



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría En Ciencia y Tecnología de Alimentos

Desarrollo de una bebida de té verde adicionada con probióticos microencapsulados en almidón modificado de huauzontle (*Chenopodium berlandieri*) y proteína de suero de leche.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBT. Tana Hernández Barrueta

Dirigido por:

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Co-dirigido por:

Dr. Fernando Martínez Bustos

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Presidente

Dr. Fernando Martínez Bustos  
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Vocal

Dra. Blanca García Almendárez  
Suplente

Dr. Michael J. Miller  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Octubre 2019  
México

*A Tana Barrueta Rath, Guillermo Hernández Hernández, y a mis hermanos.*

*Mi amor infinito y gratitud eterna.*

*A la memoria de Rosaura Margarita Rath Quintal.*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## AGRADECIMIENTOS

- Dra. Silvia Lorena Amaya Llano. Por recibirme en su grupo de trabajo, y haberme brindado tantas oportunidades y apoyo durante este tiempo. Por su calidez como persona y asesora.
- Dr. Eduardo Castaño Tostado. Por toda la ayuda y guía que me brindó siempre como profesor, miembro del comité, y ser humano. Por enseñar en sus clases con un entusiasmo que se contagia.
- Dr. Fernando Martínez Bustos y Dra. Blanca Almendárez, por sus aportaciones en el diseño del trabajo, y las acertadas revisiones realizadas.
- Dr. Michael Miller y Dr. Youngsoo Lee. Por la invitación, el caluroso recibimiento, los recursos y la guía brindada durante mi estancia en la Universidad de Illinois.
- Los autores agradecen las facilidades otorgadas en el uso de la infraestructura de LIDTRA, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Unidad Querétaro), a través de los proyectos LN-295261 y LN-254119. Se agradece también la asistencia técnica de la M.C. Vero Flores Casamayor, M. C. Juan Vélez Medina e Ing. Eleazar Urbina Álvarez.
- Al Ing. Guillermo Hernández Hernández, por el diseño, creación, montaje y mantenimiento del sistema de monitoreo en línea, instalado en el refrigerador donde se llevó a cabo el análisis de vida de anaquel. Al Ing. Julio Lugo, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por la asesoría en el diseño del mismo.
- A la Dra. Karina Cruz, Dra. Lucía Abadía, Dr. Manuel Santos y demás compañeros del Laboratorio de Innovación y Desarrollo de Alimentos, así como del Posgrado de Alimentos de la UAQ.
- A Alan Canto, Karen Nieto, Francisco Santoyo, Isac Rivas y Cecilia Moreno. Por acompañarme y hacer mis días más fáciles.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por la beca de maestría, así como la beca mixta.
- Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ), por el financiamiento para el traslado a la Universidad de Illinois.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Alimentos probióticos, prebióticos y simbióticos	3
2.2. Té verde como matriz para la adición de probióticos	5
2.3. Tecnología de microencapsulación	7
2.3.1. Secado por aspersión	9
2.3.2. Matrices para el secado por aspersión	9
2.3.1.2. Proteína de suero de leche	10
2.3.1.1. Almidón	10
2.4. Huauzontle, fuente novedosa para la obtención de almidón	13
III. OBJETIVOS	14
3.1. General	14
3.2. Específicos	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Materiales	15
4.2. Métodos	15
Etapa 1	
4.2.1. Extracción de almidón de semillas de huauzontle.	17
4.2.2. Modificación del almidón	17
4.2.3. Caracterización fisicoquímica y funcional del almidón	18
4.2.3.1. Análisis bromatológico	18

4.2.3.2. Contenido de amilosa y almidón resistente	18
4.2.3.3. Índice de solubilidad y absorción de agua	18
4.2.3.4. Propiedades de pasta	19
4.2.3.5. Comportamiento térmico	19
4.2.3.6. Difracción de rayos-x	19
4.2.3.7. Morfología	20
4.2.3.8. Color	20
Etapa 2	
4.2.4. Cultivo de LGG	20
4.2.5. Microencapsulación	21
4.2.5.1. Determinación del rendimiento de encapsulación	22
4.2.5.2. Determinación de la viabilidad se las células después de la microencapsulación	22
4.2.5.3. Determinación del contenido de humedad y actividad de agua de las microcápsulas	22
4.2.5.4. Tamaño de partícula y morfología de las microcápsulas	23
4.2.5.5. Color de las microcápsulas	23
4.2.5.6. Tolerancia a condiciones de tracto gastrointestinal simulado	23
4.2.5.7. Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de LGG microencapsulado	24
ETAPA 3	
4.2.6. Estabilidad de las células de LGG en un extracto de té verde	24
4.2.7. Evaluación sensorial para la selección de una bebida de té verde con probióticos	25
4.2.8. Vida de anaquel sensorial de la bebida de té verde con probióticos microencapsulados	26
4.2.8.1. Equipo de monitoreo de variables de proceso	26
4.2.8.2. Preparación de las bebidas mediante diseño reversa	28
4.2.8.3. Evaluación sensorial de la bebida	29
4.2.8.4. Caracterización fisicoquímica de la bebida	29
4.2.9. Análisis estadístico	29

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
ETAPA 1	
5.1. Rendimiento de extracción de almidón de semilla de huauzontle	30
5.2. Caracterización fisicoquímica del almidón de semilla de huauzontle	32
5.3. Efecto de la hidrólisis ácida y extrusión en las características funcionales del almidón de semilla de huauzontle	33
ETAPA 2	
5.4. Selección de las condiciones para el cultivo de LGG	40
5.5. Caracterización de las microcápsulas	41
5.5.1. Supervivencia de LGG al proceso de secado por aspersion.	41
5.5.2. Características fisicoquímicas	43
5.5.3. Características morfológicas	46
5.5.4. Características funcionales	48
5.5.4.1. Efecto de la encapsulación y la temperatura de entrada del secador, en la supervivencia de LGG ante condiciones de tracto gastrointestinal simulado	48
5.5.4.2. Efecto del almacenamiento en la supervivencia del LGG libre y encapsulado	49
ETAPA 3	
5.6. Efecto del ácido ascórbico en la estabilidad de la viabilidad de LGG en una bebida de té verde	51
5.7. Selección de una formulación para una bebida de té verde con probióticos microencapsulados	54
5.8. Vida de anaquel sensorial de una bebida de té verde con probióticos microencapsulados	58
VI. CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS	70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Formulaciones de una bebida de té verde con base en el edulcorante utilizado	25
2	Rendimiento de extracción de almidón de huauzontle a partir de semilla o harina utilizando remojo en agua o NaOH	31
3	Composición química del almidón de semilla de huauzontle	32
4	Características funcionales del almidón nativo y modificado de huauzontle	33
5	Parámetros de color y fotografías del almidón nativo y modificado de huauzontle	39
6	Efecto del secado por aspersion en la viabilidad de LGG	41
7	Características fisicoquímicas de las microcápsulas de LGG obtenidas a diferentes temperaturas de entrada en el secador por aspersion	45
8	Estabilidad del pH, acidez titulable y azúcares reductores de una bebida de té verde con probióticos microencapsulados, almacenada a 4 °C	60
9	Cambios de color de una bebida de té verde con probióticos microencapsulados, a lo largo del almacenamiento a 4 °C	61
10	Coeficientes de correlación de Pearson de las funciones de rechazo respecto a los parámetros fisicoquímicos de la bebida de té verde con probióticos microencapsulados	66
11	Días a los que ocurre el rechazo sensorial de un té verde con probióticos microencapsulados	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama general de la metodología	16
2	Montaje de un equipo para el monitoreo de variables de proceso, dentro de un refrigerador tipo vitrina	28
3	Página web para el acceso remoto a los datos monitoreados en el refrigerador	28
4	Perfil de viscosidad y comportamiento térmico del almidón nativo y modificado de huauzontle	36
5	Difractograma de rayos-X del almidón de huauzontle	37
6	Micrografía electrónica de barrido del almidón nativo y modificado de huauzontle	38
7	Cinética de crecimiento de LGG en medio MRS a 37 °C y condiciones anaerobias	40
8	Micrografía electrónica de barrido de las microcápsulas de LGG obtenidas mediante secado por aspersion a diferentes temperaturas de entrada	46
9	Supervivencia de las células de LGG libres y encapsuladas ante condiciones de tracto gastrointestinal in vitro	48
10	Supervivencia de LGG libre y microencapsulado, almacenado a 4 y 22°C	50
11	Viabilidad de LGG libre y microencapsulado, en una bebida de té verde almacenada a 4 °C	51



12	Viabilidad de LGG microencapsulado, en una bebida de té verde con 0.1 mg/mL de ácido ascórbico, almacenada a 4 °C	53
13	Modelo de la conformación de las microcápsulas de LGG en una bebida de té verde	54
14	Aceptabilidad general de tres formulaciones de té verde con probióticos	55
15	Aceptabilidad del sabor, color y aroma de tres formulaciones de té verde con probióticos microencapsulados	57
16	Supervivencia de células microencapsuladas de LGG en una bebida de té verde almacenada a 4 °C	59
17	Concentración de compuestos polifenólicos totales, en una bebida de té verde con probióticos microencapsulados	61
18	Promedios de la iluminancia registrada durante 5 semanas en el refrigerador donde se almacenó la bebida de té verde con probióticos microencapsulados	63
19	Actividad de inhibición del radical ABTS y DPPH de un té verde con probióticos microencapsulados, almacenado a 4°C	64
20	Función de rechazo de una bebida de té verde con probióticos microencapsulados, almacenada a 4 °C	65

## RESUMEN

El objetivo del proyecto fue desarrollar una bebida de té verde adicionada con probióticos microencapsulados en una mezcla de almidón modificado de huauzontle (AMH) y aislado de proteína de suero de leche (APSL). Inicialmente se extrajo el almidón de las semillas de huauzontle (ANH) y se hizo pasar por un proceso de hidrólisis ácida y extrusión para obtener AMH. Éste presentó una mayor solubilidad en agua y menor viscosidad que el ANH, cambios que favorecieron su uso como agente microencapsulante mediante secado por aspersion. A continuación se utilizó una mezcla de AMH y APSL (1.6:1 p/p) como matriz para microencapsular células de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) mediante secado por aspersion. Las microcápsulas contenían  $09.01 \pm 0.03$  log UFC/g y favorecieron la supervivencia de las células ante condiciones de tracto gastrointestinal simulado y almacenamiento a 4 y 22°C, en comparación con las células libres. A continuación, en un experimento preliminar, se observó que cuando se adicionaron las microcápsulas de LGG a una bebida de té verde presentó una disminución de 2 log UFC/mL de las células, durante los primeros tres días de almacenamiento a 4°C (situación que pudo ser parcialmente evitada mediante la adición de ácido ascórbico) y el acomplejamiento de aproximadamente 40% de los compuestos polifenólicos del té verde a las mismas. Posteriormente se realizó un análisis sensorial de tres formulaciones de té verde con las microcápsulas generadas, a partir del cual se estableció una formulación final con 3% de sacarosa y 0.15% de stevia como endulzante; y se tomó la consideración de almacenar la bebida en un contenedor no transparente. Finalmente se determinó la vida de anaquel sensorial de la bebida envasada en botellas color ámbar y almacenadas a 4°C por 5 semanas. Durante tal periodo no se registraron cambios significativos en el pH, acidez titulable o concentración de azúcares reductores, y se observó una buena estabilidad de los compuestos polifenólicos totales y la actividad antioxidante de la bebida. La vida de anaquel sensorial fue diferente dependiendo del género del evaluador, siendo aproximadamente 20% más corta para las mujeres. En conclusión, los resultados sugirieron que el sistema de encapsulación desarrollado a partir de AMH y APSL puede ser utilizado para adicionar células de LGG a una bebida de té verde lista para consumo, permitiendo que las células se mantengan viables y sin fermentación de la bebida, favoreciendo además la estabilidad de la concentración de compuestos polifenólicos totales y capacidad antioxidante durante al menos 5 semanas.

Palabras clave: *huauzontle, almidón, probióticos, microencapsulación, té verde, proteína de suero de leche.*

## SUMMARY

The aim of the work was to develop a ready-to-drink green tea beverage with the addition of probiotics microencapsulated in a mixture of huauzontle modified starch (HMS) and whey protein isolate (WPI). Initially starch was extracted from huauzontle seeds and then hydrolyzed with acid and extruded to obtain HMS. Such process allowed HMS to have a higher solubility in water and a lower viscosity than the native starch. These changes were favorable for the use of HMS on spray drying. Then, a mixture of HMS and WPI (1.6:1 w/w) was used as wall material to encapsulate *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) cells via spray drying. The obtained microcapsules had a viability of 9 log CFU/g and protected LGG throughout a simulated gastrointestinal tract and storage at 4 and 22°C compared to free cells. During a preliminary experiment, it was observed that the addition of microcapsules to a green tea beverage caused a 2 log CFU/mL drop during the first three days of storage at 4 °C (situation that was partially prevented by adding ascorbic acid to the product) and the binding of approximately 40% of the green tea polyphenols to the microcapsules. After that, a sensory test was conducted to evaluate three formulas of a ready-to-drink green tea with the LGG microcapsules, from which it was determined that final formula should have had 3% of sucrose and 0.15% of stevia as sweeteners, and that the beverage was going to be placed in a non-transparent container. Finally, sensory shelf life of the beverage was analyzed using amber bottles stored at 4°C for five weeks. During the storage of the product, no changes were observed on pH, titratable acidity or reducing sugar content. No decrease in total polyphenol compounds or antioxidant capacity was observed as well. Shelf life of the products turned out to be different among evaluator's genders, being approximately 20% shorter for females. In conclusion, the data suggests that the encapsulation system for LGG that was developed using HMS and WPI is suitable to be incorporated on a ready-to-drink green tea beverage, allowing probiotic cells to survive on the product during at least five weeks without fermentation of the beverage, and avoiding the reduction of the total polyphenol content and antioxidant capacity.

Key words: *huauzontle, starch, probiotics, microencapsulation, green tea, whey protein.*

## I. INTRODUCCIÓN

El consumo de productos probióticos se ha asociado a diversos beneficios a la salud. Entre las diferentes cepas existentes, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) ha sido ampliamente estudiado puesto que su consumo se ha relacionado a la salud del tracto gastrointestinal y el sistema inmune (Capurso, 2019). Actualmente la mayoría de los productos probióticos se comercializan en formulaciones lácteas, sin embargo existe una creciente demanda por productos que no contengan lactosa (Kandylis et al., 2016). En este contexto, el té verde representa una matriz alimenticia potencial considerando su alto contenido de compuestos polifenólicos. El consumo de éstos tiene múltiples beneficios a la salud principalmente asociados a su capacidad antioxidante, característica que también puede ayudar a mantener la viabilidad de las células probióticas las cuáles son sensibles al oxígeno (López de Lacey et al., 2014; Šipailienė and Petraitytė, 2018). Sin embargo, cuando se agregaron probióticos a una bebida de té verde lista para consumo se detectó una disminución de la aceptabilidad del producto a partir de los 12 días de almacenamiento a 4°C, lo cual pudo ser consecuencia de la disminución del pH y aumento de la acidez titulable (Tewari et al., 2018). Así, la tecnología de microencapsulación podría ayudar a solucionar tal situación puesto que segrega a las células de la matriz que la contiene promoviendo la estabilidad de tales parámetros (Ding and Shah, 2008). De las diferentes matrices que pueden utilizarse para tales fines, mezclas de proteína de suero de leche y almidón se han implementado con éxito permitiendo la supervivencia de células probióticas en productos como yogurt y jugo de frutas (Castro-Becerra, 2010; Ying et al., 2013). Sin embargo, en ocasiones los almidones deben ser modificados para que sus características funcionales sean compatibles para su uso mediante secado por aspersión (Gharsallaoui et al., 2007).

Aunque existen diversas fuentes a partir de las cuáles obtener almidón, las tendencias actuales apuntan a la evaluación de fuentes novedosas ya que la diversidad de cualidades tecnológicas de los almidones es tan amplia como la variedad de especies que los poseen (Falfán-Cortés et al., 2014). En este contexto, el huauzontle representa una opción interesante puesto que es un pseudocereal de la dieta tradicional mexicana cuyo uso se ha limitado únicamente al consumo de la infusión y al uso de las

semillas únicamente para la producción de más plantas, pese a que sus semillas pueden contener hasta 50% de almidón (Assad-Bustillos et al., 2014).

Así, el objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de una bebida de té verde adicionada con células de LGG microencapsuladas mediante secado por aspersión en una mezcla de AMH y aislado de proteína de suero de leche.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Alimentos probióticos, prebióticos y simbióticos

Las bacterias probióticas han sido incorporadas a diversos alimentos, especialmente a productos lácteos; esto debido a la asociación natural histórica entre las bacterias ácido-lácticas y la leche fermentada. Algunos productos que contienen probióticos son yogurt, queso, helado, salami y pan (Šipailienė y Petraitytė, 2018), aunque aproximadamente el 80% de la venta de probióticos se hace a través de yogurt. No obstante, el consumo de productos lácteos se ha asociado a algunos riesgos a la salud como intolerancia a la lactosa, alergias a las proteínas de la leche o por el contenido de grasa y colesterol de la misma (Prado et al., 2008; Vijaya-Kumar et al., 2015). Estas situaciones, en conjunto con las crecientes tendencias a mantener una dieta vegana o libre de lácteos, hace necesario el desarrollo de productos probióticos en matrices de una índole distinta. Algunas bebidas de este tipo que se han desarrollado a nivel investigación en todo el mundo, utilizan matrices como el jugo de frutas y cereales (Kandyliis et al., 2016).

Así también es posible que a un producto probiótico se incorporen prebióticos. Estos últimos son definidos como aquellos substratos que son selectivamente fermentados por los microorganismos de un huésped, confiriendo beneficios a su salud de éste (Kayshap y Quigley, 2018). De modo que aquellos alimentos que contienen tanto prebióticos como probióticos han sido nombrados como productos *simbióticos*, y están diseñados para incrementar los beneficios de los probióticos así como estimular el crecimiento de microorganismos benéficos (Azizi, 2015). Por tal motivo, una propuesta interesante para el desarrollo de productos probióticos no lácteos, es la selección de matrices alimenticias con actividad prebiótica.

Cuando se desarrolla un producto probiótico o *simbiótico*, es importante tomar las consideraciones necesarias respecto a la composición del mismo, tipos de empaque y las condiciones de almacenamiento, puesto que son factores que influyen de manera

importante en la supervivencia de estos microorganismos. A continuación se describen algunas de ellas.

El oxígeno molecular es dañino para los probióticos debido a su naturaleza anaerobia. Éste puede afectar de manera negativa a dichos microorganismos al ser directamente tóxico para las células. O de manera indirecta, por ejemplo, debido a la toxicidad de los radicales libres que son generados de la oxidación de componentes como las grasas. Por ello, para minimizar la oxidación y maximizar la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento, la presencia de antioxidantes puede ser efectiva (Tripathi y Giri, 2014). En este respecto, las catequinas de extracto de té verde han mostrado buenos resultados en el crecimiento de cepas probióticas con diferentes sensibilidades al oxígeno. Esto hace del té verde, como tal, una opción interesante como matriz alimenticia para el desarrollo de productos probióticos (Gaudreau et al., 2013).

Los ingredientes en los alimentos pueden ser protectores, neutrales o detrimentales para la estabilidad de los probióticos, de modo que debe considerarse la compatibilidad de éstos con los ingredientes. Algunos aditivos como los agentes curantes pueden significar un reto para la supervivencia de los microorganismos probióticos. Sin embargo, algunos otros como los hidrolizados de proteína de suero de leche, compuestos antioxidantes y prebióticos, tienen efectos positivos en la supervivencia de las células durante el almacenamiento. Esto ya que proveen de nutrientes, reducen el potencial redox o incrementan la actividad amortiguadora del medio (Tripathi y Giri, 2014).

Debe considerarse también que la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento es inversamente proporcional a la temperatura. Este tipo de productos suelen almacenarse preferentemente entre 4 y 5°C (Tripathi y Giri, 2014). Además, el pH y acidez titulable del medio afectan de manera importante la viabilidad celular. Algunas cepas de *Lactobacillus* tienen pH óptimos de crecimiento entre 5.5 y 7, aunque pueden sobrevivir a pH de 3.7-4.3 (Tripathi y Giri, 2014).

Algunos aspectos del empaque que tienen influencia en la vida de anaquel de productos probióticos son el tipo y dureza de los materiales, la permeabilidad a gases y luz, entre otros. La temperatura y humedad durante el almacenamiento afecta la permeabilidad del material de empaque y por ende también puede afectar la viabilidad

celular (Cruz et al., 2007). Es de especial interés la permeabilidad al oxígeno, por los factores mencionados anteriormente. Cruz et al. (2013) observaron que contenedores de vidrio con las menores tasas de permeabilidad al oxígeno presentaron las mayores cuentas viables de bacterias probióticas durante el almacenamiento en refrigeración. Adicionalmente, estas mismas muestras mostraron una mayor extensión de post-acidificación y producción de ácidos orgánicos.

## **2.2. Té verde como matriz para la adición de probióticos**

El término *té verde* se utiliza para denominar aquellas infusiones hechas de las hojas de la planta *Camellia sinensis*. La obtención de té verde se hace sin fermentación de las hojas y su preparación protege a los polifenoles de ser oxidados; de modo que éste contiene una importante cantidad de antioxidantes. El té verde es una mezcla compleja de compuestos que incluyen polifenoles, aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, vitaminas, polisacáridos y L-teanina. Los polifenoles son los componentes mayoritarios de este producto, siendo los flavonoides los más abundantes de éstos. Entre ellos se encuentran la epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) y epigalocatequina galato (EGCG). Contiene también otros compuestos como la cafeína, aunque con una concentración menor a la mitad de la que se encuentra en el café (Singhal et al., 2017).

El té verde tiene el estatus de Reconocido Como Seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la *Food and Drug Administration* (Cooper, 2012) y un estudio reciente ha mencionado que un nivel seguro observado de 704 mg EGCG/día puede ser considerado para el consumo de bebidas de té por humanos (Hu et al., 2018). El consumo de esta bebida es parte de la medicina tradicional china; sin embargo, en las últimas décadas su empleo se ha expandido alrededor del mundo al igual que el interés por los potenciales beneficios a la salud asociados a su consumo. Se ha generado evidencia científica que sugiere que entre estos beneficios se encuentran la disminución en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, diabetes y asma; también se ha mostrado que puede ayudar a la pérdida de peso y a disminuir el estrés (Singhal et al., 2017).



López de Lacey et al. (2014) concluyeron por primera vez que el té verde era una matriz alimentaria potencial para la incorporación de probióticos. Para ello, inocularon una suspensión de células de *L. acidophilus* en extracto de té verde (0.5% p/v) y analizaron la viabilidad de los microorganismos durante 72 horas a 37°C. Estos autores observaron que el log de la cuenta viable se mantenía entre 5 y 2 después de 24 h. Dichos resultados podrían no parecer tan favorables considerando la recomendación de que los productos probióticos deben contener al menos 7 log UFC/mL al final de la vida de anaquel del producto (Šipailienė y Petraitytė, 2018) sin embargo, este análisis se realizó a 37°C. Si la adición de los microorganismos al té se realiza con intenciones de desarrollar un producto comercial listo para consumo, éste debería conservarse en refrigeración a 4°C, condición que podría mantener un número importante de microorganismos viables durante más tiempo (Daneshi et al., 2013).

Recientemente y en un ambiente más cercano a la realidad de un producto comercial, Tewari et al. (2018) incorporaron células de *L. acidophilus* a una bebida de té verde lista para consumo la cual se almacenó a 4°C. Ésta contenía 0.14% de sólidos de té (p/v), 9% de sacarosa (p/v), 2% (p/v) del cultivo de *L. acidophilus* y 1.26, 6.75 y 0.99% de fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) e inulina, respectivamente. Después de 28 días de almacenamiento la cuenta viable disminuyó menos de 1 log de modo que en este punto se obtuvieron 7.74 log UFC/mL. Este resultado favorable se atribuyó a la mezcla optimizada de GOS, FOS e inulina, así como a la temperatura de refrigeración. Sin embargo, en el análisis sensorial se observó que la aceptabilidad general (que fue evaluada por un panel entrenado de 15 personas mediante una escala hedónica de 9 puntos) fue de  $1.0 \pm 0.0$  al final de los 28 días. Esto significó que el 100% de los evaluadores contestó que la bebida “les desagradaba mucho”. Este comportamiento se asoció al desarrollo de aromas y sabores desagradables, así como un color que dejó de gustar a los panelistas y que se correlacionó con la caída del pH y aumento de la acidez titulable.

Así, aunque el almacenamiento a 4°C pudo mantener la cuenta viable de los microorganismos, esto no fue suficiente para mantener también la aceptabilidad sensorial del producto durante los 28 días analizados. Para solucionar esto, los autores realizaron un secado por aspersion de la bebida con la idea de preservar las

características sensoriales del producto fresco (Tewari et al., 2018). No obstante, esta acción elimina la característica de ser un producto listo para consumo; y ya que dicha propiedad es de creciente interés para el mercado actual debido al rápido ritmo de vida moderno (Silva et al., 2005), sería importante encontrar alternativas que permitan mantener dichas propiedades.

Además es importante mencionar que el producto propuesto por Tewari et al. (2018) contenía 9% de azúcar. Considerando que México es uno de los países con mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad así como el alto índice de consumo de bebidas azucaradas (Afeiche et al., 2018), es primordial que el desarrollo de nuevos productos tome en cuenta estos antecedentes como base para la creación de bebidas bajas o libres en calorías para su posterior comercialización en el país. Así, una alternativa es el uso de edulcorantes no calóricos como el stevia que tiene el estatus de generalmente reconocido como seguro por la FDA (Ciriminna et al., 2019).

Sobre este contexto, una alternativa que podría ayudar a mantener la viabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento así como las propiedades organolépticas del mismo, es la microencapsulación de los probióticos.

### **2.3. Tecnología de microencapsulación**

La microencapsulación se define como la tecnología de recubrir materiales sólidos, líquidos o gases, en cápsulas miniatura que pueden liberar su contenido a tasas controladas y bajo la influencia de condiciones específicas (Anal y Singh, 2007). El tamaño de las cápsulas debe estar entre 0.2 - 5000  $\mu\text{m}$  para que se considere microencapsulación (Azizi A, 2015).

Si lo que se encapsulan son probióticos, este método permite segregar a las células del ambiente que las rodea lo que genera beneficios como proteger a los microorganismos de condiciones adversas durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos (Tripathi and Giri, 2014). Esto es de suma importancia pues se recomienda que la cantidad de organismos viables sea igual o mayor a  $10^7$  UFC por ml o g del producto, al momento de consumirlos (Šipailienė and Petraitytė, 2018). De igual forma ayuda a proteger a las células del paso por el tracto gastrointestinal, mejora y estabiliza las propiedades sensoriales e incluso es posible conseguir una distribución más

homogénea de los probióticos en el producto, debido a la inmovilización de los mismos (Tripathi and Giri, 2014).

Previamente se mencionó que el rechazo sensorial que ocurrió en la bebida de té verde con probióticos y prebióticos del trabajo de Tewari et al. (2018) se correlacionó con la caída del pH y el aumento de la acidez titulable del producto. Los prebióticos que se agregaron a la bebida (FOS, GOS e inulina) son carbohidratos que pueden ser metabolizados por las células probióticas que se encuentran libres y, en consecuencia, producir ácidos orgánicos que disminuyen el pH y aumentan la acidez. No obstante se ha observado que la microencapsulación, al segregar a las bacterias del medio, puede resultar en cambios menos bruscos de pH y acidez titulable de jugos refrigerados (Ding and Shah, 2008). De modo que esta tecnología podría ayudar a resolver el problema de la disminución en la aceptabilidad general de una bebida de té verde adicionada con probióticos al retrasar la fermentación.

Ahora bien, la microencapsulación de probióticos se puede realizar mediante diversos métodos como la extrusión, coacervación, liofilización y secado por aspersión. La extrusión implica la preparación de una solución de hidrocoloide a la cual se le agregan los microorganismos y esto se extruye a través de una jeringa formando gotas que caen en una solución que solidifica las esferas (Martín et al., 2015). A pesar de sus múltiples ventajas, su uso a gran escala se ve limitado debido a la lenta formación de las microcápsulas (Mortazavian et al., 2007). Otro método es la coacervación, que se refiere a la separación de fases de coloides liófilos, en microgotas líquidas en lugar de agregados. La fase con una mayor concentración de componentes coloidales es el coacervado, mientras que la fase con la mínima concentración de biopolímero es la solución de equilibrio. Aunque este método tiene una eficiencia de encapsulación muy alta, el proceso resulta altamente costoso y complejo, lo que ha frenado su uso a escala industrial (Soukoulis y Bohn, 2018). También se incluye el método de liofilización, en donde las células son primero congeladas y luego secadas por sublimación bajo condiciones de vacío; siendo en esta última etapa donde se remueve el líquido en que estaban suspendidas las mismas. A pesar de su alta eficiencia generalmente no se usa a gran escala puesto que es un proceso que consume demasiado tiempo y energía (Barbosa et al., 2015).

### **2.3.1. Secado por aspersión**

Otra técnica de microencapsulación es el secado por aspersión, que presenta diversas ventajas en comparación con los métodos antes mencionados. En esta técnica, un líquido es atomizado en un gas caliente lo que instantáneamente lleva a la formación de un polvo. Presenta diversas ventajas como bajo costo, alta productividad y puede realizarse de forma continua y de manera rápida. Se ha reportado que puede llegar a ser hasta seis veces más barato que la liofilización, por kg de agua removida. Debido a lo anterior es uno de los métodos de encapsulación más utilizados en la industria alimenticia. Sin embargo, las altas temperaturas, el estrés osmótico, la deshidratación y la exposición al oxígeno (condiciones inherentes al proceso) pueden resultar en un daño a los ácidos grasos, proteínas intracelulares, ribosomas, ADN y ARN de las bacterias probióticas causando su muerte. Para superar estas carencias y así mejorar la supervivencia de los probióticos durante el secado por aspersión, se han aplicado distintos métodos. El ajuste de los parámetros del secado por aspersión como la temperatura de entrada/salida, el flujo, la presión del aire durante el atomizado y el tiempo de residencia, son algunas de las estrategias que puede realizarse. Normalmente la reducción de las condiciones en los parámetros anteriores está relacionada con una mayor supervivencia por parte de las bacterias. Esto atribuido a un menor daño térmico en las células y menor esfuerzo cortante durante la atomización (Barbosa et al., 2015; Liu et al., 2017a).

### **2.3.2. Matrices para el secado por aspersión**

Otra estrategia para proteger a las bacterias probióticas ante las condiciones adversas del secado por aspersión, es la selección cuidadosa de los materiales de pared. Los más comúnmente utilizados para este fin (todos naturales, de bajo costo, biocompatibles y generalmente reconocidos como seguros) son carbohidratos como el almidón, maltodextrina, pectina, goma arábica; y proteínas como la obtenida del suero de la leche, soya, etc. (Azizi, 2015). También se han propuesto sistemas binarios que utilizan una combinación de éstos, los cuales han resultado en mayores eficiencias de encapsulación y tasas de supervivencia así como mayor capacidad para sobrevivir a la digestión gastrointestinal *in vitro* y al almacenamiento, cuando se comparan con la microencapsulación con un único material (Liu et al., 2017).

### 2.3.1.2. Proteína de suero de leche

Las proteínas de los alimentos pueden ser utilizadas como material para encapsular debido a su alto valor nutricional y sus excelentes propiedades. Un ejemplo de éstas es la mezcla de proteínas globulares que se aíslan del suero de la leche, que es un material residual que se genera como parte del proceso de producción de quesos. Dicha mezcla se conoce como aislado de proteína de suero de leche (APSL) y consta principalmente de tres proteínas:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y albúmina sérica bovina (Corrochano et al., 2018). Las proteínas presentes en el APSL tienen la capacidad de interactuar con una amplia variedad de sustancias y pueden proteger sustancias activas hasta su liberación en el huésped. Por ejemplo, se ha documentado que la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina tienen una fuerte afinidad para interactuar con (-)-EGCG, compuesto polifenólico mayoritario en el té verde. Esta interacción puede resultar en la protección del (-)-EGCG contra la degradación y proteger su actividad antioxidante (Al-Hanish et al., 2016; Chen et al., 2019). La evidencia sugiere incluso que tales uniones pueden aumentar la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos (Bhushani et al., 2016) y que la actividad biológica de éstos no se ve afectada, por ejemplo en lo referente a su actividad anti-proliferativa contra ciertas líneas celulares (Al-Hanish et al., 2016; von Staszewski et al., 2012) y su actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas (Carson et al., 2018).

Otro beneficio potencial de la proteína de suero de leche como matriz es la hidrólisis de las mismas por parte de las enzimas digestivas. Esto puede generar péptidos bioactivos que ejerzan distintos efectos fisiológicos *in vivo* (Martín et al., 2015). Este material ha mostrado protección a probióticos microencapsulados, hasta por 3 horas en una incubación gástrica *in vitro* (Doherty et al., 2011) además de que sus propiedades de barrera contra el oxígeno pueden ayudar a proteger a las células probióticas (Galus and Kadzińska, 2019).

### 2.3.1.1. Almidón

El almidón está compuesto de dos tipos de alfa-glucanos, amilosa y amilopectina. La primera es una molécula lineal de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosil unidas mediante un enlace  $\alpha(1\rightarrow4)$ , mientras que la segunda es una molécula ramificada formada también

por unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosil unidas de la misma manera, aunque con ramificaciones generadas por enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Es uno de los tres polisacáridos más abundantes en la naturaleza y también uno de los materiales más multifuncionales utilizados por las industrias debido a sus muchas aplicaciones tecnológicas (Agama-Acevedo et al., 2019).

Sin embargo, los almidones nativos no siempre cumplen con las características necesarias para una aplicación industrial específica. Por ejemplo, para que un material pueda ser considerado como adecuado para el secado por aspersión, éste debe tener una alta solubilidad en agua y baja viscosidad a las temperaturas de secado (Gharsallaoui et al., 2007), características de las que suele carecer el almidón nativo. Así, para cumplir con tales especificaciones, los almidones pueden ser modificados. Los métodos convencionales de modificación suelen requerir grandes cantidades de reactivos químicos que pueden conllevar a problemas de contaminación ambiental. Por el contrario, la tecnología de extrusión es un proceso de alta temperatura y corto tiempo que presenta la ventaja de su gran versatilidad y ausencia de efluentes. Durante dicho proceso el almidón es calentado, transportado y comprimido por un tornillo y después presionado contra un dado, dando como resultado cambios moleculares. Entre esto se incluye la disrupción de la estructura cristalina del almidón y la reducción de las cadenas poliméricas por moléculas más pequeñas, que se traducen en un aumento de la solubilidad en agua y disminución de la viscosidad (Murúa-Pagola et al., 2009). Almidones provenientes de diversas fuentes como maíz, amaranto y arroz han sido modificados mediante extrusión para su posterior uso como matrices de microencapsulación mediante secado por aspersión (Calvo-López, 2018; Castro-Becerra, 2010; N. Falfán-Cortés et al., 2014; Murúa-Pagola et al., 2009).

En ocasiones, los almidones son hidrolizados con ácido previo al proceso de extrusión lo cual conlleva a la formación de moléculas de almidón más pequeñas luego de la hidrólisis. Dichas moléculas tienen mayor libertad y movilidad para retrogradar y producir estructuras resistentes a la digestión por la alfa-amilasa (Hasjim and Jane, 2009), y que se denominan como almidón resistente (AR). Estas estructuras resisten la digestión durante su paso por el tracto gastrointestinal, de modo que pueden ser fermentados por la microbiota del colon. Se ha sugerido que la incorporación de AR a la dieta puede

incrementar la sensación de saciedad y reducir la densidad calórica de un alimento debido a que no puede ser digerido. Además, su consumo prolongado puede aumentar el número de bacterias del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y disminuir el de coliformes que hay en el colon. Su ingesta también se asocia a un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta y disminución del pH intestinal (Higgins, 2014). Estas son algunas de las razones por las que al AR se le atribuyen efectos fisiológicos protectores contra padecimientos como la diabetes, cáncer de colon, enfermedades cardiovasculares y obesidad (Fuentes-Zaragoza et al., 2010), además de ser considerado como prebiótico (Fuentes-Zaragoza et al., 2011). En resumen, la habilidad del AR a escapar de la digestión en el intestino delgado, los beneficios antes mencionados, su bajo costo y fácil procesamiento, hacen de este un material de pared apropiado para la liberación de probióticos al intestino (Ashwar et al., 2016).

No obstante, el proceso de hidrólisis ácida previo a la extrusión genera grandes cantidades de residuos debido a que la hidrólisis se lleva a cabo en soluciones de 20-40% de sólidos con 3.6% de HCl y se requiere un proceso de lavado final (Hasjim and Jane, 2009; Murúa-Pagola et al., 2009). Recientemente Calvo-López (2018) desarrolló un proceso de hidrólisis ácida de almidón de maíz, en el que la reacción ocurre ajustando la humedad del almidón al 11% con una solución de 0.5% de HCl. El almidón obtenido al final no requiere de lavados antes de ser alimentado al extrusor. Implementando dicho proceso, Calvo-López (2018) obtuvo un almidón con alta solubilidad en agua y baja viscosidad, lo que benefició su uso para el proceso de secado por aspersion a partir del cual obtuvo altos rendimientos de microencapsulación de betalaínas. Además, gracias a las propiedades termodinámicas obtenidas como consecuencia de la modificación, se sugirió que dicho material podía ser utilizado en alimentos de alta actividad de agua.

Así, combinaciones de AR y proteína de suero de leche han sido utilizadas anteriormente para microencapsular probióticos por secado por aspersion, obteniendo buenos resultados. Por ejemplo, Castro-Becerra (2010) utilizó estos materiales para encapsular células de *B. brevis*, reportando que la disminución de la viabilidad después del proceso de secado por aspersion fue de 0.25 log UFC/mL, y de 0.54 log UFC/mL luego de su almacenamiento en yogurt durante 4 semanas a 4°C. Ying et al (2013)

utilizaron el mismo método para encapsular células de LGG, observando una pérdida de viabilidad menor a 1 log UFC/mL luego de la formación de las microcápsulas, y de 2.5 log UFC/mL cuando éstas se colocaron en jugo de manzana durante 4 semanas a 4°C (el cual tenía un pH de 3.5).

#### **2.4. Huauzontle, fuente novedosa para la obtención de almidón**

Los almidones comerciales más comunes se obtienen de maíz; por ende muchos de los trabajos de encapsulación de probióticos utilizan almidón de maíz. Aunque también se han estudiado otras fuentes para esta finalidad, como el arroz y el amaranto (Ashwar et al., 2018; Falfán-Cortés et al., 2014; Fuentes-Zaragoza et al., 2010). Sin embargo, la diversidad de cualidades tecnológicas de los almidones es tan amplia como la variedad de especies que los poseen. Por lo tanto es de interés la búsqueda de nuevas fuentes para la obtención de dichos materiales (Falfán-Cortés et al., 2014).

En México existe un pseudocereal conocido como huauzontle (*Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae*), cuya parte comestible es la inflorescencia y que se comercializa como una verdura en algunos estados del centro del país. La semilla de esta planta se utiliza únicamente para la producción de plántulas, pese a que como los demás pseudocereales es rica en almidón (Aghamirzaei et al., 2013; SAGARPA, 2013). Assad-Bustillos et al. (2014) realizaron una caracterización fisicoquímica, funcional, térmica y reológica del almidón de semillas de huauzontle. Observaron que éste tenía un 50% de rendimiento de extracción y que presentó valores de hinchamiento y solubilidad en agua similares a los del maíz. Además dichas semillas contienen otros compuestos como saponinas, polifenoles y fibra, lo que podría permitir el aprovechamiento integral de la semilla (Lazo-Vélez et al., 2016).

Por lo anterior, y con el fin de diversificar las aplicaciones de las semillas del huauzontle, en este trabajo se propuso su uso como fuente para la obtención de almidón y su posterior uso como matriz para microencapsular probióticos, en combinación con proteína de suero de leche. Los probióticos encapsulados fueron incorporados a una bebida de té verde lista para consumo, a partir de cuál se evaluó su vida de anaquel sensorial en conjunto con los cambios fisicoquímicos ocurrido durante el almacenamiento.



### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. General**

Desarrollar una bebida de té verde, adicionada con células de LGG, microencapsuladas en una mezcla de almidón modificado de huauzontle y proteína de suero de leche.

#### **3.2. Específicos**

- Obtener y caracterizar almidón de semillas de huauzontle modificado por hidrólisis ácida y extrusión.
- Evaluar el efecto de dos temperaturas de entrada en el secador aspersion, en las características fisicoquímicas de microcápsulas con células viables de LGG, utilizando como matriz almidón modificado de huauzontle y aislado de proteína de suero de leche.
- Evaluar el efecto de la microencapsulación en la supervivencia de LGG ante condiciones de tracto gastrointestinal simulado y almacenamiento.
- Generar y caracterizar fisicoquímicamente una bebida de té verde con LGG microencapsulado, y determinar su vida anaquel sensorial.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

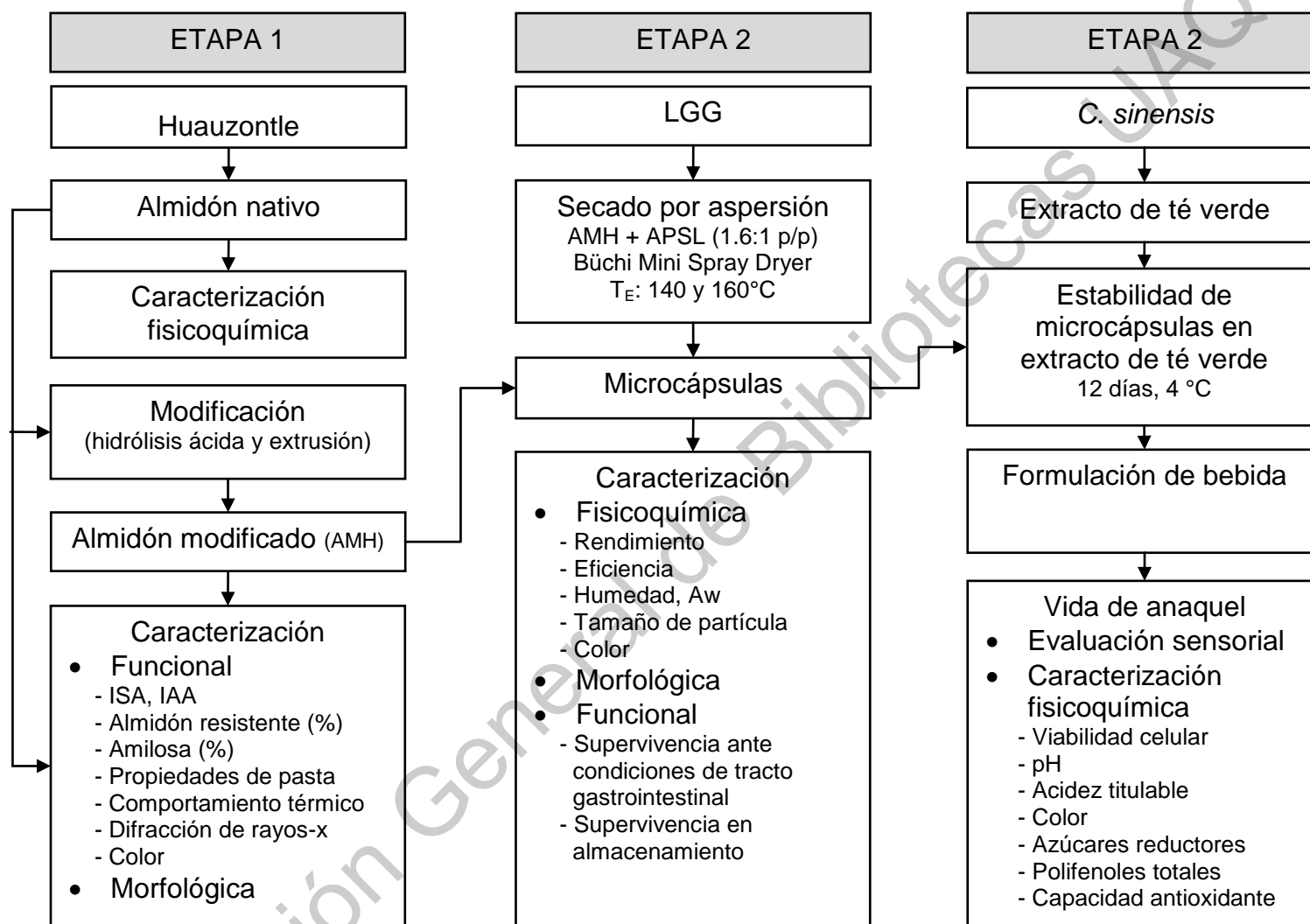
Las semillas de huauzontle (*C. berlandieri* spp. *nuttallie*) fueron obtenidas de un proveedor en Cholula, Puebla, México. El aislado de proteína de suero de leche fue donado por Hilmar Ingredients (California, USA) y, de acuerdo al fabricante, contenía 90.5% de proteína, 0.1% de lactosa, 0.22% de grasa, 4.16% de humedad y 2.6% de cenizas. Se utilizó LGG (ATCC 53103) perteneciente al cepario del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del departamento de Ciencia de los Alimentos y Nutrición Humana de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. Las hojas de *C. sinensis*, variedad Gyokuro, fueron adquiridas de Teavana (Seattle, USA).

### 4.2. Métodos

De manera general, la metodología se planteó en tres etapas (**Figura 1**). La primera etapa se diseñó para cumplir el primer objetivo específico e involucró la extracción, modificación (mediante hidrólisis ácida y extrusión) y caracterización del almidón de semillas de huauzontle. En esta etapa se buscó que las características del almidón modificado fueran favorables para su uso como material de pared para la microencapsulación por secado por aspersión.

La segunda etapa abarcó el cumplimiento del segundo y tercer objetivo específico. Para esto, una mezcla de AMH y APSL se utilizó para la microencapsulación de células de LGG mediante secado por aspersión. Se probaron dos temperaturas de entrada en el secador, y se evaluaron las características fisicoquímicas, morfológicas y funcionales de las microcápsulas obtenidas a ambas condiciones. A partir de dicha evaluación se seleccionó una temperatura de entrada como condición para la microencapsulación, y las microcápsulas obtenidas mediante dichas condiciones se utilizaron en los experimentos posteriores.

La tercera y última etapa comprendió el tercero y cuarto objetivo específico. En ésta, se obtuvo un extracto de té verde a partir de hojas de *C. sinensis* y se preparó una bebida modelo a la que se le adicionaron las microcápsulas de LGG para estudiar la estabilidad de las mismas durante el almacenamiento del producto en refrigeración.



**Figura 1.** Diagrama general de la metodología. ISA: índice de solubilidad en agua; IAA: índice de absorción de agua; APSL: aislado de proteína de suero de leche; TE: temperatura de entrada.

Datos recabados de este experimento se utilizaron para generar formulaciones de una bebida de té verde. Con la formulación seleccionada se montó un análisis de vida de anaquel sensorial, en el cuál se monitorearon algunos parámetros fisicoquímicos del producto.

Así, se detallan a continuación los métodos utilizados en cada etapa.

## **Etapa 1**

### **4.2.1. Extracción de almidón de semillas de huauzontle.**

Las semillas de huauzontle se limpiaron manualmente para asegurar la remoción de materia extraña. La extracción se realizó de acuerdo a lo establecido por (Lindeboom et al., 2005) con modificaciones. Para esto se molieron las semillas con ayuda de una licuadora, y la harina obtenida se remojó en agua desionizada (1:5, p/v) a 4 °C durante 16 horas. Posteriormente la pasta se licuó nuevamente durante 1 minuto y se dejó en reposo por 1 hora. La pasta se prensó utilizando tela chifón, el filtrado se tamizó utilizando una malla No. 200 (Tyler) y se centrifugó a 4500  $\times g$  durante 15 minutos. La capa color café-gris que se formó sobre el precipitado blanco fue cuidadosamente removida utilizando una espátula. El pellet se resuspendió dos veces con agua destilada y se centrifugó a las mismas condiciones, eliminando la capa café-gris en cada lavado. Finalmente el pellet se lavó con etanol al 95% y acetona, se secó en horno de convección a 40°C durante 12 horas, se molió con ayuda de un molino (Krupps GX4100) y se guardó en bolsas de polietileno cerradas y a temperatura ambiente, hasta su posterior utilización. El almidón obtenido de este proceso se denominó almidón nativo de huauzontle (ANH).

### **4.2.2. Modificación del almidón**

La modificación del ANH se realizó mediante hidrólisis ácida y extrusión de acuerdo con la metodología de Calvo-López (2018). Para esto, al ANH se le adicionó HCl al 0.5% (p/p) en base seca, con agua suficiente para que la muestra tuviera una humedad final del 11%. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno y se almacenaron a 4°C durante 36 horas al final de las cuales la humedad se ajustó al 18%. Posteriormente se realizó el proceso de extrusión. Para esto se utilizó un extrusor de tornillo simple (diseñado y manufacturado por CINVESTAV-IPN, Querétaro) con un barril de diámetro

interno de 20 mm (longitud/diámetro=20). La temperatura del barril fue de 60, 136 y 170 °C en la alimentación, transición y salida, respectivamente. La relación de compresión del tornillo fue de 1:2, el diámetro de salida del dado fue de 5 mm y la velocidad de alimentación 89 rpm. Las muestras extrudidas fueron secadas en un horno de convección a 45°C durante 24 horas, se pulverizaron con un molino de maíz y fueron cernidas con una malla No. 60 (250 µm). El almidón modificado de huauzontle (AHM) obtenido se almacenó a temperatura ambiente en bolsas de polietileno, hasta su posterior uso.

#### **4.2.3. Caracterización fisicoquímica y funcional del almidón**

##### **4.2.3.1. Análisis bromatológico**

Se estimó la cantidad de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda del ANH, según los métodos AOAC (1990) 925.10, 923.03, 920.87, 920.85 y 962.09, respectivamente. Los carbohidratos se determinaron por diferencia y los azúcares reductores mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959).

##### **4.2.3.2. Contenido de amilosa y almidón resistente**

Se determinó el contenido de amilosa y almidón resistente del ANH y AHM utilizando los kits *Amylose/amylopectin* y *Resistant Starch (Megazyme)* acorde a las instrucciones del fabricante.

##### **4.2.3.3. Índice de solubilidad y absorción de agua**

El índice de absorción de agua (IAA) y el índice de solubilidad en agua (ISA) del ANH y AHM se determinaron con base en lo descrito por Anderson et al. (1969). Se colocaron 0.25 g de muestra en un tubo para centrífuga y se agregó 3 ml de agua destilada. La pasta se mantuvo a 30°C durante 30 minutos y se agitó cada 5 minutos con ayuda de un vórtex. Posteriormente el contenido se centrifugó a 2,012 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó en un crisol de aluminio (previamente puesto a peso constante) y se secó en estufa a 105 °C durante 2 horas. Dicho valor se registró como peso del residuo de evaporación y se utilizó para calcular el ISA utilizando la fórmula:

$$ISA = \frac{\text{Peso del residuo de evaporación}}{\text{Peso seco de la muestra}} \times 100$$

El pellet que se sedimentó se pesó y dicho valor se registró como peso del residuo de centrifugación. Éste sirvió para obtener el IAA con la siguiente fórmula:

$$IAA = \frac{\text{Peso del residuo de centrifugación}}{\text{Peso de la muestra} - \text{Peso del residuo de evaporación}}$$

#### 4.2.3.4. Propiedades de pasta

Las propiedades de pasta del ANH y AHM se midieron utilizando el equipo *Rapid Visco Analyzer* (RVA, modelo 3C, *Newport Scientific*, Warriewood, Australia). El análisis se basó en el programa estándar para análisis en RVA acorde a la metodología internacional aprobada de la AACC 61-02.01. Los ciclos de calentamiento y enfriamiento se programaron como se describe a continuación. Las muestras permanecieron a 50 °C por un minuto, luego se calentaron hasta 92 °C con rampas de 5.6 °C por minuto; se mantuvieron a esta temperatura por 5 minutos y luego se enfriaron de nuevo hasta 50 °C con rampas de 5.6 °C por minuto. La última temperatura se mantuvo por dos minutos. El tiempo total del análisis fue de 23 minutos.

#### 4.2.3.5. Comportamiento térmico

El comportamiento térmico del ANH y AMH se analizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un DSC (Mettler Toledo, 822). Se utilizaron crisoles de aluminio estándar de 40 µL y utilizando indio metálico como referencia. Se pesaron 5 mg de muestra por crisol a los cuales se agregaron 15 µL de agua grado HPLC. Los crisoles se dejaron estabilizar a 4°C durante 12 horas. El análisis se realizó calentando la muestra a razón de 10 °C por minuto de 25 a 130 °C.

#### 4.2.3.6. Difracción de rayos-x

El patrón de difracción de rayos X del ANH y AMH se analizó utilizando un difractómetro RIGAKU modelo Dmax2100. El equipo se operó a 20 mA y 30 kV. Se

analizó la región comprendida entre 4° y 50° del ángulo 2θ, con saltos de 0.03°. Para calcular el porcentaje de cristalinidad relativa (CR) se integró el área bajo la curva de los picos cristalinos y el área total utilizando el software *OriginLab Pro*, y los datos se colocaron en la fórmula siguiente:

$$CR = \frac{\text{Área de los picos cristalinos}}{\text{Área total}} \times 100$$

#### **4.2.3.7. Morfología**

La morfología de los almidones se determinó utilizando un Microscopio Ambiental Electrónico de Barrido (Phillips XL30 ESEM) ubicado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Recubrimientos Avanzados del CINVESTAV Unidad Querétaro. Las muestras se colocaron en una cinta adherente sobre una matriz metálica y se recubrieron con platino, para posteriormente ser analizadas.

#### **4.2.3.8. Color**

El color de los almidones se midió utilizando un colorímetro Hunter Lab. Los valores obtenidos fueron la luminosidad (L), color (+a: rojo, -a: verde, +b: amarillo, -b: azul) y diferencia de color (ΔE).

### **Etapas 2**

#### **4.2.4. Cultivo de LGG**

El material que se utilizó para el cultivo y manipulación de los probióticos fue previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos. El cultivo de LGG, que se encontraba conservado en glicerol (50% v/v), se reactivó mediante la transferencia de una azada a 5 mL de caldo MRS (preparado de acuerdo con instrucciones del fabricante). Esto se realizó en condiciones de anaerobiosis, a 37°C durante 24 h.

Se realizó una cinética de crecimiento del cultivo para determinar el tiempo aproximado en que se alcanzó la fase logarítmica tardía y el inicio de la fase estacionaria, del ciclo de vida. Lo anterior para seleccionar el tiempo de cultivo en que se debían recolectar las células para el secado por aspersión. La cinética se realizó durante 20 h, tomando muestra cada 2 h.

Para el conteo unidades formadoras de colonia (UFC) durante la cinética se utilizó el método de Miles y Misra (1938). Para esto, se realizaron diluciones decimales del cultivo en PBS y posteriormente se coloraron 20  $\mu$ L de cada dilución (por triplicado) en cajas de Petri con agar MRS. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones anaerobias. Finalmente la cuenta de UFC se llevó a cabo en aquellas cajas en donde el número de colonias fue entre 2 y 20.

Después del proceso de secado por aspersión se realizó un recuento de células con un nivel de estrés fuerte. Para esto se realizó el conteo de células como se mencionó anteriormente pero utilizando agar MRS adicionado con 2% de NaCl (MRSs). Así, el número de células con nivel de estrés fuerte se calculó como la diferencia en la cuenta de UFC entre los cultivos con medio MRS y MRSs (Moayyedi et al., 2018).

#### **4.2.5. Microencapsulación**

Primero se cultivaron las células de LGG como se explicó anteriormente, durante el tiempo necesario para obtener 9 log UFC/mL al inicio de la fase estacionaria. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 2,000  $\times$  g durante 10 minutos con dos lavados en PBS a las mismas condiciones de centrifugación. El pellet obtenido se utilizó para el secado por aspersión.

Además se prepararon, por separado, soluciones acuosas del APSL y AMH, al 7.5 y 20% de sólidos respectivamente. Las soluciones se dejaron hidratar en agitación constante a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación la suspensión del APSL se calentó en un baño de agua a 90 °C durante 10 minutos y se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. A esta suspensión se le agregó la suspensión de AMH en cantidad suficiente para que la mezcla final tuviera una relación de AMH y APSL de 1.6:1 (p/p). El pH se ajustó a 7 con NaOH 1 N y la matriz se homogenizó utilizando un Ultra-turrax (IKA, T-25) a 8,000 rpm durante 5 minutos. Se agregó el pellet de células y la matriz se mantuvo en agitación constante utilizando una placa de calentamiento y un agitador magnético. Se tomó una muestra de la suspensión para cuantificar la concentración de UFC antes de la microencapsulación.

Para la microencapsulación por secado por aspersión se utilizó el equipo Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Switzerland) con una boquilla de doble flujo de 0.5 mm. Previo a la microencapsulación, las piezas del equipo fueron lavadas y desinfectadas con etanol al



70%, el cual se dejó evaporar a temperatura ambiente antes de montar el equipo. Se realizaron, por triplicado y de manera aleatoria, experimentos con una temperatura de aire en la entrada ( $T_E$ ) de 140 y 160 °C y con un flujo de 7.5 mL/min (25% velocidad de aspiración). Las microcápsulas fueron recuperadas del vaso colector del equipo y se colocaron en tubos para centrífuga estériles sellados con papel parafilm, los cuales se almacenaron en un desecador a 4°C.

#### **4.2.5.1. Determinación del rendimiento de encapsulación**

El peso del polvo obtenido en el vaso recolector al final del secado por aspersión se utilizó para calcular el rendimiento de encapsulación de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Polvo en vaso recolector (g)}}{\text{Material de pared (g)}} \times 100$$

En donde el material de pared es la cantidad de AMH y APSL que se mezclaron al inicio de la encapsulación.

#### **4.2.5.2. Determinación de la viabilidad se las células después de la microencapsulación**

Se suspendieron 0.25 g de cápsulas en tubos con 2.5 mL de solución de citrato de sodio al 2%. Las suspensiones se agitaron con ayuda de un vortex, a velocidad máxima durante 1 minuto y se sembraron como se mencionó en la sección 4.2.4 tanto en medio MRS como MRSs.

#### **4.2.5.3. Determinación del contenido de humedad y actividad de agua de las microcápsulas**

Se colocaron 0.5 g de cápsulas en crisoles de aluminio (previamente llevados a peso constante) y se dejaron en estufa a 105°C durante dos horas o hasta alcanzar peso constante. El contenido de humedad se calculó como:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde  $P_i$  es el peso de las microcápsulas antes del secado en horno y  $P_f$  el peso de las microcápsulas después del mismo.

Se determinó la actividad de agua ( $A_w$ ) utilizando el equipo Aqualab (4TE DUO). Para esto las muestras se estabilizaron a 25 °C durante 15 minutos.

#### **4.2.5.4. Tamaño de partícula y morfología de las microcápsulas**

El tamaño de partícula se determinó utilizando el equipo Particle Size Analyzer. Se analizó la superficie de las microcápsulas utilizando un microscopio electrónico de barrido XL30 ESEM-FEG (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) perteneciente al Instituto Beckmann de Ciencias Avanzadas y Tecnología de la Universidad de Illinois (Urbana-Champaign, Illinois, USA). Para esto, las muestras se montaron en una matriz metálica y se recubrieron con una capa delgada de oro y paladio utilizando un revestidor (Desk-1 TSC, Denton Vacuum, Moorestown, N.J., U.S.A.).

#### **4.2.5.5. Color de las microcápsulas**

Se analizaron los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de las microcápsulas utilizando un Colorímetro (HunterLab).

#### **4.2.5.6. Tolerancia a condiciones de tracto gastrointestinal simulado**

Se evaluó *in vitro* la supervivencia de células de LGG libres y encapsuladas ante condiciones simuladas de tracto gastrointestinal. Lo anterior se realizó acorde a la metodología de Castro-Becerra (2010). El primer paso consistió en preparar las soluciones. 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 se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Los jugos gástricos e intestinales simulados se prepararon inmediatamente antes de los experimento. Para el jugo gástrico se re-suspendieron 3 g de pepsina en 1 L de solución salina estéril al 0.5% acidificada a pH 2 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, y el pH se ajustó a 8 con NaOH 0.1 M.

Una vez preparadas las soluciones, se colocó 1 g de microcápsulas y se les adicionó 1 mL de saliva artificial y 9 mL de jugo gástrico simulado; la mezcla se homogenizó manualmente durante un minuto y luego se colocó a 37°C por 2 horas. Se cuantificó la cuenta viable (ver sección 4.2.4.) al inicio y al final de la incubación. Posteriormente se tomaron 8.3 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 10,000 x g durante 3 minutos, para luego decantar el sobrenadante. Se adicionaron 333 µL del sobrenadante recién decantado a 3 mL de jugo intestinal simulado. Las muestras se colocaron a 37°C durante 4 horas. La cuenta viable se determinó recién agregado el jugo intestinal así como a las 2 y 4 horas de incubación.

#### **4.2.5.7. Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad de LGG microencapsulado**

Se prepararon microcápsulas frescas con una TE de 140 °C y se colocaron de manera separada en tubos cónicos de polietileno sellados con parafilm. Éstos se almacenaron a 4 y 22 °C. Se determinó el número de células viables de LGG (ver sección 4.2.5.5.) cada 6 días durante 60.

### **ETAPA 3**

#### **4.2.6. Estabilidad de las células de LGG en un extracto de té verde**

Se preparó un extracto de té verde para lo cual se remojó 1 g de hojas en 40 mL de agua destilada a 60 °C, durante 40 min. Transcurrido el tiempo, el contenido se filtró utilizando papel Whatman No. 1. Al extracto se añadió 2.5 % de sacarosa y 0.15 % de ácido cítrico y el pH se ajustó a 4.5 utilizando HCl 0.1 M. El extracto se ultra pasteurizó durante 15 segundos a 120 °C utilizando un HTST/UHT (Armfield, FT74) y se colocó en un vaso estéril. Se consideraron tres tratamientos: LGG libre, LGG encapsulado y LGG encapsulado más la adición de 0.1 mg/mL de ácido ascórbico. Cada tratamiento consistió en 7 mL del extracto de té verde colocados en tubos opacos para centrifuga con capacidad de 50 mL y sellados con papel parafilm. Se prepararon triplicados de cada tratamiento, para cada punto de muestreo. Los tubos se almacenaron a 4 °C durante doce días, tomando muestra cada tres.

En cada punto de muestreo se cuantificó la viabilidad celular para lo cual se tomó 1 mL del extracto y se hicieron diluciones decimales en PBS. El conteo en placa se realizó como se explicó en la sección 4.2.4. A los extractos se les determinó también el pH, la

acidez titulable (Cairns et al., 2002), compuestos polifenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (Anesini et al., 2008) y azúcares reductores (Miller, 1969).

#### 4.2.7. Evaluación sensorial para la selección de una bebida de té verde con probióticos

Se prepararon las bebidas para la evaluación sensorial la siguiente manera. Se obtuvo un extracto de té verde para lo cual se remojó 1 g de hojas por cada 40 mL de agua purificada a 60 °C, durante 40 min. Transcurrido el tiempo, el contenido se filtró utilizando papel Whatman No. 1. El filtrado se diluyó 1:1 con agua purificada y se le añadió 0.15 % de ácido cítrico y 0.1% de ácido ascórbico. A partir de esto se prepararon 3 formulaciones, como se describen en la **Tabla 1**, con base en el tipo y concentración de edulcorante utilizado. Se utilizó sacarosa y stevia (poder endulzante 280%).

**Tabla 1.** Formulaciones de una bebida de té verde con base en el edulcorante utilizado

Formulación	Edulcorante (% p/v)	
	Sacarosa	Stevia
1	3	0
2	1.5	0.11
3	0	0.23

Las bebidas se envasaron en botellas de vidrio color ámbar y se llevó a cabo una pasteurización colocando las botellas en agua a 76 °C y dejándolas incubar por 10.5 min. Posteriormente se añadió 1% de microcápsulas de LGG en campana de flujo laminar. Las bebidas preparadas se sometieron a un análisis microbiológico para la detección de coliformes.

La evaluación sensorial se llevó a cabo entre la 1 y 3 pm y participaron 28 hombres y mujeres entre 21 y 51 años de edad, considerados consumidores (panelistas no entrenados). Las bebidas se colocaron en vasos transparentes de 20 mL de capacidad con un código aleatorio de tres dígitos para cada formulación escrito sobre el vaso y se entregó también un vaso con agua y una galleta salada. Previo a la evaluación, los evaluadores leyeron y firmaron un consentimiento informado y posteriormente se les

instruyó para que, antes de probar cada formulación, comieran un pedazo de galleta y bebieran un sorbo de agua (en ese orden). Las bebidas se encontraban a una temperatura aproximada de 15 °C. En las papeletas entregadas se pidió que para cada formulación calificaran su agrado respecto al sabor, olor, color y aceptabilidad general de la bebida en una escala hedónica de 9 puntos donde 1 significaba “me disgusta mucho” y 9 “me gusta mucho”. Se recabaron también datos de edad, sexo y frecuencia de consumo de té verde. Para esto último se les dio tres opciones: nunca, al menos una vez al mes y más de una vez al mes.

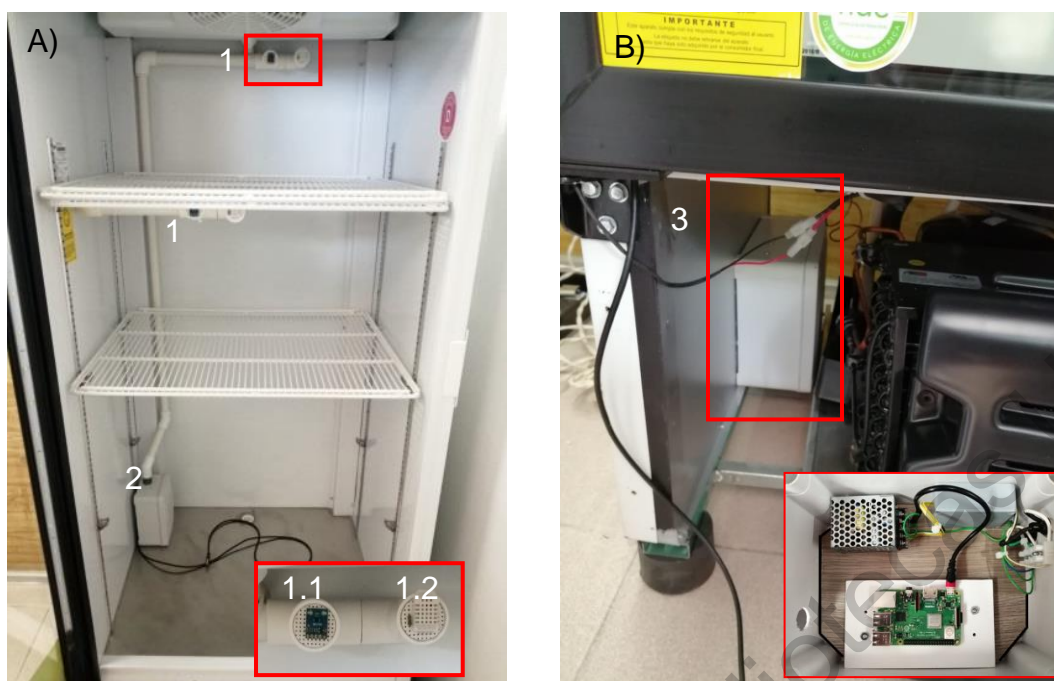
#### **4.2.8. Vida de anaquel sensorial de la bebida de té verde con probióticos microencapsulados**

El análisis de vida de anaquel comprendió tres etapas. En la primera etapa se diseñó y ensambló un equipo para monitorear variables de proceso, el cual se instaló en un refrigerador tipo vitrina. La segunda etapa comprendió la preparación de las bebidas y su almacenamiento en el refrigerador, así como la evaluación sensorial de las bebidas. La última etapa constó de los análisis fisicoquímicos realizados a las bebidas. A continuación se detallan las etapas.

##### **4.2.8.1. Equipo de monitoreo de variables de proceso**

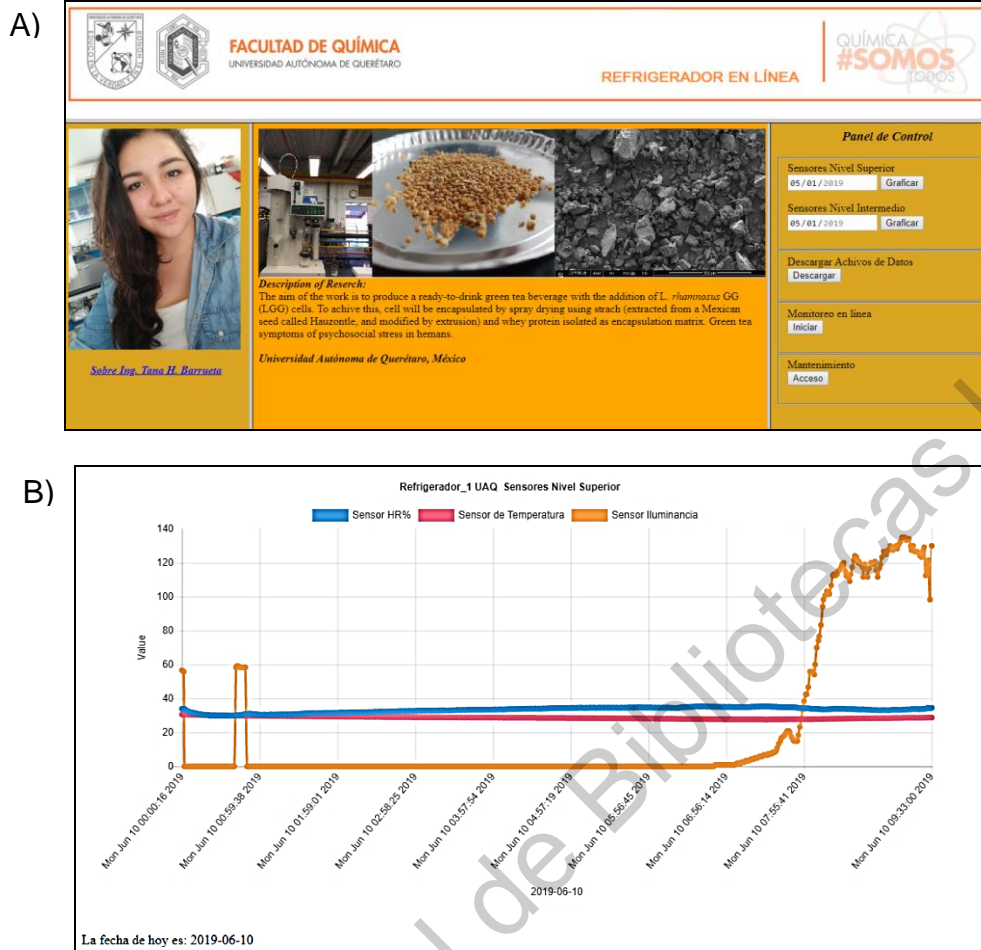
Se diseñó y ensambló un equipo para el monitoreo de temperatura (°C), humedad relativa (%) e iluminancia (lux). Este equipo se instaló en un refrigerador tipo vitrina, en donde se almacenaron las bebidas para el análisis de vida de anaquel sensorial. El equipo constó de tres partes: sensores, microcontrolador y servidor web. A continuación se explica cada una de ellas.

Como se observa en la **Figura 2A**, el equipo diseñado comprendió dos grupos de sensores colocados en los dos niveles superiores del refrigerador. Cada grupo se integró por un sensor para la medición de iluminancia y otro para temperatura y humedad relativa. Ambos juegos de sensores se conectaron a un microcontrolador Arduino Uno, encargado de la lectura y conversión de las señales digitales de los sensores, a las unidades pertinentes para cada variable. A solicitud del servidor web (Raspberry Pi 3B Plus), el microcontrolador Arduino Uno le envió la información de cada sensor, la cual fue almacenada localmente en un archivo de datos (en el servidor), junto con la fecha y hora del muestreo.



**Figura 2.** Montaje de un equipo para el monitoreo de variables de proceso, dentro de un refrigerador tipo vitrina. 1) Sensores; 1.1) sensor de luz; 1.2) sensor de temperatura y humedad relativa; 2) Microcontrolador Arduino Uno; 3) Servidor web Raspberry Pi

Toda la información recabada por el equipo de monitoreo puede ser revisada vía Internet, las 24 horas del día, desde la dirección web [idea.uaq.mx](http://idea.uaq.mx) y es de carácter público. La página de inicio se observa en la **Figura 3A**. A través de dicho web sitio fue posible graficar los datos para cada grupo de sensores (de manera independiente) seleccionando una fecha específica (**Figura 3B**). Además, los archivos con los datos generados pueden descargarse en formato cvs para ser leídos en Excel. Fue posible también monitorear en tiempo real las variables del proceso. El tiempo de muestreo se fijó en 1 min. El desarrollo del equipo permitió monitorear y registrar ininterrumpidamente las variables mencionadas, durante todo el tiempo en que se llevó a cabo el almacenamiento de las bebidas para la vida de anaquel.



**Figura 3.** Página web para el acceso remoto a los datos monitoreados en el refrigerador. Arriba: página de inicio. Abajo: ejemplo de las gráficas de datos para un día específico.

#### 4.2.8.2. Preparación de las bebidas mediante diseño reversa

Las bebidas para el análisis de vida de anaquel sensorial se prepararon mediante un diseño reversa. El diseño comprendió un total de cinco semanas, tomando muestras de manera semanal. Cada semana se preparó un lote de bebidas, que se almacenó a 4 °C en un refrigerador tipo vitrina en el cuál se instaló el equipo de monitoreo (sección 4.2.8.1). De modo que, el día de la evaluación sensorial, la bebida que se preparó en el primer lote representa el máximo tiempo de almacenamiento, y así sucesivamente. Las bebidas se prepararon como se explicó en la sección 4.2.7 y se colocaron en botellas de vidrio color ámbar.

#### **4.2.8.3. Evaluación sensorial de la bebida**

La evaluación sensorial se llevó a cabo entre las 11 a.m. y 1 p.m. y participaron 47 hombres y mujeres entre 21 y 51 años de edad, considerados consumidores (panelistas no entrenados). Las bebidas se colocaron en vasos transparentes de 20 mL de capacidad con un código aleatorio de tres dígitos. Se entregaron un total de 5 muestras, correspondientes a los tiempos de almacenamiento de 1, 2, 3, 4 y 5 semanas. Se entregó también un vaso con agua y una galleta salada. Previo a la evaluación, los evaluadores leyeron y firmaron un consentimiento informado y posteriormente se les instruyó para que, antes de probar cada formulación, comieran un pedazo de galleta y bebieran un sorbo de agua (en ese orden). Las bebidas se encontraban a una temperatura aproximada de 15 °C y se utilizó luz roja durante toda la evaluación. En las papeletas entregadas se pidió que para cada formulación contestaran si consumirían de manera regular el producto o no. Se recabaron también datos de edad, sexo y frecuencia de consumo de té verde. Para esto último se les dio tres opciones: nunca, al menos una vez al mes y más de una vez al mes.

#### **4.2.8.4. Caracterización fisicoquímica de la bebida**

Se analizó el perfil fisicoquímico de las bebidas a los diferentes tiempos de almacenamiento. Se obtuvieron datos de la viabilidad de LGG, pH, acidez titulable, color, concentración de polifenoles totales y azúcares reductores y capacidad antioxidante, como se explicó en la sección 4.2.6.

#### **4.2.9. Análisis estadístico**

Los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo por triplicado (a menos que se indique lo contrario) y los resultados fueron siempre expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar. Para determinar diferencia estadística entre tratamientos se realizaron análisis de varianza. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico R versión 3.4.1.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### ETAPA 1

#### 5.1. Rendimiento de extracción de almidón de semilla de huauzontle

La extracción de almidón de semilla de huauzontle inicialmente se realizó de acuerdo al método de Lindeboom *et al.* (2011) en el cual se utilizó la semilla entera previamente remojada en agua. Sin embargo, este método permitió un rendimiento de extracción del  $8.74 \pm 3.80\%$ , que se consideró bajo comparado con Assad-Bustillos *et al.* (2014) quienes reportaron 50% para esta misma especie. Se han obtenido rendimientos para otros pseudocereales del mismo género, como *C. album* y *C. quinoa*, de entre 17 – 54% dependiendo de la variedad y el proceso de extracción realizado (Jan *et al.*, 2017, 2016).

Es de considerar que no se conoce el tiempo de almacenamiento que tenían las semillas de huauzontle al momento en que fueron adquiridas en el presente trabajo. Carrillo-Ocampo y Engleman (1994) observaron de manera cualitativa que la cantidad de almidón en la semilla de huauzontle se reduce conforme la semilla madura. No obstante no es sólo la cantidad de almidón lo que puede cambiar con el almacenamiento, sino la facilidad de extraerlo. Por ejemplo, el rendimiento de extracción de almidón de arroz puede disminuir hasta 10% luego de 9 meses, siendo estos cambios dependientes de la variedad de arroz así como el tiempo y temperatura de almacenamiento. Este fenómeno fue relacionado con una mayor interacción entre el almidón y el resto de los componentes de la matriz, lo que dificulta la separación de los gránulos de almidón del medio que los contiene (Patindol *et al.*, 2005). De igual forma existen otros factores intrínsecos de la semilla que pueden afectar los rendimientos de extracción mediante molienda húmeda, los cuales se relacionan con la composición química y tamaño de las semillas. Esto puede generar resultados diferentes incluso entre cultivares de la misma especie. Además el tratamiento post-cosecha de las semillas en ocasiones involucra el secado de las mismas mediante el uso de aire caliente lo cual puede dificultar la separación de los componentes ya que se inducen

cambios en el endospermo como consecuencia de las altas temperaturas (Haros and Schoenlechner, 2016).

Debe mencionarse que no existe literatura respecto a cómo la variación en los distintos parámetros del proceso de molienda húmeda afecta el rendimiento de extracción de almidón para semillas de huauzontle. Por tal motivo en el presente trabajo se analizaron algunos factores que fueron previamente estudiados para *C. quinoa*. Para esto la semilla entera y la harina (semilla molida) fueron remojadas en agua o NaOH al 0.25% (Jan et al., 2017) como paso inicial. Los resultados del experimento se presentan en la **Tabla 2**. El uso de semilla o harina con remojo en agua o NaOH no afectó significativamente el rendimiento de extracción del almidón de huauzontle ( $p=0.816$ ). Contrario a esto se ha reportado que el molido de semillas de amaranto y quinoa previo a la extracción y/o el uso de álcalis como el NaOH, puede generar un incremento en el rendimiento de 15 - 30% (Jan et al., 2017; Villareal et al., 2013).

**Tabla 2.** Rendimiento de extracción de almidón de huauzontle a partir de semilla o harina utilizando remojo en agua o NaOH.

Tratamiento	Rendimiento de extracción (%) <sup>*</sup>	Desviación estándar
Semilla/agua	8.74	3.80
Semilla/NaOH	8.89	1.04
Harina/agua	7.26	0.24
Harina/NaOH	9.45	2.59

<sup>\*</sup> $p = 0.816$

La extracción del almidón a partir de ciertos pseudocereales mediante molienda húmeda puede verse dificultada debido a la fuerte asociación entre el almidón y las proteínas y al tamaño tan pequeño de los granulos de almidón (Haros and Schoenlechner, 2016). Se recomienda que para trabajos posteriores se analice cómo se ve afectado el rendimiento de extracción de almidón de semillas de huauzontle respecto a la temperatura y tiempo del remojo, diferentes concentraciones de NaOH, el número de lavados a realizar, el uso de métodos de purificación como la sedimentación

e incluso evaluar el uso de otros agentes como dióxido de sulfuro y/o ácido láctico. Otra información útil sería determinar los rendimientos de extracción de diferentes cultivares de huauzontle y si éstos se ven afectados por el tiempo de almacenamiento de las semillas (Haros and Schoenlechner, 2016; Ji et al., 2004; Villareal et al., 2013).

Con base en los resultados anteriores se decidió utilizar la harina remojada en agua para los experimentos posteriores.

## 5.2. Caracterización fisicoquímica del almidón de semilla de huauzontle

Se analizó la composición química del almidón extraído de las semillas de huauzontle. Como se muestra en la **Tabla 3**, estos datos se compararon contra lo reportado por Assad-Bustillos et al. (2014) para almidón procedente de semillas de la misma especie.

**Tabla 3.** Composición química del almidón de semilla de huauzontle.

Componente	Cantidad (g/100 g muestra)	
	(Assad-Bustillos <i>et al.</i> , 2014)	
Humedad	05.04 ± 0.17	05.32 ± 1.40
Proteína	02.14 ± 0.07	11.40 ± 0.40
Grasa cruda	00.43 ± 0.11	00.08 ± 0.20
Cenizas	01.88 ± 0.10	01.09 ± 0.10
Carbohidratos	90.52 ± 0.11	82.10 ± 0.40
Almidón	81.53 ± 0.21	72.50 ± NR
Azúcares reductores	10.69 ± 0.09	01.00 ± 0.10
Fibra cruda	02.11 ± 0.13	04.13 ± 0.10

NR: no reportado

El contenido de humedad del almidón fue cercano a lo reportado por Assad-Bustillos et al. (2014). Valores por debajo del 10%, como los obtenidos para el almidón de huauzontle, se han asociado a una buena estabilidad de las harinas durante el almacenamiento (Butt et al., 2003).

El almidón caracterizado, que se extrajo a partir de la semilla molida, tuvo una menor cantidad de proteína que lo reportado por Assad-Bustillos et al. (2014) quienes usaron la semilla entera. En concordancia con estos resultados, se ha observado que cuando

la extracción de almidón se hacer a partir de harina en lugar de semillas intactas, se obtienen menores concentraciones de proteína en el producto final. Esto independientemente de si el remojo se realiza en agua o NaOH (Jan et al., 2017). Sin embargo, las diferencias podrían deberse también a que las semillas procedían de cultivares distintos pues las condiciones agroecológicas en donde se cultivan las plantas afectan su composición nutricional (Reguera et al., 2018).

Los valores de grasa cruda, ceniza y fibra cruda se encuentran dentro de los valores reportados para almidones provenientes de especies como *C. quinoa*, *C. pallidicaule* y *C. album*, los cuales varían entre 0.01-2.87, 0.08-1.86 y 1.9-5.7%, respectivamente.

### 5.3. Efecto de la hidrólisis ácida y extrusión en las características funcionales del almidón de semilla de huauzontle

El almidón nativo de la semilla de huauzontle (ANH) se sometió a un proceso hidrólisis con HCl (0.5% p/v) y extrusión, para obtener almidón modificado (AMH). La caracterización funcional de ambos materiales se presenta en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Características funcionales del almidón nativo (ANH) y modificado (AMH) de huauzontle.

Parámetro	ANH		AMH		p-valor
ISA (%)	07.29	± 0.25	52.00	± 1.47	3.31E-07
IAA (g/g)	02.88	± 0.12	08.66	± 0.12	4.39E-07
Almidón resistente (%)	08.08	± 1.03	15.21	± 3.17	0.0071
Amilosa (%)	12.94	± 5.13	32.30	± 9.18	0.0332

ISA: índice de solubilidad en agua; IAA: índice de absorción en agua.

El índice de solubilidad en agua (ISA) del AMH fue siete veces mayor que el del ANH. Dicho parámetro indica el grado de degradación molecular al medir la cantidad de componentes solubles que se liberan del almidón luego de la extrusión. En todo los casos los almidones extrudidos tienen un ISA significativamente mayor que sus contrapartes nativas (Ye et al., 2018). Se han reportado valores de ISA entre 31 - 83

para almidones modificados de amaranto los cuales fueron utilizados con éxito para la encapsulación de *L. casei* y *Bifidobacterium breve* (Falfán-Cortés et al., 2014), siendo que el valor obtenido en el presente trabajo se encuentra dentro de dicho rango.

También se observó que el índice de absorción de agua (IAA) fue significativamente mayor para el AMH que para el ANH (**Tabla 4**). Este valor es una medida del volumen que ocupa el almidón después de hincharse en un exceso de agua. Comúnmente los almidones nativos presentan un bajo IAA debido a que la estructura compacta del gránulo intacto restringe la accesibilidad del agua a baja temperatura. Su valor suele verse aumentado luego de la extrusión (como ocurrió con el AMH) debido a dos razones. Primero, a la disrupción de la estructura cristalina del almidón como consecuencia de la gelatinización que ocurre durante la extrusión. Esto conlleva a la ruptura de los puentes de hidrógeno dentro y entre las moléculas, lo que resulta en una mayor cantidad de grupos hidroxilos expuestos los cuales pueden formar puentes de hidrógeno con el agua. Segundo, debido a que las moléculas de agua pueden difundirse dentro de la estructura amorfa del almidón extrudido más fácilmente con relación al almidón nativo (Ye et al., 2018).

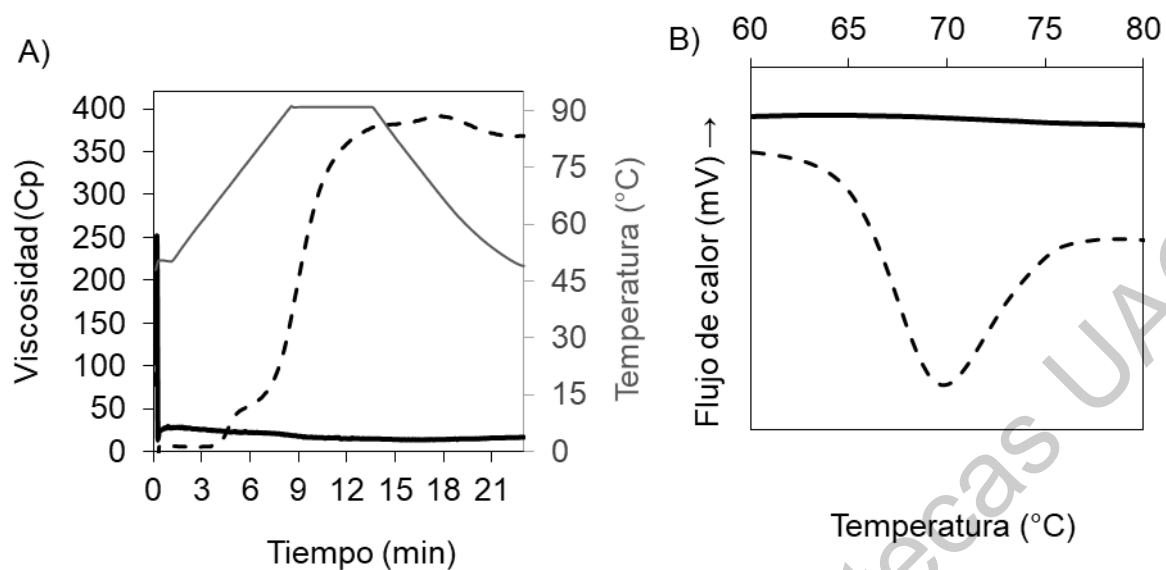
Assad-Bustillos *et al.* (2014) reportaron valores de ISA e IAA de 25.4% y 23.3 g/g respectivamente para almidón de semilla de huauzontle, valores mayores a los obtenidos en el presente trabajo para el ANH. Es común encontrar diferencias en dichos parámetros para cultivares distintos de una misma especie y puede deberse a diferencias en la cantidad de amilosa, contenido de lípidos y a la organización del gránulo para cada cultivar (Singh et al., 2003).

De igual forma se observó un aumento del 88% en la cantidad de almidón resistente como consecuencia de la modificación realizada (**Tabla 4**). Esto ocurre debido a que la hidrólisis ácida y extrusión del almidón nativo permite la formación de cadenas lineares de amilosa. Estas cadenas tienen una mayor movilidad y un peso molecular idóneo para su re-arreglo y recristalización durante el enfriamiento posterior a la extrusión (proceso conocido como retrogradación) en estructuras resistentes a la digestión de la  $\alpha$ -amilasa. Se ha reportado que la tasa de retrogradación del almidón se incrementa por la hidrólisis ácida previa y, aparentemente, esto depende más del pH que del tipo de ácido utilizado (Öztürk and Mutlu, 2019; Htoon et al., 2010). El aumento en la

proporción de almidón resistente del AMH resulta favorable para el uso de éste como ingrediente alimenticio debido a que el consumo de dicho tipo de almidón está asociado a diversos beneficios a la salud. Entre ellos se encuentran el incremento de la saciedad, mejoramiento de las respuestas a insulina y su actividad prebiótica (Öztürk and Mutlu, 2019).

Asimismo se cuantificó una proporción de amilosa significativamente mayor en el AMH que el ANH. Previamente se ha correlacionado un aumento en el contenido de amilosa con una reducción en la digestibilidad del almidón. Debido a este fenómeno se ha propuesto que las cadenas de amilosa son los principales componentes del almidón resistente tipo 3, es decir, almidón retrogradado (Öztürk and Mutlu, 2019).

Adicionalmente se evaluó el perfil de viscosidad y comportamiento térmico del ANH y AMH mediante el uso de RVA y CDB. El ANH presentó un pico de viscosidad de  $391.6 \pm 21.5$  cP (**Figura 4A**), siendo éste el primer reporte en la literatura para dicho material. Su temperatura de gelatinización fue de  $69.7$  °C (**Figura 4B**), cercano al valor de  $68.4$  °C reportado por Assad-Bustillos et al. (2014) para esta misma especie. La viscosidad del ANH es baja cuando se compara contra almidones procedentes de fuentes como trigo, maíz, arroz, quinoa, cassava y papa, cuyos picos de viscosidad se encuentran entre 2000 y 9000 cP (Araujo-Farro, 2005). Así, el ANH presenta entonces una baja viscosidad y un alto contenido de azúcares reductores (**Tabla 3**). En la industria de los alimentos los almidones se modifican con el fin de obtener materiales con dichas características para su uso como reemplazos de grasas para panadería y lácteos así como materiales para recubrimientos de ciertos alimentos (Singh et al., 2007). Debido a que el ANH presenta las características deseadas para tales fines, sin la necesidad de ninguna modificación, su uso podría representar una ventaja económica respecto a otros almidones. Por lo anterior se sugiere, para trabajos posteriores, la evaluación del ANH en aplicaciones como las antes mencionadas.

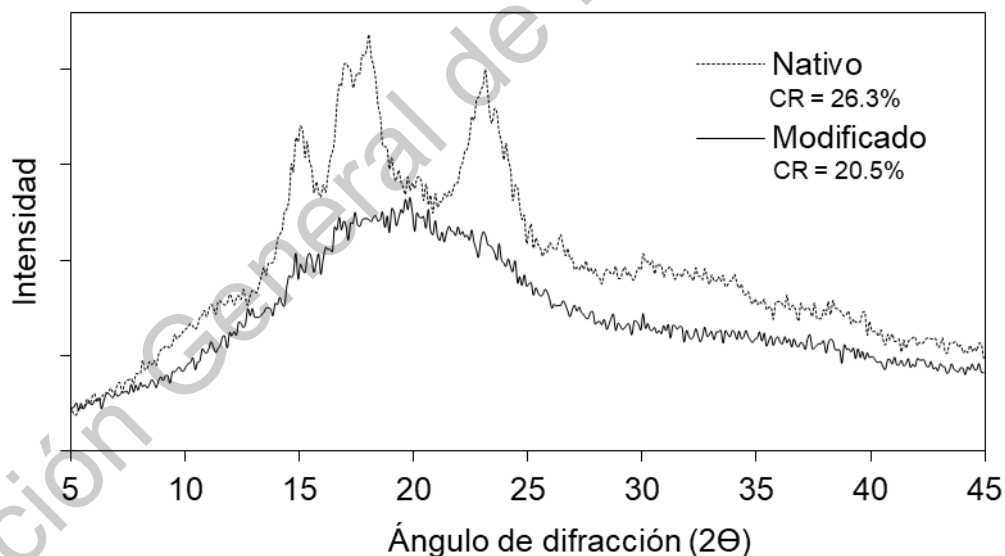


**Figura 4.** Perfil de viscosidad (A) y comportamiento térmico (B) del almidón nativo (---) y modificado (—) de huauzontle.

El AMH mostró un perfil de viscosidad y comportamiento térmico distinto al de su contraparte nativa (**Figura 4**). Como consecuencia de la modificación, el AMH presentó una viscosidad promedio de 26.73 cP que fue significativamente menor ( $p = 4.3E-07$ ) que la del ANH. De igual manera, en el análisis de CDB no se detectó gelatinización en el AMH. Dichos cambios pueden explicarse debido a la pérdida de integridad del gránulo de almidón durante la extrusión (Ye et al., 2018). Este fenómeno ha sido ampliamente reportado para almidones extraídos de diversas fuentes como maíz, amaranto y arroz (Calvo-López, 2018; Falfán-Cortés *et al.*, 2014; Hagenimana *et al.*, 2006). La modificación realizada en este trabajo involucró un proceso de hidrólisis ácida previo a la extrusión. Se ha observado que este pretratamiento genera viscosidades menores que cuando el almidón no se hidroliza antes de ser extrudido, posiblemente como consecuencia de una mayor desintegración del gránulo (Calvo-López, 2018; Murúa-Pagola et al., 2009).

La cristalinidad de los almidones se analizó mediante difracción de rayos X (**Figura 5**). El ANH presentó los principales picos a los ángulos de difracción  $15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $18^\circ$  y  $23^\circ 2\theta$ , siendo éste el patrón característico de la estructura cristalina tipo A (Vanier et al., 2016).

Este tipo de estructura es encontrada en cereales y ha sido reportada también para pseudocereales como amaranto y quinoa (Qian and Kuhn, 1999). Como se puede observar en el patrón de difracción que presentó el AMH, el proceso de hidrólisis ácida y extrusión propició la desaparición de los picos. Esto se debe a la disrupción de las doble hélices de la amilopectina y se ha reportado para almidones, por ejemplo, de maíz y arroz retrogradados obtenidos mediante extrusión (Vanier et al., 2016; Zhang et al., 2014). Conjuntamente se observó que el proceso de hidrólisis ácida y extrusión generaron una disminución del 22% de la estructura cristalina, lo cual ha sido ampliamente documentado en almidones extrudidos de diversas fuentes (Hasjim and Jane, 2009; Vanier et al., 2016). Estos datos concuerdan con el mayor porcentaje de amilosa observado en el AMH (**Tabla 4**) pues, como se ha observado ya, existe una correlación inversa entre el porcentaje de cristalinidad y de amilosa en los almidones (Cheetham and Tao, 1998).

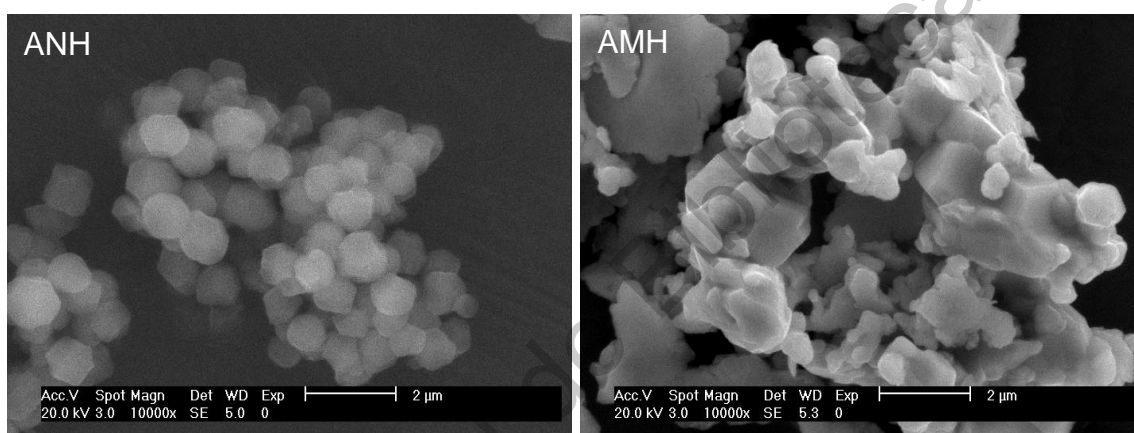


**Figura 5.** Diffractograma de rayos-X del almidón de huauzontle. CR: cristalinidad relativa.

Posteriormente el ANH y AMH se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido. Como se observa en la **Figura 6**, los gránulos del ANH son de morfología poligonal irregular y de tamaño pequeño. De acuerdo con Assad-Bustillos et al. (2014),



los gránulos de almidón de huauzontle tienen un tamaño de 0.5–1  $\mu\text{m}$  y la misma estructura que se observó en el presente trabajo. El huauzontle comparte dichas características con los almidones de otras especies de pseudocereales como quinoa y el amaranto (Lindeboom et al., 2005; Villareal et al., 2013). Ahora, los cambios estructurales generados como consecuencia de la modificación del almidón se observan en la micrografía del AMH presentada en la **Figura 6**. Se aprecia la pérdida de la integridad de los gránulos y la morfología típica del almidón gelatinizado (Yan and Zhengbiao, 2010).




**Figura 6.** Micrografía electrónica de barrido del almidón nativo (ANH) y modificado (AMH) de huauzontle.

Por último se evaluó el color de los almidones. Como se observa en la **Tabla 5**, la modificación del almidón generó cambios significativos en el color, caracterizados por una disminución del parámetro  $L^*$ , y el aumento de  $a^*$  y  $b^*$ . La diferencia de color entre los almidones, que puede ser expresada como el valor de  $\Delta E$ , fue  $20.88 \pm 0.21$ . Un valor de  $\Delta E$  mayor de 2 indica cambios visuales que pueden ser percibidos por el ojo humano a simple vista (Francis and Clydesdate, 1975), como ocurrió con el ANH y AMH. El mismo comportamiento se ha observado para extrudidos de almidón obtenido de diversas fuentes como maíz, sorgo y chícharo, con valores de  $\Delta E$  que van desde 15 hasta 40 (Jafari et al., 2017; Sharma et al., 2015).

Es posible que la diferencia de color entre el ANH y AMH fuera causada por la reacción de Maillard. Esto considerando que el almidón contenía 2% de proteína y 10.69% de azúcares reductores (**Tabla 3**), y que las semillas de la familia *Chenopodium* suelen contener altos porcentajes de lisina (Paucar-Menacho et al., 2018; Poonia and Upadhayay, 2015). Durante dicha reacción, el grupo amino de ciertas proteínas, especialmente lisina, se une covalentemente al grupo carbonilo terminal del azúcar reductor de un polisacárido con el subsecuente oscurecimiento de la muestra debido a la formación de compuestos de color marrón (de Oliveira et al., 2016).

**Tabla 5.** Parámetros de color y fotografías del almidón nativo (ANH) y modificado (AMH) de huauzontle.

		ANH		AMH		<i>p</i> -valor
Parámetros de color	L*	87.03	± 0.22	67.62	± 0.04	1.16E-08
	a*	00.40	± 0.02	02.89	± 0.04	7.93E-08
	b*	07.01	± 0.19	27.56	± 0.06	3.47E-08

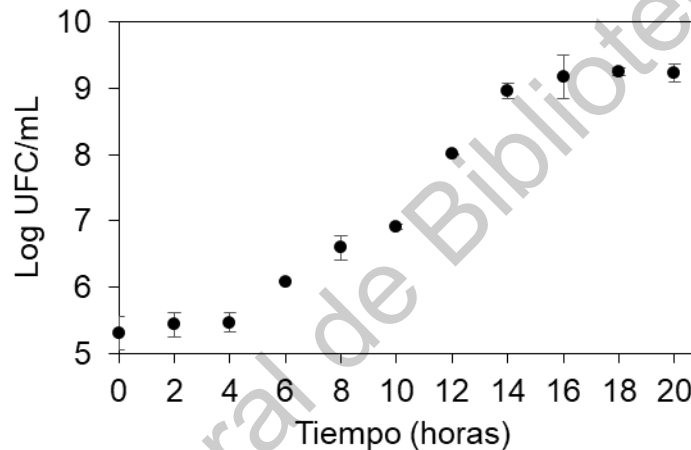


En resumen, y como se mencionó con anterioridad, el almidón de semillas de huauzontle fue seleccionado en el presente trabajo para su evaluación como material de pared en la encapsulación de probióticos mediante secado por aspersión. Debido a que en la industria de alimentos dicho proceso se lleva a cabo principalmente a partir de soluciones acuosas, el material de pared debe tener una buena solubilidad en agua y una baja viscosidad a las concentraciones y temperaturas utilizadas (Gharsallaoui et al., 2007). Así, los cambios que se generaron en el almidón de huauzontle como consecuencia de la hidrólisis ácida y extrusión fueron favorables, y sugirieron que el AMH podría utilizarse como matriz para la encapsulación mediante secado por aspersión.

## ETAPA 2

### 5.4. Selección de las condiciones para el cultivo de LGG

Previo a la encapsulación de LGG, se determinó su cinética de crecimiento en medio MRS a 37 °C y en condiciones anaerobias (**Figura 7**). La mayor concentración de células fue de  $9.2 \pm 0.1$  log UFC/mL las cuales se obtuvieron al inicio de la fase estacionaria que comenzó a partir de las 18 horas de cultivo. Por lo tanto, dichas condiciones fueron seleccionadas para recolectar las células que se sometieron al proceso de secado por aspersion.



**Figura 7.** Cinética de crecimiento de LGG (ATCC 53103) en medio MRS a 37 °C y condiciones anaerobias.

Este experimento se realizó debido a que la selección de la etapa del crecimiento en que se cosechan las células para ser microencapsuladas afecta fuertemente la eficiencia del proceso. Cuando las células de LGG fueron recolectadas en la fase de latencia, logarítmica temprana o estacionaria, la supervivencia al final del secado por aspersion (utilizando leche descremada reconstituida y povidexrosa como material de pared) fue de 2, 14 y 50% respectivamente (Corcoran *et al.*, 2004). La mayor eficiencia para las células cosechadas durante la fase estacionaria puede deberse a que durante dicha etapa, éstas presentan un aumento en la resistencia ante varios tipos de estrés

(Huang, 2017). Además Burgain *et al.* (2014) mostraron con ayuda de cepas mutantes, que el pili de LGG es capaz de interactuar con la  $\beta$ -lactoglobulina presente en el APSL y que la ausencia de esta estructura significó una disminución del 98.5% en la eficiencia de encapsulación. Debido a que esta estructura se sintetiza durante la fase estacionaria, la recolección de las células en dicha fase es de suma importancia cuando el APSL es parte de la matriz de encapsulación (Burgain *et al.*, 2014).

## 5.5. Caracterización de las microcápsulas

El AMH obtenido se utilizó en conjunto con APSL para encapsular células de LGG. Para esto se evaluó el uso de una temperatura de entrada ( $T_E$ ) de 140 o 160 °C. Las temperaturas de salida ( $T_S$ ) registradas fueron de 70 y 80 °C, respectivamente. A continuación se presentan los resultados de la caracterización de las microcápsulas.

### 5.5.1. Supervivencia de LGG al proceso de secado por aspersión.

El secado por aspersión es un proceso que conlleva el uso de altas temperaturas las cuales tienen un efecto negativo en la viabilidad de las células bacterianas. Por ello, lo primero que se analizó fue la supervivencia de LGG ante tal proceso (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Efecto del secado por aspersión en la viabilidad de LGG

Parámetro	Temperatura de entrada (°C)		$p$ -valor
	140	160	
Eficiencia de encapsulación (%) <sup>*</sup>	11.00 ± 0.48	07.04 ± 1.23	0.007
Células en las microcápsulas (log UFC/g)	09.01 ± 0.03	08.53 ± 0.05	0.053
Células con nivel de estrés fuerte (%)	25.99 ± 12.8	25.51 ± 16.6	0.976

\*[Células en las microcápsulas (UFC/mL)/Células en la solución alimentada (UFC/mL)]\*100

El secado por aspersión generó una pérdida de  $0.96 \pm 0.02$  y  $1.32 \pm 0.2$  log UFC/g, al realizar el proceso a una  $T_E$  de 140 y 160 °C respectivamente. Así, se obtuvo una mayor eficiencia de encapsulación y por ende un mayor número de células en las microcápsulas obtenidas con la menor  $T_E$  (**Tabla 6**). Esto puede explicarse debido a que

durante el secado por aspersión la muerte de las células ocurre principalmente debido a factores como la deshidratación de la membrana celular como consecuencia de la remoción de agua por las altas temperaturas y/o desnaturalización de ADN y ARN. El grado del daño celular se incrementa con el aumento de la  $T_S$  y por ende se obtiene una menor eficiencia (Ananta et al., 2005; Arepally and Goswami, 2019). Debido a lo anterior se propone para trabajos posteriores la evaluación de la viabilidad de LGG posterior al proceso de secado por aspersión modificando la velocidad de flujo de alimentación para, a las mismas  $T_E$ , obtener menores  $T_S$ . Otro enfoque que se puede utilizar para incrementar las eficiencias de encapsulación es la adaptación térmica de los cultivos, previo a la encapsulación, al colocarlos a temperaturas sub-letales durante periodos cortos. Con esto se ha logrado un incrementar el porcentaje de supervivencia hasta en un 30% (Desmond et al., 2002).

La concentración de células de LGG contenidas en las microcápsulas en este trabajo (**Tabla 6**) se asemeja a las obtenidas por otros autores bajo condiciones similares. Por ejemplo, Ying *et al.* (2013) microencapsularon células de LGG mediante secado por aspersión usando APSL y almidón resistente (Hylon VII, Ingredion) como material de pared. Utilizando una  $T_E/T_S$  de 160 y 65 °C, obtuvieron 8.3 – 8.8 log UFC/g de cápsulas con una humedad de 3-4%, y reportaron una pérdida menor a 1 log UFC/g como consecuencia del secado (sin mencionar el valor exacto de la pérdida). Bajo las mismas condiciones de  $T_E/T_S$ , Castro-Becerra (2010) encapsuló células de *B. breve* en una combinación de almidón alto en amilosa y concentrado de proteína de suero de leche, extrudidos. Se logró una concentración final de células de 9 – 10 log UFC/g de cápsulas con pérdidas de viabilidad de 0.3 – 0.6 log UFC/g y humedad de 3-6%.

De los resultados de Yin *et al.* (2013) y Castro-Becerra (2010) se observó que cuando la matriz de encapsulación contuvo proteína de suero de leche se generaron menores pérdidas de viabilidad con relación al uso únicamente de almidón. Esto puede explicarse debido a que la presencia de proteínas en conjunto con carbohidratos como matriz para la encapsulación forma una capa protectora que recubre la pared celular bacteriana mientras que los carbohidratos proveen un reemplazo parcial en los sitios de unión al agua de las células durante el proceso de secado. Como resultado, la disrupción de la membrana puede prevenirse y por tanto resulta en mayores eficiencias

de encapsulación (Arepally and Goswami, 2019; Rajam and Anandharamakrishnan, 2015). También es posible que dicho fenómeno esté relacionado con la capacidad de LGG de interactuar con la  $\beta$ -lactoglobulina presente en la proteína de suero de leche generando mayores eficiencias de encapsulación (Burgain *et al.*, 2014).

Además de conocer el número de células que sobrevivieron al proceso, es importante evaluar la integridad de las mismas. Un método indirecto para estimar el daño celular es cultivar a las células probióticas en medio MRS y MRSs, en donde la diferencia en la cuenta viable en ambos medios representa el número de células con un nivel de estrés fuerte. Esta metodología se basa en que las células que han sufrido daños como consecuencia del estrés térmico (como ocurre durante el secado por aspersión) son más sensibles a la presión osmótica que genera el NaCl (Moayyedi *et al.*, 2018). Así, en este trabajo se infirió que del total de células viables que sobrevivieron al proceso de secado por aspersión, aproximadamente un 25% presentaron niveles de estrés fuerte sin diferencia significativa debido a la  $T_E$  (**Tabla 6**). Se han reportado valores similares de 18-31 % de células de *B. breve* y *L. rhamnosus* sensibles a 2% de NaCl después del proceso de secado por aspersión utilizando proteínas de suero de leche en combinación con almidón extrudido o inulina a  $TE/TS$  de 160-100/65-60 °C (Castro-Becerra, 2010; Moayyedi *et al.*, 2018).

### 5.5.2. Características fisicoquímicas

El rendimiento de encapsulación se define como la cantidad de microcápsulas obtenidas al final del secado por aspersión respecto a la cantidad de material colocado en la solución alimentada. En el presente trabajo se obtuvieron rendimientos de  $57.4 \pm 2.0$  y  $56.9 \pm 2.4$  % con  $T_E$  de 140 y 160 °C, respectivamente. Otros trabajos han reportado rendimientos de encapsulación de entre 18 y 74% utilizando almidones nativos y modificados, con y sin proteína de suero de leche. Esto con  $T_E$  entre 135 - 155 °C (Avila-Reyes *et al.*, 2014; Castro-Becerra, 2010).

A nivel laboratorio, un valor por debajo del 50% se considera desventajoso debido a que limita la cantidad de material disponible para ciertos análisis que requieren mucha muestra (Adler and Lee, 1999). El equipo Büchi 290, que se utilizó en los trabajos mencionados y en el presente, tiene ventajas que lo ha hecho uno de los secadores por

aspersión más utilizados a nivel laboratorio. Sin embargo, una de sus limitaciones es que típicamente presenta un rendimiento medio o bajo. Esto puede explicarse de la siguiente manera. Las gotas que emergen de la boquilla de doble flujo del equipo Büchi entran a la cámara de secado proyectadas hacia las paredes verticales de la misma. Si las gotas asperjadas no se han secado lo suficiente antes de impactar las paredes, éstas pueden adherirse a la mismas resultando en la formación de depósitos húmedos disminuyéndose el rendimiento. La cámara de secado de dicho equipo es estrecha por lo que este fenómeno se ha reportado ampliamente. Sin embargo, el incremento en la  $T_E$  genera un producto más seco lo que disminuye la adherencia de partículas a las paredes de la cámara de secado y por ende un aumento del rendimiento. Otras variables que pueden afectar el rendimiento del proceso son el porcentaje de sólidos y flujo de la solución alimentada, el flujo del aire y el diseño de la cámara de secado (Keshani et al., 2015) .

Aunque en el presente trabajo no se detectó diferencia significativa en el rendimiento a las  $T_E$  evaluadas ( $p = 0.599$ ), sí se observó una ligera disminución en dicho parámetro con la  $T_E$  más alta. Respecto a esto se ha observado que después de cierto punto, el aumento de la  $T_E$  provoca una disminución en el rendimiento aun cuando las partículas tienen un contenido de humedad más bajo. Esto ocurre debido a la formación de depósitos de partículas en el ciclón del secador, como consecuencia del aumento de la temperatura en la pared interior del equipo hasta temperaturas cercanas al punto de adherencia del material (Lazar et al., 1956).

También se analizó el efecto de las diferentes  $T_E$  en las características fisicoquímicas de las microcápsulas (**Tabla 7**). No se observó diferencia significativa en los parámetros analizados, como consecuencia del uso de las diferentes  $T_E$ .

El polvo obtenido después del secado presentó una baja humedad. La diferencia de temperatura entre la solución inicial y el aire de secado resulta en una rápida transferencia de calor asociada a la remoción del agua produciendo polvos con tales características (Arepally and Goswami, 2019). El contenido de humedad tiene una gran influencia en la estabilidad del producto durante el almacenamiento por lo que es un parámetro importante en las microcápsulas que contienen microorganismos (Guerin et al., 2017).

**Tabla 7.** Características fisicoquímicas de las microcápsulas de LGG obtenidas a diferentes temperaturas de entrada en el secador por aspersión.

Parámetro	Temperatura de entrada (°C)		p-valor	
	140	160		
Humedad (%)	02.13 ± 0.27	01.88 ± 0.37	0.388	
Actividad de agua	0.04 ± 0.009	0.03 ± 0.005	0.223	
Diámetro promedio de partícula (µm)	13.05 ± 2.31	10.94 ± 0.49	0.199	
Color	L*	82.74 ± 0.03	82.20 ± 0.03	0.093
	a*	-0.18 ± 0.01	00.17 ± 0.01	0.373
	b*	08.74 ± 0.03	08.99 ± 0.12	0.023

Sin embargo, el porcentaje de humedad no es un parámetro tan crítico como la actividad de agua en lo referente a la viabilidad de las células probióticas o al deterioro de los alimentos. Dicho parámetro indica la cantidad de agua libre (que no está unida a las moléculas del alimento) en el producto y que por lo tanto se encuentra disponible para los procesos metabólicos de los microorganismos. Las células bacterianas pueden mantener su viabilidad sin importar la actividad de agua, aunque para que exista crecimiento se requiere que ésta sea mayor a 0.8 para bacterias y 0.6 para hongos y levaduras. Para microencapsulados de probióticos se recomienda una actividad de agua menor de 0.25 (Vesterlund et al., 2012). En el presente trabajo, el valor de actividad de agua de las microcápsulas se encontró dentro del límite recomendado. La baja actividad de agua podría deberse a la capacidad del AMH para unirse al agua, como se discutió anteriormente en lo respectivo al IAA del mismo (ver sección 5.3) así como al uso de APSL desnaturalizado (Zhou and Labuza, 2007). Un valor similar de 0.06 fue obtenido por Moayyedi et al. (2018) mediante liofilización utilizando APSL e inulina para la microencapsulación de *L. rhamnosus*.

Se evaluó también el diámetro promedio de partícula. Este parámetro es importante debido a que afecta las características de textura que son percibidas por el consumidor cuando las microcápsulas son añadidas a un alimento. Tamaños tan pequeños como 25 µm pueden ser detectadas por el paladar (Engelen et al., 2005). Las microcápsulas obtenidas en el presente trabajo presentaron diámetros promedios menores a tal valor.

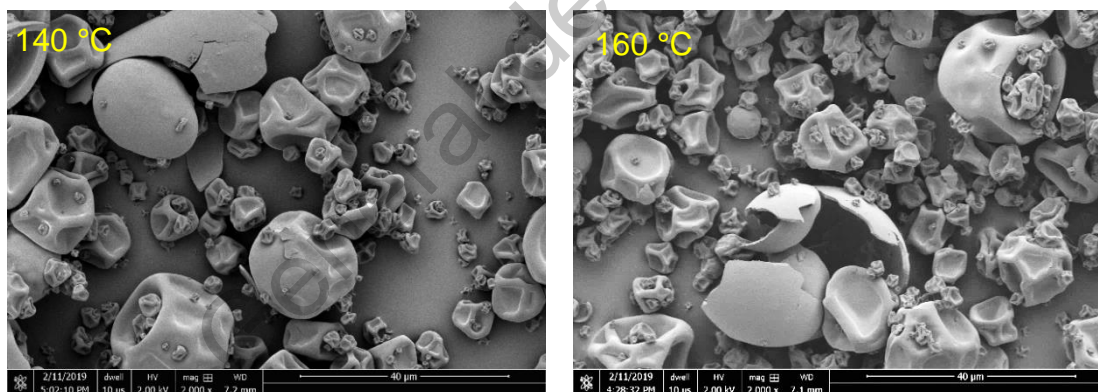


Se han reportado diámetros de partícula entre 9 y 20  $\mu\text{m}$  para probióticos microencapsulados mediante secado por aspersión, dependiendo de los materiales de pared y las condiciones del secado (Guerin et al., 2017; Rajam and Anandharamakrishnan, 2015).

Respecto al color de las microcápsulas, el parámetro  $b^*$  presentó valores positivos posiblemente debido al color pardo del AMH. Además, la mayor  $T_E$  generó un valor ligeramente mayor en este parámetro que pudo deberse a un oscurecimiento generado por las altas temperaturas (Arepally and Goswami, 2019).

### 5.5.3. Características morfológicas

Se analizó también la morfología de las microcápsulas obtenidas a diferentes  $T_E$  (**Figura 8**). Este análisis se realizaron con la finalidad de dilucidar el grado de integridad de las microcápsulas, puesto que éste se relaciona con la capacidad del material de pared para retener el material a encapsular (Rosenberg et al., 1985).



**Figura 8.** Micrografía electrónica de barrido de las microcápsulas de LGG obtenidas mediante secado por aspersión a diferentes temperaturas de entrada.

Primero, se observó que las microcápsulas presentaron una morfología redondeada con concavidades en la superficie. Esto puede ocurrir como consecuencia de la rápida evaporación del agua durante el proceso, lo que conlleva a la solidificación del material de pared previo a la expansión de las partículas. Sin embargo, también puede ser el resultado de un insuficiente contenido de sólidos en la solución alimentada lo que causa

que las partículas húmedas impacten contra las paredes de la cámara de secado, deformándose (Anandharamakrishnan and Ishwarya, 2015; Xie et al., 2010). No obstante, este tipo de morfología ha sido ampliamente reportada para microcápsulas ricas en almidón (Avila-Reyes et al., 2014; N. Falfán-Cortés et al., 2014; Castro-Becerra, 2010; Murúa-Pagola et al., 2009).

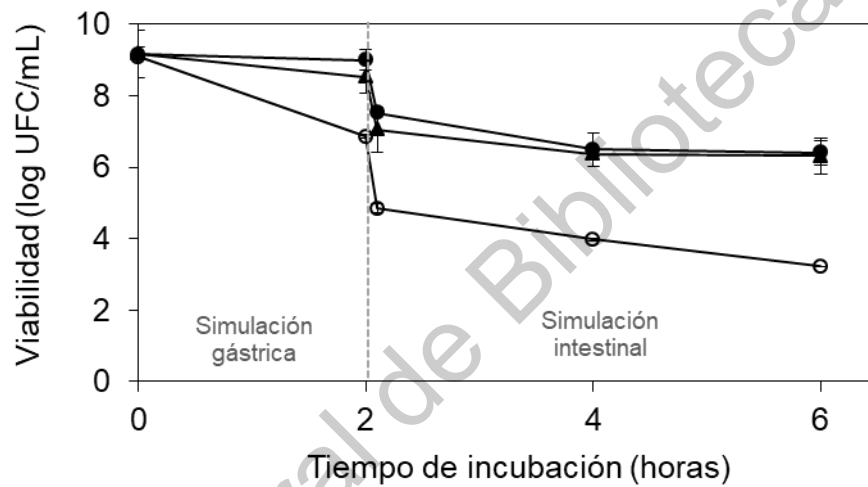
Para el presente trabajo no fueron considerados experimentos que permitieran dilucidar la distribución de los componentes en la microcápsula, no obstante estos análisis han sido realizados por otros autores en sistemas similares. Castro-Becerra (2010) encapsuló probióticos mediante secado por aspersión, utilizando almidón de maíz y concentrado de proteína de suero de leche, extrudidos. Observó, mediante microscopía confocal utilizando colorantes específicos para proteínas y carbohidratos, que las microcápsulas estaban formadas por una capa externa de proteínas con los carbohidratos al interior. Este fenómeno ha sido reportado ya para otros sistemas de encapsulación mediante secado por aspersión cuando se usan combinaciones de proteínas y carbohidratos. Por ejemplo, Porras-Saavedra et al. (2015) y Adhikari et al. (2009) observaron el mismo fenómeno en microcápsulas de goma arábica/maltodextrina y sacarosa/APSL al cuantificar el N total en las capas de las microcápsulas. Eso ocurre debido a que durante el secado las proteínas son capaces de difundirse rápidamente a la superficie, saturándola (Shrestha et al., 2007).

Por último, se observó la presencia de microcápsulas rotas a ambas  $T_E$ , lo que podría ser una consecuencia del efecto *balloning* causado por las altas temperaturas. Esto ocurre cuando se forma vapor en el interior de la gota durante el secado como resultado de la diferencia en la presión parcial del vapor de agua entre la gota y el medio que la rodea, causando que ésta se hinche. Lo anterior resulta en una partícula hueca de paredes delgadas que no retendrá eficientemente el material encapsulado. La temperatura de *balloning* depende del material utilizado y el diseño del secador. Aunque menores  $T_E/T_S$  podrían ayudar a eliminar este efecto, debe recordarse que la disminución de éstos parámetros pone en riesgo el costo del proceso debido a que conlleva una disminución en la velocidad de secado. Así mismo, la disminución de las temperaturas afecta las propiedades de las microcápsulas en lo referente, por ejemplo, a la humedad y actividad de agua (Anandharamakrishnan and Ishwarya, 2015).

## 5.5.4. Características funcionales

### 5.5.4.1. Efecto de la encapsulación y la temperatura de entrada del secador, en la supervivencia de LGG ante condiciones de tracto gastrointestinal simulado

Microcápsulas frescas obtenidas con una  $T_E$  de 140 y 160 °C, así como células libres de LGG, fueron sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*. Como se observa en la **Figura 9**, las células microencapsuladas mostraron una mayor supervivencia que las células libres a lo largo de toda la simulación.



**Figura 9.** Supervivencia de las células de LGG libres (○) y encapsuladas (● 140 y ▲ 160 °C) ante condiciones de tracto gastrointestinal *in vitro*.

Lo anterior puede explicarse debido a que el APSL que fue parte del material de pared, genera un microambiente amortiguador dentro de la partícula coloidal hidratada que rodea a las células de LGG aislándolas del estrés generado por los cambios de pH (Ying et al., 2013). Una mayor pérdida de viabilidad se observó en las células libres, quienes estaban directamente expuestas a las soluciones. Estos resultados sugieren el efecto protector del sistema de microencapsulación ante las condiciones estudiadas.

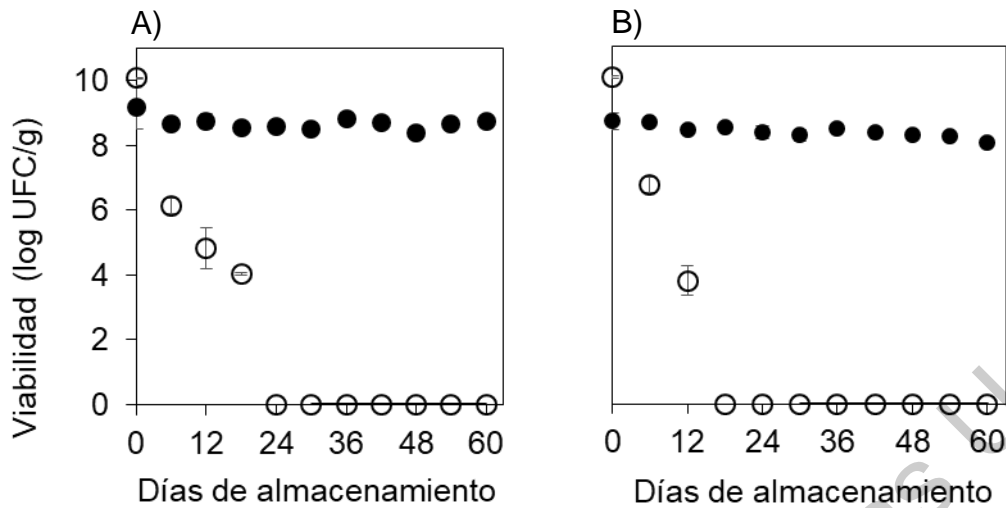
Como se ilustra en la **Figura 9**, no se observó diferencia en la supervivencia de las células de LGG encapsuladas a las  $T_E$  evaluadas. Esto podría deberse a que las

microcápsulas presentaron propiedades fisicoquímicas similares (**Tabla 7**) y un porcentaje igual de células con un nivel de estrés fuerte (**Tabla 6**).

Ahora bien, debido a que la  $T_E$  de 140 °C permitió una mayor eficiencia de encapsulación así como microcápsulas con las mismas características fisicoquímicas y grado de protección ante condiciones gastrointestinales simuladas, ésta condición fue seleccionada para trabajar en los experimentos posteriores. La selección se sustentó en que una menor  $T_E$  requiere un menor gasto energético y por ende menor costo de producción (Arepally and Goswami, 2019).

#### **5.5.4.2. Efecto del almacenamiento en la supervivencia del LGG libre y encapsulado**

Microcápsulas frescas obtenidas a una  $T_E$  de 140 °C, así como células libres de LGG, se almacenaron a 4 y 22°C durante un periodo de 60 días (**Figura 10**). Las células de LGG que fueron microencapsuladas presentaron una buena supervivencia después de 60 días de almacenamiento a 4 y 22 °C dado que se detectó una pérdida de únicamente 0.43 y 0.64 log UFC/g, respectivamente. En contraste, se dejaron de detectar células libres viables a partir de los días 24 y 18, cuando éstas se almacenaron a 4 y 22°C respectivamente. Estos resultados sugieren el efecto protector del sistema de microencapsulación sobre las células de LGG ante las condiciones evaluadas. Considerando que el almacenamiento no se realizó en condiciones anaerobias, y que el oxígeno puede ser tóxico para las células probióticas, es posible que tales resultados sean consecuencia de la protección que ejerce el sistema de encapsulación respecto al oxígeno (Talwalkar and Kailasapathy, 2003). Combinaciones de APSL y almidón han sido utilizados para la elaboración de bio-películas justamente por sus propiedades de barrera contra el oxígeno (Wang et al., 2007; Yoo and Krochta, 2012).



**Figura 10.** Supervivencia de LGG libre (○) y microencapsulado (●), almacenado a 4 (A) y 22 °C (B).

No se encontró diferencia en la supervivencia de LGG microencapsulado cuando las microcápsulas se almacenaron a las diferentes temperaturas, durante los primeros 54 días. Esto posiblemente como consecuencia de la baja actividad de agua de las microcápsulas (**Tabla 7**) pues ha sido reportado que la disminución en dicho parámetro aumenta la estabilidad durante el almacenamiento (Vesterlund et al., 2012). Abe et al. (2009) reportaron resultados similares en lo respectivo a la estabilidad de células de *B. longum* BB536 en una formulación en polvo con actividad de agua de 0.04 cuando éstas se almacenaron a 5 y 22 °C durante un periodo de 30 meses, sin encontrar diferencia en la supervivencia a ambas temperaturas.

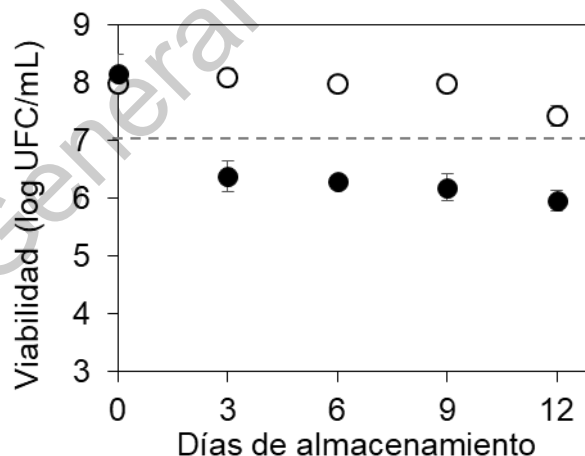
El sistema de encapsulación otorgó a LGG una protección ante el almacenamiento que fue superior en comparación con otros sistemas. Entre ellos destacan la microencapsulación con AR-APSL o maltodextrina-alginato, en donde se han observado pérdidas de entre 0.6 y 6 log UFC/g cuando las cápsulas se almacenaron entre 14 y 60 días a temperaturas de 4 o 22 °C (Ying et al., 2010; Sohail et al., 2013; Ying et al., 2016; Pirarat et al., 2015). Las diferencias en la supervivencia pudieron deberse a la baja actividad de agua de las microcápsulas obtenidas en el presente trabajo así como a diferencias en la protección generadas por los materiales utilizados.

Así, pese a que la eficiencia de encapsulación ( $T_E$  de  $140^\circ\text{C}$ ) fue de 11% (**Tabla 6**), lo que puede ser considerado como bajo, el número final de las células contenidas en las microcápsulas estuvo dentro de un valor aceptable. Considerando lo anterior y en conjunto con la buena protección del sistema ante la simulación gastrointestinal y almacenamiento, las condiciones seleccionadas se utilizaron para los experimentos posteriores.

### ETAPA 3

#### 5.6. Efecto del ácido ascórbico en la estabilidad de la viabilidad de LGG en una bebida de té verde

Para poder realizar un análisis de vida de anaquel sensorial es importante tener, *a priori*, información sobre el comportamiento del producto en almacenamiento (Hough, 2010). Debido a esto se realizó un experimento preliminar en el que células de LGG, libres y microencapsuladas en el sistema diseñado, se colocaron en una bebida de té verde que se almacenó durante 12 días a  $4^\circ\text{C}$  (**Figura 11**).



**Figura 11.** Viabilidad de LGG libre (○) y microencapsulado (●), en una bebida de té verde almacenada a  $4^\circ\text{C}$ .

Se observó una buena estabilidad de las células libres en la bebida de té verde durante los primeros 9 días de almacenamiento. Es posible que esto se debiera a la presencia de

polifenoles presentes en el extracto de té verde, que presentan actividad antioxidante y por ende reducen el potencia redox. Esto se ha reportado para otras cepas probióticas como *L. helveticus* cuando se cultivó en medio adicionado con extracto de té verde (Gaudreau et al., 2013; Tripathi and Giri, 2014).

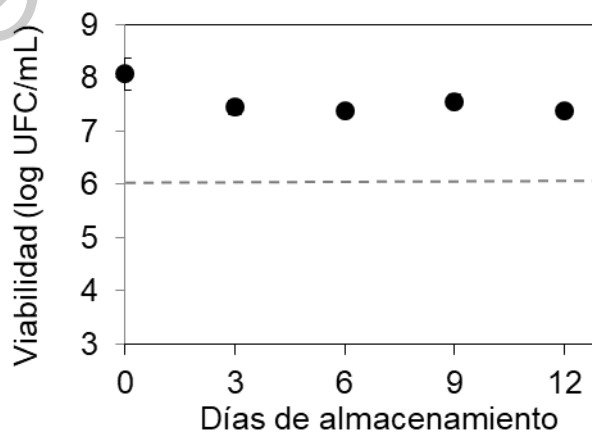
En contraste, luego de 3 días de almacenamiento la viabilidad de las células de LGG microencapsuladas cayó por debajo del valor mínimo recomendado de 7 log UFC/mL. Es de destacar que la mayor pérdida de viabilidad ocurrió durante los primeros tres días de almacenamiento, comportamiento que no se observó en las células libres. Esto sugirió que la pérdida de viabilidad debía estar relacionada al sistema de encapsulación. El material de pared de las cápsulas fue una combinación de AMH y APSL. Este último está conformado en su mayoría por tres proteínas:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina y albúmina sérica bovina. Todas ellas han mostrado afinidad para interactuar de manera covalente o no-covalente a la EGCG, compuesto polifenólico más abundante en el té verde (Al-Hanish et al., 2016; Nozaki et al., 2009; Zorilla et al., 2011). En este respecto, Von Staszewski et al. (2011) reportaron que la adición de proteína de suero de leche a infusiones de té verde causó una disminución de la actividad antioxidante de las infusiones, fenómeno asociado con un aumento en el potencial redox (Manzocco et al., 1998). Así mismo mostraron que si la bebida se centrifugaba a 5000 rpm durante 10 minutos, se cuantificaba entre 32–65% menos de polifenoles totales en comparación con la bebida sin centrifugar. Dichas observaciones fueron atribuidas a la formación de un complejo insoluble polifenoles-proteínas, causante de la disminución de la actividad antioxidante (von Staszewski et al., 2011).

Por lo anterior, es posible que la drástica disminución de la viabilidad de las células microencapsuladas de LGG en los primero tres días de almacenamiento del té verde (**Figura 11**) se debiera a una disminución en la actividad antioxidante, y por ende aumento del potencial redox, como consecuencia de la unión de los polifenoles del extracto de té a las proteínas de las microcápsulas. La formación de los complejos insolubles entre el APSL y los polifenoles se corroboró al centrifugar las bebidas y medir los compuestos polifenólicos totales. Un 40% menos de éstos fueron cuantificados en los sobrenadantes de la formulación con células microencapsuladas respecto a la que

contenía células libres, inmediatamente después de la adición de las células a las bebidas.

También se ha observado que el almidón puede interactuar con ciertos compuestos polifenólicos a través de interacciones no covalentes, aunque los mecanismos detallados no han sido completamente deducidos aún (Amoako and Awika, 2016; Zhu, 2015). Se ha evidenciado, por ejemplo, la unión de polifenoles del té verde a almidón de maíz alto en amilosa mediante puentes de hidrogeno (Chai et al., 2013), fenómeno que se documentó también en almidones provenientes de otras fuentes como la semilla de loto (Zhao et al., 2019). Aunque no parece existir literatura respecto al efecto de la adición de almidón a infusiones de té sobre la capacidad antioxidante de las mismas, el potencial de los compuesto polifenólicos de interactuar con el almidón debe ser mencionado.

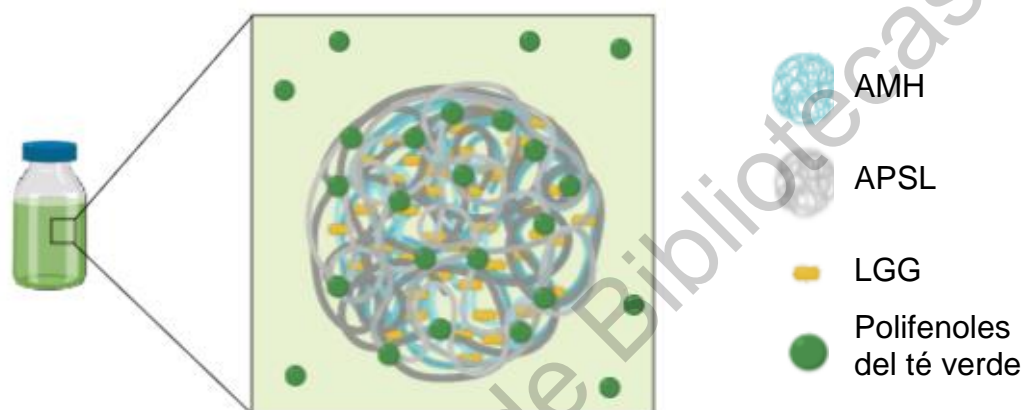
En consideración de lo anterior, se repitió el experimento colocando la microcápsulas de LGG en té verde con 0.1 mg/mL de ácido ascórbico. Como se observa en la **Figura 12**, la adición del ácido ascórbico permitió una mayor supervivencia de las células encapsuladas, en un número igual que las células libres de LGG cuando en la bebida no se adicionó dicho antioxidante. Con base en estos resultados se consideró que las formulaciones del té verde debían contener 0.1 mg/mL de ácido ascórbico con la finalidad de mantener la viabilidad celular.



**Figura 12.** Viabilidad de LGG microencapsulado, en una bebida de té verde con 0.1 mg/mL de ácido ascórbico, almacenada a 4 °C.



Así, las microcápsulas de LGG en el té verde podrían tener una conformación como la que se presenta en la **Figura 13**. Las microcápsulas están formadas por AMH y APSL con células de LGG embebidas en dicha matriz. Como se discutió anteriormente, es probable que el APSL se encuentre en su mayoría en la parte superficial de la microcápsulas. Cuando éstas son añadidas a una bebida de té verde, una porción de los compuestos polifenólicos se unen a las microcápsulas al interactuar con el APSL y/o el AMH, y la otra parte se mantiene libre y soluble en el agua.

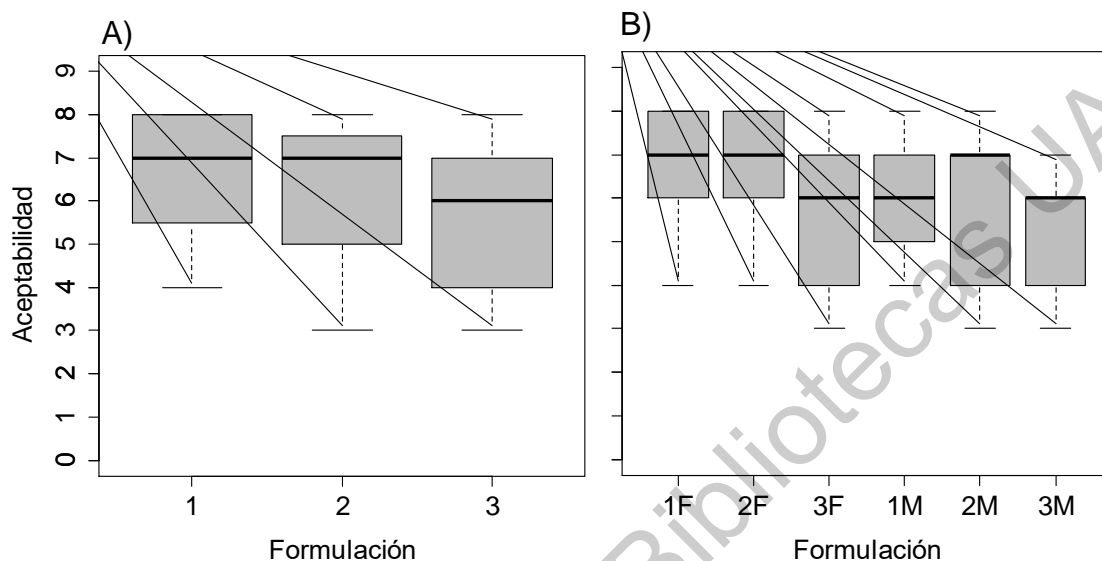


**Figura 13.** Modelo de la conformación de las microcápsulas de LGG en una bebida de té verde. AMH: almidón modificado de huauzontle; APSL: aislado de proteína de suero de leche; LGG: *L. rhamnosus* GG.

### 5.7. Selección de una formulación para una bebida de té verde con probióticos microencapsulados

Se generaron tres formulaciones de una bebida de té verde con células de LGG microencapsuladas en el sistema generado. Las tres bebidas contenían 1% de microcápsulas (valor que se fijó con base en la viabilidad de LGG por gramo de cápsulas), 0.1% de ácido ascórbico, 0.15% de ácido cítrico y el dulzor equivalente a 6% de sacarosa. Se generaron tres formulaciones 1) 6% de sacarosa 2) 3% de sacarosa y 0.11% de stevia y 3) 0.23% de stevia. Se realizó una evaluación sensorial con 28 consumidores, de los cuales el 50% fueron mujeres. Se les pidió dar su opinión respecto a la aceptabilidad general de la bebida así como en lo respectivo al sabor,

aroma y color de cada formulación en una escala hedónica de 9 puntos en donde 1 representó “me disgusta mucho” y 9 “me gusta mucho”. Los resultados de la evaluación se presentan en la **Figura 14**.



**Figura 14.** Aceptabilidad general de tres formulaciones de té verde con probióticos. Formulación 1) 6% de sacarosa 2) 3% de sacarosa, 0.11% de stevia 3) 0.25% de stevia.

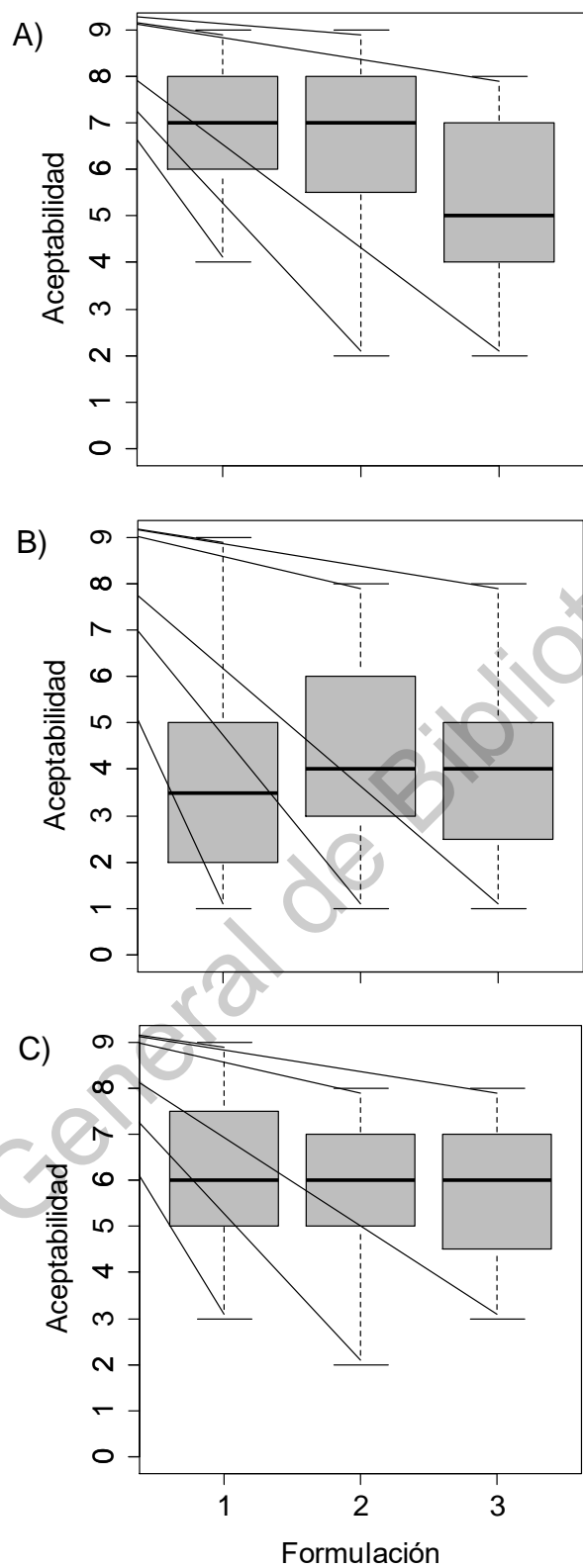
Como se observa en la **Figura 14A**, la aceptabilidad general media de las bebidas fue significativamente diferente dependiendo de la formulación ( $p = 0.030$ ). La formulación 1 y 2 presentaron un valor promedio de aceptabilidad general similar mientras que la formulación 3 presentó el menor valor. Además se detectó que la aceptabilidad general de las bebidas fue distinta dependiendo del sexo del evaluador ( $p=0.061$ ), como se ilustra en la **Figura 14B**. Los datos indicaron que las mujeres tuvieron un mayor agrado por las formulaciones en comparación con los hombres, especialmente en lo respectivo a las primeras dos. No se detectó diferencia estadística significativa en la aceptabilidad general de la bebida de acuerdo a la edad ( $p=0.811$ ) o frecuencia de consumo de té verde ( $p=0.567$ ) de los consumidores. Bae et al. (2016) reportaron que la edad, más que el género de los evaluadores, influye en la aceptabilidad de té verde listo para consumo. Sin embargo, dicho estudio se realizó con consumidores residentes de Korea

del Sur cuya alta frecuencia de consumo de tales productos, y el número mayor de la muestra evaluada podría explicar las diferencias encontradas.

La aceptabilidad del sabor de la bebida (**Figura 15A**) fue significativamente diferente entre las formulaciones ( $p=0.0301$ ) pero no así de acuerdo al género ( $p=0.293$ ), edad ( $p=0.723$ ) o frecuencia de consumo de té verde ( $p=0.728$ ) de los consumidores. La formulación 3, que contenía únicamente stevia como endulzante, presentó la menor aceptabilidad respecto al sabor. De acuerdo a los comentarios escritos por los consumidores en sus papeletas esto se debió al resabio del producto. Este sabor es generado por el stevia, fenómeno que ha sido ampliamente reportado para productos como yogurt, jugos de fruta y panes (Ahmad et al., 2019; Andersen et al., 2019; Costa et al., 2019; Luo et al., 2019).

Se observó también una amplia variabilidad en la aceptabilidad del sabor para todas las formulaciones. Lo anterior podría estar explicado por el sabor astringente que generan los polifenoles presentes en el té verde (Bae et al., 2016). En este respecto, Dinnella et al. (2011) reportaron que existen diferencias fisiológicas individuales en la salivación que afectan de manera significativa la sensibilidad ante estímulos astringentes complejos y que éstos tienen influencia en la aceptabilidad de alimentos ricos en polifenoles. Observaron que un incremento en la concentración de taninos presentes en jugos indujo una disminución importante en el agrado de la bebida en sujetos altamente sensibles a compuestos polifenólicos astringentes en comparación con aquellos que fueron menos sensibles a dicho estímulo.

En cuanto al color de las bebidas (**Figura 15B**), la aceptabilidad de este parámetro no varió significativamente respecto a las formulaciones ( $p=0.8940$ ), y no se vio influenciada por el sexo ( $p=0.622$ ), edad ( $p=0.558$ ) o frecuencia de consumo de té ( $p=0.766$ ) de los evaluadores. El color presentó las calificaciones más bajas entre todos los parámetros evaluados. Esto se debió, probablemente, a que la adición de 1% de microcápsulas al té provocó que se perdiera la transparencia de la bebida. Sin embargo, debido a la eficiencia de encapsulación no fue posible adicionar una concentración menor de microcápsulas a la bebida de té verde. Debe considerarse que en los productos de té que se promocionan como listos para consumo, el color es un factor determinante tanto en la satisfacción de compra como en la intención de



**Figura 15.** Aceptabilidad del sabor (A), color (B) y aroma (C) de tres formulaciones de té verde con probióticos microencapsulados. Formulación 1) 6% de sacarosa 2) 3% de sacarosa, 0.11% de stevia 3) 0.25% de stevia.

re-adquirir el producto (Park and Na, 2015). Así, como consecuencia de la baja aceptabilidad que se observó respecto al color de las bebidas, se decidió que éstas debían almacenarse en un contenedor que evitara que el consumidor viera el color. Por lo tanto, para el análisis de vida de anaquel posterior se tomaron dos consideraciones: colocar las bebidas en botellas color ámbar, y realizar la evaluación sensorial utilizando luz roja para enmascarar el color.

En cuanto al aroma de las bebidas (**Figura 15C**), no hubo diferencia significativa en la aceptabilidad de las diferentes formulaciones ( $p=0.8039$ ) y ésta no se estuvo influenciada por el sexo ( $p=0.456$ ), edad ( $p=0.494$ ) o frecuencia de consumo de té verde ( $p=0.825$ ).

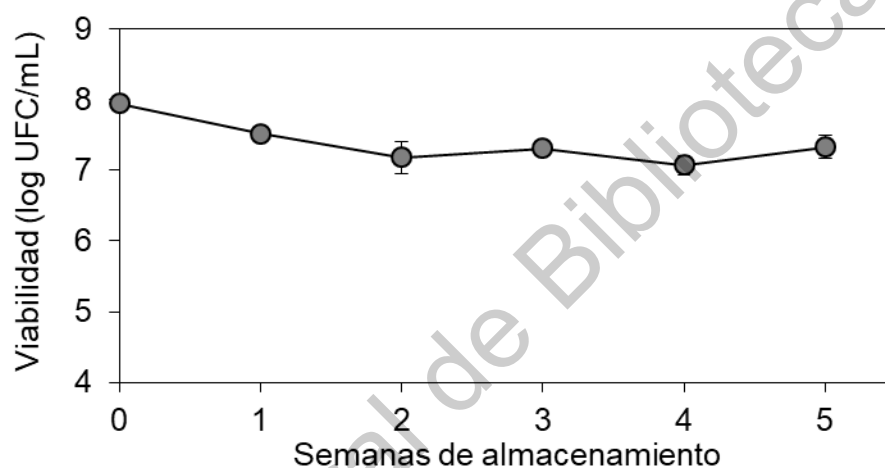
En resumen, la formulación 1 obtuvo las mayores calificaciones en todos los parámetros evaluados, sin embargo, esta bebida contenía únicamente sacarosa como endulzante. La formulación 2 obtuvo calificaciones muy similares pero con la mitad de la concentración de sacarosa y por ende un menor aporte calórico. Así, la formulación 2 fue seleccionada para los experimentos posteriores.

#### **5.8. Vida de anaquel sensorial de una bebida de té verde con probióticos microencapsulados**

Se analizó la vida de anaquel sensorial de una bebida de té verde adicionada con probióticos microencapsulados en AMH y APSL. Dicha bebida contenía (p/v): 1% de microcápsulas, 0.1% de ácido ascórbico, 0.15% de ácido cítrico, 3% de sacarosa y 0.11% de stevia. Para esto, las bebidas se prepararon de manera semanal y se almacenaron a 4°C. Finalizado el almacenamiento se realizó una evaluación sensorial para determinar la vida de anaquel sensorial, y se analizaron las características fisicoquímicas de los productos a los diferentes tiempos de almacenamiento.

Al final de las 5 semanas de almacenamiento se observó que la viabilidad de LGG fue de  $7.35 \pm 0.16$  log UFC/mL (**Figura 16**). La mayor disminución de dicho parámetro se detectó durante la primera semana ( $-0.44$  log UFC/mL) el cual fue un fenómeno esperado, como se mencionó en la sección 5.6, como posible consecuencia de una capacidad antioxidante disminuida en el medio causada por la unión de los polifenoles al APSL presente a las microcápsulas. Posteriormente la viabilidad se mantuvo estable

perdiéndose únicamente 0.18 log UFC/mL durante las 4 semanas restantes. Dichos resultados son favorables puesto que indican que es posible, durante al menos 5 semanas, mantener el número de células de LGG por encima del valor recomendado de 7 log UFC/mL (World Gastroenterology Organization, 2017). Se ha sugerido que es necesario ingerir una dosis de  $5 \times 10^9$  UFC de células de LGG durante un periodo de 5-7 días para que dicho microorganismo pueda colonizar el intestino y ser detectado en las heces (Capurso, 2019). Tal dosis diaria podría alcanzarse mediante la ingesta de 250 mL del té verde con probióticos generado en el presente trabajo.



**Figura 16.** Supervivencia d células microencapsuladas de LGG en una bebida de té verde almacenada a 4 °C.

La evaluación de la post-acidificación de los alimentos probióticos es de suma importancia pues éstos tienen impactos directos en la percepción sensorial de los mismos. Si el objetivo es el desarrollo de productos no fermentados, como en el caso del presente trabajo, se desea mantener estables el pH y acidez titulable (Gandomi et al., 2016). Cuando las células se encuentran libres, por ejemplo en una bebida, éstas pueden metabolizar los azúcares presentes en el producto lo que resulta en la producción y liberación de ácidos orgánicos con un subsecuente aumento en la acidez titulable, lo que impacta de manera negativa en la viabilidad celular. También es posible que las bacterias muertas liberen enzimas que hidrolicen los azúcares de la matriz alimenticia (Pimentel et al., 2015). Como se observa en la **Tabla 8**, no se detectaron

cambios en el pH, acidez titulable o concentración de azúcares reductores del té verde con probióticos microencapsulados durante el periodo de almacenamiento evaluado. Tales resultados sugieren que no ocurrió fermentación del producto, posiblemente como consecuencia de la segregación de las células de LGG del medio que la rodeaba, gracias al sistema de microencapsulación (Sohail et al., 2013). En contraste, Tewari et al. (2018) reportaron un aumento de la acidez titulable y una disminución del pH de una bebida de té verde con células de *L. acidophilus* luego de 28 días de almacenamiento a 4 °C. Dichos cambios fueron correlacionados con una disminución importante en la aceptabilidad general de las bebidas especialmente en lo relacionado al sabor y aroma de las mismas.

**Tabla 8.** Estabilidad del pH, acidez titulable y azúcares reductores de una bebida de té verde con probióticos microencapsulados, almacenada a 4 °C.

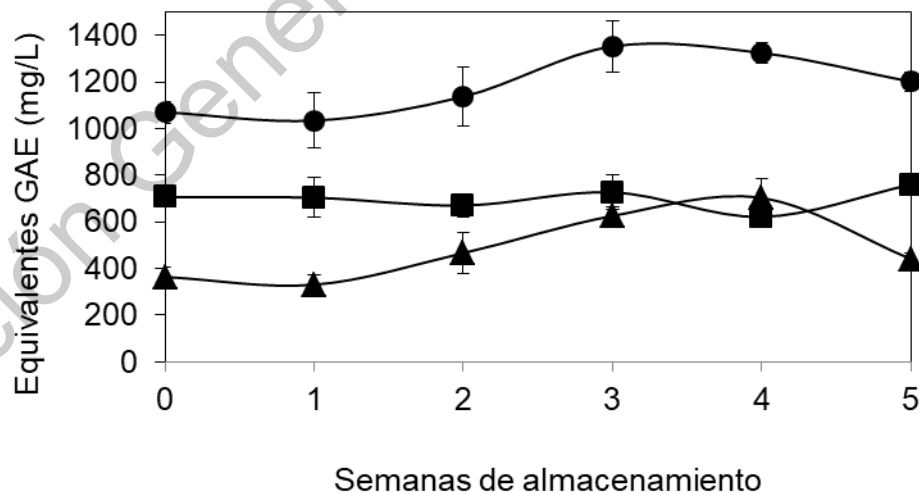
Semanas de almacenamiento	pH	Acidez titulable (% ácido láctico)	Azúcares reductores (g/L)
0	4.04 ± 0.05	0.33 ± 0.04	2.61 ± 0.11
1	4.00 ± 0.02	0.33 ± 0.05	2.69 ± 0.30
2	3.95 ± 0.02	0.36 ± 0.00	2.27 ± 0.20
3	3.98 ± 0.03	0.33 ± 0.03	2.36 ± 0.24
4	4.03 ± 0.06	0.33 ± 0.05	2.61 ± 0.12
5	4.03 ± 0.04	0.33 ± 0.05	2.62 ± 0.09

Respecto al color, se observó un aumento del parámetro  $a^*$  y una disminución de  $b^*$ , (Tabla 9). Este mismo comportamiento ha sido previamente reportado durante el almacenamiento de bebidas de té verde (Jiménez-Zamora et al., 2016; Urías-Orona and Niño-Medina, 2019). Sin embargo, es posible que estos cambios no pudieran ser detectados visualmente por el consumidor como lo indica el valor de  $\Delta E$  menor de 3 (Francis and Clydesdale, 1975). Aunado a eso, la evaluación sensorial a la que se sometió el té verde con probióticos microencapsulados se realizó utilizando luz roja de modo que el color tuviera la menor influencia posible en la aceptación o rechazo sensorial de las bebidas.

**Tabla 9.** Cambios de color de una bebida de té verde con probióticos microencapsulados, a lo largo del almacenamiento a 4 °C.

Semanas de almacenamiento	L	a	b	$\Delta E$
0	50.2 ± 1.40	01.4 ± 0.05	03.5 ± 0.05	0
1	49.7 ± 0.81	01.4 ± 0.11	03.6 ± 0.20	1.5
2	50.7 ± 0.79	01.7 ± 0.10	03.1 ± 0.15	1.4
3	48.5 ± 1.11	01.2 ± 0.15	03.2 ± 0.15	1.6
4	52.0 ± 0.63	02.1 ± 0.05	02.5 ± 0.05	2.4
5	49.9 ± 0.83	02.0 ± 0.05	02.3 ± 0.23	1.3

De igual manera se evaluó la concentración de compuestos polifenólicos totales, así como la cantidad de ellos que se encontraban libres y acomplejados (**Figura 17**). El análisis de los compuestos polifenólicos en el té verde es de suma importancia por dos razones. Primero, son éstos los compuestos bioactivos más importantes en dicho producto, ya que a ellos se asocian muchos de los efectos benéficos de su consumo (Xing et al., 2019). Segundo, porque la cantidad y tipo de compuestos polifenólicos presentes afectan el sabor y color (Yu et al., 2014).



**Figura 17.** Concentración de compuestos polifenólicos totales (●), en una bebida de té verde con probióticos microencapsulados. Una parte de los compuestos polifenólicos se encontraba libre (■) y la otra acomplejada (▲).



En todos los casos de almacenamiento de infusiones de té verde se ha observado una clara disminución de los compuestos polifenólicos totales a medida que transcurre el almacenamiento, tendencia que se mantiene cuando se analizan éstos de manera individual (Jiménez-Zamora et al., 2016; Kim et al., 2011; Urías-Orona and Niño-Medina, 2019; Wang et al., 2000). En contraste, en el té verde con probióticos microencapsulados los compuestos polifenólicos totales no mostraron una disminución importante con respecto al tiempo. De hecho, durante la tercera y cuarta semana de almacenamiento se detectó una cantidad mayor que en la bebida fresca (**Figura 17**). Ünal et al. (2018) y Amirdivani and Baba (2015) reportaron un fenómeno similar durante el almacenamiento de yogurt con extracto de té verde, en donde se observó un incremento en la concentración de polifenoles totales a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento.

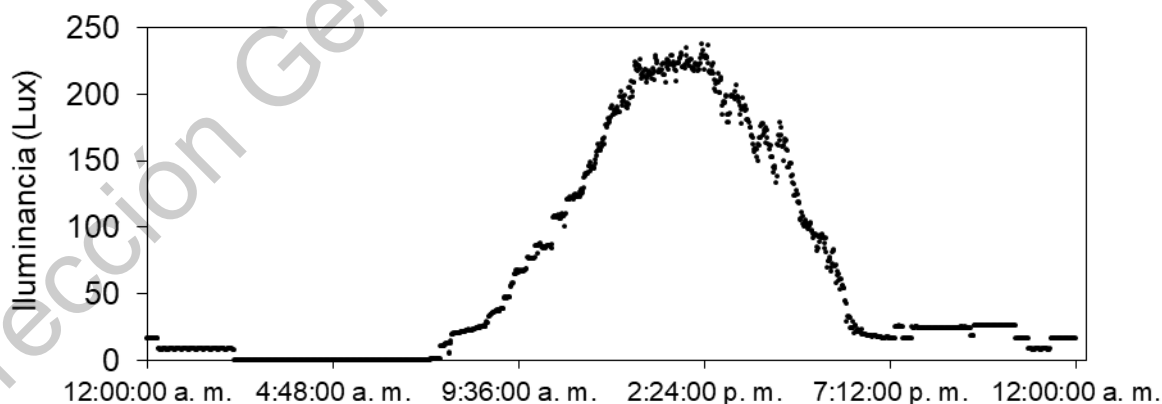
Sin embargo, de los compuestos polifenólicos totales una parte se encontraba libre y otra acompañada. Así, se ilustra en la **Figura 17** que durante el almacenamiento ocurrió un incremento en la concentración de polifenoles acompañados sin la disminución de compuesto polifenólicos libres. Esto indicó que ese aumento no es debido a un mayor acompañamiento de polifenoles libres a las microcápsulas. De acuerdo con los datos del fabricante, el APSL utilizado como parte de las microcápsulas contenía 2.7% del aminoácido tirosina. Se ha propuesto que dicho aminoácido puede incrementar las lecturas de compuestos polifenólicos como consecuencia del anillo fenólico que contiene en su estructura y que puede ser detectado por el método de Folin-Ciocalteu. Así, las células probióticas podrían, durante el almacenamiento, hidrolizar el APSL debido a su capacidad de producir proteasas, causando la liberación de tales aminoácidos (Amirdivani and Baba, 2015). Además las células probióticas son capaces de metabolizar compuestos como el ácido p-cumárico presente en el té verde, dando lugar a la producción de otros compuestos polifenólicos (Amirdivani and Baba, 2015).

Almajano et al. (2007) sugirieron que el complejo formado entre el EGCG y las proteínas del APSL puede pasar de una interacción no-covalente inmediata, a una interacción covalente a medida que transcurre el almacenamiento, al haber observado que dicho complejos se mantienen estables durante 7 días. En el presente trabajo, los datos sugieren que dicha estabilidad comienza a perderse a partir de la cuarta semana

de almacenamiento, dado que se observó la disminución de los compuestos polifenólicos acomplejados en conjunto con un aumento de los libres.

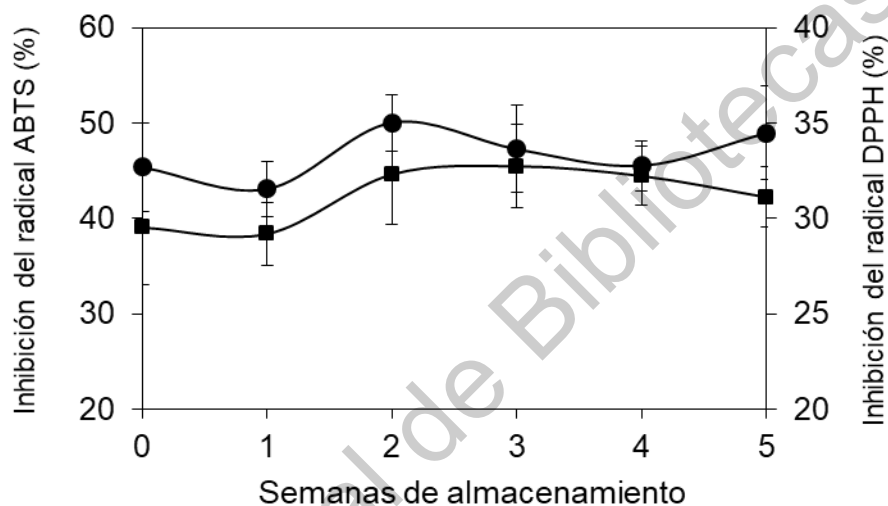
El mantenimiento de la estabilidad de polifenoles libres (**Figura 17**) pudo ser una consecuencia de la adición de ácido ascórbico a la bebida así como el uso de vidrio color ámbar durante el almacenamiento de las mismas (Kim et al., 2011; Nekvapil et al., 2012). Sin embargo, más estudios son necesarios para conocer cómo varió la concentración de las catequinas de manera individual puesto que los cambios de color observados en el té verde con probióticos (**Tabla 9**) sugieren que, efectivamente, ocurrieron cambios en la composición los mismos (Jiménez-Zamora et al., 2016).

Es bien sabido que ciertos compuestos polifenólicos como los que se encuentran en el té verde son altamente sensibles a la luz solar (Zeng et al., 2018). De modo que es interesante notar que, pese a que las bebidas de té verde con probióticos estuvieron expuestas cada día a ciclos de luz y oscuridad, como se ilustra en la **Figura 18**, dichos compuestos no disminuyeron durante el almacenamiento. Lo anterior pudo deberse al uso de botellas de vidrio color ámbar y/o a la concentración inicial de los compuestos polifenólicos (Volf et al., 2014; Zeng et al., 2018). Sin embargo, más estudios son necesarios para determinar si la interacción entre las proteínas y los polifenoles ejerció algún efecto estabilizador contra la luz.



**Figura 18.** Promedios de la iluminancia registrada durante 5 semanas en el refrigerador donde se almacenó la bebida de té verde con probióticos microencapsulados.

Respecto a la actividad antioxidante de infusiones de té verde, ésta también suele verse disminuida durante el almacenamiento en correlación con la disminución de compuestos polifenólicos totales que se mencionó con anterioridad (Jiménez-Zamora et al., 2016; Kim et al., 2011; Urías-Orona and Niño-Medina, 2019). Por el contrario, en el presente trabajo se observó un ligero aumento en la capacidad antioxidante del té verde con probióticos microencapsulados a lo largo de las 5 semanas evaluadas, tanto en el porcentaje de inhibición del radical ABTS como DPPH (**Figura 19**).



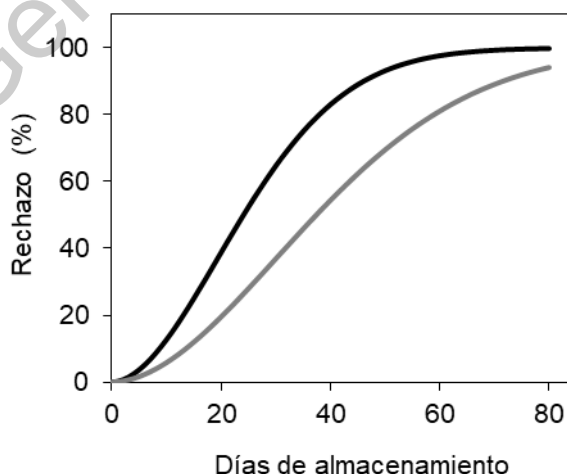
**Figura 19.** Actividad de inhibición del radical ABTS (●) y DPPH (■) de un té verde con probióticos microencapsulados, almacenado a 4°C.

El comportamiento de la actividad antioxidante pudo deberse al comportamiento que se observó en los compuestos polifenólicos totales. En concordancia con el presente trabajo, Almajano et al., (2007) observaron que en mezclas independientes de las proteínas más abundantes en el APSL con EGCG, se incrementó la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) durante el almacenamiento de las mezclas a 30°C.

En primera instancia pudo parecer que la presencia del APSL a la bebida tuvo efectos negativos en la misma, como se discutió en la sección 5.6 en lo relacionado a la viabilidad de LGG. Sin embargo, parecen existir diversas ventajas como consecuencia de las interacciones entre los polifenoles y el APSL, relacionadas especialmente a la estabilidad de los polifenoles totales y la actividad antioxidante de las bebidas durante

el almacenamiento. No obstante, de acuerdo a la literatura existen otras posibles ventajas asociadas a tales interacciones. Por ejemplo, la interacción entre ambos componentes puede reducir la astringencia causada por los polifenoles (Shpigelman et al., 2012), potenciar la actividad antimicrobiana contra bacterias gram-positivas (Carson et al., 2018), mejorar la estabilidad de los polifenoles durante el paso por el tracto gastrointestinal (Lamothe et al., 2014; Shpigelman et al., 2012; Stojadinovic et al., 2013) e inclusive aumentar su bioaccesibilidad (Bhushani et al., 2016). Se ha observado que la actividad anti-proliferativa contra ciertas líneas celulares se mantiene a pesar de dichas interacciones (von Staszewski et al., 2012).

Ahora bien, para la evaluación sensorial de la bebida a diferentes tiempo de almacenamiento se reclutaron un total de 46 consumidores, pero únicamente 37 evaluaciones fueron contempladas para el análisis de datos debido a que se eliminaron las 9 papeletas en donde los evaluadores indicaron que no consumirían el producto fresco. De los 37 evaluadores finales, cuyas edades variaron entre 20 y 33 años, 23 fueron mujeres. En la **Figura 20** se presenta la función de rechazo de la bebida de té verde con probióticos microencapsulados, de acuerdo al modelo lognormal. Los datos sugirieron que la vida de anaquel del producto es diferente para hombres y mujeres, en donde el rechazo del producto ocurre primero para las mujeres.



**Figura 20.** Función de rechazo (— Mujeres; — Hombres) de una bebida de té verde con probióticos microencapsulados, almacenada a 4 °C.

De igual forma se examinó la correlación lineal entre las funciones de rechazo obtenidas para hombres y mujeres respecto a los parámetros fisicoquímicos de las bebidas (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Coeficientes de correlación de Pearson de las funciones de rechazo respecto a los parámetros fisicoquímicos de la bebida de té verde con probióticos microencapsulados

Parámetro fisicoquímico	Mujeres	Hombres
<i>b</i>	0.9100	0.9231
<i>a</i>	0.5133	0.5398
L	0.0318	0.0317
Viabilidad	0.4265	0.3499
pH	0.0414	0.0704
Acidez titulable	0.0493	0.0613
Azúcares reductores	0.0013	0.0119
Compuestos polifenoles totales	0.5179	0.4188
Compuestos polifenoles libres	0.0096	0.0239
Compuestos polifenoles acomplexados	0.3726	0.3723
ABTS	0.1907	0.1781
DPPH	0.3288	0.2405

Se observó una alta correlación entre las funciones de rechazo y el parámetro de color *b*, y una correlación menor pero igualmente importante con el parámetro de color *a*. De modo que el incremento en el rechazo por parte de los consumidores conforme el tiempo de almacenamiento de la bebida podría deberse a los presuntos cambios en el perfil de los compuestos polifenólicos que se evidenció por lo cambio de color. Específicamente, la oxidación de las catequinas genera el obscurecimiento de las bebidas (Munoz-Munoz et al., 2008) mientras que, la concentración de quercetina está relacionada con el color verde (Wang et al., 2004). El cambio de color por sí solo debió tener poca influencia en el rechazo del producto en cuanto al aspecto visual, puesto que se utilizó luz roja. Sin embargo, es posible que sí haya tenido implicaciones en el sabor. Nuevamente esto indica la necesidad de analizar los compuestos polifenólicos de manera individual. Lo anterior sugiere que los cambios de color podrían utilizarse para tener una idea de la vida de anaquel del producto.

También se observó una correlación importante entre la función de rechazo del té verde con probióticos microencapsulados y la concentración de compuestos polifenólicos totales, los cuáles aumentaron con el almacenamiento (**Figura 17**). Como se discutió anteriormente, las personas pueden presentar diferencias fisiológicas individuales en la sensibilidad de detección de compuestos astringentes como los polifenoles (Dinnella et al., 2011). De modo que el incremento de los compuestos polifenólicos totales en la bebida con el paso del tiempo pudo generar un aumento en la astringencia explicando el aumento del rechazo de la misma.

Otra explicación podría ser el aroma de la bebida. Se han documentado cambios en la composición de los compuesto volátiles del té verde durante el almacenamiento (Choi et al., 2016; Wang et al., 2003), situación que finalmente impacta la percepción sensorial puesto que estos influyen en el aroma (Lee et al., 2013). Sin embargo, en el presente trabajo no se consideró el análisis de dichos compuestos.

Para poder deducir con exactitud cuál fue el parámetro sensorial con mayor influencia en el rechazo de los productos, para trabajos posteriores podría implementarse el uso de la técnica del análisis descriptivo cuantitativo, mediante el uso de un panel entrenado.

Ahora bien, como se ilustra en la **Tabla 11**, suponiendo que se decida que la vida de anaquel se fija a un 25% de rechazo del producto por parte de los consumidores, esto ocurriría entre los 16-55 días dependiendo si el consumidor es mujer u hombre.

**Tabla 11.** Días a los que ocurre el rechazo sensorial de un té verde con probióticos microencapsulados.

Género	% Rechazo	Menor	Mayor	Error
Mujeres	10	9.40	23.51	3.47
	25	16.06	27.47	2.87
	50	23.07	35.02	3.02
Hombres	10	14.63	38.89	5.94
	25	20.55	55.28	8.50
	50	25.40	81.89	13.61

Los datos obtenidos de este análisis no son fácilmente comparables con lo reportado por Tewari et al. (2018) respecto al té verde listo para consumo con probióticos que desarrollaron. Sin embargo, estos autores reportaron una aceptabilidad general del producto de  $1 \pm 0.0$  (valor que representaba “me disgusta mucho”) a los 28 días de almacenamiento. Esto se correlacionó con un incremento de la acidez titulable y una disminución del pH, evidencia de una posible fermentación del té. Lo anterior podría interpretarse como que a las 4 semanas se obtuvo un porcentaje de rechazo del 100%. Para el mismo tiempo de almacenamiento, el té verde con probióticos microencapsulados que se generó en el presente trabajo tuvo un rechazo del 40-60%, lo que insinúa una mayor vida de anaquel sensorial. Las diferencias entre ambos trabajos podrían estar explicadas por la estabilidad observada en el pH y acidez titulable del té verde desarrollado en el presente trabajo y que posiblemente fue una consecuencia de la microencapsulación de los probióticos.

En resumen, la adición de las microcápsulas conllevó a una disminución de la viabilidad de aproximadamente 0.5 log UFC/mL en la primera semana de almacenamiento, aún cuando al medio se añadió ácido ascórbico. Esto pudo deberse a la a la composición de las microcápsulas. Sin embargo, al final de las 5 semanas de almacenamiento se observó una buena estabilidad de la viabilidad de LGG así como el mantenimiento del pH, la acidez titulable, concentración de polifenoles totales y actividad antioxidante. Finalmente, los datos sugirieron una vida de anaquel mayor en comparación con otras bebidas de té verde listo para consumo adicionadas con probióticos.

## VI. CONCLUSIONES

El proceso de hidrólisis ácida y extrusión del ANH, generó AMH con características funcionales favorables para su uso en el secado por aspersión.

La mezcla de AMH y APSL es una matriz competente para la microencapsulación de células viables de LGG, mediante secado por aspersión. A una  $T_E$  de 140°C se obtuvieron los mejores resultados en lo respectivo a la eficiencia del proceso. Además, por su composición y características fisicoquímicas, el sistema de microencapsulación protegió a las células probióticas ante condiciones de tracto gastrointestinal simulado, y durante el almacenamiento a 4 y 22°C por hasta 60 días.

La adición de ácido ascórbico al té verde listo para consumo coadyuva en el mantenimiento de la viabilidad celular de LGG cuando las células se encuentran microencapsuladas en el sistema generado. La bebida desarrollada representa una alternativa prometedora de producto probiótico, puesto que las células de LGG se mantienen en un número mayor al recomendado durante al menos 5 semanas de almacenamiento a 4°C. En tales condiciones el producto no presentó fermentación y se registró estabilidad en la concentración de compuestos polifenólicos totales y actividad antioxidante. Finalmente, la vida de anaquel sensorial del té verde con probióticos microencapsulados fue diferente dependiendo del género del consumidor, siendo más corta para las mujeres.



## REFERENCIAS

- Abe, F., Miyauchi, H., Uchijima, A., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., 2009. Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *Int. J. Dairy Technol.* 62, 234–239. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00464.x>
- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B.R., Langrish, T.A.G., 2009. Effect of addition of proteins on the production of amorphous sucrose powder through spray drying. *J. Food Eng.* 94, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.029>
- Adler, M., Lee, G., 1999. Stability and surface activity of lactate dehydrogenase in spray-dried trehalose 88, 199–208. <https://doi.org/10.1021/js980321x>
- Afeiche, M.C., Koyratty, B.N.S., Wang, D., Jacquier, E.F., Lê, K.-A., 2018. Intakes and sources of total and added sugars among 4 to 13-year-old children in China, Mexico and the United States. *Pediatr. Obes.* 13, 204–212. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12234>
- Agama-Acevedo, E., Flores-Silva, P.C., Bello-Perez, L.A., 2019. Cereal Starch Production for Food Applications, in: *Starches for Food Application*. Elsevier, pp. 71–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809440-2.00003-4>
- Aghamirzaei, M., Heydari-Dalfard, A., Karami, F., Fathi, M., 2013. Pseudo-cereals as a functional ingredient: effects on bread nutritional and physiological properties. *Review. Int J Afric Crop Sci* 5, 1574–1580.
- Ahmad, U., Ahmad, R.S., Mushtaq, Z., Hussian, S.M., 2019. Characterization of low calorie ready-to-serve peach beverage using natural sweetener, Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Prog. Nutr.* 21, 435–444. <https://doi.org/10.23751/pn.v21i1-S.6555>
- Al-Hanish, A., Stanic-Vucinic, D., Mihailovic, J., Prodic, I., Minic, S., Stojadinovic, M., Radibratovic, M., Milcic, M., Cirkovic Velickovic, T., 2016. Noncovalent interactions of bovine  $\alpha$ -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Food Hydrocoll.* 61, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.012>
- Almajano, M.P., Delgado, M.E., Gordon, M.H., 2007. Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chem.* 101, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.009>
- Amirdivani, S., Baba, A.S.H., 2015. Green tea yogurt: major phenolic compounds and microbial growth. *J. Food Sci. Technol.* 52, 4652–4660. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1670-6>
- Amoako, D., Awika, J.M., 2016. Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. *Curr. Opin. Food Sci.* 8, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.01.010>

- Anal, A.K., Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- Anandharamakrishnan, C., Ishwarya, P., 2015. *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*, 1<sup>o</sup>. ed. John Wiley & Sons, Ltd.
- Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D., 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal* 15, 399–409. <https://doi.org/doi:10.1016/j.idairyj.2004.08.004>.
- Andersen, B.V., Brockhoff, P.B., Hyldig, G., 2019. The importance of liking of appearance, -odour, -taste and -texture in the evaluation of overall liking. A comparison with the evaluation of sensory satisfaction. *Food Qual. Prefer.* 71, 228–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.07.005>
- Anderson, R., Conway, H., Pfeifer, V., Griffin, E., 1969. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Sci Today* 14, 4–12.
- Anesini, C., Ferraro, G.E., Filip, R., 2008. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea ( *Camellia sinensis* ) in Argentina. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9225–9229. <https://doi.org/10.1021/jf8022782>
- Araujo-Farro, P.C., 2005. Comparison of starch pasting and retrogradation properties of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), rice, potato, cassava, wheat and corn starches. Presented at the 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, p. 8.
- Arepally, D., Goswami, T.K., 2019. Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT* 99, 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.022>
- Ashwar, B.A., Gani, A., Shah, A., Wani, I.A., Masoodi, F.A., 2016. Preparation, health benefits and applications of resistant starch-a review: Resistant starch-a review. *Starch - Stärke* 68, 287–301. <https://doi.org/10.1002/star.201500064>
- Ashwar, B.A., Gani, Asir, Gani, Adil, Shah, A., Masoodi, F.A., 2018. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chem.* 239, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.110>
- Assad-Bustillos, M., Ramírez-Gilly, M., Tecante, A., Chaires-Martínez, L., 2014. Physicochemical, functional, thermal and rheological characterization of starch from huauzontle seeds (*Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae*). *Agrociencia* 48, 789–803.
- Avila-Reyes, S.V., Garcia-Suarez, F.J., Jiménez, M.T., San Martín-Gonzalez, M.F., Bello-Perez, L.A., 2014. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydr. Polym.* 102, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.033>
- Azizi A, M.D., 2015. Methods of Increasing Probiotic Survival in Food and Gastrointestinal Conditions. *Prensa Medica* 101. <https://doi.org/10.4172/lpma.1000154>

- Bae, Y.-W., Lee, S.M., Kim, K.-O., 2016. Age and gender differences in the influence of extrinsic product information on acceptability for RTD green tea beverages: Age and gender difference in green tea beverage acceptability. *J. Sci. Food Agric.* 96, 1362–1372. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7232>
- Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M.J., Oliveira, A., Pintado, M.E., Teixeira, P., 2015. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *J. Funct. Foods* 17, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.001>
- Bhushani, J.A., Karthik, P., Anandharamkrishnan, C., 2016. Nanoemulsion based delivery system for improved bioaccessibility and Caco-2 cell monolayer permeability of green tea catechins. *Food Hydrocoll.* 56, 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.035>
- Butt, M.S., Nasir, M., Akhtar, S., Sharif, K., 2003. Effect of moisture and packaging on the shelf life of wheat flour. *International Journal of Agriculture and Biology* 5, 1–6.
- Cairns, A.M., Watson, M., Creanor, S.L., Foye, R.H., 2002. The pH and titratable acidity of a range of diluting drinks and their potential effect on dental erosion. *J. Dent.* 30, 313–317. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(02\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(02)00044-1)
- Calvo-López, A., 2018. Microencapsulación de betalaínas extraídas de “jiotilla” (*Escontria chiotilla* [Weber] Britton & Rose) y evaluación de su estabilidad libres y microencapsuladas. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Querétaro, México.
- Capurso, L., 2019. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. *J. Clin. Gastroenterol.* 53, S1–S41. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001170>
- Carrillo-Ocampo, A., Engleman, E.M., 1994. Anatomía de la semilla de *Chenopodium berlandieri* spp *nuttalliae* (Chenopodiaceae) “huauzontle”. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 54, 17–34.
- Carson, M., Keppler, J.K., Brackman, G., Dawood, D., Vandrovцова, M., Fawzy El-Sayed, K., Coenye, T., Schwarz, K., Clarke, S.A., Skirtach, A.G., Douglas, T.E.L., 2018. Whey Protein Complexes with Green Tea Polyphenols: Antimicrobial, Osteoblast-Stimulatory, and Antioxidant Activities. *Cells Tissues Organs* 206, 106–118. <https://doi.org/10.1159/000494732>
- Castro-Becerra, A.L., 2010. Efecto de la microencapsulación de *bifidobacterium breve*, en matrices de almidón fosfatado y proteína de suero mediante secado por aspersión, sobre su viabilidad en yogurt y en condiciones gastrointestinales simuladas.
- Chai, Y., Wang, M., Zhang, G., 2013. Interaction between Amylose and Tea Polyphenols Modulates the Postprandial Glycemic Response to High-Amylose Maize Starch. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8608–8615. <https://doi.org/10.1021/jf402821r>
- Cheetham, N.W.H., Tao, L., 1998. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydr. Polym.* 36, 277–284. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00007-1)

- Chen, W., Wang, W., Ma, X., Lv, R., Balaso Watharkar, R., Ding, T., Ye, X., Liu, D., 2019. Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Food Chem.* 274, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.106>
- Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Pecoraino, M., Pagliaro, M., 2019. A bioeconomy perspective for natural sweetener Stevia. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 13, 445–452. <https://doi.org/10.1002/bbb.1968>
- Cooper, R., 2012. Green tea and theanine: health benefits. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63, 90–97. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.629180>
- Corrochano, A.R., Arranz, E., De Noni, I., Stuknytė, M., Ferraretto, A., Kelly, P.M., Buckin, V., Giblin, L., 2018. Intestinal health benefits of bovine whey proteins after simulated gastrointestinal digestion. *J. Funct. Foods* 49, 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.043>
- Costa, G.M., Paula, M.M., Barão, C.E., Klososki, S.J., Bonafé, E.G., Visentainer, J.V., Cruz, A.G., Pimentel, T.C., 2019. Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. *Int. Dairy J.* 97, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.007>
- Cruz, A.G., Castro, W.F., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A., Celeghini, R.M.S., Raices, R.S.L., Oliveira, C.A.F., Freitas, M.Q., Conte Júnior, C.A., Mársico, E.T., 2013. Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage. *Food Res. Int.* 51, 723–728. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.028>
- Cruz, A.G., Faria, J. de A.F., Van Dender, A.G.F., 2007. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res. Int.* 40, 951–956. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.05.003>
- Daneshi, M., Ehsani, M., Razavi, S., Labbafi, M., 2013. Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. *Electrin J Biotechn* 16, 5.
- de Oliveira, F.C., Coimbra, J.S. dos R., de Oliveira, E.B., Zuñiga, A.D.G., Rojas, E.E.G., 2016. Food Protein-polysaccharide Conjugates Obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1108–1125. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.755669>
- Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Collins, K., Paul, R.R., 2002. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 12, 183–190.
- Ding, W.K., Shah, N.P., 2008. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal* 15, 219–232.
- Dinnella, C., Recchia, A., Tuorila, H., Monteleone, E., 2011. Individual astringency responsiveness affects the acceptance of phenol-rich foods. *Appetite* 56, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.02.017>

- Doherty, S.B., Gee, V.L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Brodkorb, A., 2011. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocoll.* 25, 1604–1617. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.012>
- Engelen, L., Van Der Bilt, A., Schipper, M., Bosman, F., 2005. Oral size perception of particles: effect of ize, type, viscosity and method. *J. Texture Stud.* 36, 373–386. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2005.00022.x>
- Falfán-Cortés, N., Gaytán-Martínez, M., Verdalet-Guzmán, I., Amaya-Llano, S.L., Ferreira-Grosso, C.R., Martínez-Bustos, F., 2014. Evaluation of modified amaranth tarch a shell material for encapsulation of probiotics. *Cereal Chemistry Journal* 91, 300–308.
- Falfán-Cortés, R.N., Gaytán-Martínez, M., Verdalet-Guzmán, I., Amaya-Llano, S.L., Ferreira-Grosso, C.R., Martínez-Bustos, F., 2014. Evaluation of Modified Amaranth Starch as Shell Material for Encapsulation of Probiotics. *Cereal Chem. J.* 91, 300–308. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-06-13-0112-R>
- Francis, F.J., Clydesdate, F.M., 1975. *Food colorimetry: theory and applications*. The AVI Publishing Co., Inc, Westport.
- Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M.J., Sánchez-Zapata, E., Pérez-Álvarez, J.A., 2010. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Res. Int.* 43, 931–942. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.004>
- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J.A., 2011. Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch - Stärke* 63, 406–415. <https://doi.org/10.1002/star.201000099>
- Galus, S., Kadzińska, J., 2019. Gas barrier and wetting properties of whey protein isolate-based emulsion films. *Polym. Eng. Sci.* 59, E375–E383. <https://doi.org/10.1002/pen.24992>
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., Noori, N., 2016. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Sci. Technol.* 69, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.064>
- Gaudreau, H., Champagne, C.P., Remondetto, G.E., Bazinet, L., Subirade, M., 2013. Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. *Food Research International* 53, 751–757.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 40, 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., Desobry, S., Scher, J., Gaiani, C., 2017. *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *J. Food Eng.* 193, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.08.008>

- Hagenimana, A., Ding, X., Fang, T., 2006. Evaluation of rice flour modified by extrusion cooking. *J. Cereal Sci.* 43, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.09.003>
- Haros, C.M., Schoenlechner, R., 2016. *Pseudocereals: Chemistry and Technology*. John Wiley & Sons.
- Hasjim, J., Jane, J., 2009. Production of Resistant Starch by Extrusion Cooking of Acid-Modified Normal-Maize Starch. *J. Food Sci.* 74, C556–C562. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01285.x>
- Higgins, J.A., 2014. Resistant Starch and Energy Balance: Impact on Weight Loss and Maintenance. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 1158–1166. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.629352>
- Hough, G., 2010. *Sensory shelf life estimation of food products*. Tylor and Francis Gourp.
- Htoon, A.K., Uthayakumaran, S., Piyasiri, U., Appelqvist, I.A.M., López-Rubio, A., Gilbert, E., Mulder, R., 2010. The effect of acid dextrinisation on enzyme-resistant starch content in extruded maize starch 120, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.094>
- Hu, J., Webster, D., Cao, J., Shao, A., 2018. The safety of green tea and green tea extracts consumption in adults – Results of a systematic review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.03.019>
- Jafari, M., Koocheki, A., Milani, E., 2017. Effect of extrusion cooking on chemical structure, morphology, crystallinity and thermal properties of sorghum flour extrudates | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.05.005>
- Jan, K.N., Panesar, P.S., Singh, S., 2017. Process standardization for isolation of quinoa starch and its characterization in comparison with other starches. *J. Food Meas. Charact.* 11, 1919–1927. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9574-6>
- Jan, R., Saxena, D.C., Singh, S., 2016. Pasting, thermal, morphological, rheological and structural characteristics of Chenopodium (*Chenopodium album*) starch. *LWT - Food Sci. Technol.* 66, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.040>
- Ji, Y., Seetharaman, K., White, P.J., 2004. Optimizing a Small-Scale Corn-Starch Extraction Method for Use in the Laboratory. *Cereal Chem. J.* 81, 55–58. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.1.55>
- Jiménez-Zamora, A., Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A., 2016. Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chem.* 199, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.019>
- Kandyli, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A.A., 2016. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>
- Kayshap, P.C., Quigley, E.M., 2018. Therapeutic implications of the gastrointestinal microbiome. *Curr. Opin. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.01.004>

- Keshani, S., Daud, W.R.W., Nourouzi, M.M., Namvar, F., Ghasemi, M., 2015. Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. *Journal of Food Engineering* 146, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.004>
- Kim, Y., Welt, B.A., Talcott, S.T., 2011. The Impact of Packaging Materials on the Antioxidant Phytochemical Stability of Aqueous Infusions of Green Tea (*Camellia sinensis*) and Yaupon Holly (*Ilex vomitoria*) during Cold Storage. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4676–4683. <https://doi.org/10.1021/jf104799y>
- Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., Couillard, C., Britten, M., 2014. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food Funct* 5, 2621–2631. <https://doi.org/10.1039/C4FO00203B>
- Lazar, M., Brown, A., Smith, G., Wong, F., Linnquist, F., 1956. Experimental production of tomato powder by spray drying 11, 129–134.
- Lazo-Vélez, M.A., Guajardo-Flores, D., Mata-Ramírez, D., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldivar, S.O., 2016. Characterization and Quantitation of Triterpenoid Saponins in Raw and Sprouted *Chenopodium berlandieri* spp. (Huauzontle) Grains Subjected to Germination with or without Selenium Stress Conditions: *Chenopodium berlandieri* spp. saponins profile.... *J. Food Sci.* 81, C19–C26. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13174>
- Lee, J., Chambers, D., Chambers, E., Adhikari, K., Yoon, Y., 2013. Volatile Aroma Compounds in Various Brewed Green Teas. *Molecules* 18, 10024–10041. <https://doi.org/10.3390/molecules180810024>
- Lindeboom, N., Chang, P., Falk, K., Tyler, R., 2005. Characteristics of starch from eight quinoa lines. *Cereal Chem* 82, 216–222.
- Liu, H., Cui, S.W., Chen, M., Li, Y., Liang, R., Xu, F., Zhong, F., 2017a. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1377684>
- Liu, H., Cui, S.W., Chen, M., Li, Y., Liang, R., Xu, F., Zhong, F., 2017b. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1377684>
- López de Lacey, A.M., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M.E., Montero, P., 2014. Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. *LWT - Food Sci. Technol.* 55, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.021>
- Luo, X., Arcot, J., Gill, T., Louie, J.C.Y., Rangan, A., 2019. A review of food reformulation of baked products to reduce added sugar intake. *Trends Food Sci. Technol.* 86, 412–425. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.051>
- Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C., 1998. Antioxidant Properties of Tea Extracts as Affected by Processing. *LWT - Food Sci. Technol.* 31, 694–698. <https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0491>

- Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., Morales, M.E., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
- Moayyedi, M., Eskandari, M.H., Rad, A.H.E., Ziaee, E., Khodaparast, M.H.H., Golmakani, M.-T., 2018. Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *J. Funct. Foods* 40, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.016>
- Mortazavian, A., Hadi, R.S., Ehsani, M.R., Sohrabvandi, S., 2007. Principles and methods of encapsulation of probiotic microorganism 5, 1–18.
- Munoz-Munoz, J.L., García-Molina, F., Molina-Alarcón, M., Tudela, J., García-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N., 2008. Kinetic Characterization of the Enzymatic and Chemical Oxidation of the Catechins in Green Tea. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9215–9224. <https://doi.org/10.1021/jf8012162>
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C., Martínez-Bustos, F., 2009. Preparation of starch derivates using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J Food Eng* 91, 380–386.
- Nekvapil, T., Kopriva, V., Boudny, V., Hostovsky, M., Dvorak, P., Malota, L., 2012. Decrease in the Antioxidant Capacity in Beverages Containing Tea Extracts during Storage. *Sci. World J.* 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1100/2012/361698>
- Nozaki, A., Hori, M., Kimura, T., Ito, H., Hatano, T., 2009. Interaction of Polyphenols with Proteins: Binding of (-)-Epigallocatechin Gallate to Serum Albumin, Estimated by Induced Circular Dichroism. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 57, 224–228. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.224>
- Öztürk, S., Mutlu, S., 2019. Physicochemical Properties, Modifications, and Applications of Resistant Starches. *Starches for Food Application*.
- Park, J.-M., Na, K.-S., 2015. Effect of RTD Tea Drinks Selection Attributes on the Purchase Satisfaction and Repurchase Intention: Evidence in Korea. *Indian J. Sci. Technol.* 8, 242. <https://doi.org/10.17485/ijst/2015/v8iS8/71499>
- Patindol, J., Wang, Y.-J., Jane, J., 2005. Structure-Functionality Changes in Starch Following Rough Rice Storage. *Starch - Stärke* 57, 197–207. <https://doi.org/10.1002/star.200400367>
- Paucar-Menacho, L., Dueñas, M., Peñas, E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., 2018. Effect of Dry Heat Puffing on Nutritional Composition, Fatty Acid, Amino Acid and Phenolic Profiles of Pseudocereals Grains. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 68, 289–297. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2018-0005>
- Pimentel, T.C., Madrona, G.S., Garcia, S., Prudencio, S.H., 2015. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.009>



- Pirarat, N., Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Ooi, E.L., Katagiri, T., Maita, M., 2015. Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against *Streptococcus agalactiae*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 207, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.002>
- Poonia, A., Upadhayay, A., 2015. *Chenopodium album* Linn: review of nutritive value and biological properties. *J. Food Sci. Technol.* 52, 3977–3985. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1553-x>
- Porrás-Saavedra, J., Palacios-González, E., Lartundo-Rojas, L., Garibay-Febles, V., Yáñez-Fernández, J., Hernández-Sánchez, H., Gutiérrez-López, G., Alamilla-Beltrán, L., 2015. Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. *J. Food Eng.* 152, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.014>
- Prado, F.C., Parada, J.L., Inaba, J., Pandey, A., Soccol, C.R., 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res Int* 41, 111–123.
- Qian, J., Kuhn, M., 1999. Characterization of *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* Starch. *Starch* 51, 116–120.
- Rajam, R., Anandharamakrishnan, C., 2015. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>
- Reguera, M., Conesa, C.M., Gil-Gómez, A., Haros, C.M., Pérez-Casas, M.Á., Briones-Labarca, V., Bolaños, L., Bonilla, I., Álvarez, R., Pinto, K., Mujica, Á., Bascuñán-Godoy, L., 2018. The impact of different agroecological conditions on the nutritional composition of quinoa seeds. *PeerJ* 6, e4442. <https://doi.org/10.7717/peerj.4442>
- SAGARPA, 2013. Secretaría de Agricultura, Gandería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [WWW Document].
- Sharma, S., Singh, N., Singh, B., 2015. Effect of extrusion on morphology, structural, functional properties and in vitro digestibility of corn, field pea and kidney bean starches. *Starch - Stärke* 67, 721–728. <https://doi.org/10.1002/star.201500021>
- Shpigelman, A., Cohen, Y., Livney, Y.D., 2012. Thermally-induced  $\beta$ -lactoglobulin-EGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study. *Food Hydrocoll.* 29, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.016>
- Shrestha, A., Howes, T., Adhikari, B., Wood, B., Bhandari, B., 2007. Effect of protein concentration on the surface composition, water sorption and glass transition temperature of spray-dried skim milk powders. *Food Chem.* 104, 1436–1444. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.015>
- Silva, E., Fialho, E., Lopes, M., Valente-Mesquita, V., 2005. Sucos de laranja industrializados e preparados sólidos para refrescos: estabilidade química e físico-química. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 25, 597–602.

- Singh, J., Kaur, L., McCarthy, O.J., 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocoll.* 21, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.02.006>
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh, S., Singh, B., 2003. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry* 81, 219–231. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00416-8)
- Singhal, K., Raj, N., Gupta, K., Singh, S., 2017. Probable benefits of green tea with genetic implications. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* 21, 107–114. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.203758>
- Šipailienė, A., Petraitytė, S., 2018. Encapsulation of Probiotics: Proper Selection of the Probiotic Strain and the Influence of Encapsulation Technology and Materials on the Viability of Encapsulated Microorganisms. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9347-x>
- Sohail, A., Turner, M.S., Coombes, A., Bhandari, B., 2013. The Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM Following Double Encapsulation in Alginate and Maltodextrin. *Food Bioprocess Technol.* 6, 2763–2769. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0938-y>
- Soukoulis, C., Bohn, T., 2018. A comprehensive overview on the micro- and nano-technological encapsulation advances for enhancing the chemical stability and bioavailability of carotenoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 1–36. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.971353>
- Stojadinovic, M., Radosavljevic, J., Ognjenovic, J., Vesic, J., Prodic, I., Stanic-Vucinic, D., Cirkovic Velickovic, T., 2013. Binding affinity between dietary polyphenols and  $\beta$ -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food Chem.* 136, 1263–1271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.040>
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K., 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology* 58, 36–39.
- Tewari, S., Dubey, K.K., Singhal, R.S., 2018. Evaluation and application of prebiotic and probiotic ingredients for development of ready to drink tea beverage. *J. Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3070-9>
- Tripathi, M.K., Giri, S.K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods* 9, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Ünal, G., Karagözlü, C., Kınık, Ö., Akan, E., Akalın, A.S., 2018. Effect of Supplementation with Green and Black Tea on Microbiological Characteristics, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Drinking Yoghurt. *Tarım Bilim. Derg.* 153–161. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.446430>
- Urías-Orona, V., Niño-Medina, G., 2019. Changes in phenolics and antioxidant capacity during short storage of ready-to-drink green tea (*Camellia sinensis*) beverage at commercial conditions. *Bragantia* 78, 141–145. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2018027>

- Vanier, N.L., Vamadevan, V., Bruni, G.P., Ferreira, C.D., Pinto, V.Z., Seetharaman, K., Zavareze, E. da R., Elias, M.C., Berrios, J.D.J., 2016. Extrusion of Rice, Bean and Corn Starches: Extrudate Structure and Molecular Changes in Amylose and Amylopectin: Extrusion of isolated starches.... J. Food Sci. 81, E2932–E2938. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13545>
- Vesterlund, S., Salminen, K., Salminen, S., 2012. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. Int. J. Food Microbiol. 157, 319–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.016>
- Vijaya-Kumar, B., Vijayendra, S.V.N., Reddy, O.V.S., 2015. Trends in dairy and non-dairy probiotic products: a review. J Food Sci Technol 52, 6112–6124.
- Villareal, M.E., Ribotta, P.D., Iturriaga, L.B., 2013. Comparing methods for extracting amaranthus starch and the properties of the isolated starches | Elsevier Enhanced Reader 51, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.009>
- Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M., Popa, V., 2014. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. Chem. Pap. 68. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0417-6>
- von Staszewski, M., Jara, F.L., Ruiz, A.L.T.G., Jagus, R.J., Carvalho, J.E., Pilosof, A.M.R., 2012. Nanocomplex formation between  $\beta$ -lactoglobulin or caseinomacropeptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. J. Funct. Foods 4, 800–809. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.008>
- von Staszewski, M., Pilosof, A.M.R., Jagus, R.J., 2011. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. Food Chem. 125, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.059>
- Wang, L.-F., Kim, D.-M., Lee, C.Y., 2000. Effects of Heat Processing and Storage on Flavanols and Sensory Qualities of Green Tea Beverage. J. Agric. Food Chem. 48, 4227–4232. <https://doi.org/10.1021/jf0003597>
- Wang, L.-F., Park, S.-C., Chung, J.-O., Baik, J.-H., Park, S.-K., 2004. The Compounds Contributing to the Greenness of Green Tea. J. Food Sci. 69, S301–S305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09894.x>
- Wang, L.Z., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J.F., Kerry, J.P., 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. Int. J. Food Sci. Technol. 42, 1128–1138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01440.x>
- World Gastroenterology Organization, 2017. Probioóticos y prebióticos (Guía mundial de la WGO).
- Xie, Y., Zhou, H., Liang, X., He, B., Han, X., 2010. Study on the Morphology, Particle Size and Thermal Properties of Vitamin A Microencapsulated by Starch Octenylsuccinate. Agric. Sci. China 9, 1058–1064. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60190-5](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60190-5)

- Xing, L., Zhang, H., Qi, R., Tsao, R., Mine, Y., 2019. Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 67, 1029–1043. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06146>
- Ye, J., Hu, X., Luo, S., Liu, W., Chen, J., Zeng, Z., Liu, C., 2018. Properties of Starch after Extrusion: A Review. *Starch* 70, 1–8. <https://doi.org/10.1002/star.201700110>
- Ying, D., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., Augustin, M.A., 2013. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *J. Funct. Foods* 5, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.009>
- Ying, D.Y., Phoon, M.C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I., Augustin, M.A., 2010. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *J. Food Sci.* 75, E588–E595. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x>
- Yoo, S., Krochta, J.M., 2012. Starch-methylcellulose-whey protein film properties: Starch-methylcellulose-whey protein film properties. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 255–261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02833.x>
- Zeng, J., Xu, H., Cai, Y., Xuan, Y., Liu, J., Gao, Y., Luan, Q., 2018. The Effect of Ultrasound, Oxygen and Sunlight on the Stability of (–)-Epigallocatechin Gallate 23, 1–13.
- Zhang, Y., Liu, W., Liu, C., Luo, S., Li, T., Liu, Y., Wu, D., Zuo, Y., 2014. Retrogradation behaviour of high-amylose rice starch prepared by improved extrusion cooking technology. *Food Chem.* 158, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.072>
- Zhao, B., Sun, S., Lin, H., Chen, L., Qin, S., Wu, W., Zheng, B., Guo, Z., 2019. Physicochemical properties and digestion of the lotus seed starch-green tea polyphenol complex under ultrasound-microwave synergistic interaction. *Ultrason. Sonochem.* 52, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.001>
- Zhou, P., Labuza, T.P., 2007. Effect of Water Content on Glass Transition and Protein Aggregation of Whey Protein Powders During Short-Term Storage. *Food Biophys.* 2, 108–116. <https://doi.org/10.1007/s11483-007-9037-4>
- Zhu, F., 2015. Interactions between starch and phenolic compound. *Trends Food Sci. Technol.* 43, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.02.003>
- Zorilla, R., Liang, L., Remondetto, G., Subirade, M., 2011. Interaction of epigallocatechin-3-gallate with  $\beta$ -lactoglobulin: molecular characterization and biological implication. *Dairy Sci. Technol.* 91, 629–644. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0036-3>