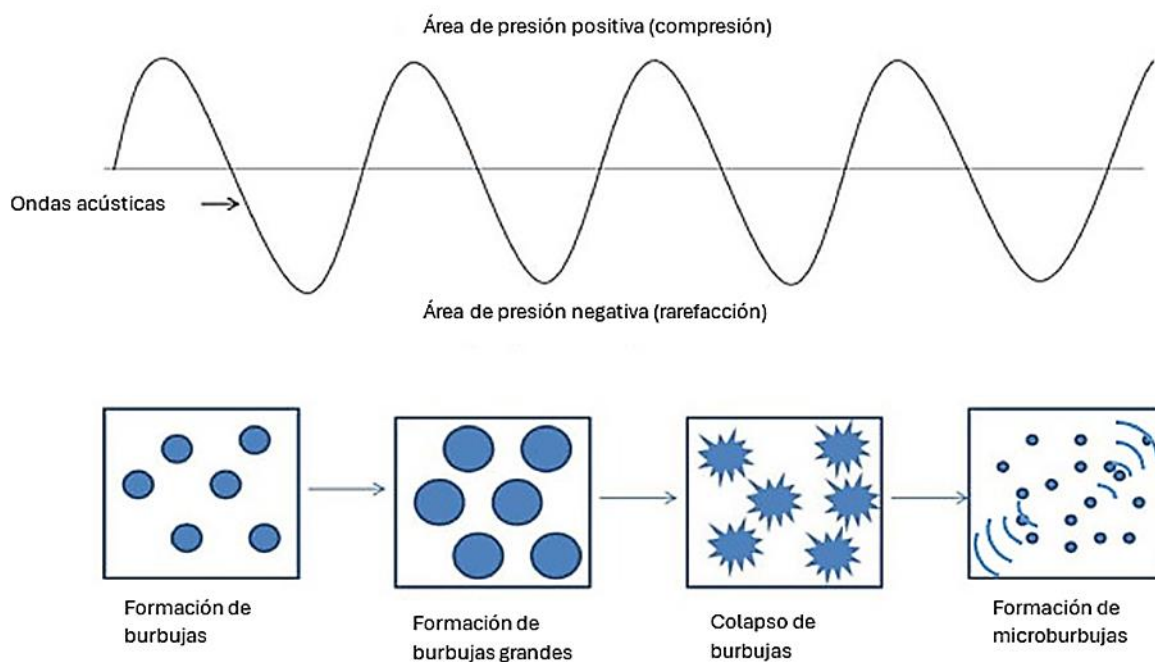


Figura 1. El principio del efecto de cavitación (Sarangapany y col., 2022).

En la Figura 2 se presentan dos tipos distintos de equipos donde (A) es un sonotrodo y (B) es un baño de agua ultrasónico que se utilizan principalmente para la aplicación de ultrasonidos.

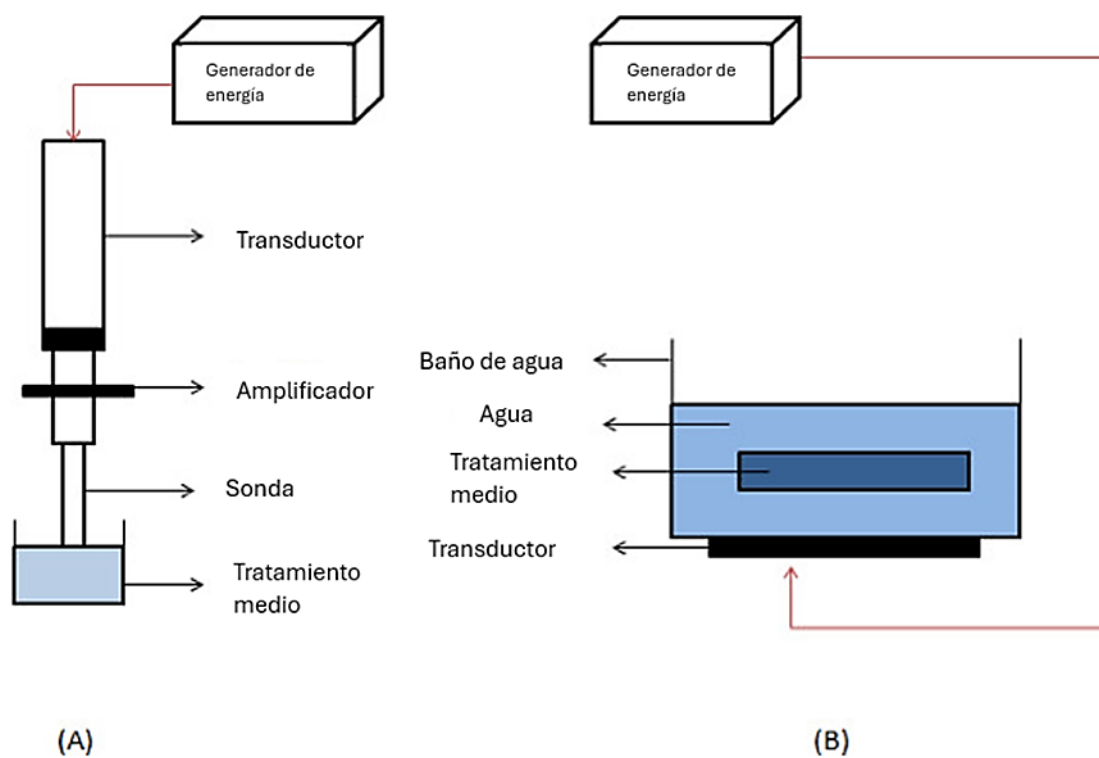


Figura 2. Sistemas de ultrasonido (Sarangapany y col., 2022).

En el Cuadro 3 se muestran las principales aplicaciones del ultrasonido en la industria alimentaria.



Cuadro 3. Aplicación de ultrasonido en la industria alimentaria (Yuan y col., 2021).

Aplicaciones	Productos	Ventajas
Extracción	Aromas, polifenoles, minerales.	Disminuye el tiempo, se obtienen mayores rendimientos y se utilizan menores temperaturas que conservan mejor algunos compuestos termosensibles.
Emulsificación	Emulsiones (Kétchup, mayonesa, etc.)	Disminuye el tiempo de procesamiento, se obtiene una mejor estabilidad en el producto.
Fermentación	Yogurt, vino, leche, productos lácteos.	Disminuye el tiempo de procesamiento, mejora las propiedades reológicas, mejora la calidad organoléptica de los productos.
Inactivación enzimática y microbiana	Leche, vegetales, frutas.	Mejora la calidad organoléptica de los productos, aumenta la retención de sustancias bioactivas dentro del producto.
Congelación / cristalización	Carne, vegetales, frutas, productos lácteos.	Mejora la estabilidad, disminuye el tiempo, produce cristales más pequeños, mejora la difusión, desciende rápidamente la temperatura.
Marinado	Vegetales, carne, pescado, queso.	Disminuye el tiempo, mejora la calidad organoléptica de los productos, el producto aumenta su estabilidad.

### II.9.1 Efecto del ultrasonido en bebidas de origen vegetal

El efecto del ultrasonido en las propiedades físicas de los productos bebibles a base de plantas ha sido reportado por Maghsoudlou y col. (2016), quienes revelaron que la leche de almendra adicionada con aditivos, almidón modificado, lecitina y agar, usando un tratamiento de ultrasonido a 20 kHz y 300 W disminuía el valor de Brix en las muestras a comparación de las muestras no ultrasonificadas. Esto se correlacionó con el aumento del tiempo de sonicación y se atribuyó a la disrupción de las paredes celulares y a la hidrólisis de los polisacáridos, es decir, almidones modificados, por las fuerzas de cizallamiento de los ultrasonidos causadas por la cavitación acústica.

Una de las propiedades más importantes en la formulación de un producto bebible a base de plantas es mantener su estabilidad, ya que, determina la aceptación sensorial de las alternativas de leches vegetales, no lácteas en el mercado. Maghsoudlou y col. (2016), utilizaron un tratamiento de ultrasonificación en muestras de leche de almendra en donde la sedimentación de la partícula se redujo con el aumento del tiempo de tratamiento debido al elevado efecto de cizallamiento que se produjo durante la cavitación, que fragmentó las moléculas de pectina coloidal en partículas mucho más pequeñas, lo que a su vez contribuyó a la estabilización del sistema coloidal.

Las emulsiones surgen al combinar dos o más líquidos insolubles, uno de los cuales se dispersa se denomina fase dispersa, en el otro, la fase continua en forma de gotitas muy diminutas. Muchos estudios han reportado que la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad es energéticamente más eficiente que cualquier otro método de emulsificación convencional y moderno. Los impactos físicos de los ultrasonidos causados por la cavitación acústica pueden aumentar la ruptura de las gotas de aceite, lo que facilita la creación de emulsiones estables de aceite en agua con tamaños de gota pequeños (Sarangapany y col., 2022).

Salve y col. (2019), reportaron el efecto de la ultrasonificación en el tamaño de partícula en muestras de extractos de maní. Los resultados mostraron que la

cavitación ultrasónica de alta intensidad disminuyó el tamaño de los glóbulos de grasa, causando la fragmentación de partículas, generándose una matriz bien definida con partículas suspendidas más pequeñas que condujeron a una menor sedimentación en comparación con la sedimentación observada en muestras no ultrasonificadas con partículas de mayor tamaño.

## II.10 Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica emergente que consiste principalmente en la protección de diferentes componentes de alimentos o constituyentes funcionales, contra diversas condiciones y que permite su liberación controlada dependiendo el propósito por el cual se quiera liberar. Puede definirse como un proceso fisicoquímico o mecánico que atrapa una sustancia o “agente activo” en un material adecuado para producir partículas esféricas con una membrana semipermeable delgada pero fuerte que puede ser de varios milímetros, micrómetros o nanómetros (Frakolaki y col., 2020).

Además, esta técnica mejora la calidad sensorial al enmascarar algunos sabores u olores desagradables, así como, aumenta la seguridad alimentaria al inhibir el crecimiento de los microorganismos. Se utilizan distintos materiales de encapsulación respecto a las propiedades reológicas que se busquen en el producto final, su capacidad para dispersar el compuesto activo y estabilizarlo, su inercia hacia el compuesto activo y su capacidad para retener adecuadamente el compuesto activo. Algunos materiales que se utilizan para el recubrimiento incluyen carbohidratos tales como almidón, maltodextrina, almidón modificado, ciclodextrina, y celulosa; lípidos como la cera, parafina, cera de abejas, diacilglicerol; gomas como la goma arábiga, agar, carragenina y proteínas como gluten, caseína y gelatina (Choudhury, 2021).

El material encapsulante recibe también el nombre de revestimiento, membrana, cubierta, cápsula, material portador, fase externa o matriz. Se utilizan distintas técnicas de encapsulación como secado por aspersión, liofilización, coacervación, extrusión, etc. Estas técnicas conducen a diferencias en las propiedades de las

cápsulas, como el tamaño de la cápsula, la morfología, la porosidad, la higroscopicidad, la hidrofobicidad, la tensión superficial y el comportamiento térmico, por esta razón, es importante conocer las propiedades del material encapsulante, así como elegir el método adecuado para lograr el comportamiento deseado dentro del producto alimentario final (Frakolaki y col., 2020).

#### II.10.1 Microencapsulación de probióticos

La microencapsulación tiene una gran variedad de aplicaciones dentro de la industria de alimentos, sin embargo, una de las aplicaciones que ha tenido un mayor impacto en los últimos años es la microencapsulación de los probióticos. Varios estudios han reportado que las condiciones bajo las que se deben microencapsular estos microorganismos son con temperaturas relativamente bajas, con un pH moderado y bajos niveles de oxígeno. Asimismo, la agitación debe ser controlada y el tamaño de las microcápsulas debe ajustarse para proteger a las bacterias y evitar los efectos sensoriales negativos en caso de obtener una textura gruesa. Independientemente del método de microencapsulación que se utilice, el mecanismo de liberación de los probióticos va a depender de la tecnología y de los materiales de pared utilizados y de factores como: alteraciones del pH, agentes quelantes y acción enzimática (Frakolaki y col., 2020).

Los beneficios de utilizar microcápsulas para encapsular los probióticos son: 1) Que pueden crear una barrera física que proteja a los probióticos del entorno fisiológico como de ácidos gástricos, las sales biliares o las enzimas digestivas, 2) Pueden coencapsular los probióticos con nutrientes específicos que los ayuden a sobrevivir como carbohidratos digeribles, fibras dietéticas, proteínas, lípidos o minerales, 3) Pueden contener aditivos que proporcionan un ambiente favorable para los probióticos, como antiácidos para controlar el pH local, y 4) Pueden estar diseñadas para atrapar componentes específicos excretados por los probióticos que los benefician en su supervivencia (Yao y col., 2020).

En la Figura 3 se muestran los rangos de tamaño de partícula de cápsulas producidos con diferentes técnicas de microencapsulación.

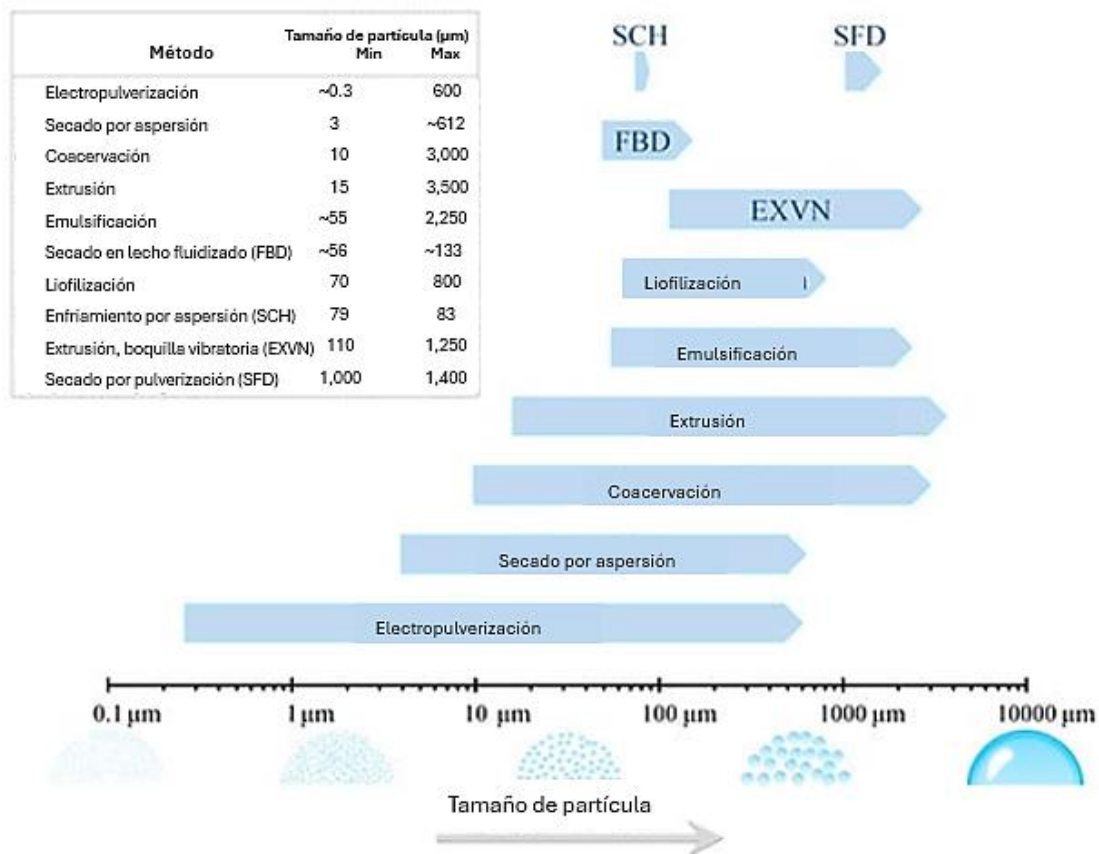


Figura 3. Rangos de tamaño de partícula de cápsulas obtenidas con diversas técnicas de microencapsulación (Pech-Canul y col., 2020).

#### II.10.1.1 Secado por aspersión

La técnica de microencapsulación llamada secado por aspersión, aunque también conocida como secado por pulverización, es una de las técnicas más utilizadas en la industria. Consiste principalmente en la combinación de transferencia de masa y calor del aire a las gotitas atomizadas y viceversa. El procedimiento consta de tres pasos indispensables: 1) una emulsión o dispersión en una solución acuosa de un material portador, 2) la atomización de la mezcla líquida pasa a través de una boquilla o rueda giratoria y 3) su evaporación mediante el contacto con aire caliente o gas. Se utilizan diversos materiales encapsulantes que se encargan de encapsular al material activo o de interés y se comporta como un agente protector bajo condiciones adversas (Frakolaki y col., 2020).

Los aspectos que pueden afectar la eficiencia del método son las características de operación del secador (temperatura, tiempo de secado, tipo de atomización), las características del alimento (matriz alimentaria y su concentración, tipo de estrés aplicado: osmótico, oxidativo o mecánico), las condiciones operativas (temperatura de secado y velocidad de alimentación) y las condiciones de almacenamiento. Una de sus principales ventajas es que es el método más económico, alrededor de 10 veces más económico que la liofilización, y consta de un solo proceso unitario, además, se obtienen productos secos, estables y con una baja densidad aparente. Este método tiene una tasa elevada de producción y una gran cantidad de materiales encapsulantes disponibles para secar y el secador es fácil de operar (Frakolaki y col., 2020).

## II.10.2 Materiales microencapsulantes para probióticos

### II.10.2.1 Goma de algarrobo

La goma de algarrobo (LBG) es un polisacárido de galactomanano no iónico de alto peso molecular, extraído de las semillas de *Ceratonia Siliqua*, es estructural y químicamente similar a la goma guar, aunque muestra diferencias significativas. Debido a que LBG no posee funciones ionizables, la solubilización depende de la cantidad de enlaces de hidrógeno y la calidad del solvente, así como de sus unidades ramificadas de galactosa que poseen dos funciones principales: solubilización y antiagregación del polisacárido (Petitjean & Isasi, 2022).

En la industria, la goma de algarrobo y el alginato forman un complejo interpenetrado, útil en la administración de fármacos debido a su comportamiento de hinchazón y control de la liberación de fármacos. Esta matriz generalmente se prepara mediante la técnica de gelificación ionotrópica, utilizando la coacervación de alginato, que produce perlas comestibles a partir de materias primas naturales (Petitjean y col., 2022). Esta técnica se ha empleado también en la encapsulación de polifenoles de té (Petitjean y col., 2022). Goral y col. (2018), realizaron un estudio sobre LBG mezclado con inulina en la producción de un helado a base de extracto de coco. Una mayor proporción de inulina sobre LBG produjo una mejor textura y

un helado de buen gusto. Se han publicado numerosas patentes de mezclas de LBG con goma garrofín, polisacáridos variados y proteínas, en su mayoría para la elaboración de salsas u otras recetas alimenticias (Petitjean y col., 2022).

#### II.10.2.2 Goma guar

La goma guar (GUG) es otro polisacárido natural no iónico que se deriva de las semillas de la planta guar *Cyanopsis tetragonolobus*. Es un galactomanano, hablando químicamente, cuya estructura consiste en un esqueleto de unidades de D-manosa con enlaces  $\beta$ -1,4 y con cadenas laterales de unidades individuales dispersas de D-galactosa con enlaces  $\alpha$ -1,6. Recientemente se ha descrito como un material de recubrimiento para la microencapsulación de probióticos (Pech-Canul y col., 2020).

En un estudio reciente por Muzzafar & Sharma. (2018), realizaron la microencapsulación de un cultivo mixto de tres probióticos (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *B. longum*) usando goma guar y goma xantana como materiales de recubrimiento que se incorporaron posteriormente con éxito en galletas de crema en forma de microcápsulas con el objetivo de desarrollar un alimento probiótico funcional. Además de la viabilidad probiótica mejorada durante el almacenamiento del producto, encontraron que la incorporación de microcápsulas probióticas no afectó el gusto y el sabor de los productos finales.

#### II.10.2.3 Alginato

Los alginatos son polisacáridos naturales que se obtienen de algas marinas, compuestos por dos unidades monoméricas, ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G). El alginato tiene la capacidad de formar una estructura reticulada cuando entra en contacto con cationes divalentes (p. ej.,  $\text{Ca}^{2+}$ ) y se cree que solo los bloques G en las cadenas de alginato participan en la reticulación intermolecular con cationes divalentes para formar hidrogeles (Liu y col., 2020).

Las perlas de alginato con probióticos que se pueden producir se obtienen mediante las técnicas de extrusión o microencapsulación en emulsión. La técnica de

microencapsulación por extrusión se realiza con una jeringa que contiene una solución de alginato con la bacteria probiótica y, por medio de la extrusión, la suspensión celular se deja caer sobre una solución de  $\text{CaCl}_2$  endurecedora. Normalmente, las perlas de alginato se reducirán cuando se expongan en condiciones de ácido gástrico y colapsarán cuando se coloquen en condiciones intestinales. Este tipo de mecanismo producido por las perlas de alginato se ha utilizado para producir sistemas de partículas de liberación sostenida o controlada para una variedad de probióticos, fármacos y proteínas (Liu y col., 2020).

La microencapsulación de probióticos con alginato se ha utilizado en varios estudios para evaluar la supervivencia de probióticos en el almacenamiento. Valero-Cases y Frutos (2015), estudiaron la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* encapsulado con alginato utilizando la técnica de extrusión y emulsión y analizaron el efecto del tiempo de almacenamiento, así como la supervivencia durante la digestión gastrointestinal in vitro. Encontraron que después de 15 días de almacenamiento, las cápsulas más grandes preparadas por el método de extrusión resistieron mejor que las cápsulas preparadas por el método de emulsión durante las condiciones adversas del entorno gastrointestinal.

#### II.10.2.4 Proteína de suero

Las proteínas de suero se encuentran disponibles comercialmente como concentrados (WPC) y aislados (WPI) que contienen alrededor de 35 – 85 % y > 95 % de proteína, respectivamente. Los WPC se caracterizan por un bajo contenido de grasas y colesterol, y altos niveles de lactosa y lípidos totales, mientras que los WPI tienen un alto contenido de proteínas y una baja concentración de lactosa y lípidos (Liu y col., 2020).

Gómez-Mascaraque y col. (2016) realizaron la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* dentro de una matriz de proteína de suero por medio de la técnica de electropulverización con potencial para la protección de los probióticos. Los resultados mostraron que se lograron pérdidas de viabilidad inferiores a 1 log CFU/g de modo que las muestras finales tenían recuentos bacterianos medios en el rango



de 8.7-9.3 log CFU/g, es decir, las microcápsulas conferían a *L. plantarum* una protección adicional frente a la digestión *in-vitro*.

#### II.10.2.5 Almidón

El almidón es un polvo blanco y suave producido por las plantas, que se compone principalmente de dos polisacáridos de D-glucosa diferentes: la amilosa lineal y la amilopectina altamente ramificada. La estructura de la amilosa consta de moléculas lineales con unidades de D-glucosa unidas a  $\alpha$ -(1,4) que dan una estructura helicoidal, mientras que la estructura de la amilopectina consiste en una cadena central de unidades de D-glucosa unidas a  $\alpha$ -(1,4), que está unida aleatoriamente con cadenas laterales de unidades de D-glucosa unidas a  $\alpha$ -(1,6) (Pech-Canul y col., 2020).

Las películas de almidón son inodoras, insípidas, incoloras, no tóxicas y semipermeables al dióxido de carbono, la humedad, el oxígeno, así como a los componentes lipídicos y de sabor, esto las hace adecuadas para utilizarse como material de recubrimiento en la microencapsulación de probióticos. En este sentido, Baltrusch y col. (2022), evaluaron la administración de biopolímeros como agentes de recubrimiento en los rendimientos finales del producto, capacidad antioxidante, estabilidad y la microestructura. Los materiales de microencapsulación que utilizaron consistieron en almidón, carragenina y alginato para estabilizar y proteger los bioactivos del té a través de la técnica de secado por aspersión. Los rendimientos del producto variaron del 55 al 58 %. Se lograron altas eficiencias de microencapsulación y carga (60–93 % y 65–84 %, respectivamente).

#### II.10.2.6 Pectina

La pectina es un polisacárido aniónico extraído de las paredes celulares de las plantas y que está compuesto por secuencias largas de ácido  $\alpha$ -D-galactosilurónico parcialmente esterificado con metilo (1→4). De forma similar al alginato, la pectina se asocia cadena a cadena y forma hidrogeles al agregar cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$ . La técnica de microencapsulación que utiliza pectina como material de pared para encapsular bacterias probióticas es similar a la del alginato, que es una técnica

de extrusión y emulsión. Sin embargo, se ha reportado que las perlas hechas con pectina son más resistentes a los entornos gástrico e intestinal. En la literatura hay menos información sobre el uso de la microencapsulación a base de pectina para su aplicación en bacterias probióticas y en los alimentos, sin embargo, algunas investigaciones han demostrado su superioridad (Liu y col., 2020).

Nuakhaekul y col. (2013), compararon perlas de alginato y pectina para mejorar la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 y *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809 durante 4 semanas de almacenamiento y encontraron que ambas perlas mejoraron considerablemente la supervivencia celular. Los resultados para *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 no mostraron diferencias en la viabilidad celular entre perlas de alginato y pectina, sin embargo, para *Bifobacterium longum* NCIMB 8809, la protección de las perlas de pectina fue mucho mayor que la de las perlas de alginato.

### **III. HIPÓTESIS**

La ultrasonificación de alta intensidad a 20 kHz y 500 W incrementará la estabilidad y propiedades fisicoquímicas del extracto fermentado a base de almendras, adicionado de probióticos, durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Evaluación del efecto de ultrasonificación de extracto de almendra en las propiedades fisicoquímicas, reológicas y de estabilidad de un producto fermentado adicionado del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 334.

### IV.2 Específicos

- Evaluar el efecto de ultrasonificación a diferentes amplitudes en extractos de almendra en la estabilidad física, propiedades fisicoquímicas y viabilidad de *L. casei* ATCC 334 libre.
- Determinar la cinética de crecimiento del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 334 libre y encapsulado en el producto fermentado de almendra seleccionado y su sobrevivencia en el almacenamiento en refrigeración y en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.
- Determinar la viscosidad aparente en los productos fermentados de almendra.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

La harina de almendra se obtuvo de un mercado agrícola (Querétaro, México). Fluoresceína disódica, AAPH, Trolox, Fosfato de potasio dibásico, ABTS, persulfato de potasio, etanol, peptona de caseína, cloruro de sodio, agar MRS, caldo MRS, agua destilada, cloruro de potasio, cloruro de calcio, bicarbonato de sodio, pepsina, pancreatina, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La goma algarrobo fue proporcionada por Kerry Inc. Se utilizó almidón alto en amilosa (Cargill, Qro., México) fosfatado mediante el método convencional como material encapsulante de un trabajo previo del grupo de trabajo e inulina de agave proporcionada por la empresa Granotec (Qro., México), así como aislado de proteína de leche (Granotec, Qro., México). Se utilizó el antibiótico vancomicina comercial (Vitalis, Qro., México). Se utilizaron cultivos iniciadores de la marca YO-PROX 753 (Bioprox, Qro., México) (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*). Se utilizó el cultivo probiótico de colección *Lactobacillus casei* ATCC 334. El resto de los reactivos químicos a utilizar fueron grado reactivo a menos que se especificara lo contrario.

### V.2 Métodos

#### V.2.1 Preparación de materiales encapsulantes

El almidón alto en amilosa por método convencional se llevó a cabo en una suspensión de almidón de acuerdo con el método propuesto por Paschall (1964) con modificaciones. A una suspensión de almidón (56 g/100 ml de agua destilada) se le adicionaron 2.5 g de trimetafosfato de sodio (STMP) por 100 g de almidón en base seca y se ajustó el pH a 8.0 utilizando una solución de NaOH al 5 %. La suspensión fue colocada hasta sequedad a 45 °C en horno de convección y posteriormente fue sometido a 130 °C durante dos horas. Las muestras fueron molidas en un molino de cuchillas eléctrico marca Krups (modelo 6X410011, Qro., México). Posteriormente el polvo fue cribado en una malla con apertura de 180 µm y almacenado a temperatura ambiente en una bolsa de polietileno.

### V.2.2 Microencapsulación de *Lactobacillus casei* ATCC 334 mediante secado por aspersión

Se prepararon suspensiones acuosas del material encapsulante con un contenido de sólidos del 10 % (p/v). *L. casei* ATCC 334 fue encapsulado en matrices de almidón alto en amilosa fosfatado en una proporción de 90 % (p/v) de sólidos y un 10 % (p/v) de inulina de agave y por otro lado en una matriz de aislado de proteína de suero. Las soluciones se homogeneizaron durante 5 min en un homogeneizador (Turrax, T25-J, Qro., México) a velocidad media (6,000 rpm). Se ajustó el pH a 7.0 con una solución estéril de NaOH al 5 %. Las suspensiones fueron calentadas a baño María (Termobañero Felisa, Qro., México) durante 10 min a 80 °C. En cada suspensión del material matriz se dispersaron aproximadamente  $10^9$  UFC/mL de células del probiótico. La concentración de células se cuantificó en la suspensión antes de la microencapsulación por secado por aspersión. La microencapsulación se llevó a cabo en un secador por aspersión de laboratorio marca Büchi (Modelo B-290, Suiza). Las condiciones de operación del secador fueron 150 °C de aire de entrada, 56-60 °C aire de salida, aspiración del 90 % y velocidad de alimentación de 25 %. La boquilla de atomización fue de 0.7 mm de diámetro. Las cápsulas fueron recuperadas del vaso colector del producto del secador con una espátula estéril y fueron almacenadas en frascos de vidrio estériles cerrados.

### V.2.3 Activación y conteo de *Lactobacillus casei*

El cultivo liofilizado de *Lactobacillus casei* ATCC 334 se activó mediante dos transferencias sucesivas en 3 mL de caldo MRS a 37 °C por 24 h. El conteo de células se realizó por medio del método de siembra de extensión por superficie en agar MRS. Se llevaron a cabo diluciones decimales de las muestras en una solución de peptona al 0.1 %. Las cajas sembradas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Para el conteo de células de *L. casei* adicionadas en el extracto de almendra, el agar MRS se adicionó con 5 mg/L de vancomicina, posterior a la esterilización del medio, una vez que se alcanzó una temperatura inferior a los 40 °C (MRS-V).

## V.2.4 Formulación del fermentado de almendra

### V.2.4.1 Elaboración del extracto de almendra

La harina de almendra (500 g) se disolvió en 4500 mL de agua destilada y se calentó hasta alcanzar una temperatura de 80 °C. Posteriormente, se mezcló con un turbolicuador modelo TR-270 (Torrey, México) por 5 min, y se filtró a través de una malla para poder obtener los sólidos residuales de harina de almendra. Se agregó 0.05 % (p/v) de goma de algarrobo. Finalmente, se calentó hasta llegar nuevamente a 80 °C para evitar el crecimiento bacteriano, y el extracto de almendras se conservó en refrigeración a 4 °C para su posterior análisis y uso.

### V.2.4.2 Elaboración del fermentado de almendra

Se inoculó la cepa activada de *L. casei* en 40 mL de caldo MRS, se incubó a 37 °C por 24 horas y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. Posteriormente, las bacterias se lavaron con agua salina al 0.1 % y se traspasaron a las muestras de extracto de almendra ultrasonificadas en frascos de vidrio individuales de 100 mL estériles, cerrados herméticamente, en una concentración aproximada de  $1 \times 10^8$  UFC/g. Se agregaron 10 mL de cultivo láctico iniciador YO-PROX 753. Los extractos de almendra se fermentaron hasta alcanzar un pH de 5.0. En un tratamiento adicional se adicionaron 1 g cápsulas con las bacterias probióticas /100 g de extracto de almendra.

## V.2.5 Tratamiento ultrasónico

El extracto de almendra se trató con un equipo ultrasónico modelo AO-04711-50 (Cole-Parmer, USA) a 500 W y una frecuencia constante de 20 kHz, con amplitudes del 40 % y 80 %. Se utilizaron 100 mL de extracto de almendra para cada muestra en períodos de tiempo de 5 min y se ultrasonificó con una sonda de 13 mm.

## V.2.6 Propiedades físicas

### V.2.6.1 Medición de grados Brix

Los sólidos solubles totales (°Brix) de las muestras tratadas con ultrasonido se determinaron de acuerdo con el método AOAC (2000) a temperatura ambiente (25 °C ± 1) con un refractómetro modelo HI96801 (Hanna, Qro., México) y se expresaron como °Brix.

### V.2.6.2 Estabilidad física

Para evaluar la estabilidad de los extractos fermentados de almendra, se adicionaron 100 mL del extracto en frascos de vidrio individuales y se almacenaron a 4 °C. Después de 10 días de almacenamiento, se midió la capa de precipitado (volumen), de estar presente, y se calculó el porcentaje de separación (v/v).

## V.2.7 Propiedades químicas

### V.2.7.1 Medición de la acidez titulable y el pH

La acidez titulable y pH fueron determinados en muestras de 10 mL. Para % acidez se llevó a cabo una titulación utilizando 0.3 mL de fenolftaleína como indicador y NaOH 0.1 N como titulante siguiendo lo establecido por la NOM-185-SSAI-2002 y se expresó en % de acidez, como se especifica en la siguiente ecuación (1):

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V \times N \times 9}{M} \quad (1)$$

Donde

V = Volumen gastado de hidróxido de sodio (mL)

N = Normalidad del hidróxido de sodio (Eq/L)

M = Masa de la muestra (g)



#### V.2.8 Viscosidad aparente

La viscosidad aparente del extracto fermentado, previamente equilibrado a 25 °C se midió de acuerdo con lo descrito por Bancalari y col. (2020), por medio de un viscosímetro digital DV2T (Brookfield, Wisconsin, EE. UU.) equipado con un husillo A1. La temperatura se mantuvo a  $25.0 \pm 0.5$  °C.

#### V.2.9 Análisis microbiológico

##### V.2.9.1 Cinética de crecimiento

El tiempo cero de la cinética de crecimiento fue tomado posteriormente a la inoculación del medio de crecimiento en los extractos de almendra previamente tratados con el ultrasonido. Se consideró el tiempo desde que inició la fermentación de las muestras de extracto de almendra hasta llegar a un pH de 4.5 – 5.0. Se realizaron conteos bacterianos tomando 1 mL de cada frasco de vidrio con el extracto fermentado de almendra y diluciones seriadas en tubos de ensayo con 9 mL de peptona de caseína. Las diluciones 7 y 8, se sembraron en agar MRS utilizando la técnica de extensión en placa. Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron a  $37 \pm 1$  °C en aerobiosis durante 48 h. Los resultados se expresaron en Log<sub>10</sub> UFC/mL. Los recuentos bacterianos se analizaron en un contador de colonias. Los medios utilizados para el conteo de iniciadores fueron agar M17 para *Streptococcus thermophilus* y agar MRS pH 5.0 para *Lactobacillus bulgaricus*. Los probióticos libres y encapsulados fueron cuantificados en agar MRS-V.

##### V.2.9.2 Evaluación de la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* en muestras de extracto fermentado de almendra almacenadas a 4 °C.

Las muestras de extracto fermentado de almendra fueron almacenadas en frascos de vidrio estériles de 100 mL con tapa de aluminio, herméticamente cerrados a una temperatura de refrigeración de 4 °C. Se determinó la viabilidad de las células iniciadoras y el probiótico libre y microencapsulado en las muestras inoculadas a las 24 horas de su elaboración, a los 7 días, 14 y 21 días de almacenamiento, mediante la técnica de extensión en superficie.

#### V.2.10 Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI) *in-vitro*.

A los 28 días de almacenamiento, se evaluó *in vitro* la supervivencia de los probióticos en el fermentado de almendra en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal como lo describe Fernández de Palencia y col. (2008) con algunas modificaciones.

Para simular las condiciones gástricas se adicionaron 3 g de muestra de fermentado de almendra con 3 mL de saliva artificial y se realizó la cuenta viable de los microorganismos probióticos (TG0); posteriormente se adicionaron 24 mL de jugo gástrico simulado a pH 5, se homogenizaron las muestras manualmente por 1 minuto y se colocaron a 37 °C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se ajustaron las muestras a un pH 3.8 y fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se ajustó nuevamente el pH hasta llegar a 2.0 y se mantuvieron en incubación a 37 °C durante 70 minutos (TG1). Se monitoreó la cuenta viable una vez que se concluyó el tiempo de residencia en cada ajuste de pH. Posteriormente las muestras fueron expuestas a condiciones intestinales simuladas. Para ello se agregó jugo intestinal simulado recién preparado, se ajustó a pH 5.0 y se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se ajustó el pH de las muestras a 6.5 y se incubaron en las mismas condiciones durante 30 minutos (TI0). Finalmente, el pH fue ajustado a un valor de 8.0 y las muestras se incubaron durante 60 minutos (TI1).

La saliva artificial se preparó diluyendo 6.2 g de cloruro de sodio, 2.2 g de cloruro de potasio, 0.22 g de cloruro de calcio y 1.2 g de bicarbonato de sodio en 1 L de agua destilada. La mezcla fue esterilizada a 121 °C durante 15 min. Para el jugo gástrico simulado se resuspendieron 3 g de pepsina en 1 L de solución salina estéril al 0.5 % acidificada a pH 5.0 con ácido clorhídrico 0.1 M. El jugo intestinal simulado

se preparó con 1 g de pancreatina y 1.5 g de sales biliares en 1 L de solución salina al 0.5 % estéril, ajustando el pH a 5.0 con solución de NaOH 0.1 M.

#### V.2.11 Análisis bromatológicos

El total de sólidos, proteína, grasa y cenizas fueron determinados por los métodos de prueba descritos en las siguientes normas mexicanas (NMX-F-083-1986, NMX-F-068-S-1980, PROY-NMX-F-427-NORMEX-2019 y NMX-F-066-S-1978) respectivamente. La fibra dietaria total fue determinada utilizando el kit enzimático de Sigma Aldrich.

#### V.2.12 Actividad de eliminación de radicales

##### V.2.12.1 Capacidad antioxidante por el método ABTS

Se siguió la técnica descrita por Rivas-Vela y col. (2023), se mezclaron 5 mL de una solución acuosa de ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) 7 mM y 88 µL de una solución de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) 140 mM y se mantuvieron en oscuridad durante 12 h para la generación radical. Luego, se tomaron 500 µL de solución y se disolvieron en 24 mL de etanol (98 %). Se tomaron 20 µL de la muestra y se depositaron en 24 pocillos de una microplaca de 96 pocillos. Posteriormente, se agregaron 230 µL de solución ABTS a cada pocillo manteniendo la microplaca en oscuridad durante 5 minutos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Multiskan GO Microplate (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.) a una longitud de onda de 734 nm.

El % de inhibición se calculó con la siguiente ecuación (2):

$$\% \text{ inhibición de ABTS} = \left( 1 - \left( \frac{Abs \text{ muestra}}{Abs \text{ control}} \right) \right) \times 100 \quad (2)$$

En donde:

Abs muestra = es la absorbancia de la solución ABTS con la muestra.

Abs control = es la absorbancia de la solución ABTS sin la muestra.

#### V.2.12.2 Capacidad antioxidante por el método DPPH

Se siguió el método descrito por Rivas-Vela y col. (2023), las muestras se disolvieron en agua, se diluyeron a diferentes concentraciones y se agregaron (20  $\mu$ L) a una microplaca de 96 pocillos, usando etanol como blanco. Se añadieron 200  $\mu$ L de solución de DPPH (150  $\mu$ M) y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Multiskan GO Microplate (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.) a una longitud de onda de 520 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la misma ecuación (2) descrita anteriormente en el punto V.2.12.1. Los resultados se reportaron evaluando la actividad eliminadora de radicales libres de varias diluciones de las muestras.

### V.2.13 Diseño experimental

Cuadro 4. Diseño experimental

Ensayo preliminar de ultrasonificación de extractos de almendra fermentados con <i>L. casei</i> ATCC 334 libre.	
Control	Muestra sin ultrasonicar
PA40	Muestra ultrasonificada a 40A
PA80	Muestra ultrasonificada a 80A
Extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud adicionados de cultivo iniciador para yogurt y probióticos libres y encapsulados	
LCL	<i>L. casei</i> ATCC 334 libre
LCW	<i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con proteína de suero
LCI	<i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con inulina y almidón
STL	<i>S. thermophilus</i> libre y <i>L. casei</i> ATCC 334 libre
STW	<i>S. thermophilus</i> libre y <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con aislado de proteína de suero
STI	<i>S. thermophilus</i> libre y <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con almidón e inulina
LBL	<i>L. bulgaricus</i> libre y <i>L. casei</i> ATCC 334 libre
LBW	<i>L. bulgaricus</i> libre y <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con aislado de proteína de suero
LBI	<i>L. bulgaricus</i> libre y <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con almidón e inulina

#### V.2.14 Análisis estadístico

Los tratamientos fueron aleatorizados y analizados por triplicado. Se analizaron los datos de sobrevivencia de los microorganismos libres y encapsulados durante el almacenamiento y durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal mediante un análisis de varianza, comparando las medias utilizando la prueba de Tukey. Se consideró diferencia significativa cuando  $p \leq 0.05$ . Los datos fueron analizados con el programa Minitab (R) versión 17.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Comportamiento del pH y acidez titulable en los ensayos preliminares sobre el efecto del tratamiento ultrasónico en los extractos de almendra.

Los tratamientos ultrasónicos a 40 % de amplitud y 80 % de amplitud mostraron un efecto similar en el desarrollo de acidez durante la fermentación de *L. casei* ATCC 334 libres (Cuadro 5). El control (muestra sin ultrasonicar) con la cepa *L. casei* ATCC 334 mostró la mayor producción final de ácido durante la fermentación al obtener un  $0.29 \pm 0.01$  % de acidez titulable. Los tratamientos de PA40 y PA80 obtuvieron resultados similares de % de acidez final de  $0.22 \pm 0.015$  %.

No se observaron diferencias significativas entre los valores finales de pH de los diferentes tratamientos al término de la fermentación (Cuadro 5), de  $4.51 \pm 0.15$ ,  $4.83 \pm 0.05$  y  $4.67 \pm 0.23$  registrados para el control, tratamientos PA40 y PA80, respectivamente. La temperatura de incubación fue de 37 °C durante las primeras 6 y después fueron dejadas a temperatura ambiente ( $24 \pm 1$  °C) hasta las 22 horas de fermentación debido a un corte de electricidad en el laboratorio.

Cuadro 5. pH y % acidez de las muestras preliminares de los extractos de almendra fermentados por *L. casei* ATCC 334.

Muestra	Tiempo de fermentación	pH	Acidez (%) <sup>*</sup>
Muestra sin ultrasonicar con <i>L. casei</i> ATCC 334 libre (C)	0 horas	6.81 ± 0.04 <sup>B</sup>	0.07 ± 0.0 <sup>A</sup>
	3 horas	6.16 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.08 ± 0.0 <sup>A</sup>
	6 horas	5.79 ± 0.05 <sup>D</sup>	0.08 ± 0.0 <sup>A</sup>
	22 horas	4.51 ± 0.15 <sup>E</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>B</sup>
Muestra ultrasonificada a 40A con <i>L. casei</i> ATCC 334 libre (PA40)	0 horas	7.17 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.07 ± 0.0 <sup>A</sup>
	3 horas	6.25 ± 0.10 <sup>C</sup>	0.07 ± 0.0 <sup>A</sup>
	6 horas	5.92 ± 0.04 <sup>D</sup>	0.08 ± 0.0 <sup>A</sup>
	22 horas	4.83 ± 0.05 <sup>E</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>C</sup>
Muestra ultrasonificada a 80A con <i>L. casei</i> ATCC 334 libre (PA80)	0 horas	6.95 ± 0.12 <sup>B</sup>	0.06 ± 0.0 <sup>A</sup>
	3 horas	6.15 ± 0.10 <sup>C</sup>	0.07 ± 0.0 <sup>A</sup>
	6 horas	5.87 ± 0.06 <sup>CD</sup>	0.08 ± 0.0 <sup>A</sup>
	22 horas	4.67 ± 0.23 <sup>E</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>C</sup>

<sup>\*</sup>Expresado como ácido láctico. Los resultados representan las medias de las muestras (n=3) ± DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, p<0.05).

## VI.2 Viabilidad de *L. casei* ATCC 334 durante el tiempo de fermentación en los tratamientos preliminares de ultrasonicación.

La cepa evaluada de *L. casei* ATCC 334 mostró que el tratamiento PA40 tuvo un recuento final de células viables de 10.59 ± 0.52 log UFC/mL. El tratamiento PA80 mostró un recuento final de 10.24 ± 0.30 log UFC/mL. En el control se obtuvo un incremento en cuanto al contenido de células de *L. casei* ATCC 334 hasta la sexta hora de fermentación y posteriormente una disminución de la cepa llegadas las 22 horas, con un recuento final de 10.62 ± 0.39 log UFC/mL. No hubo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos PA40, PA80 y el control sobre el recuento final de células viables, no obstante, se observó una diferencia significativa en cuanto al recuento de células al inicio y al final de la fermentación para la muestra



control que incrementó la cuenta viable en 1 log UFC/mL, a comparación de los tratamientos ultrasonificados que se mantuvieron sin diferencias significativas, manteniendo el recuento total de células durante la fermentación (Cuadro 6).

Cuadro 6. Viabilidad de *L. casei* ATCC 334 libre durante el tiempo de fermentación de los tratamientos preliminares de los extractos de almendra.

Muestra	Tiempo de fermentación			
	0 horas (log UFC/mL)	3 horas (log UFC/mL)	6 horas (log UFC/mL)	22 horas (log UFC/mL)
Control	9.67 ± 0.52 <sup>B</sup>	10.59 ± 0.27 <sup>C</sup>	11.33 ± 0.47 <sup>E</sup>	10.62 ± 0.39 <sup>CH</sup>
Tratamiento PA40	10.81 ± 0.18 <sup>AF</sup>	10.27 ± 0.23 <sup>CDG</sup>	10.63 ± 0.32 <sup>FGJ</sup>	10.59 ± 0.52 <sup>FGH</sup>
Tratamiento PA80	10.02 ± 0.45 <sup>BI</sup>	10.13 ± 0.31 <sup>DI</sup>	10.43 ± 0.36 <sup>IJ</sup>	10.24 ± 0.30 <sup>HI</sup>

Los resultados representan las medias de las muestras (n=3) ± DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos y letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas en la viabilidad (Tukey,  $p < 0.05$ ).

### VI.3 Estabilidad física

En el Cuadro 7 se indica la estabilidad física expresada como % de separación (v/v) de los extractos de almendra tratados bajo distintas condiciones de ultrasonificación y almacenados a 4 °C. Las muestras ultrasonificadas a 40 % de amplitud presentaron un menor porcentaje de separación que el control y el tratamiento PA80. No hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento PA40 y el control, pero fue notable el menor % de separación para los extractos de almendra en el tratamiento PA40. Se llevaron a cabo dos mediciones, la primera se llevó a cabo a las dos semanas de almacenamiento y las muestras fueron agitadas y almacenadas nuevamente por dos semanas. Se observaron ligeras diferencias en los valores, aunque éstas no fueron significativamente diferentes.

Cuadro 7. Estabilidad física del extracto de almendra bajo distintas condiciones del tratamiento ultrasónico.

% Separación (v/v) del extracto de almendra $\pm$ DE		
Tiempo	Muestra	% Separación (v/v)
2da semana de almacenamiento	Control	38.0 $\pm$ 2.0 <sup>AB</sup>
	Tratamiento PA40	34.0 $\pm$ 1.7 <sup>B</sup>
	Tratamiento PA80	40.7 $\pm$ 1.2 <sup>A</sup>
Agitación		
4ta semana de almacenamiento	Control	35.3 $\pm$ 1.2 <sup>B</sup>
	Tratamiento PA40	33.3 $\pm$ 0.6 <sup>B</sup>
	Tratamiento PA80	38.3 $\pm$ 0.6 <sup>A</sup>

Los resultados representan las medias de las muestras (n=3)  $\pm$  DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

En base a los resultados obtenidos en estos ensayos preliminares sobre el efecto de la ultrasonificación, los tratamientos posteriores a partir de aquí se realizaron a una ultrasonificación de 40 % de amplitud.

#### VI.4 Comportamiento del pH y acidez titulable durante la fermentación de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud.

Los tratamientos LCW y LCI mostraron un comportamiento similar en el desarrollo de acidez durante la fermentación. El tratamiento LCL mostró la mayor producción final de ácido durante la fermentación al obtener una acidez final de  $0.30 \pm 0.01$  %. Los tratamientos de LCW y LCI mostraron resultados estadísticamente diferentes al tratamiento LCL. No se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos en cuanto a los valores obtenidos de pH al final de la fermentación (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de la fermentación en el pH y la acidez de las muestras de almendra ultrasonificadas\*.

Muestra	Tiempo de fermentación	pH	Acidez (%)**
Muestra con <i>L. casei</i> ATCC 334 libre (LCL)	0 horas	6.69 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.056 ± 0.0 <sup>A</sup>
	1 hora	6.07 ± 0.02 <sup>E</sup>	0.073 ± 0.0 <sup>A</sup>
	3 horas	4.94 ± 0.04 <sup>G</sup>	0.223 ± 0.0 <sup>B</sup>
	4 horas	4.62 ± 0.04 <sup>H</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>D</sup>
Muestra con <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con aislado de proteína de suero (LCW)	0 horas	6.46 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.06 ± 0.0 <sup>A</sup>
	1 hora	6.19 ± 0.04 <sup>D</sup>	0.070 ± 0.0 <sup>A</sup>
	3 horas	5.11 ± 0.07 <sup>F</sup>	0.183 ± 0.0 <sup>C</sup>
	4 horas	4.53 ± 0.03 <sup>H</sup>	0.273 ± 0.0 <sup>E</sup>
Muestra con <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con inulina y almidón (LCI)	0 horas	6.56 ± 0.03 <sup>C</sup>	0.056 ± 0.0 <sup>A</sup>
	1 hora	6.24 ± 0.04 <sup>D</sup>	0.066 ± 0.0 <sup>A</sup>
	3 horas	4.93 ± 0.04 <sup>G</sup>	0.180 ± 0.0 <sup>C</sup>
	4 horas	4.57 ± 0.03 <sup>H</sup>	0.273 ± 0.0 <sup>E</sup>

\*Muestras ultrasonificadas a 40 % de amplitud. \*\*Expresado como ácido láctico. Los resultados representan las medias de las muestras (n=3) ± DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

#### VI.5 Comportamiento del pH y acidez titulable durante el almacenamiento de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud.

Los tratamientos LCW y LCI mostraron un comportamiento similar de acidez durante el almacenamiento de la bebida fermentada de almendra. El tratamiento LCL mostró la mayor producción final de ácido láctico durante el almacenamiento al obtener una acidez final de  $0.32 \pm 0.0$  %. Los tratamientos de LCW y LCI mostraron resultados significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al tratamiento LCL. En cuanto al comportamiento del pH durante el almacenamiento de la bebida fermentada de almendra se observó una gran disminución en la muestra con el tratamiento LCL de  $4.83 \pm 0.03$  a  $4.45 \pm 0.02$ . No hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con los tratamientos LCW y LCI, mientras que, el tratamiento LCL mostró diferencias

significativas con los tratamientos LCW y LCI en los valores iniciales de pH en la segunda semana de almacenamiento (Cuadro 9).

Los datos en este análisis fueron obtenidos de una corrida diferente respecto a la fermentación donde también se midió el pH y la acidez. Se realizaron de manera individual para medir el comportamiento del pH y acidez en los distintos tratamientos en el tiempo de almacenamiento. No obstante, los resultados muestran que el tratamiento con las células libres tiende a disminuir más el pH e incrementar la acidez de las muestras.

Esta tendencia coincide con lo reportado por Jaman y Aman (2023) quienes reportaron una post-acidificación en extracto de almendra, fermentado con *L. casei* ATCC 393, durante el almacenamiento en refrigeración.

Cuadro 9. Comportamiento en el pH y la acidez de las muestras de los extractos de almendra ultrasonificados\*.

Muestra	Tiempo de almacenamiento	pH	Acidez (%)**
Muestra con <i>L. casei</i> ATCC 334 libres (LCL)	2 semanas	4.85 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.29 ± 0.0 <sup>A</sup>
	3 semanas	4.70 ± 0.02 <sup>C</sup>	0.30 ± 0.0 <sup>C</sup>
	4 semanas	4.45 ± 0.02 <sup>E</sup>	0.32 ± 0.0 <sup>D</sup>
Muestra con <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con aislado de proteína de suero (LCW)	2 semanas	4.73 ± 0.02 <sup>C</sup>	0.27 ± 0.0 <sup>B</sup>
	3 semanas	4.61 ± 0.02 <sup>D</sup>	0.27 ± 0.0 <sup>B</sup>
	4 semanas	4.49 ± 0.05 <sup>E</sup>	0.28 ± 0.0 <sup>E</sup>
Muestra con <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado con inulina y almidón (LCI)	2 semanas	4.71 ± 0.02 <sup>C</sup>	0.27 ± 0.0 <sup>B</sup>
	3 semanas	4.62 ± 0.03 <sup>D</sup>	0.27 ± 0.0 <sup>B</sup>
	4 semanas	4.52 ± 0.03 <sup>E</sup>	0.28 ± 0.0 <sup>E</sup>

\*Muestras ultrasonificadas a 40 % de amplitud. \*\*Expresado como ácido láctico. Los resultados representan las medias de las muestras (n=3) ± DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

## VI.6 Evaluación de la viabilidad de las bacterias probióticas e iniciadoras en los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud durante su fermentación y almacenamiento.

Se observó una mayor tendencia a aumentar el contenido de bacterias en el tratamiento LCI durante la fermentación del extracto de almendra con un recuento final de  $9.09 \pm 0.16$  log UFC/mL. No hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cuanto al recuento final de células viables de cada tratamiento, pero si una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) del recuento inicial de células, siendo el tratamiento de bacterias libres el que registró el recuento mayor después de adicionar el inóculo que los tratamientos adicionados con el probiótico microencapsulado LCW y LCI, respectivamente.

La cepa de *S. thermophilus* mostró una mayor tendencia a aumentar el contenido de bacterias en los tratamientos STW y STL durante la fermentación de los extractos de almendra con un recuento final de  $12.25 \pm 0.01$  y  $12.17 \pm 0.00$  log UFC/mL, respectivamente. No hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cuanto al recuento final de células viables de cada tratamiento, pero si una diferencia significativa del recuento inicial de células para los tratamientos STW y STL.

Finalmente, la cepa evaluada de *L. bulgaricus* en los tratamientos LBL, LBW y LBI mostró una mayor tendencia a aumentar el contenido de bacterias en el tratamiento LBL durante la fermentación de los extractos de almendra con un recuento final de  $8.84 \pm 0.18$  log UFC/mL. El tratamiento LBL mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con los tratamientos LBW y LBI al inicio y final de la fermentación (Cuadro 10).

Cuadro 10. Viabilidad de las bacterias durante el tiempo de fermentación de los tratamientos con *L. casei* ATCC 334 libres y encapsuladas en extractos ultrasonificados\*.

Muestra	0 horas (log UFC/mL)	3 horas (log UFC/mL)
LCL	9.57 ± 0.24 <sup>A</sup>	9.46 ± 0.19 <sup>AD</sup>
LCW	8.84 ± 0.02 <sup>B</sup>	8.98 ± 0.04 <sup>BD</sup>
LCI	8.22 ± 0.09 <sup>C</sup>	9.09 ± 0.16 <sup>D</sup>
STL	11.43 ± 0.06 <sup>EF</sup>	12.25 ± 0.01 <sup>G</sup>
STW	11.19 ± 0.10 <sup>E</sup>	12.17 ± 0.00 <sup>G</sup>
STI	11.93 ± 0.00 <sup>F</sup>	12.05 ± 0.09 <sup>FG</sup>
LBL	8.48 ± 0.06 <sup>J</sup>	8.84 ± 0.18 <sup>I</sup>
LBW	7.37 ± 0.08 <sup>H</sup>	7.60 ± 0.07 <sup>H</sup>
LBI	7.32 ± 0.00 <sup>H</sup>	7.61 ± 0.02 <sup>H</sup>

\*Muestras ultrasonificadas a 40 % de amplitud. Los resultados representan las medias de las muestras (n=3) ± DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

La cepa evaluada de *L. casei* ATCC 334 en los tratamientos LCL, LCW y LCI no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en cuanto a la población bacteriana durante el almacenamiento de 1 semana a 4 semanas de la bebida fermentada de almendra con un recuento final para cada tratamiento de  $10.31 \pm 0.06$ ,  $9.47 \pm 0.14$ ,  $9.38 \pm 0.28$  log UFC/mL, respectivamente. La cepa evaluada de *S. thermophilus* en los tratamientos STL, STW y STI mostró una mayor tendencia a disminuir su población bacteriana en el tratamiento STW durante el almacenamiento de la bebida fermentada de almendra con un recuento inicial de  $11.82 \pm 0.04$  log UFC/mL y un recuento final de  $11.23 \pm 0.21$  log UFC/mL, respectivamente. El tratamiento STW mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al recuento inicial y final de células viables durante el almacenamiento, mientras que los tratamientos STL y STI, no mostraron diferencias y mantuvieron la población total de células viables durante el almacenamiento. Finalmente, la cepa evaluada de *L. bulgaricus* en los tratamientos LBL, LBW y LBI mostró una mayor tendencia a aumentar su población en el tratamiento LBL durante el almacenamiento de la bebida fermentada de

almendra con un recuento inicial de  $9.07 \pm 0.43$  log UFC/mL y un recuento final de  $9.79 \pm 0.20$  log UFC/mL. La población bacteriana en los tratamientos LBW y LBI se mantuvieron con el mismo número de células viables durante el almacenamiento y mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento LBL (Cuadro 11).

Cuadro 11. Viabilidad de la población bacteriana durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C de los tratamientos con *L. casei* libres y encapsuladas\*.

Muestra	1 Semana (Log UFC/mL)	3 Semanas (Log UFC/mL)	4 Semanas (Log UFC/mL)
LCL	$10.69 \pm 0.57^A$	$10.77 \pm 0.47^A$	$10.31 \pm 0.06^A$
LCW	$9.60 \pm 0.37^B$	$9.19 \pm 0.05^B$	$9.47 \pm 0.14^B$
LCL	$9.73 \pm 0.46^B$	$9.23 \pm 0.39^B$	$9.38 \pm 0.28^B$
STL	$12.42 \pm 0.20^{CE}$	$12.54 \pm 0.49^E$	$12.34 \pm 0.41^E$
STW	$11.82 \pm 0.04^D$	$11.02 \pm 0.17^F$	$11.23 \pm 0.21^F$
STI	$12.08 \pm 0.44^{CDG}$	$11.50 \pm 0.53^{FG}$	$11.43 \pm 0.45^{FG}$
LBL	$9.07 \pm 0.43^H$	$9.33 \pm 0.44^{HIJ}$	$9.79 \pm 0.20^J$
LBW	$8.52 \pm 0.40^{HK}$	$8.53 \pm 0.41^K$	$8.63 \pm 0.26^K$
LBI	$8.81 \pm 0.38^{HK}$	$8.71 \pm 0.01^{IK}$	$8.78 \pm 0.08^K$

\*Muestras ultrasonificadas a 40 % de amplitud. Los resultados representan las medias de las muestras ( $n=3$ )  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

#### VI.7 Tolerancia de las bacterias a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Se observa en el Cuadro 12 el comportamiento de las bacterias en la bebida fermentada de almendra ultrasonificadas a 40 % de amplitud durante la exposición de las muestras a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Al ser expuestas a la primera condición gástrica simulada (pH 2), se observó un efecto adverso en la viabilidad de las bacterias. Se observó una disminución de la viabilidad de las bacterias de las cepas *L. casei* ATCC 334, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* con las bacterias libres y encapsuladas de *L. casei* ATCC 334 al final de la exposición a condiciones simuladas del TGI. Los bajos valores de pH y la

presencia de sales biliares durante las condiciones intestinales provocaron efectos adversos en la viabilidad de las bacterias. Las bacterias *L. casei* ATCC 334 de los tratamientos LCW y LCI mostraron una mayor estabilidad en la cuenta viable durante su exposición a condiciones gástricas e intestinales con una reducción final de  $3.23 \pm 0.0$  y  $3.24 \pm 0.0$  log UFC/mL respectivamente, comparando con las bacterias libres que mostraron una reducción drástica de  $5.10 \pm 0.0$  log UFC/mL, dejando evidente el efecto de protección de la microencapsulación del probiótico.

Por otro lado, las condiciones también mostraron efectos adversos en las bacterias de *S. thermophilus*; el tratamiento con las bacterias de *L. casei* ATCC 334 libres mostró una mayor disminución de la población bacteriana después de las condiciones simuladas del TGI con una reducción de  $5.16 \pm 0.0$  log UFC/mL. Finalmente, las bacterias de *L. bulgaricus* también mostraron efectos adversos una vez expuestas a las condiciones simuladas del TGI, no obstante, se observó una menor disminución de la viabilidad para todos los tratamientos.

Cuadro 12. Viabilidad de las bacterias iniciadoras y *L. casei* ATCC 334 libre y encapsulado durante la simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal\*.

Tiempo de las condiciones gastrointestinales					
Muestra	TG 0 (log UFC/mL)	TG 1 (log UFC/mL)	TI 0 (log UFC/mL)	TI 1 (log UFC/mL)	Diferencia después del TGI (log UFC/mL)
LCL	$10.87 \pm 0.15^A$	$8.10 \pm 0.08^C$	$7.54 \pm 0.27^E$	$5.21 \pm 0.31^G$	5.10
LCW	$9.27 \pm 0.25^B$	$7.17 \pm 0.02^D$	$6.55 \pm 0.25^F$	$6.24 \pm 0.23^{FG}$	3.23
LCI	$9.42 \pm 0.33^B$	$7.15 \pm 0.11^D$	$6.50 \pm 0.26^F$	$6.15 \pm 0.04^{FG}$	3.24
STL	$11.31 \pm 0.13^H$	$11.05 \pm 0.64^I$	$8.41 \pm 0.04^K$	$7.18 \pm 0.04^L$	5.16
STW	$11.12 \pm 0.11^H$	$10.22 \pm 0.23^{IJ}$	$8.57 \pm 0.49^K$	$7.49 \pm 0.21^{KM}$	3.74
STI	$11.15 \pm 0.23^H$	$10.06 \pm 0.12^J$	$8.60 \pm 0.27^{JK}$	$7.62 \pm 0.49^{JM}$	3.81
LBL	$8.91 \pm 0.40^{NO}$	$9.04 \pm 0.17^{PS}$	$8.34 \pm 0.33^{NS}$	$6.41 \pm 0.38^P$	3.38
LBW	$8.32 \pm 0.24^O$	$8.30 \pm 0.11^Q$	$7.82 \pm 0.58^{QT}$	$5.62 \pm 0.20^{QU}$	3.01
LBI	$9.03 \pm 0.36^N$	$7.86 \pm 0.19^R$	$7.73 \pm 0.38^{RT}$	$5.48 \pm 0.18^{RU}$	3.30

\*Muestras ultrasonificadas a 40 % de amplitud. Los resultados representan las medias de las muestras ( $n=3$ )  $\pm$  DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey,  $p<0.05$ ).



## VI.8 Viscosidad aparente

Se puede observar en la Figura 4 que los valores de viscosidad aparente de las muestras de la bebida fermentada y ultrasonificada a 40 % de amplitud mostraron una disminución a medida que se mantuvo la velocidad de cizallamiento lo que indica un comportamiento de fluido pseudoplástico. Las mediciones de viscosidad se realizaron después de dos semanas de la fermentación. Se observó una diferencia significativa ( $p<0.05$ ) en la viscosidad de los tres tratamientos con *L. casei* ATCC 334 libres y encapsuladas (con WPC e inulina/almidón) respectivamente. La bebida fermentada adicionada de células encapsuladas con WPC mostró la mayor viscosidad, mientras que la muestra con las células encapsuladas con inulina/almidón mostró los menores valores de viscosidad.

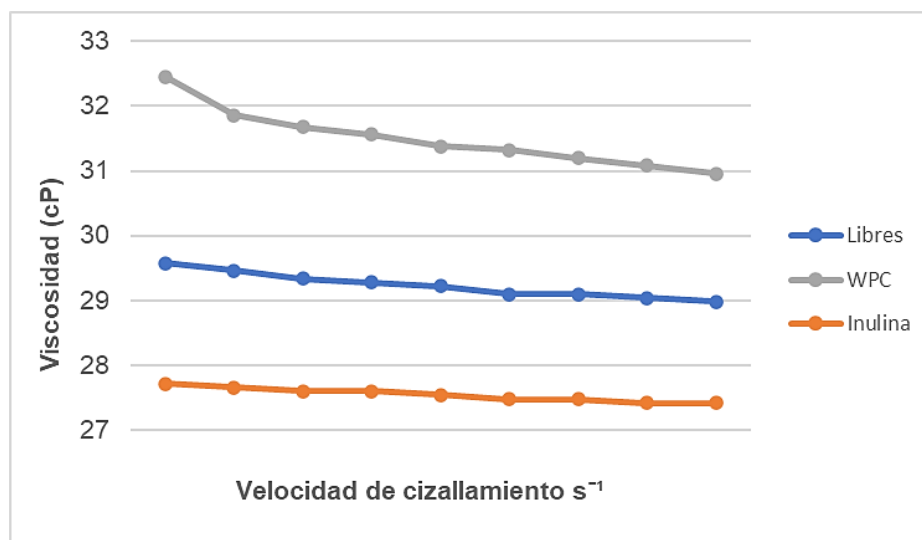


Figura 4. Viscosidad aparente vs velocidad de cizallamiento de la bebida fermentada de almendra ultrasonificada y almacenada a 4 °C.

## VI.9 Capacidad antioxidante

En el Cuadro 13 se muestran los resultados de las actividades de eliminación de radicales libres ABTS y DPPH de las muestras control, ultrasonificadas a 40 % de amplitud y fermentadas con *L. casei* ATCC 334 libre y ultrasonificadas a 40 % de

amplitud sin fermentar. Todos los tratamientos y el control mostraron actividad de inhibición contra el radical libre ABTS. La muestra control mostró la menor actividad con un % de inhibición del  $22.79 \pm 3.90$ . El tratamiento con ultrasonificación a 40 % de amplitud mostró una mejor actividad de inhibición del radical libre ABTS que la muestra control con un % de inhibición de  $30.91 \pm 2.19$ . No obstante, el tratamiento ultrasonificado a 40 % de amplitud y fermentado mostró los mejores resultados de actividad de inhibición de radicales libres ABTS con un % de inhibición de  $38.46 \pm 1.06$ .

Cuadro 13. Actividad de barrido de radicales libres DPPH y ABTS de la bebida fermentada de almendra, muestra control y ultrasonificada.

Muestra	% Inhibición ABTS	% Inhibición DPPH
Muestra control sin tratamiento	$22.79 \pm 3.90^B$	$0.0 \pm 0$
Muestra ultrasonificada a 40% de amplitud	$30.91 \pm 2.19^{AB}$	$0.0 \pm 0$
Muestra fermentada con <i>L. casei libre</i> y ultrasonificada 40A	$38.46 \pm 1.06^A$	$0.0 \pm 0$

Los resultados representan las medias de inhibición del radical ( $n=3$ )  $\pm$  DE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey,  $p<0.05$ ).

#### VI.10 Análisis bromatológicos

Se realizó un análisis bromatológico a la formulación de la bebida fermentada de almendra. La composición química se presenta resumida en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Análisis bromatológicos de la bebida fermentada de almendra formulada.

<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>
Humedad (%)	90.10 ± 0.163
Cenizas (%)	0.46 ± 0.041
Proteína (%)	2.78 ± 0.006
Grasa (%)	2.50 ± 0.200
Fibra dietética (%)	0.80 ± 0.199
Sólidos solubles (°Brix)	1.55 ± 0.212

\*Promedio ± DE (n=3)

## VII. DISCUSIÓN

### VII.1 Comportamiento del pH y acidez titulable de los extractos de almendra en los ensayos preliminares después del tratamiento ultrasónico.

La acidez titulable y los valores de pH en una bebida fermentada juegan un papel muy importante para la calidad final del producto por su influencia en la estabilidad fisicoquímica y microbiana (Kenari & Razavi, 2021).

Los resultados muestran un incremento en los valores de pH de las muestras ultrasonificadas con respecto al extracto de almendra sin ultrasonificar. El valor inicial del control fue de  $6.81 \pm 0.04$ , el cual incrementó a  $7.17 \pm 0.05$  y  $6.95 \pm 0.12$  en los tratamientos ultrasonificados (PA40 y PA80, respectivamente). El pH del extracto de almendra sin tratamiento difirió del reportado por Meza-Plaza y col. (2021), quienes registraron en extractos de almendra sin tratamiento un pH de 6.08. Dhakal y col. (2016) reportaron un pH de  $6.5 \pm 0.03$  para una bebida de almendra cruda. Meza-Plaza y col. (2021) reportaron un incremento de pH en muestras ultrasonificadas a 50 y 100 % de amplitud durante 15 y 30 minutos de aproximadamente 0.3 unidades de pH, el cual es comparable con el incremento de pH en el tratamiento P040 de este trabajo. Un incremento en el % de amplitud resultó en un menor incremento del pH en el tratamiento PA80. No se observó una diferencia en la acidez titulable entre los tres tratamientos.

Salve y col. (2019), reportaron que había un pequeño aumento del pH de las muestras de leche de cacahuate tratadas con ultrasonido en comparación con la muestra no tratada y aumentó de 6.6 en la muestra no tratada a 6.7 en la muestra tratada con ultrasonido durante 3 min. Estos resultados coinciden con nuestros resultados de pH de los extractos de almendra sin tratar y tratados con ultrasonificación, aunque no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se observa un ligero aumento en el pH de las muestras tratadas en comparación a la muestra control. Asimismo, reportaron que la acidez titulable de la leche de cacahuate se redujo sustancialmente del valor de 1.08 en la muestra sin tratar a 0.13 en la muestra tratada con ultrasonificación debido al aumento de la intensidad del tratamiento, lo

que también coincide con nuestros resultados. Esto es debido a que la muestra de los extractos de almendra sin tratar tuvo el mayor contenido de acidez a comparación de las muestras tratadas con ultrasonificación.

Gram & Mortas (2023) observaron que los principales efectos del ultrasonido sobre las propiedades fisicoquímicas de extractos de semillas de cáñamo fueron principalmente en el color, la estabilidad y el tamaño de las partículas. Sin embargo, no observaron ningún efecto sobre la acidez titulable y el pH en los 20 tratamientos ultrasonificados a diferentes condiciones de % de amplitud, tiempo y potencia aplicados. En cuanto a nuestros resultados, no se observó ningún efecto significativo en los valores de acidez titulable y pH en los extractos de almendra ultrasonificados.

#### VII.2 Viabilidad de *L. casei* ATCC 334 durante el tiempo de fermentación en los tratamientos preliminares de ultrasonificación.

Dependiendo de la intensidad y la duración de la sonicación, el uso de ultrasonido ha mostrado efectos de reducción del tiempo de fermentación en productos lácteos cultivados, lo que influye en la disminución del tiempo y el costo de producción. También han demostrado mejorar la viabilidad de las BAL, dependiendo de los parámetros del proceso (temperatura, amplitud, presión y duración de la sonicación) y las propiedades físicas y biológicas de los microorganismos (fase de crecimiento, tamaño, grosor de la cápsula) (Abesinghe y col., 2019). Sin embargo, se debe tener en cuenta que dependiendo de los parámetros de proceso utilizados y la matriz alimentaria, se pueden obtener resultados diferentes.

Varios estudios han utilizado la aplicación del ultrasonido en productos lácteos, y han logrado obtener resultados favorables en cuanto a la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas. En cuanto a nuestros resultados se obtuvo que no había una diferencia significativa respecto al recuento final de células viables durante la fermentación entre los tratamientos ultrasonificados y control. Cabe mencionar que los tratamientos fueron inoculados después del proceso de ultrasonificación. Se observó un aumento en la cantidad de células en las primeras 6 horas de

fermentación en el control y una reducción significativa ( $p<0.05$ ) de células viables al término de ésta (Cuadro 6), probablemente debido al agotamiento de sustratos disponibles, que explica un punto más alto de producción y una disminución de células viables a medida que transcurre el tiempo de fermentación (Dahroud y col., 2016). Apparently el control proporcionó ventajas para el crecimiento de *L. casei* ATCC 334 comparado con los tratamientos ultrasonificados, el cual incrementó su población en 1 log UFC/mL, mientras que la cuenta viable en los tratamientos ultrasonificados no mostró diferencias significativas ( $p<0.05$ ) durante el proceso de fermentación.

Otros trabajos han reportado el efecto de la ultrasonificación en el crecimiento de bacterias presentes en los extractos ultrasonificados. Dahroud y col. (2016), demostraron que el tratamiento con ultrasonido al 60% de amplitud durante 15 s aumentó la duración de la fase logarítmica y el crecimiento de *Lactobacillus casei subsp. casei* ATTC 393 en caldo MRS.

Este resultado también coincidió con la investigación de Avhad & Rathod (2015), donde utilizaron las condiciones de ultrasonido de 25 kHz, 160 W durante 10 min, lo que aumentó la biomasa celular y la producción de enzimas fibrinolíticas en *Bacillus sphaericus* debido a la desaglomeración de los grupos celulares y a la mejora en la utilización de los nutrientes.

### VII.3 Estabilidad física

La estabilización es uno de los principales problemas en la formulación de extractos vegetales alternativos de leche. La estabilidad física de los extractos de almendra control y ultrasonificados fueron determinados mediante el porcentaje de separación de fases de los extractos (% v/v) a las dos semanas de almacenamiento en refrigeración. Un mayor porcentaje implica una menor estabilidad física.

Se observó que la muestra con el tratamiento de ultrasonificación PA40 y el control no mostraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) (Cuadro 7), aunque se observó una menor separación para el tratamiento a PA40, mientras que el tratamiento de ultrasonificación a PA80 mostró la mayor separación de fases y, por lo tanto, la menor

estabilidad física. Maghsoudlou y col. (2015), evaluaron el efecto de ultrasonificación en extractos de almendra sobre la estabilidad física, viscosidad, grados Brix, luminosidad y tamaño de partícula, aplicando un diseño central compuesto de 6 puntos al centro para optimizar la formulación. Establecieron dos factores y tres niveles de las variables independientes: tiempo de ultrasonificación y % de estabilizantes (almidón modificado, lecitina y agar) al centro para optimizar la formulación. La frecuencia se mantuvo constante a 20 KHz y se utilizó una amplitud de 100 %. El tiempo máximo de ultrasonificación fue de 5 min, mismo que fue aplicado en este trabajo.

La estabilidad física del extracto de almendra del trabajo referido se evaluó midiendo los sólidos sedimentables durante el período establecido en cada tratamiento. Los autores reportaron que la sedimentación de partículas disminuyó cuando el tiempo de ultrasonificación se incrementó. Esto debido al efecto cortante provocado por la cavitación que fragmentó las moléculas de pectina coloidal en pequeñas partículas lo que pudo ayudar a estabilizar el sistema coloidal. Los autores no evaluaron los efectos de ultrasonificación a diferentes amplitudes. Los resultados de este trabajo muestran que los tratamientos de ultrasonido a mayor porcentaje de amplitud (PA80) mostraron menor estabilidad.

El mecanismo de sedimentación puede explicarse según la ley de Stokes, es decir, las muestras no sonicadas tendrán un mayor tamaño de partícula, por lo que sedimentarán más rápido con la gravedad que las muestras sonicadas con menor tamaño de partícula, durante el almacenamiento. Esto explica la ligeramente menor separación física de las muestras con el tratamiento a PA40 (Sarangapany y col., 2022), aunque este efecto no se observa de forma proporcional en el tratamiento PA80.

Por otro lado, Salve y col. (2019) sometieron extractos de cacahuate a 20 kHz durante 3 min. Todas las muestras de leche de cacahuate sonicadas a potencias de 200 W, 300 W y 400 W con un tiempo de tratamiento de 3 min mostraron buena estabilidad. A medida que aumentó la potencia de ultrasonificación, se observó una mayor reducción del tamaño de partícula y menor índice de sedimentación. Los

autores reportan que el extracto de cacahuete es una matriz muy compleja que hace difícil identificar las moléculas exactas sobre las que tiene efecto la ultrasonificación. El extracto de almendra de este trabajo fue ultrasonificado a una potencia constante, por lo que la diferencia en la estabilidad no puede atribuirse a cambios de potencia.

Es importante considerar que dependiendo de los parámetros de los procesos usados se pueden obtener diferentes resultados que pueden incrementar o disminuir la funcionalidad de las proteínas. Karabulut y Yemis (2022) reportaron que, si las condiciones de ultrasonificación son demasiado intensas, tales como tiempos prolongados y altas intensidades, pueden resultar en una excesiva agregación molecular que conduzca a pobres propiedades funcionales de las proteínas. Los autores observaron un incremento en la solubilidad de aislado de proteína de semilla de cáñamo después del proceso de ultrasonificación en un rango de 45-65 % de amplitud (6–11 W/cm<sup>2</sup>, 27–32 W/cm<sup>2</sup>) por 5–10 min, el cual fue atribuido a un desdoblamiento parcial de las moléculas de proteína y a una mayor interacción proteína-agua. Debe tenerse en cuenta que la sonicación se ha centrado en la modificación de proteínas aisladas (en suspensión), pero no debe olvidarse la modificación de proteínas en matrices alimentarias complejas y la posible interacción de las proteínas con otros componentes.

De acuerdo con los resultados de estabilidad observados en las muestras ultrasonificadas (Cuadro 7), se eligieron las condiciones de ultrasonificación a 40 % de amplitud para los ensayos posteriores.

#### VII.4 Comportamiento del pH y acidez titulable durante la fermentación de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud.

Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y el control en los valores de pH, tanto al inicio de la fermentación como al final. Se observó una disminución en general sobre el pH durante las 6 horas de fermentación, mientras que, para la acidez titulable, solo se observó una mayor tendencia a aumentar el % de acidez en todas las muestras, sin embargo, el control fue el que mostró el mayor % de acidez titulable producida



(Cuadro 8). Esto se debe a que las BAL se encuentran en mayor volumen y libres en el sustrato, lo que produce una mayor cantidad de ácido láctico a comparación de las encapsuladas. Asimismo, durante la fermentación las cepas probióticas mejoran las propiedades sensoriales del producto, que depende en gran medida de las cantidades de ácido láctico, ácido acético y volátiles aromáticos que se producen (Rasika y col., 2020).

En general, durante la fermentación, el pH de las muestras tiende a disminuir y la acidez titulable a aumentar, esta relación se debe a las BAL aumentan la cantidad de ácido láctico que afecta el valor de la acidez titulable (Sebastian y col., 2018).

Bernat y col. (2014) elaboraron una "leche" fermentada de almendras de *Lactobacillus reuteri* y *Streptococcus thermophilus*. Los investigadores obtuvieron valores de pH de  $4.83 \pm 0.03$  al final de la fermentación y reportaron que estos son resultados observados con frecuencia en productos fermentados con cultivos iniciadores tradicionales de yogurt de leche de vaca y con otras matrices vegetales. Los valores de pH obtenidos en los tratamientos control y ultrasonificados fermentados por *L. casei* ATCC 334 son similares a los obtenidos en otros productos fermentados a partir de extractos vegetales.

#### VII.5 Comportamiento del pH y acidez titulable durante el almacenamiento de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud.

En los resultados se puede observar una disminución progresiva en el pH y un aumento en la acidez titulable de las muestras de la bebida fermentada de almendra conforme aumenta el tiempo de almacenamiento. Esto se debe principalmente a una post-acidificación por la actividad metabólica de las bacterias *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, que aumenta aún más por el proceso metabólico de *L. casei* ATCC 334 que es un microorganismo productor de ácido láctico (Bernat y col., 2014).

Jaman y Amal (2023), observaron un incremento más pronunciado de acidez titulable en el extracto de almendra fermentado por *L. casei* ATCC 339 después de 21 días de almacenamiento de 0.29 a 0.56 % de ácido láctico. Nuestros resultados muestran una post-acidificación moderada con un incremento de 0.01 % para los

tratamientos LCW y LCI, siendo ligeramente más pronunciado en el tratamiento LCL.

Por otro lado, Bernat y col. (2014), realizaron estudios sobre un producto fermentado probiótico (*L. reuteri* y *S. thermophilus*) no lácteo a base de leche de almendras e inulina, donde obtuvieron valores de pH siendo el valor medio de 4.65, y su % de acidez titulable aumentó con el tiempo de almacenamiento, situándose en torno a 2.2 g/L, lo que es comparable con nuestros resultados obtenidos en las muestras con tratamientos de ultrasonificación.

Estos hallazgos confirman la potencial capacidad de *L. casei* ATCC 334 para producir ácidos orgánicos durante el almacenamiento en frío. Así pues, la adición de cepas probióticas de *Lactobacillus* a los extractos de almendras mejora la acumulación de la acidez, lo que da lugar a una disminución del pH y un aumento de los valores de acidez titulable.

En la bebida fermentada de almendra se observó que el control que contenía *L. casei* ATCC 334 sin encapsular mostró una mayor disminución de pH y un mayor aumento de acidez, a comparación de los tratamientos con el probiótico encapsulado (Cuadro 9). Esto muestra que la microencapsulación, disminuyó la post-acidificación y el pH de las muestras con tratamiento, lo que es beneficioso, puesto que evita un exceso de acidificación y un posible rechazo por el consumidor, además de efectos sobre la vida de anaquel.

#### VII.6 Evaluación de la viabilidad de las bacterias de los extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud durante su fermentación y almacenamiento.

Los resultados mostraron que para la cepa *L. casei* ATCC 334 durante la fermentación, el tratamiento con las células microencapsuladas con inulina (LCI), mostró un aumento en el recuento final de células viables (Cuadro 10), sin embargo, el recuento final de células viables no mostró diferencias significativas entre tratamientos, fue el mismo para todos los tratamientos debido a que las muestras de LCL y LCW no mostraron un crecimiento significativo. Estos resultados coinciden con lo reportado por Muncey y Hekmat (2021) quienes observaron una diferencia

sustancial en la cuenta viable de *L. rhamnosus* G-1 entre el tratamiento control (extracto de almendra) y el extracto de almendra fortificado con 2 % de inulina de cadena corta durante y al final de un período de fermentación de 9 horas, de 1 ciclo logarítmico aproximadamente.

Los prebióticos pueden estimular la proliferación de bacterias en varios productos fermentados y pueden también mejorar la sobrevivencia durante el almacenamiento (Ranadheera y col., 2017). Considerando que el extracto de almendra tiene bajo contenido de carbohidratos, la suplementación con carbohidratos, como la inulina, puede ayudar a mejorar el crecimiento de probióticos y la acidificación del producto fermentado (Bernat y col., 2014). Los autores evaluaron el efecto de diferentes azúcares y combinaciones con inulina durante la fermentación de una bebida de almendra con *L. reuteri* y *S. thermophilus* y encontraron que un 2 % de inulina (p/v) tuvo un efecto positivo en la sobrevivencia de los microorganismos durante el almacenamiento.

*S. thermophilus* no mostró diferencias significativas en las cuentas viables entre tratamientos al inicio y final de la fermentación, mientras que para *L. bulgaricus* se observó un aumento significativo en el recuento de células viables al final de la fermentación para el tratamiento control (LCL) (Cuadro 10).

Por otro lado, el recuento de células viables durante el almacenamiento de la bebida fermentada de almendra no mostró diferencias significativas en cuanto al recuento de células viables en todas las cepas estudiadas inicialmente y a los 28 días de almacenamiento entre los tratamientos (Cuadro 11). Jaman y Amal (2023), reportaron que los tratamientos en muestras de leche fermentada de soja y almendra no mostraron resultados significativos y mantuvieron una viabilidad entre 6 y 6.9 log UFC/g durante el almacenamiento a 4 °C.

#### VII.7 Tolerancia de las bacterias en extractos de almendra ultrasonificados a 40 % de amplitud a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Las muestras de los extractos de almendra fermentados fueron expuestas a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después de 28 días de

almacenamiento. En los resultados obtenidos, se observó que hubo diferencias significativas para las tres cepas evaluadas una vez que fueron sometidas a las condiciones gástricas simuladas a las 2 horas de exposición, mostrando una disminución en la población de células viables (Cuadro 12). Al exponerlas a las condiciones intestinales simuladas, de igual forma, se mostró una disminución significativa en la viabilidad de las bacterias para las tres cepas evaluadas. Sin embargo, se observó una mayor disminución sobre las muestras que contenían las bacterias de *L. casei* ATCC 334 sin encapsular para los tratamientos LCL y STL, mientras que esta disminución fue mayor para el tratamiento LBW. *L. casei* ATCC 334 mostró mayor sensibilidad a las condiciones ácidas del ensayo gástrico disminuyendo en número en aproximadamente 2 log UFC/mL, pero este probiótico mostró mayor estabilidad durante el ensayo intestinal (Cuadro 12). Una de las propiedades importantes de las bacterias probióticas potenciales es su capacidad de sobrevivir a las concentraciones biliares producidas en el intestino delgado y de establecerse y multiplicarse en el intestino grueso (Dimitrellou y col., 2019).

Los resultados muestran que para el probiótico *L. casei* la reducción del número de células viables durante el ensayo completo de TGI fue de 3.2 log UFC/mL, mientras que para el tratamiento de bacterias libres (LCL) fue de 5.1 log UFC/mL, dejando en evidencia el efecto protector de la microencapsulación de las células.

Dimitrellou y col. (2016), demostraron que el uso de microencapsulación proporcionó una protección a las células de *L. casei* ATCC 393 ya que la supervivencia de las células de *L. casei* en jugo gástrico simulado mejoró significativamente con la microencapsulación en comparación con las células libres. De la misma forma, la microencapsulación afectó significativamente a la viabilidad de las células de *L. casei* en las soluciones de sales biliares, incluso tras 6 h de incubación.

Dimitrellou y col. (2019), publicaron un estudio más actualizado de la encapsulación de *L. casei* ATCC 393 con alginato y evaluaron su supervivencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, demostraron que la encapsulación en cápsulas de alginato de calcio proporcionó una protección celular significativa en los jugos

gástricos simulados, y en los jugos intestinales simulados, a comparación de las muestras control.

Asimismo, Afzaal y col. (2020), evaluaron la viabilidad y la estabilidad de *L. casei* libre y encapsulado con WPI en jugo gástrico e intestinal simulado expuestas en un intervalo de tiempo definido. En general, observaron una tendencia decreciente en ambas células, libres y encapsuladas, pero una mayor disminución del recuento celular en las células no encapsuladas en comparación con las encapsuladas. Tarifa y col. (2021), obtuvieron resultados similares, las células de *L. casei* y *L. rhamnosus* encapsuladas en pectina y pectina e inulina presentaron mayores tasas de supervivencia después de la exposición gastrointestinal completa y las reducciones a lo largo de las fases gástrica e intestinal fueron más progresivas para las células sin encapsular.

El efecto protector de la microencapsulación sobre los probióticos expuestos a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal es notable. Es importante tener en cuenta la sobrevivencia de las células probióticas, ya que, deben ser capaces de mantener su viabilidad y estabilidad durante el almacenamiento, y condiciones habituales del tracto gastrointestinal de los seres humanos, con el fin de proporcionar beneficios para la salud (Liu y col., 2020).

Existe información muy limitada sobre la adición de probióticos encapsulados adicionados a extractos de vegetales fermentados.

#### VII.8 Viscosidad aparente

En la mayoría de los productos fermentados, la viscosidad es uno de los atributos que más influye en su calidad y aceptación sensorial (Chávez-Martínez y col., 2020). Por otro lado, se ha reportado que la tensión de corte y el aumento de temperatura durante la sonicación resultan en una significativa modificación en las propiedades fisicoquímicas de macromoléculas como la grasa y la proteína de la leche. Esto altera la consistencia y las propiedades de textura de los productos lácteos fermentados (Abesinghe y col., 2019).

Los resultados sobre la viscosidad aparente en las muestras de la bebida fermentada de almendra a las 2 semanas de almacenamiento mostraron que las muestras con las células encapsuladas con aislado de proteína de suero mostraron la mayor viscosidad (Figura 4). Por otro lado, las muestras con las células encapsuladas con inulina/almidón mostraron los menores valores de viscosidad. No obstante, se observó que hubo una tendencia a disminuir los valores de viscosidad al mantenerse la velocidad de cizallamiento y disminuir la tensión de corte, más pronunciado para las muestras encapsuladas con aislado de proteína de suero.

En este contexto, un comportamiento de fluido no newtoniano también ha sido observado recientemente en otros estudios. Ahsan y col. (2021), evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los extractos de soja fermentada por LAB durante 0, 8, 16 y 24 días de almacenamiento. Los resultados mostraron que los extractos de soja no son un fluido newtoniano ya que su viscosidad fluctuó consistentemente bajo diferentes fuerzas de corte a una temperatura constante y las tres variedades fermentadas con diferentes bacterias mostraron una relación no lineal entre la viscosidad y el esfuerzo cortante.

En otro estudio, Maghsoudlou y col. (2015), evaluaron la ultrasonificación en la formulación y estabilización de una bebida de almendra. Mostraron que los efectos del tiempo de ultrasonificación y el almidón modificado tuvieron una interacción, el almidón modificado aumentó la viscosidad a niveles bajos de ultrasonificación y su efecto disminuyó a medida que aumentó el tiempo de ultrasonificación. Asimismo, Bernat y col. (2014), estudiaron el comportamiento reológico de un producto fermentado probiótico no lácteo a base de almendras e inulina. Los análisis reológicos de todas las muestras mostraron que tanto las curvas de velocidad de corte ascendentes como las descendentes mostraron una degradación estructural progresiva con cizallamiento repetido, reflejando así su naturaleza tixotrópica.

#### VII.9 Capacidad antioxidante

Los resultados de la capacidad antioxidante para las muestras control, ultrasonificadas con y sin fermentación se muestran en el Cuadro 13. Ninguno de los

tratamientos y el control mostraron actividad de inhibición del radical libre DPPH. No obstante, todos los tratamientos y el control mostraron actividad de inhibición del radical libre ABTS. Esto demuestra que las muestras de almendra no son buenas donadoras de átomos de hidrogeno, sin embargo, son buenas donadoras de electrones para reducir el radical catiónico ABTS (Wołosiak y col., 2022).

Por lo tanto, se obtuvieron resultados favorables en cuanto a la capacidad antioxidante por el método de ABTS, en donde la mayor actividad antioxidante se mostró en las muestras ultrasonificadas y fermentadas con un valor de  $38.46 \pm 1.06$  a comparación de la muestra control que resultó en el menor valor de capacidad antioxidante con un valor de  $22.79 \pm 3.90$  (Cuadro 13). La fermentación con *L. casei* ATCC 334 y el cultivo iniciador, así como la aplicación de la ultrasonificación a 40 % de amplitud afectaron significativamente la actividad eliminadora de radicales libres en las muestras de la bebida fermentada de almendra. El uso de cepas de *Lactobacillus* para la fermentación, así como la aplicación de ultrasonificación, puede constituir una ruta prometedora para mejorar la capacidad antioxidante y cualidades nutricionales sobre la bebida fermentada de almendra.

Asimismo, estudios recientes han demostrado el efecto de la fermentación sobre la capacidad antioxidante de los productos fermentados. Ahsan y col. (2021), obtuvieron que la mayor actividad antioxidante en la de leche de soja se mostró en la leche de soja fermentada con cocultivo, seguida de *L. casei*, *L. acidophilus* y con el valor más bajo la leche de soja no fermentada. Demostraron también que en los fermentados de leche de soja se sugiere que las cepas *L. acidophilus* y *L. casei* son capaces de producir altas cantidades de compuestos antioxidantes, probablemente debido a su mayor actividad proteolítica sobre la fuente de proteínas.

En otro estudio, Jaman y Amal (2023), estudiaron la viabilidad de los probióticos y actividad antioxidante de la leche de soja y almendras fermentadas con cepas seleccionadas de probióticos *Lactobacillus spp.* Demostraron que tienen una alta capacidad antioxidante en muestras fermentadas, incluso sometidas a varios días de almacenamiento. La mayor capacidad antioxidante en las muestras la atribuyeron a que la fermentación puede disminuir el contenido de polifenoles, lo

que puede mejorar la digestión de proteínas y carbohidratos y mejorar la absorción de minerales, mejorando así el valor antioxidante de los productos fermentados.

Por otro lado, varios estudios han observado que la aplicación de la ultrasonificación tiene relación en cuanto al aumento de la capacidad antioxidante en los productos alimenticios. Se ha reportado que esta técnica ayuda en la liberación de antioxidantes unidos en matrices alimentarias, como ácidos fenólicos, ácidos orgánicos, estilbenos, y flavanoles (Aadil y col., 2020).

#### VII.10 Análisis bromatológicos

La composición obtenida para la bebida fermentada de almendra fue similar a la composición encontrada por otros autores para las mismas variedades de estos productos. Se realizó una comparación con otros autores ya que actualmente no existe una Norma Oficial Mexicana que establezca los valores mínimos permisibles para una bebida fermentada de origen vegetal.

Bernat y col. (2014), evaluaron la composición química de un producto fermentado probiótico no lácteo a base de leche de almendras e inulina, la composición de ambas bebidas fue bastante similar, aunque se obtuvo un mayor contenido de proteínas en nuestro estudio (Cuadro 14), lo que puede deberse a la cantidad de almendra utilizada para la formulación de ambas bebidas, lo que también explica su menor contenido de humedad y su menor contenido de grasa en nuestro estudio, a comparación de los resultados reportados. De la misma forma, Maghsoudlou y col. (2015), evaluaron la composición química de la formulación de una leche de almendra, sus resultados en cuanto al contenido de proteína fueron menores a los resultados obtenidos en esta investigación.



## VIII. CONCLUSIONES

Esta investigación demostró que *L. casei* ATCC 334 microencapsulado mediante secado por aspersión en una matriz de inulina/almidón modificado, así como de aislado de proteína de suero, protegió su viabilidad ante las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, comparado con el probiótico sin encapsular. Adicionalmente, la bebida fermentada de almendra fue un buen vehículo para *L. casei* ATCC 334 en su forma libre y encapsulada. Por otro lado, se observó gran viabilidad de las tres cepas evaluadas durante 4 semanas de almacenamiento. La disminución del pH y el aumento de acidez titulables fue más notoria en el producto conteniendo las bacterias libres. Esto demostró que la microencapsulación logró disminuir la post-acidificación durante el almacenamiento.

Las muestras ultrasonificadas y fermentadas mostraron una mayor capacidad antioxidante por el método de ABTS en comparación de las muestras control. Los valores de viscosidad aparente de todas las muestras disminuyeron conforme avanzó la velocidad de cizallamiento.

Las muestras ultrasonificadas a 40 % de amplitud mostraron mejor estabilidad física al obtenerse un menor % de separación de fases en los extractos de almendra, mientras que, los tratamientos de ultrasonido a mayor porcentaje de amplitud (PA80) y control, mostraron menor estabilidad al tener un mayor porcentaje de sólidos sedimentables.

Se desarrolló una bebida fermentada de almendra adicionada con probióticos, cuya composición química fue comparable a la de otras investigaciones, pero con mayor contenido de proteína y menor contenido de grasa, así como buenas características de textura, viscosidad, acidez y estabilidad.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

**Aadil** RM, Khalil AA, Rehman A, Khalid A, Inam-ur-Raheem M, Karim A, Afraz MT. Assessing the impact of ultra-sonication and thermo-ultrasound on antioxidant indices and polyphenolic profile of apple-grape juice blend. *Journal of Food Processing and Preservation*. **2020**;0:1-11.

**Abesinghe** NL, Islam N, Vidanarachchi JK, Prakash S, Silva ST, Karim MA. Effects of ultrasound on the fermentation profile of fermented milk products incorporated with lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **2019**;90:1-14.

**Abdel-Hamid** M, Romeih E, Gamba RR, Nagai E, Suzuki T, Koyanagi T, Enomoto T. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *International Dairy Journal*. **2019**;91:1-8.

**Afzaal** M, Khan AU, Saeed F, Arshad MS, Khan MA, Saeed M, Anjum FM. Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Science & Nutrition*. **2020**;8(3): 1649–1656.

**Ahsan** S, Khaliq A, Chughtai MFJ, Nadeem M, Tahir AB, Din AA, Thiruvengadam M. Technofunctional quality assessment of soymilk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **2021**;69(1): 172-182.

**Allen** H. (2008). Priority areas for research on the intake, composition, and health effects of tree nuts and peanuts. *The Journal of Nutrition*. **2008**;138(9):1763–1765.

**Avhad** DN & Rathod VK. Ultrasound assisted production of a fibrinolytic enzyme 723 in a bioreactor. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2015**;22:257–264.

**Baltrusch** MD, Torres H, Domínguez N, Flórez-Fernández R. Spray-drying microencapsulation of tea extracts using green starch, alginate, or carrageenan as carrier materials. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2022**;4:417-429.

**Bancalari** E, Alinovi M, Bottari B, Caligiani A, Mucchetti G & Gatti M. Ability of a Wild Weissella Strain to Modify Viscosity of Fermented Milk. *Frontiers in Microbiology*, **2020**;10:1-18.

**Barral-Martínez** M, Fraga-Corral M, Garcia-Perez P, Simal-Gandara J & Prieto MA. Almond By-Products: Valorization for Sustainability and Competitiveness of the Industry. *Foods*. **2021**;10(8):1793-1815.

**Barreca** D, Nabavi SM, Sureda A, Rasekhian M, Raciti R, Silva AS, Mandalari G. Almonds (*Prunus Dulcis* Mill. D. A. Webb): A Source of Nutrients and Health-Promoting Compounds. *Nutrients*. **2020**;12(3):672-696.

**Bernat** N, Cháfer M, Chiralt A & González-Martínez C. Development of a non-dairy probiotic fermented product based on almond milk and inulin. *Food Science and Technology International*. **2014**;21(6): 440–453.

**Bhargava** N, Mor RS, Kumar K & Singh Sharanagat V. Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. **2020**;70:1-12.

**Bórawski** P, Pawlewicz A, Parzonko A, Harper JK, Holden L. Factores que dan forma a la producción de leche de vaca en la UE. *Sustentabilidad*. **2020**;12(0):420-432.

**Chávez-Martínez** A, Reyes-Villagrana RA, Rentería-Monterrubio AL, Sánchez-Vega R, Tirado-Gallegos JM & Bolivar-Jacobo NA. Low and High-Intensity Ultrasound in Dairy Products: Applications and Effects on Physicochemical and Microbiological Quality. *Foods*. **2020**;9(11):1688-1715.

**Choudhury** N, Meghwal M & Das K. Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties, and applications in foods. *Food Frontiers*. **2021**;2:426–442.

**Chugh** B & Kamal-Eldin A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*. **2020**;32:76–82.

**Chung-Yen** C, Karen L & Jeffrey B. A nutrition and health perspective on almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2006**;86(14):2245–2250.

**Dahrud** BD, Mokarram RR, Khiabani MS, Hamishehkar H, Bialvaei AZ, Yousefi M & Kafil HS. Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei subsp.casei* ATTC 393. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2016**;86:462–467.

**Dhakal** S, Giusti MM, Balasubramaniam VM. Effect of high pressure processing on dispersive and aggregative properties of almond milk. *J Sci Food Agric*. **2016**;11:3821-3830.

- Dimitrellou D**, Kandylis P, Petrović T, Dimitrijević-Branković S, Lević S, Nedović V & Kourkoutas Y. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. *LWT - Food Science and Technology*. **2016**;71:169–174.
- Dimitrellou D**, Kandylis P, Lević S, Petrović T, Ivanović S, Nedović V & Kourkoutas Y. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production. *LWT*. **2019**;116:108501.
- Fernández de Palencia P**, López P, Corbí AL, Peláez C & Requena T. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology*. **2008**;227(5):1475–1484.
- Frakolaki G**, Giannou V, Kekos D & Tzia C. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2020**;61(9):1–22.
- García SN**, Osburn BI & Cullor JS. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health*. **2019**;7(0):100-116.
- Gomez-Mascaraque LG**, Morfin RC, Pérez-Masiá R, Sanchez G & Lopez-Rubio A. Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*. **2016**;69:438–446.
- Goral M**, Kozowicz K, Pankiewicz U, Goral D, Kluza F, Wójtowicz A. Impacto de los estabilizadores en el proceso de congelación y propiedades fisicoquímicas y organolépticas del helado a base de leche de coco. *LWT*. **2018**;92:516–522.
- Gram S**, Mortas M. The effects of ultrasound and high-pressure homogenization processes on physiochemical properties of hemp seed milk. *Food Chemistry Advances*. **2023**;3:100477.
- Granato D**, Barba FJ, Kovačević DB, Lorenzo JM, Cruz AG & Putnik P. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*. **2020**;11(1):1-26.

- Hejazi** SN & Orsat V. Malting process optimization for protein digestibility enhancement in finger millet grain. *Journal of food science and technology*. **2016**; 53(4):1929-1938.
- Hill** D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C & Ross RP. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology*. **2018**;9: 1-24.
- Huang** CH, Li SW, Huang L & Watanabe K. Identification and Classification for the *Lactobacillus casei* Group. *Frontiers in Microbiology*. **2018**;9:1-13.
- Hussain** SZ, Naseer B, Qadri T, Fatima T & Bhat TA. Chapter 22: Almond (*Prunus dulcis*) Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. In: *Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas*. United States: Springer. **2021**:283-293.
- Jaman** AZ, Amal BS. Viability of probiotics and antioxidant activity of soy and almond milk fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus spp.* *LWT*. **2023**;176, 114531.
- Karabulut** G, Yemiş O. Modification of hemp seed protein isolate (*Cannabis sativa* L.) by high-intensity ultrasound treatment. Part 1: Functional properties. *Food Chemistry*. **2022**;375:131843.
- Kaur** S & Das M. Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*. **2011**;20(4):861–875.
- Kenari** RE & Razavi R. Effect of sonication conditions: Time, temperature, and amplitude on physicochemical, textural and sensory properties of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*. **2021**;74(2): 332–343.
- Lenssen** KM, Bast A & de Boer A. Clarifying the health claim assessment procedure of EFSA will benefit functional food innovation. *Journal of Functional Foods*. **2018**; 47:386–396.
- Lipan** L, Rusu B, Sendra E, Hernández F, Vázquez-Araújo L, Vodnar DC & Carbonell-Barrachina ÁA. Spray drying and storage of probiotic enriched almond milk: probiotic survival and physicochemical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2020**;100(9):3697-3708.
- Liu** H, Xie M & Nie S. Recent trends and applications of polysaccharides for microencapsulation of probiotics. *Food Frontiers*. **2020**;1(1):45–59.

**Mäkinen** OE, Wanhalinna V, Zannini E & Arendt EK. Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2015**;56(3):339–349.

**Maghsoudlou** Y, Alami M, Mashkour M & Shahraki MH. Optimization of Ultrasound-Assisted Stabilization and Formulation of Almond Milk. *Journal of Food Processing and Preservation*. **2015**;40(5):828–839.

**McClements** DJ, Newman E & McClements IF. Plant-based Milks: A Review of the Science Underpinning Their Design, Fabrication, and Performance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2019**;1:1-21.

**Meza-Plaza** EF, Sosa-Morales ME, Morales-De la Peña M, Gómez-Salazar JA. Propiedades fisicoquímicas de bebida de almendras tratada con ultrasonidos de potencia. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. **2021**;6:200-206.

**Muncey** L, Hekmat S. Development of Probiotic Almond Beverage Using *Lactocaseibacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short-Chain and Long-Chain Inulin Fibre. *Fermentation* **2021**;7(2): 90-100.

**Muzzafar** A & Sharma V. Microencapsulation of probiotics for incorporation in cream biscuits. *Food Measure*. **2018**;12:2193–2201.

Norma Mexicana **NMX-F-066-S-1978**, Alimentos. Determinación de cenizas en alimentos.

Norma Mexicana **NMX-F-068-S-1980**, Alimentos. Determinación de proteínas.

Norma Mexicana **NMX-F-083-1986**, Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios.

Norma Oficial Mexicana **NOM-185-SSA1-2002**, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias.

Norma Oficial Mexicana **NOM-155-SCFI-2012**, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.

**Nualkaekul** S, Cook MT, Khutoryanskiy VV & Charalampoulos D. Influencia de los materiales de encapsulación y recubrimiento en la supervivencia de *Lactobacillus*

*plantarum* y *Bifidobacterium longum* en jugos de frutas. Food Research International. **2013**;53(1):304 – 311.

**O'Toole** PW & Cooney JC. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. **2008**;1:1–9.

Parlamento Europeo y Consejo (EU). Los beneficios nutricionales y para la salud de las almendras: Una elección alimentaria saludable. Recuperado el 1 de julio de 2023, de: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2007:012:FULL&from=SL>

**Paul** AA, Kumar S, Kumar V, Sharma R. Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **2019**;(10):1–19.

**Pech-Canul** A, Ortega D, García-Triana A, González-Silva N & Solis-Oviedo A. A Brief Review of Edible Coating Materials for the Microencapsulation of Probiotics. Coatings. **2020**;10(3):197-233.

**Petitjean** M & Isasi JR. Goma de algarrobo, un hidrocoloide vegetal con aplicaciones industriales y biofarmacéuticas. Molecules. **2022**;27:8265-8282.

**Potoroko** I, Kalinina I, Botvinnikova V, Krasulya O, Fatkullin R, Bagale U, Sonawane SH. Ultrasound effects based on simulation of milk processing properties. Ultrasonics Sonochemistry, **2018**;48:463-472.

**Potter** NN & Hotchkiss JH. Chapter 9: Beverages. In: Food Science. United States: Springer. **1995**:437–463.

**Rahim** MA, Hazrin-Chong NH & Harith HH. Roles of fermented plant, dairy and meat-based foods in the modulation of allergic responses. Food Science and Human Wellness. **2023**;12(3):691-701.

**Ranadheera** C, Vidanarachchi J, Rocha R, Cruz A, Ajlouni S. Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. Fermentation **2017**;3:67.

**Rasika** D, Vidanarachchi J, Rocha R, Balthazar C, Cruz A, Sant'Ana AS & Ranadheera C. Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. Current Opinion in Food Science. **2020**;38(0):1-28.

**Richardson** D, Astrup A, Cocaúl A, Ellis P. The nutritional and health benefits of almonds: a healthy food choice. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods. **2009**;6(4):41–50.

**Rivas-Vela** C, Castaño-Tostado E, Cardador-Martínez A, Amaya-Llano S, Castillo-Herrera G. Subcritical water hydrolysis for the obtention of bioactive peptides from a grasshopper *Sphenarium purpurascens* protein concentrate. The Journal of Supercritical Fluids. **2023**;197:1-27.

**Salve** AR, Pegu K & Arya SS. Comparative assessment of high-intensity ultrasound and hydrodynamic cavitation processing on physico-chemical properties and microbial inactivation of peanut milk. Ultrasonics Sonochemistry. **2019**;59:1-10.

**Samreen** A, Adnan K, Muhammad FJC, Muhammad N, Assam BT, Amir AD, Godswill NN, Mohammad AS, Maksim R, Zhanibek Y, Muthu T. Technofunctional quality assessment of soymilk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. Biotechnology and Applied Biochemistry. **2021**;69(1):172-182.

**Sarangapany** A, Murugesan A, Annamalai B, Balasubramanian B, Shanmu A. An overview on ultrasonically treated plant-based milk and its properties – A Review. Applied food research. **2022**;2(2):100130-100145.

**Sebastian** A, Barus T, Mulyono N, Yanti. Effects of fermentation and sterilization on quality of soybean milk. Int. Food Res. J. **2018**;25:2428-2434.

**Slover** CM & Danziger L. *Lactobacillus*: A Review. Clinical Microbiology Newsletter. **2008**;30(4):23–27.

**Tarifa** MC, Piqueras CM, Genovese DB & Brugnoli LI. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* in pectin and pectin-inulin microgel particles: Effect on bacterial survival under storage conditions. International Journal of Biological Macromolecules. **2021**;179:457–465.

**Turkmen** N, Akal C & Özer B. Probiotic dairy-based beverages: A review. Journal of Functional Foods. **2019**;53:62–75.

US Department of Health and Human Services. Dietary Guidelines for Americans: Nuts, Almonds. [Monografía en internet]. Florida, US: US Department of Agriculture, 2018 [Consultado 2023 julio 1]. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170567/nutrients>.



- Valero-Cases** E & Frutos MJ. Efecto de diferentes tipos de encapsulación sobre la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* durante el almacenamiento con inulina y digestión in vitro. LWT—Ciencia y tecnología de los alimentos. **2015**;64(2):824–828.
- Vanga** SK & Raghavan V. How well do plant-based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? Journal of Food Science and Technology. **2017**;55(1):10–20.
- Wołosiak** R, Drużyńska B, Derewiaka D, Piecyk M, Majewska E, Ciecierska M, Worobiej E, Pakosz P. Verification of the Conditions for Determination of Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays—A Practical Approach. Molecules. **2022**;27: 50-70.
- Yao** M, Xie J, Du H, McClements DJ, Xiao H & Li L. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. **2020**;19(2):857-874.
- Yuan** S, Li C, Zhang Y, Yu H, Xie Y, Guo Y & Yao W. Ultrasound as an emerging technology for the elimination of chemical contaminants in food: A review. Trends in Food Science & Technology. **2021**;109:374–385.
- Zhao** J, Bhandari B, Gaiani C & Prakash S. Physicochemical and microstructural properties of fermentation-induced almond emulsion-filled gels with varying concentrations of protein, fat, and sugar contents. Current Research in Food Science. **2021**;4:577–587.