



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE  
YOGURT TIPO GRIEGO ADICIONADO CON PROBIÓTICOS  
MICROENCAPSULADOS”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARÍA ISABEL VÁZQUEZ AGUILAR**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. BENERANDA MURÚA PAGOLA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2019.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE  
YOGURT TIPO GRIEGO ADICIONADO CON PROBIOTICOS  
MICROENCAPSULADOS”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARÍA ISABEL VÁZQUEZ AGUILAR**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. BENERANDA MURÚA PAGOLA**

**SINODALES**

**Dra. BENERANDA MURÚA PAGOLA**  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

**Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dra. LUCÍA GUADALUPE ABADÍA GARCÍA**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dra. MARGARITA CONTRERAS PADILLA**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
INDICE DE CUADROS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
1. ANTECEDENTES .....	1
1.1 Alimentos funcionales.....	1
1.2 Probióticos.....	4
1.2.1 Los probióticos y el yogurt .....	9
1.2.2. <i>Lactobacillus casei</i> .....	9
1.3 Microencapsulación.....	11
1.4 Microencapsulación de Probióticos .....	12
1.4.1 Técnicas de microencapsulación de probióticos.....	14
1.4.2 Materiales encapsulantes para microencapsulación de probióticos..	17
1.4.3 Aislado de proteína de suero como material encapsulante de probióticos mediante secado por aspersión .....	17
1.5 Yogurt.....	18
1.5.1 Bacterias ácido lácticas en yogurt.....	19
1.5.2 <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	20
1.5.3 <i>Lactobacilus bulgaricus</i> .....	20
1.5.4 Fermentación del yogurt.....	20
1.5.5 Coagulación ácida.....	21
1.6 Yogurt estilo griego.....	22

1.6.1	Procesos de manufactura de yogurt estilo griego .....	23
1.6.2	Parámetros de calidad de yogurt estilo griego .....	24
1.6.3	Propiedades reológicas del yogurt .....	24
1.7	Yogurt estilo griego con probióticos.....	26
2.	HIPÓTESIS .....	28
3.	OBJETIVOS .....	29
3.1	General.....	29
3.2	Específicos .....	29
4.	METODOLOGÍA.....	30
4.1	Materiales .....	30
4.2	Activación y conteo de células probióticas .....	30
4.3	Preparación de la cepa para el proceso de microencapsulación.....	30
4.4	Microencapsulación de células probióticas.....	31
4.5	Sobrevivencia durante proceso de microencapsulación.....	31
4.6	Formulación de yogurt griego .....	32
4.7	Análisis Bromatológicos.....	33
4.8	Acidez titulable .....	33
4.9	Sinéresis.....	33
4.10	Evaluación de la sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 en muestras de yogurt estilo griego almacenadas a 4°C. ....	34
4.11	Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. ....	34
4.12	Viscosidad aparente .....	35
4.13	Firmeza y adhesividad.....	35
4.14	Reología .....	36
4.15	Análisis de los datos experimentales.....	36

5. RESULTADOS.....	37
5.1 Análisis Bromatológicos.....	37
5.2 Secado por aspersion.....	37
5.4 Sinéresis.....	39
5.4 Evaluación de la sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 en muestras de yogurt estilo griego almacenadas a 4°C. ....	40
5.6 Tolerancia a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.....	41
5.7 Viscosidad aparente .....	43
5.8 Textura .....	45
5.9 Reología .....	47
6. DISCUSIÓN .....	49
6.1 Análisis Bromatológicos.....	49
6.2 Secado por aspersion.....	50
6.3 pH y acidez titulable .....	51
6.4 Sinéresis.....	52
6.5 Evaluación de la sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 en muestras de yogurt estilo griego almacenadas a 4°C. ....	53
6.6 Tolerancia a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.....	55
6.7 Viscosidad aparente .....	56
6.8 Textura .....	57
6.9 Reología .....	58
7. CONCLUSIONES.....	60
8. REFERENCIAS.....	62

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Categorías de Alimentos Funcionales .....	2
2. Ejemplos de microorganismos probióticos y sus efectos reportados.....	6
3. Clasificación del yogurt en función a sus diferentes características .....	19
4. Formulación del yogurt estilo griego .....	32
5. Análisis bromatológico del yogurt formulado. ....	37
6. Efecto del almacenamiento en el pH y la acidez de las muestras de yogurt .	39
7. Viabilidad de las bacterias durante el tiempo de almacenamiento. ....	41
8. Viabilidad de las bacterias durante la prueba de simulación del tracto gastrointestinal después de 3 semanas de almacenamiento .....	42
9. Efecto del almacenamiento en la firmeza y adhesividad de los yogures (sin probióticos y con probióticos libres y microencapsulados).....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Lactobacillus casei</i> .....	10
2. Morfología de diferentes tipos de microcápsulas .....	12
3. Esquema de funcionamiento de un secador por aspersión de laboratorio. ....	16
4. Reacciones de cooperación de las bacterias del yogurt .....	21
5. Viabilidad de <i>L. casei</i> ATCC 334 durante su exposición al secado por aspersión.....	38
6. Efecto del almacenamiento en la sinéresis de las muestras de yogurt con diferentes semanas de almacenamiento.....	40
7. Viabilidad de <i>L. Casei</i> ATCC 334 encapsulado y sin encapsular en yogurt almacenado a 4°C durante 3 semanas. ....	41
8. Viabilidad de <i>L. casei</i> ATCC 334 encapsulado y sin encapsular en yogurt durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal....	43
9. Viscosidad aparente vs tasa de corte (Shear Rate) de las diferentes muestras de yogurt almacenado 24 h a 4°C.....	44
10. Viscosidad aparente vs velocidad de corte (Shear Rate) de las diferentes muestras de yogurt almacenado 2 semanas a 4°C.....	45
11. Firmeza de los diferentes yogures, con diferentes tiempos de almacenamiento.....	46
12. Barrido de deformación de las muestras de yogurt a las 24 h de su preparación. ....	47
13. Barrido de frecuencia para las muestras de yogurt a las 24 h de su preparación. ....	48
14. Barrido de deformación para las muestras de yogurt a las 2 semanas de almacenamiento.....	48
15. Barrido de frecuencia para las muestras de yogurt a las 2 semanas de almacenamiento.....	49

## RESUMEN

El estrés, los malos hábitos alimentarios y el abuso de antibióticos son sólo algunos de los factores que pueden afectar negativamente el equilibrio necesario de nuestra flora intestinal. La ingestión de probióticos en nuestra dieta diaria, ayuda a mantener una flora intestinal balanceada y saludable disminuyendo la susceptibilidad de sufrir infecciones de estómago y del intestino. El desarrollo de "alimentos funcionales" constituye una gran oportunidad a contribuir a la calidad de la dieta y la selección de alimentos que puede afectar positivamente a la salud y bienestar del individuo. De los alimentos funcionales que se comercializan en México, los probióticos son los que tienen mayor mercado. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la incorporación de microorganismos probióticos (*L. casei* ATCC 334) microencapsulados mediante secado por aspersión en la manufactura y calidad de un yogurt estilo griego, evaluar la sobrevivencia del microorganismo a lo largo de su almacenamiento en yogurt en su forma encapsulada y su forma libre durante 28 días a 4°C y en condiciones gastrointestinales simuladas (TGI) después del período de almacenamiento, así como sus propiedades reológicas. Se utilizó una matriz de aislado de proteína de suero (APS) como agente encapsulante. La viabilidad de *L. casei* ATCC 334 fue determinada en agar MRS adicionado con vancomicina (MRS-V). Para el estudio se evaluaron 3 tratamientos: yogurt control, yogurt con probióticos libres y yogurt con los probióticos microencapsulados. Las bacterias mostraron una sobrevivencia al proceso de secado mayor a 94%. Al término del almacenamiento, ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas entre la cantidad inicial y final de células viables de *L. casei*. No se observaron diferencias significativas en ambos tratamientos al exponerse durante 2 horas a jugo gástrico artificial (pH 2); al ser expuestas a condiciones intestinales simuladas (pH 8), se evidenció una disminución de la viabilidad de células de *L. casei* en células libres registrándose una diferencia significativa con respecto a las células encapsuladas. Las evaluaciones de viscosidad, textura y propiedades reológicas en las 3 muestras de yogurt a las 24 horas y a las 2 semanas de almacenamiento a 4°C mostraron un incremento en estos parámetros durante el tiempo de monitoreo. El porcentaje de sinéresis fue menor en el tratamiento de células microencapsuladas (similar al control). Se obtuvo un producto funcional con buenas características de textura y viscosidad. El proceso de microencapsulación tuvo un efecto protector en el probiótico durante el almacenamiento y exposición a condiciones simuladas del TGI.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Alimentos funcionales

Actualmente, existe una tendencia mundial hacia una alimentación más saludable por lo que los consumidores demandan cada vez más productos naturales y funcionales. Este tipo de alimento es el que proporciona beneficios para la salud más allá de la nutrición básica y, además, es capaz de mejorar una o varias funciones en el organismo. Esa funcionalidad se consigue mediante diferentes estrategias: maximizar la presencia de un compuesto funcional en el propio alimento, la incorporación externa de un componente bioactivo, el incremento de la biodisponibilidad del compuesto de interés, entre otros (Cámpora, 2016).

La incorporación de bacterias de origen intestinal en la dieta humana corresponde a los efectos benéficos que estas bacterias confieren al metabolismo intestinal, lo cual ha dado lugar a la aparición de una nueva generación de alimentos funcionales (Champagne et al., 2005).

Los alimentos funcionales pueden ser definidos como alimentos modificados o ingredientes alimentarios que puedan proveer beneficios a la salud, superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales, cuyo efecto puede ayudar en el mantenimiento del estado de salud como en la reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad (Ramírez et al., 2006). Pueden ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido, eliminado o modificado un componente por medios biotecnológicos, un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes o una combinación de cualquiera de estas posibilidades.

Actualmente la Asociación Americana Dietética (ADA) ha categorizado a los alimentos funcionales como se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Categorías de Alimentos Funcionales (ADA, 2009).

Alimentos convencionales	Alimentos no modificados
Alimentos modificados	Alimentos fortificados, enriquecidos o mejorados
Alimentos medicinales	Alimentos formulados para ser consumidos o administrados bajo supervisión médica
Alimentos para usos dietéticos especiales	Alimentos infantiles, hipoalergénicos y alimentos que se ofrecen para descenso de peso

Ciertos alimentos presentan una gran diversidad de funciones especiales. Algunas de estas funciones pueden dar origen a la reducción del riesgo o a la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades (a estos componentes también se les conoce como nutraceuticos), a la mejoría de algunas funciones corporales y a su utilización como suplementos para dietas especiales (Silva, 2003).

Para adaptarse a las regulaciones de los diferentes países, se han propuesto diferentes criterios y métodos que permitan demostrar la existencia de una relación entre el consumo de estos alimentos y la disminución de los riesgos de enfermedades crónicas, o bien que favorezcan la salud física y mental de los individuos. Este avance metodológico ha facilitado el desarrollo de una Ciencia de los Alimentos Funcionales, que se preocupa por resolver interrogantes como las que a continuación se detallan:

- a) Identificar interacciones beneficiosas entre el alimento y uno o más funciones fisiológicas y obtener evidencias acerca del mecanismo de estas interacciones.
- b) Identificar y validar marcadores relevantes a las funciones y su modulación por los componentes del alimento.

- c) Formular hipótesis a ser ensayadas en estudios clínicos controlados en humanos.
- d) Desarrollar metodologías de evaluación, utilizando técnicas que sean mínimamente invasivas y, en consecuencia, aplicables a poblaciones,
- e) Garantizar la inocuidad de su consumo.

(Araya, 2003).

En México, aunque el término de alimentos funcionales se utiliza familiarmente entre la comunidad científica, a la fecha no hay leyes que reglamenten específicamente el uso de estos alimentos (Alvidrez-Morales, 2002).

En los últimos años los alimentos funcionales han tenido una creciente demanda. Existe una conciencia creciente entre los consumidores de la importancia de la dieta en el estado de salud, lo que se ve acentuado por el envejecimiento de la población y el incremento de la expectativa de vida. El desarrollo de "alimentos funcionales" constituye una gran oportunidad de contribuir a la calidad de la dieta y la selección de alimentos que pueden afectar positivamente a la salud y bienestar del individuo. (Ramírez et al., 2006). Los alimentos funcionales pueden ser alimentos naturales, alimentos a los que se les ha adicionado, removido o modificado algún componente o a los que se les ha modificado la biodisponibilidad de alguno de ellos (Ilianes, 2015). Entre éstos, se encuentran los alimentos funcionales adicionados de probióticos o prebióticos, o de ambos, llamados simbióticos (Champagne et al., 2005).

La aceptación de estos alimentos se relaciona con diversos factores: gusto, calidad, precio, comodidad, fiabilidad de las declaraciones en etiqueta, familiaridad con el producto, naturaleza de la compañía oferente, forma de comunicar los efectos en la salud y de los conocimientos y conciencia que se tengan sobre los mismos, reflejando la importancia y necesidad de comunicar e informar a los consumidores con mensajes sencillos, claros y de fácil comprensión (Millone, 2011).

## 1.2 Probióticos

Las bacterias probióticas, definidas como "microorganismos vivos, que en ciertos casos ejercen beneficios de salud más allá de la nutrición básica inherente", se han convertido en un tema importante de la investigación de bacterias ácido lácticas en los últimos 20 años (Maragkoudakis et al., 2006).

La FAO (Organización de Alimentos y Agronomía de las Naciones Unidas) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) recomiendan la descripción de probióticos como "microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada, confieren beneficios en la salud del huésped" (Ross et al., 2005).

Éstos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidas como bioterapéuticos o bioprotectores y se utilizan para prevenir las infecciones gastrointestinales (Ramírez et al., 2006).

Los criterios que debe cumplir un microorganismo para considerarse probiótico incluyen que la cepa sea de origen humano, segura para su uso y estable en ambiente ácido y en presencia de sales biliares. Además, deben llegar viables y establecerse en el colon, adhiriéndose al epitelio intestinal para sobreponerse a las condiciones de estrés (Baeza, 2008).

La eficiencia de las bacterias probióticas depende de la cantidad y de la viabilidad que estos microorganismos mantengan durante el almacenamiento, vida de anaquel del producto al que se adicionan y su sobrevivencia en el tracto intestinal. (Kailasapathy y Chin, 2000). Se ha sugerido que los alimentos probióticos deben contener al menos  $10^6$  microorganismos vivos por g o mL de producto al momento del consumo para producir beneficios terapéuticos (Shah, 2000).

Durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, las bacterias probióticas son expuestas a diferentes factores como estrés oxidativo, cambios de acidez y temperatura entre otros que comprometen su viabilidad. La viabilidad de los probióticos disminuye rápidamente en productos lácteos fermentados

almacenados a temperaturas superiores a la de refrigeración. Además, durante su paso por el tracto gastrointestinal, los probióticos son adversamente afectados por la acción de enzimas como pepsina y bajos valores de pH en el estómago, así como al antagonismo asociado con la actividad antimicrobiana de las sales biliares y enzimas proteolíticas predominantes en el intestino (Tripathi y Giri, 2014; El-Salam y El-Shibiny, 2015).

Dado que la adición de bacterias vivas tiene algunos problemas tecnológicos y podrían aparecer efectos secundarios, se ha recurrido a sustancias que están de manera natural en los alimentos o que pueden añadirse a éstos y que favorecen la presencia y las acciones de los microorganismos probióticos, como los prebióticos, los cuales son componentes no digeribles de un alimento que al ingerirse promueven el crecimiento y establecimiento de microorganismos beneficiosos de la flora intestinal. La mezcla de ambos, probióticos y prebióticos, es denominada “simbiótico”. Esta mezcla simbiótica mejora la supervivencia e implantación de los microorganismos suplementados con la dieta. La presencia en un solo alimento de pro y prebióticos constituye los simbióticos (Ferrer Lorente, 2001).

Para que un ingrediente alimenticio pueda ser clasificado como prebiótico debe cumplir los siguientes requisitos: no debe ser hidrolizado u absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal; debe ser un sustrato selectivo tanto para una o varias bacterias comensales benéficas al colon, que son estimuladas en su crecimiento y metabólicamente activas; deben ser capaces de alterar la flora en favor de una composición más saludable (Baeza, 2008).

Entre los posibles candidatos se encuentran, los carbohidratos no digeribles (oligo y polisacáridos), algunos péptidos y proteínas, ciertos lípidos (tanto ésteres como éteres). Debido a su estructura química, dichos compuestos no logran ser absorbidos por la parte superior del tracto gastrointestinal, ni hidrolizados por enzimas humanas. Tales ingredientes pueden ser llamados “alimentos colónicos”, entre los cuales los carbohidratos no digeribles se encuentran de manera natural. Entre estos últimos destacan: el almidón resistente, los polisacáridos vegetales,

hemicelulosas, pectinas, gomas, así como los oligosacáridos no digeribles. Los probióticos ejercen acciones diversas sobre la salud mediante distintos mecanismos de acción. Actúan acidificando la luz intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, consumiendo nutrientes específicos o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales de forma que mantienen la flora intestinal y evitan la acción de microorganismos patógenos (Baeza, 2008).

Cuadro 2. Ejemplos de microorganismos probióticos y sus efectos reportados (Silva, 2003).

Especie	Efectos Reportados	Otra información
<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimulación del sistema inmunológico</li> <li>-Balance de la flora intestinal</li> <li>-Reducción de enzimas fecales</li> <li>-Antitumoral</li> <li>-Reducción del colesterol serológico</li> <li>-Coadyuvante de vacunas</li> <li>-Prevención de constipación</li> <li>-Prevención de la iniciación del cáncer</li> </ul>	<p>Actualmente usados en productos probióticos (Nestlé, Suiza, por ejemplo). Los efectos pueden variar dependiendo en la especie.</p>
<i>L. brevis</i>	Balance de la flora intestinal	Actualmente usado en productos probióticos
<i>L. casei</i> subespecie <i>rhamnosus</i>	•Estimulación del sistema inmunológico	Actualmente usado en productos

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balance de la flora intestinal</li> <li>• Reducción de enzimas fecales</li> <li>• Antitumoral</li> <li>• Prevención de la diarrea del rotavirus</li> </ul>	probióticos Algunos autores se refieren a este microorganismo como <i>L. casei</i> o <i>L. rhamnosus</i> .
<i>L. delbreuckii subespecie Bulgaricus</i>	Estimulación del sistema inmunológico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de enzimas fecales</li> <li>• Antitumoral</li> <li>• Prevención de la "diarrea del viajero"</li> </ul>	Actualmente usado en productos probióticos. (Meiji Milk Products, Japón, por ejemplo) Algunos autores se refieren a este microorganismo solo como <i>L. delbreuckii</i> o <i>L. bulgaricus</i>
<i>L. gasseri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de las enzimas fecales</li> <li>• Antitumoral</li> <li>• Reducción de colesterol</li> </ul>	Subespecie ADH
<i>L. helveticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balance de la flora intestinal</li> <li>• Mejoramiento de sistema inmunológico</li> <li>• Tratamiento de la gastritis</li> <li>• Mejora la patogenicidad</li> </ul>	Actualmente usados en productos probióticos (Nestle, Suiza, por ejemplo)

	contra <i>E. Coli</i>	
--	-----------------------	--

Se ha reportado que los probióticos tienen propiedades inmunomoduladoras: modifican la respuesta a antígenos, producen enzimas hidrolíticas y disminuyen la inflamación intestinal. Mediante la supresión del crecimiento de bacterias que convierten los procarcinógenos en carcinógenos, el consumo de enzimas procarcinogénicas o a través de la producción de sustancias inhibidoras de dichas enzimas, es posible disminuir el desarrollo de determinados tumores (Ferrer Lorente, 2001).

Los probióticos aumentan la actividad de las hidrolasas de las sales biliares que se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, por lo que tienen un efecto hipocolesterolémico. Mediante la producción de triglicéridos de cadena corta inhiben la síntesis de colesterol, lo redistribuyen desde el plasma al hígado y, por de conjugación de las sales biliares, el colesterol no se reabsorbe y es utilizado para la síntesis *de novo* de ácidos biliares (Ferrer Lorente, 2001).

Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos: a) alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos y que se consumen, principalmente, con fines nutritivos (yogur, leche, queso, etc.), b) leches cultivadas y fermentadas, utilizadas, básicamente, como vehículos de bacterias probióticas (leche acidófila, etc.), y c) los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas.

La propia definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos que lo integran durante todo el periodo de vida útil del producto, ya que esto condicionará su efectividad; si bien ciertas propiedades inmunológicas también se han atribuido a bacterias no viables (Sanz, 2003).

Varios factores influyen la viabilidad de las bacterias probióticas ácido lácticas en los productos lácteos. Estos factores incluyen las cepas usadas, las interacciones entre especie, el pH, la temperatura y condición de almacenamiento y la presencia de inhibidores microbianos en la matriz del alimento. También la

composición química del medio de la fermentación para el crecimiento, disponibilidad de nutrientes y promotores del crecimiento, contenido en oxígeno, las condiciones de cultivo, acidez final, etc. Otros factores que pueden afectar la viabilidad de los microorganismos son tratamientos térmicos, homogeneización y envasado (Vergara, 2007).

### 1.2.1 Los probióticos y el yogurt

El yogurt y productos relacionados han sido utilizados como el vehículo más popular para la incorporación de organismos probióticos (Sultana et al., 2000). En los productos lácteos, principalmente yogures, se pueden encontrar productos probióticos pero las dosis suelen ser bajas (Ramírez et al., 2006). El problema que se presenta al incorporar probióticos a cualquier formulación es la escasa resistencia de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura (Villena et al., 2009).

Muchos estudios han mostrado una pobre viabilidad de probióticos en yogurt y leches fermentadas. Se han llevado a cabo varias acciones para mejorar la tasa de sobrevivencia de microorganismos probióticos durante el almacenamiento de los cultivos iniciadores deshidratados y en alimentos, tales como la adición de promotores del crecimiento, manipulación de las condiciones de fermentación y almacenamiento de los productos probióticos, así como la selección cuidadosa de cultivos interrelacionados y resistentes al ácido y sales biliares (Shah et al., 2000).

### 1.2.2. *Lactobacillus casei*

Entre los lactobacillus, las especies de *L. acidophilus* y *L. casei* son usados frecuentemente como probióticos, éstos son considerados microorganismos autóctonos y asociados con el anfitrión humano. *Lactobacillus casei* es un tipo de bacteria probiótica muy eficaz para equilibrar la microflora intestinal, prevenir los

trastornos intestinales, regular el sistema inmune específicamente de la respuesta inmune celular y además posee una potente acción antidiarreica. Industrialmente, *L. casei* tiene aplicaciones como probiótico en humanos, como cultivo iniciador ácido-productor para fermentaciones de leche y especialmente como cultivos para la intensificación y aceleración de desarrollo de sabores en ciertas variedades de quesos madurados con bacterias (Velásquez et al., 2015).

Son bacilos cortos y corineformes, heterofermentativos facultativos, aún se observa crecimiento a 15°C, pero su desarrollo es variable a 45°C. Su tamaño es variable por su tendencia pleomórfica, pero generalmente gira alrededor de 2 micrones. Se hallan en el intestino del hombre y también en los cultivos naturales para la producción de quesos. Se emplean como microorganismos probióticos (Vergara, 2007).

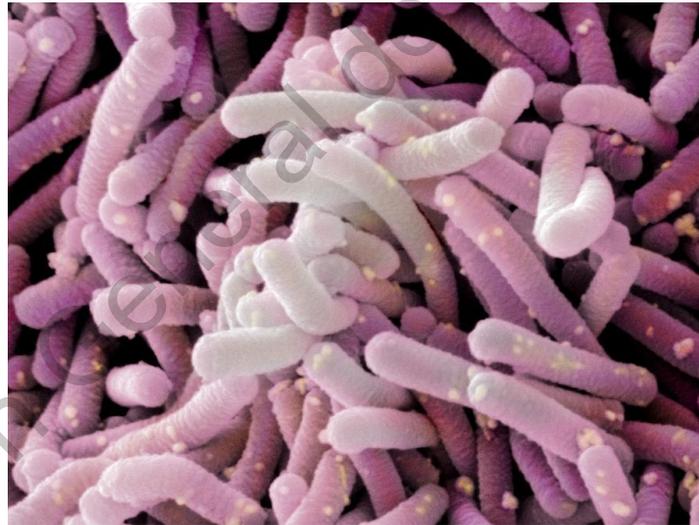


Figura 1. *Lactobacillus casei* (Fuente: Fine Art America)

Una de sus especies llamada *Lactobacillus casei* sp. *shirota* es una bacteria probiótica ampliamente comercializada a nivel mundial en lácteos fermentados y en diferentes productos de BAL. Es utilizada específicamente para reducir o eliminar la levadura *Candida albicans* del intestino humano, pero por su altísima

resistencia a sobrevivir las enzimas y ácidos gástricos, también ejerce su efecto protector contra otros patógenos (Dalel y Zambrano, 2002).

Según estudios realizados en vivo, *L. casei* es resistente al ácido de la bilis por su viabilidad en una gama de pH de 3.0 a 7.0. Concluyendo que sobrevive al tránsito a través del estómago, particularmente cuando el alimento o los productos lácteos que actúan como vehículo tienen un pH > 3.0 (Vergara, 2007).

### 1.3 Microencapsulación

La microencapsulación está definida como un proceso en el cual pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento, o incrustadas dentro de una matriz homogénea o heterogénea, para obtener pequeñas cápsulas con muchas propiedades útiles. La microencapsulación puede proveer una barrera física entre el compuesto dentro del núcleo y los otros componentes del producto. Especialmente, en el campo de alimentos, es una técnica mediante la cual gotas líquidas, partículas sólidas o compuestos gaseosos son atrapados en películas delgadas de un agente microencapsulante de grado alimenticio. La retención de estos núcleos está gobernada por su funcionalidad química, solubilidad, polaridad y volatilidad (Gharsallaoui et al., 2007).

Desde el punto de vista microbiológico la microencapsulación se define como el proceso de atrapar y rodear células de microorganismos, cubriéndolas con los materiales apropiados con el fin de segregar las células del ambiente que las rodea para reducir el daño o pérdida de la viabilidad celular, de forma que resulte en la liberación de las células en el medio intestinal en el mejor estado fisiológico posible (Sultana et al., 2000; Krasaekoopt et al., 2003; Martin et al., 2015).

En su forma más simple, una microcápsula es una pequeña esfera con una pared uniforme alrededor. El material dentro de la microcápsula es referido como el núcleo, fase interna o relleno, mientras que la pared es llamada capa,

recubrimiento, material de pared o membrana. Prácticamente el núcleo puede ser un material cristalino, una partícula adsorbente irregular, una emulsión, suspensión de sólidos, o una suspensión de microcápsulas más pequeñas. El tamaño y forma de las micropartículas formadas depende de los materiales y métodos usados para prepararlas. En la Figura 2 se muestra la morfología de diferentes tipos de microcápsulas (Gharsallaoui et al., 2007).

Los diferentes tipos de microcápsulas y microesferas son producidos por un amplio rango de materiales de pared (monómeros y/o polímeros) y por un gran número de diferentes procesos de microencapsulación como: secado por aspersión, secado por enfriamiento, secado por refrigeración, secado por congelamiento, extrusión, extrusión centrífuga, coacervación, separación por suspensión rotacional, co-cristalización, etc. (Gharsallaoui et al., 2007).

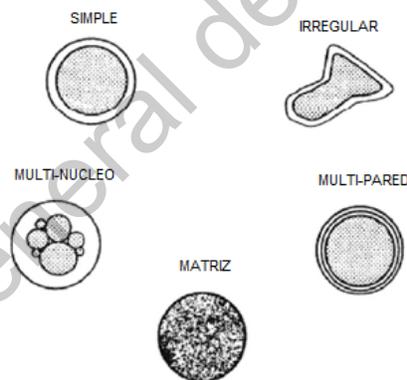


Figura 2. Morfología de diferentes tipos de microcápsulas (Gharsallaoui et al, 2007).

#### 1.4 Microencapsulación de Probióticos

Cuando se usan probióticos en alimentos, el principal problema que se presenta, es la escasa resistencia de éstos a diferentes condiciones ambientales y tecnológicas. Las técnicas de microencapsulación son un buen método para

proteger a estos microorganismos, sin embargo, no todas las técnicas son apropiadas para los probióticos (Villena et al., 2009).

Para la incorporación de bacterias probióticas inmovilizadas en productos alimenticios son deseables preparaciones secas de microcápsulas insolubles en agua con tamaño de partícula bajo ( $<100\mu\text{m}$ ) y controlado. Los cultivos con estas características tienen mayor estabilidad y su manejo y almacenamiento es más fácil, además de tener bajo impacto sobre las características sensoriales del producto, especialmente la textura (Picot y Lacroix, 2003). La dificultad técnica y el alto costo del proceso son factores limitantes importantes para la aplicación a gran escala de las tecnologías de microencapsulación, particularmente de grado alimenticio. Se han reportado varios métodos para la encapsulación de bacterias probióticas, como son: emulsión, extrusión, coacervación y secado por aspersión (De Prisco, 2016).

Entre los materiales más utilizados para la encapsulación de probióticos se encuentran polisacáridos, proteínas y lípidos (Serna-Cock y Vallejo Castillo, 2013, El-Salam y El-Shibiny, 2015).

Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias. Dentro de ella están los polímeros naturales, los semisintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacáridica, de origen animal y vegetal; se destacan el alginato, carragenina, gomas de xantana y gelana, pectina, dextrana, goma arábiga y quitosano (Caicedo, 2010).

La elección del material encapsulante es el mayor elemento de éxito en la microencapsulación de probióticos y su uso en alimentos funcionales. Las proteínas de leche se encuentran entre los materiales más usados de forma individual o en combinación con otros biomateriales como encapsulantes de probióticos (Huq et al., 2013).

## 1.4.1 Técnicas de microencapsulación de probióticos

### 1.4.1.1 Técnica de extrusión o goteo

Es la técnica más antigua y común para elaborar cápsulas a base de hidrocoloides. Ésta consiste en preparar una solución hidrocoloidal, adicionar los microorganismos y hacer pasar la suspensión por una aguja de jeringa (a nivel laboratorio) o tubos de extrusión (para planta piloto), para formar gotas que se dejaran caer en caída libre en una solución endurecedora (como el cloruro de calcio). El tamaño y la forma de la perla dependen del diámetro de la boquilla y la distancia de adición. Este método es el más popular debido a su facilidad, simplicidad, bajo costo y condiciones discretas de formulación. El material de soporte usado para la técnica de extrusión es el alginato, debido a las propiedades funcionales que éste posee, como la fortaleza en su composición que contribuye a la formación del gel (Caicedo, 2010).

### 1.4.1.2 Técnica de emulsión

En esta técnica, un pequeño volumen de suspensión hidrocoloidal con microorganismos (fase discontinua) se adiciona a un gran volumen de aceite vegetal (fase continua). La mezcla se homogeniza para formar una emulsión de agua en aceite utilizando un emulsificante. Una vez que la emulsión se forma, ésta se puede insolubilizar para formar cápsulas de gel en la fase aceitosa. El tamaño de la perla es controlado por la velocidad de agitación. Esta técnica ha sido usada para encapsular bacterias ácido lácticas (Caicedo, 2010).

El aceite vegetal, es usado en esta técnica como fase continua. En algunos casos se adicionan emulsificantes debido a que éstos disminuyen la tensión superficial y se refleja en el tamaño de las esferas formadas en la emulsión. Otros métodos que han sido reportados para la encapsulación de bacterias probióticas son: coacervación, cápsulas de alginato y secado por aspersion (Caicedo, 2010).

### 1.4.1.3 Coacervación

La coacervación es una tecnología que puede lograr un alto nivel de atrapamiento celular (hasta 99%), además ofrece posibilidades de liberación controlada basadas

en el esfuerzo mecánico, temperatura o liberación sostenida. El fundamento de la microencapsulación por coacervación (simple o compleja) es la separación de fases de uno o muchos hidrocoloides de la solución inicial y posterior depósito de la fase coacervada recién formada alrededor del ingrediente activo suspendido o emulsificado en el mismo medio de reacción. A pesar de las ventajas de la coacervación como método de encapsulación, se han enfrentado graves problemas al intentar comercializar ingredientes alimenticios coacervados pues el costo del proceso es muy elevado, el proceso es complejo y la unión del material de pared generalmente involucra glutaraldehído, que debe ser utilizado cuidadosamente de acuerdo a la legislación de varios países (Gouin, 2004).

#### 1.4.1.4 Secado por aspersión

El secado por aspersión, es el método más utilizado para la microencapsulación en la industria de los alimentos, es flexible y produce productos de buena calidad. Este proceso puede ser operado en una base continua, es de fácil escalamiento y de bajo costo, sin embargo, el proceso involucra factores como altas temperaturas, deshidratación y fuerzas de corte que al aplicarse simultáneamente originan pérdidas en la viabilidad de las bacterias probióticas (Mortazavian et al., 2007). Se ha reportado que un adecuado ajuste y control de las condiciones del proceso, como la temperatura de entrada del aire, pueden dar como resultado cultivos viables encapsulados con una distribución y tamaño de partícula adecuado (Kailasapathy, 2002; Huang, 2017).

Esta técnica consiste en una operación unitaria mediante la cual un producto líquido es atomizado en una corriente de aire caliente para obtener instantáneamente un polvo. El gas generalmente usado es aire o menos comúnmente un gas inerte como nitrógeno. El secado por aspersión produce, dependiendo del material de alimentación inicial y las condiciones de operación, un polvo muy fino (10-15  $\mu\text{m}$ ) o partículas grandes (1-3 mm) (Gharsallaoui et al. 2007).

Disminuyendo el contenido de agua y la actividad de agua, el secado por aspersión es generalmente usado en la industria alimenticia para asegurar la

estabilidad microbiológica de los productos, evitar el riesgo de degradación química o biológica, reducir los costos de almacenamiento y transporte, para obtener finalmente un producto con propiedades específicas como, por ejemplo, solubilidad instantánea. Es la técnica más económica y común para producir materiales alimenticios microencapsulados. El equipo es accesible y los costos de producción son menores que la mayoría de los otros métodos (Gharsallaoui, et al. 2007).

En la Figura 3 se muestra un esquema del funcionamiento de un secador por aspersión de laboratorio.

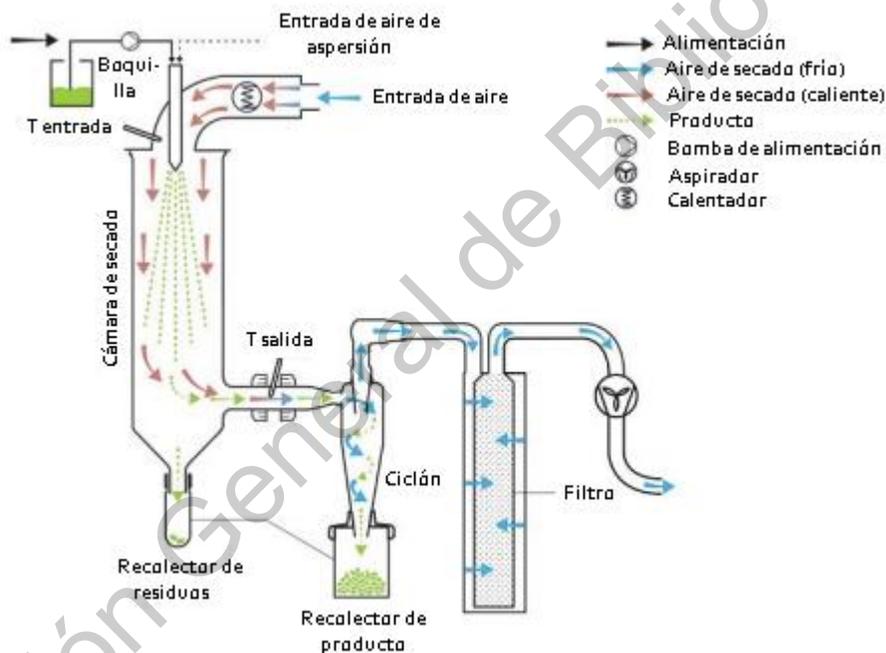


Figura 3. Esquema de funcionamiento de un secador por aspersión de laboratorio (Hernández-Rojas et al., 2014).

#### 1.4.2 Materiales encapsulantes para microencapsulación de probióticos

La selección del material pared para la encapsulación de microorganismos probióticos, juega un papel muy importante, pues de este dependerá la eficaz protección contra factores adversos. Para la encapsulación se utilizan diferentes tipos de material pared, como proteínas, lípidos y carbohidratos. Los materiales de recubrimiento más empleados en la encapsulación de bioactivos son los lípidos, polisacáridos (almidón y sus derivados- amilosa, amilopectina, dextrinas maltodextrinas, celulosa y derivados), exudados y extractos de plantas (goma arábica, goma tragacanto y goma de mezquite, entre otras) carragenatos, alginatos, adicionalmente proteínas como suero lácteo y proteína aislada de soya. En términos generales, los polisacáridos presentan una alta facilidad para formar macropartículas esféricas durante el secado, por lo que son ampliamente usados. Entre las proteínas, algunos investigadores han trabajado con polipeptonas, proteínas de soya, derivados de leche, gelatinas, entre otros. Entre los lípidos se han aplicado liposomas, parafinas, ácido estearílico y esteárico, entre otros. Los materiales pared a base de carbohidratos pueden ser entre otros almidones, goma arábica, prebióticos como maltodextrina, fosfooligosacáridos (FOS) e inulina. El empleo de almidones durante la encapsulación genera una desventaja, puesto que cuando la concentración del material encapsulante es muy alta, se pueden ocasionar problemas durante el secado debido a altas viscosidades (Rodríguez et al., 2016).

#### 1.4.3 Aislado de proteína de suero como material encapsulante de probióticos mediante secado por aspersión

Una de las proteínas más utilizadas para encapsular ingredientes alimenticios por secado por aspersión son las provenientes de la leche (o suero de leche). Debido a que poseen propiedades funcionales requeridas como material de pared; éstas proteínas se han utilizado con éxito para encapsular probióticos proporcionando una protección eficaz (Gharsallaoui et al., 2007). La leche bovina es un sistema muy complejo que contiene aproximadamente un 3.5% p/p de proteína. Ésta se

divide en dos fracciones principales basadas en su solubilidad. Las caseínas, que representan cerca del 80% del nitrógeno de la leche y el 20% restante que es soluble en el suero corresponde a un 15% de proteínas y el remanente son compuestos nitrogenados no proteicos (Philips y Williams, 2000).

La proteína del suero de leche está compuesta por un conjunto de proteínas globulares que pueden ser aisladas físicamente del suero de la leche, subproducto de procesos industriales de productos como el queso. Desde el punto de vista químico es una mezcla de proteínas solubles en agua en sus formas nativas independientemente del pH de la solución (Rocha et al., 2014). Este material posee alta capacidad emulsificante y genera microcápsulas de tamaño inferior a 2 micrómetros. Pueden utilizarse en forma individual o combinadas con carbohidratos para modificar las propiedades de la pared y el tamaño de las partículas. El uso de proteínas del suero de la leche tiene efectos sobre la morfología de las microcápsulas haciéndolas más esféricas y de superficie tersa en comparación con los polisacáridos (Villena et al, 2009).

### 1.5 Yogurt

El yogurt es un producto que se obtiene al fermentar la leche utilizando un cultivo mixto formado por las bacterias *Lactobacillus delbrueckii*, subespecie *bulgaricus*, y *Streptococcus salivarius*, subespecie *thermophilus*. Como resultado de la fermentación, se produce ácido láctico a partir de la lactosa presente en la leche y una serie de compuestos que le imparten al yogurt un sabor y aroma típicos (Hernández, 2003).

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, el yogurt es el producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH.

En la actualidad se elaboran diferentes tipos de yogurt, los cuales difieren en su composición química, método de producción, sabor, consistencia, textura y proceso post-incubación. Entre ellos están el yogurt aplanado, yogurt batido y yogurt líquido. En el Cuadro 3 se muestra una clasificación de yogurt de acuerdo a Hernández (2003).

Cuadro 3. Clasificación del yogurt en función a sus diferentes características (Hernández, 2003).

Por el contenido graso	Yogur entero
	Yogurt semidescremado
	Yogurt descremado
Por la consistencia del gel	Yogurt aplanado
	Yogurt batido
	Yogurt bebible o líquido
Por su aroma y sabor	Yogurt natural
	Yogurt frutado
	Yogurt aromatizado
Por su tratamiento post-incubación	Yogurt tratado térmicamente
	Yogurt congelado
	Yogurt deshidratado
	Yogurt concentrado

#### 1.5.1 Bacterias ácido lácticas en yogurt

Las BAL son un grupo amplio de bacterias con la característica común de producir ácido láctico como el principal producto final del metabolismo; se encuentran en la leche y en otros ambientes naturales. Las bacterias lácticas pueden clasificarse como homofermentativas cuando producen de un 70-90% de ácido láctico como producto de su metabolismo. Ejemplos de estas bacterias son *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus* (Spreer, 1995).

Las BAL forman parte de un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, de pared Gram-positiva, son anaerobias facultativas, catalasa negativa, y no formadoras de esporas. A pesar de su metabolismo anaerobio, son anaerobios

tolerantes y en los medios de cultivos sólidos forman colonias en presencia de aire. Diferentes factores afectan el crecimiento de BAL en un medio de fermentación. Además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de éstas. Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo utilizado, como también de las condiciones ambientales; la mayoría de las especies necesitan varios aminoácidos y vitaminas del grupo B para su desarrollo (Parra Huertas, 2010).

#### 1.5.2 *Streptococcus thermophilus*

Es una bacteria Gram-positiva, no móvil, anaerobio facultativo, se desarrolla a 37-40°C de temperatura, pero puede resistir 50°C e incluso 65°C por media hora. Posee gran relevancia en la industria láctea, *S. thermophilus* utiliza principalmente azúcares como sustrato para la generación de productos de fermentación, siendo el ácido láctico el principal producto, esta bacteria tiene menor poder de acidificación que el lactobacilus (Spreer, 1995).

#### 1.5.3 *Lactobacilus bulgaricus*

Es una bacteria láctea homofermentativa. Se desarrolla muy bien entre 42 y 45°C, produce disminución del pH, puede producir hasta un 2,7% de ácido láctico, es proteolítica, produce hidrolasas que hidrolizan las proteínas. Esta es la razón por la que se liberan aminoácidos como la valina, la cual tiene interés porque favorece el desarrollo del *Streptococcus thermophilus* (Spreer, 1995).

#### 1.5.4 Fermentación del yogurt

La fermentación de yogurt se lleva a cabo en dos fases de crecimiento exponencial separadas por una fase de transición con un menor crecimiento. La

primera fase se caracteriza por el crecimiento *S. thermophilus*, el cual es tolerable a un pH neutro y es más efectivo en la absorción de aminoácidos y elementos trazas que *L. bulgaricus*. Durante esta fase se produce ácido fórmico. Esto puede ayudar a la biosíntesis de purinas en *L. bulgaricus* como precursor y cofactor, respectivamente, porque a esta bacteria le faltan genes para la biosíntesis de ácido fólico de novo y por lo tanto se ve afectada en la biosíntesis de purina efectiva. Además, *S. thermophilus* consume  $O_2$  y produce  $CO_2$ , lo que beneficia a *L. bulgaricus*, que es menos tolerante al oxígeno (Sieuwerts, 2016). Estas reacciones de cooperación se pueden observar en la figura 4.

En la fase de transición, el crecimiento de *S. thermophilus* disminuye, debido a la falta de aminoácidos azufrados. También, se inicia el crecimiento de *L. bulgaricus* y su expresión del gen de proteasa prtB, aumentan los niveles de oligopéptidos que pueden absorberse y soportan una segunda fase de crecimiento exponencial de *S. thermophilus* a la vez que apoyan el crecimiento exponencial de *L. bulgaricus*, se producen ácidos grasos y acetaldehído (Sieuwerts, 2016).

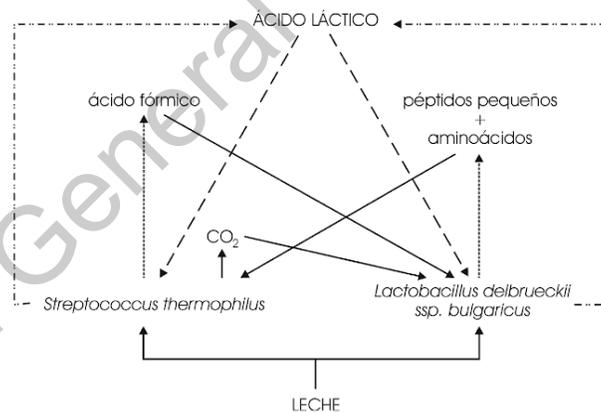


Figura 4. Reacciones de cooperación de las bacterias del yogurt (Romero y Mestres, 2004).

### 1.5.5 Coagulación ácida

La formación de geles de proteína de leche es un paso vital en la elaboración de yogurt. Es formado por la fermentación lenta de la lactosa y se produce ácido láctico, se reduce el pH de la leche, de 6.7 a 4.6, lo que ocasiona un

desordenamiento de las proteínas estructurales internas de las micelas de caseínas, debido a la solubilización de fosfato de calcio micelar. A medida que las caseínas se aproximan a su punto isoeléctrico (pH= 4.6) se reduce la carga neta, lo que hace disminuir la repulsión electrostática. Las caseínas insolubles se agrupan formando una red de disposición laminar. El retículo formado retiene parte de la fase acuosa. Los enlaces intermoleculares son hidrófobos y electrostáticos, por lo que el coágulo será frágil, sin rigidez, ni compacidad, friable (se rompe por deformación) y poco contráctil (en comparación con la coagulación enzimática) (Sbodio, 2012).

### 1.6 Yogurt estilo griego

El yogurt estilo griego es una leche fermentada semisólida producto de la separación del suero del yogurt batido o de la adición de componentes lácteos para ajustar sus sólidos (Lange, 2013), tiene un cuerpo liso y suave, su color se encuentra entre crema/blanco con un sabor ligeramente ácido y poca sinéresis (suero en la superficie del gel); es conocido por diferentes nombres (concentrado, tenso, Labneh, Skyr entre otros) y se consume usualmente en el medio oriente (Al-Kadamany et al., 2003). Actualmente el yogurt estilo griego se encuentra como el sector de mayor crecimiento en la industria láctea (Desai et al., 2013).

La composición de este yogurt dependerá del contenido de grasa y sólidos. Nsabimana et al. (2005) reportaron los siguientes rangos de nutrientes en el yogurt estilo griego: 6.42–10.70% grasa, 8.24–10.43% proteína, 2.86–4.91% lactosa, 14.12–16.47% sólidos de leche no grasos, 20.54–24.61% sólidos totales, 1.07–1.33% minerales y un pH de 3.67– 4.05. Para un yogurt bajo en grasa su composición aproximada es 4.2 % grasa, 17.4 % sólidos no grasos, 0.9 % de estabilizador, sal 0.5 % y 23 % de sólidos totales (Tamime y Robinson, 2007).

### 1.6.1 Procesos de manufactura de yogurt estilo griego

Existen varios métodos para la manufactura del yogurt estilo griego entre los que se encuentran: separación mecánica, separación por membranas y método tradicional. En el proceso por separador mecánico, la leche descremada es calentada, enfriada a 42°C e inoculada con microorganismos iniciadores (durante 4 horas aproximadamente), una vez fermentada la leche es agitada vigorosamente, calentada a 60°C por 15 min, enfriada a 15°C y concentrada hasta 18 g/100 g mediante el separador mecánico, el concentrado puede mezclarse con crema o bien con fruta, para su posterior envasado (Al-Kadamany et al., 2003; Tamime y Robinson, 2007).

Dentro de los métodos basados en membranas se encuentran principalmente la ultrafiltración y ósmosis inversa; sin embargo, los yogurts concentrados por ósmosis inversa no cuentan con las propiedades de gel similares a los elaborados por el método tradicional mediante la concentración de sólidos donde se usa una bolsa de tela, piel animal o vasija de barro; la separación del suero lácteo puede lograrse ya sea mediante drenaje por gravedad o por presión (apilando bolsas de 25 kg), el proceso es lento (15-20 horas a menos de 10°C) y se lleva a cabo principalmente en pequeñas escalas o bien en hogares (Tamime y Robinson, 2007; Lange, 2013).

Todos los métodos anteriores consisten en el aumento de los sólidos lácteos separando el suero, sin embargo, la concentración de los sólidos también se puede realizar por la adición de ingredientes lácteos (leche descremada en polvo, aislados de proteína de leche, aislados de suero de leche, concentrados de suero de leche, concentrados de proteína de leche, caseína micelar y caseinatos) a la base láctea antes de ser fermentada alcanzando características de calidad muy similares a los anteriores con menor inversión de tiempo y tecnología (Karam et al., 2013; Lange, 2013).

### 1.6.2 Parámetros de calidad de yogurt estilo griego

La aceptabilidad del yogurt estilo griego está definida por diferentes características fisicoquímicas y sensoriales. Ozer (2006) reportó que gran parte de la aceptabilidad del yogurt concentrado es dependiente de sus características reológicas y/o texturales.

La sinéresis (suero lácteo en la superficie del gel) que eventualmente es un defecto en los productos lácteos (Magenis et al., 2006) está relacionada con la microestructura del yogurt y también es una característica importante de calidad y vida de anaquel. La formación de agregados de proteína también son parámetros de calidad y pueden producirse durante la manufactura por tratamientos térmicos severos, una relación alta de proteínas de suero/caseínas, altas temperaturas de incubación, uso excesivo de microorganismos iniciadores o también a un incremento en el tamaño de las micelas de caseína por su interacción con las proteínas del suero desnaturalizadas (Lange, 2013).

Las características sensoriales juegan un rol importante para la aceptación del yogurt estilo griego. Desai et al. (2013) realizaron un estudio sobre qué atributos sensoriales de yogurt griego conducen a la aceptación por consumidores. La textura firme (fuerza requerida para comprimir el producto entre la lengua y el paladar) y densa (la compacidad de la sección transversal, la ausencia de aire percibido por la lengua al moverla a través de la muestra), aroma moderado dulce, sabores a grasa de leche y sabores agrios lácteos (asociados a los compuestos aromáticos de la fermentación), y un sabor amargo moderado (asociado a los ácidos) son los factores de mayor importancia. Entre los compuestos aromáticos más predominantes del yogurt se encuentran: el etanol, diacetil, 2- butanona y el acetaldehído, siendo este último el más predominante del aroma típico del yogurt (Gardini et al., 1999).

### 1.6.3 Propiedades reológicas del yogurt

Una de las maneras de evaluar la calidad de un producto alimentario, es a través de la caracterización reológica, la cual es correlacionada con la textura, los

atributos sensoriales y los cambios microestructurales que tienen lugar en los productos alimenticios. (González et al., 2014). La reología es la ciencia de la deformación y del flujo de la materia, es decir estudia la forma en que los materiales responden al aplicarles cierta fuerza o tensión. Todos los materiales tienen propiedades reológicas, que varían en función de la temperatura, presión, composición, tiempo y la manera en que sean modificados (Chávez et al., 2003).

Existen varias razones para justificar el estudio del comportamiento reológico de los alimentos, entre las cuales se encuentran: (1) la contribución al conocimiento de la estructura de los alimentos, (2) control de procesos y (3) ayuda al diseño de máquinas (Méndez, 2001). En reología, los métodos para determinar las funciones viscoelásticas lineales son estáticos y dinámicos, los cuales se caracterizan por ser de bajo esfuerzo o deformación.

En los ensayos reológicos dinámicos, las muestras se someten a un movimiento que varía armónicamente con el tiempo (movimiento oscilatorio), aunque sólo se pueden aplicar deformaciones que no excedan el intervalo de viscoelasticidad lineal, los cuales harían una recuperación completa imposible. Se aplica de forma oscilatoria una velocidad de cizalla sobre un material y se mide la respuesta del esfuerzo y del ángulo de fase entre el esfuerzo y la deformación. Esta prueba corresponde al estado de la viscoelasticidad lineal, si el esfuerzo es linealmente proporcional a la deformación aplicada y si la respuesta del esfuerzo es en forma de una onda sinusoidal (Barnes, 2000). Estos ensayos permiten determinar la proporción entre la componente elástica ( $G'$ ) y viscosa ( $G''$ ) de un material y establecer en qué medida se comporta como un sólido o como un líquido. Si  $G'$  es mayor que  $G''$  el material se comportará como un sólido; en la cual, la deformación será esencialmente elástica o recuperable. Sin embargo, si  $G''$  es mayor que  $G'$ , la energía usada para deformar el material es disipada y el material se comportará como un líquido (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).  $G'$  se define como la medida de la energía de deformación almacenada por la muestra durante el proceso de cizallamiento. Después de retirar la carga, esta energía está disponible en su totalidad, y actúa ahora como la fuerza de impulsión para el proceso de

reformación que compensará parcial o completamente la deformación lograda anteriormente de la estructura.  $G'$  representa el comportamiento elástico de una muestra. Mientras que  $G''$  representa la medida de la energía de deformación consumida por la muestra durante el proceso de deformación que es posteriormente perdida por la muestra. Esta energía se consume durante el proceso de cambio de la estructura del material, es decir, cuando la muestra fluye parcial o completamente.  $G''$  representa el comportamiento viscoso de un material (Mezger, 2014).

Los parámetros reológicos en general pueden ser afectados por el crecimiento de las bacterias utilizadas durante la fermentación, ya que en esta etapa se producen cambios en la composición nutricional del producto lácteo fermentado (consumo de lactosa y producción de ácidos) y se originan metabolitos tales como acetaldehído, diacetilos, ácido láctico y otros compuestos orgánicos que contribuyen enormemente con las características sensoriales del yogurt, pero que pueden afectar la viabilidad de la bacteria de interés, conllevando a una disminución en las actividades enzimáticas de las bacterias probióticas por efecto de la acumulación de dichos metabolitos (González et al., 2014).

### 1.7 Yogurt estilo griego con probióticos

En las últimas décadas, las bacterias probióticas se han agregado frecuentemente al yogurt, al helado o al queso para incrementar los beneficios de estos productos para la salud. Por definición, los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped. Para tener un impacto bioactivo se considera que el alimento debe contener un número mínimo de células probióticas vivas. La evaluación de la supervivencia de las bacterias probióticas en el yogurt se ha realizado principalmente en yogurt batido. Se sabe que la adición de proteínas de suero o caseínas promueve el crecimiento y la viabilidad de algunos lactobacilos probióticos, ya que un contenido más alto de proteínas incrementa la capacidad

amortiguadora de la leche, resultando en valores de pH más altos en los productos lácteos fermentados. El conocimiento sobre las proteínas de la leche sugiere que el yogurt estilo griego producido por centrifugación o ultrafiltración podría incrementar la supervivencia y la estabilidad de las bacterias probióticas en comparación con el yogurt batido regular. Moineau-Jean et al. (2019) compararon los recuentos viables de *Streptococcus thermophilus* (iniciador) y *Lactobacillus helveticus* R0052 (probiótico), en función de éstos dos métodos de concentración de los compuestos de la leche durante la elaboración de yogurt estilo griego y observaron que este tipo de yogurt puede ser 10 veces mejor vehículo que el yogurt tradicional para la liberación de bacterias probióticas viables.

## **2. HIPÓTESIS**

La sobrevivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 se preservará en mayor número en su forma encapsulada en comparación con su forma libre, durante su almacenamiento en yogurt estilo griego a 4°C y después de su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas; de igual forma, las propiedades reológicas del producto adicionado de probióticos se preservarán durante el tiempo de almacenamiento.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Formular un yogurt tipo griego adicionado del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 334 microencapsulado mediante secado por aspersion utilizando como acarreador aislado de proteína de suero, así como hacer una caracterización química y reológica del producto.

#### 3.2 Específicos

- Formular un yogurt estilo griego.
- Caracterizar el producto formulado mediante análisis bromatológicos y microbiológicos.
- Microencapsular *Lactobacillus casei* ATCC 334 mediante secado por aspersion en una matriz polimérica de aislado de proteína de suero.
- Determinar la viabilidad del probiótico microencapsulado y en forma libre en yogurt durante el tiempo de almacenamiento (4 semanas).
- Determinar la viabilidad del probiótico en ambos tratamientos en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal después de 4 semanas de almacenamiento.
- Evaluar la firmeza y viscosidad en yogurt y efecto de la adición de probióticos microencapsulados y en forma libre, durante el almacenamiento con respecto a un control no adicionado de probióticos.
- Evaluar los parámetros reológicos (módulo  $G'$  y  $G''$ ) del yogurt control y el yogurt adicionado de probióticos, tanto microencapsulados como en forma libre.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

Leche entera proveniente de la UAQ Campus Amazcala, concentrado de proteína de suero (MPC 70), gernetina, almidón modificado y azúcar. Cultivos lácticos para elaboración de yogurt tipo griego marca Bioprox, clave YO-PROX 569 (*Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) y probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 334.

### 4.2 Activación y conteo de células probióticas

El cultivo liofilizado de *Lactobacillus casei* ATCC 334 se activó mediante una transferencia en 3 mL de caldo MRS bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 h. El conteo de células se realizó por medio del método de siembra de extensión por superficie en agar MRS (BD Difco). Se llevaron a cabo diluciones decimales de las muestras en una solución de peptona al 0.1%. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C durante 48 h. Para el conteo de células de *L. casei* ATCC 334 adicionadas en yogurt, el agar MRS fue adicionado de 5 mg/L de vancomicina, después de la esterilización del medio a temperatura de 40°C.

### 4.3 Preparación de la cepa para el proceso de microencapsulación

La cepa probiótica activada fue inoculada en 100 mL de caldo MRS e incubada a 37°C durante 18 h para obtener aproximadamente  $10^9$  UFC/mL en fase logarítmica tardía. Las bacterias se recuperaron del medio mediante centrifugación a 6000 rpm por 3 min y se lavaron dos veces en solución salina estéril al 0.085%.

#### 4.4 Microencapsulación de células probióticas

Se prepararon suspensiones acuosas del material encapsulante APS (aislado de proteína de suero) al 10% de sólidos. Las soluciones se homogenizaron durante 5 min en un homogeneizador a velocidad media; el pH fue ajustado a 7.0 con una solución de NaOH al 5% estéril. Las suspensiones fueron calentadas a baño María durante 10 min a 80°C. En las suspensiones del material matriz se dispersaron aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL de células del probiótico. Antes de la microencapsulación por secado por aspersion se tomaron muestras de 1 mL de suspensión para determinar la concentración de bacterias antes del proceso de secado. La microencapsulación se llevó a cabo en un secador por aspersion de laboratorio marca Büchi, Modelo B-290. Las condiciones de operación del secador fueron: 150°C de aire de entrada, 56-60°C aire de salida, aspiración del 90% y velocidad de alimentación de 25%. Las cápsulas se recuperaron del vaso colector del producto del secador con una espátula estéril y se almacenaron en frascos de vidrio estériles cerrados herméticamente y en refrigeración a 4°C.

#### 4.5 Supervivencia durante proceso de microencapsulación

Las bacterias microencapsuladas fueron liberadas mediante homogenización manual por 1 minuto de 1 g de polvo en 9 mL de una solución de agua peptonada al 0.1% estéril. Las muestras homogeneizadas fueron diluidas en concentraciones apropiadas y contadas en placas de agar MRS adicionado de vancomicina de acuerdo lo descrito en el apartado 4.2. El rendimiento de encapsulación, que es una combinación de la eficiencia de encapsulación y supervivencia de las células microencapsuladas durante el proceso de microencapsulación, fue calculado de acuerdo a lo reportado por Chávarri et. al (2010) utilizando la siguiente ecuación:

$$RE = (N/N_0) \times 100$$

Dónde N es el número de células viables encapsuladas liberadas de las microcápsulas y No es el número de bacterias libres adicionadas a la suspensión del material matriz (aislado de proteína de suero) antes del secado por aspersión.

#### 4.6 Formulación de yogurt griego

Se formuló un yogurt concentrado (yogurt estilo griego) mediante la adición de sólidos de leche (concentrado de proteína de suero), leche entera, azúcar, almidón y grenetina como estabilizantes, en cantidades permitidas por la norma mexicana NOM-181-SCFI-2010 (ver tabla de formulación). Se prepararon tres diferentes lotes para evaluar la viabilidad del probiótico microencapsulado y en su forma libre, así como un control que no contenía probióticos para la evaluación de viscosidad, textura y propiedades reológicas. Se dio un tratamiento térmico de 85°C durante 10 minutos. La mezcla se enfrió a una temperatura de 45°C y fue inoculada con el cultivo iniciador de adición directa en la proporción indicada por el fabricante. Se adicionó el cultivo probiótico microencapsulado y en su forma libre en una proporción de 1%. Las muestras fueron incubadas a 42-45°C en recipientes estériles y tapados hasta alcanzar un pH de 4.6. El yogurt se enfrió y fue almacenado en refrigeración a 4°C para los análisis posteriores.

Cuadro 4. Formulación del yogurt estilo griego

Ingrediente	Cantidad
Leche	1 L
Azúcar	50 g
Grenetina	2 g
Almidón modificado	5 g
Concentrado de proteína de suero	38 g

#### 4.7 Análisis Bromatológicos

El total de sólidos, proteína, grasa y cenizas fueron determinados por los métodos de prueba descritos en las siguientes normas mexicanas (NMX-F-083-1986, NMX-F-068-S-1980, NMX-F-387-1982 y NMX-F-066-S-1978) respectivamente.

#### 4.8 Acidez titulable

La acidez titulable y pH fueron determinados en muestras de 10 g, a las cuales se adicionaron 10 mL de agua destilada. Se determinó el % de acidez mediante una titulación utilizando 0.5 mL de fenolftaleína como indicador y NaOH 0.1 N como titulante (NOM-185-SSAI-2002) de acuerdo a la siguiente fórmula.

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

V: Volumen gastado de hidróxido de sodio

N: Normalidad del hidróxido de sodio

M: Masa de la muestra (g)

#### 4.9 Sinéresis

Se determinó el grado de sinéresis mediante la técnica de Farnsworth et al. (2002) con modificaciones. Se pesaron 10 g de muestra y se centrifugaron a 6000 rpm por 5 min a 4°C, la muestra se decantó y se pesó el suero decantado. El análisis se llevó a cabo cada semana durante 3 semanas.

#### 4.10 Evaluación de la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en muestras de yogurt estilo griego almacenadas a 4°C.

Se determinó la viabilidad de las células de las muestras con células libres y encapsuladas cada semana durante 28 días de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.

#### 4.11 Tolerancia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

A los 21 días de almacenamiento, se evaluó *in vitro* la sobrevivencia de las células microencapsuladas y en su forma libre adicionadas al yogurt estilo griego en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, de acuerdo a lo reportado por Charteris et al. (1998) con algunas modificaciones.

Para la exposición de las muestras a condiciones gástricas simuladas se adicionaron 10 mL de saliva artificial y 80 mL de jugo gástrico simulado a 10 g de la muestra de yogurt con probióticos, se homogenizaron las muestras manualmente por 1 minuto y se incubaron a 37°C durante 2 h. Se monitoreó la cuenta viable recién colocada la saliva y el jugo gástrico simulado y a las 2 horas de residencia en estas soluciones. Las muestras fueron posteriormente expuestas a condiciones intestinales simuladas. Para ello se tomaron 30 mL de las suspensiones y se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue decantado; sobre la pastilla resultante de la centrifugación se adicionaron 3 mL del sobrenadante recién decantado y 27 mL de jugo intestinal simulado. Las muestras fueron colocadas a 37°C durante 4 horas. La cuenta viable de las suspensiones se determinó recién agregado el jugo intestinal simulado, a las 2 h y a las 4 h de residencia.

La saliva artificial se preparó diluyendo 6.2 g de cloruro de sodio, 2.2 g de cloruro de potasio, 0.22 g de cloruro de calcio y 1.2 g de bicarbonato de sodio en 1 L de

agua destilada. La mezcla fue esterilizada a 121°C durante 15 min. Los jugos gástrico e intestinal simulados fueron preparados el día del experimento. Para el jugo gástrico simulado se suspendieron 3 g de pepsina en 1 L de solución salina estéril al 0.5% acidificada a pH 2.0 con ácido clorhídrico 0.1 M. El jugo intestinal simulado se preparó con 1 g de pancreatina y 1.5 g de sales biliares en 1 L de solución salina al 0.5% estéril, ajustando el pH a 8.0 con una solución de NaOH 0.1 M

#### 4.12 Viscosidad aparente

La medición de viscosidad aparente, se llevó a cabo con un reómetro Anton Paar (Rheoplus/ 32V3.4) equipado con un recirculador para mantener la temperatura constante de la muestra (10°C). Se usó una geometría de cilindro concéntrico, haciendo una lectura de viscosidad con respecto a la tasa de corte (shear rate) de 0.1 a 100 s<sup>-1</sup> modificando la metodología utilizada por Pinto et al. (2017). Las lecturas de tomaron a las 24 h y a las 2 semanas de almacenamiento a 4°C.

#### 4.13 Firmeza y adhesividad

La firmeza y la adhesividad se determinaron siguiendo la metodología de Domínguez-Soberanes et al. (2002) con modificaciones, mediante un análisis de perfil de textura (TPA) usando un analizador de textura NEXYGEN Plus con una sonda cilíndrica de diámetro de 50 mm. Para el ensayo se utilizaron las siguientes velocidades: 2 mm s<sup>-1</sup> de pre-ensayo, 1mm s<sup>-1</sup> de ensayo y 2 mm s<sup>-1</sup> de post-ensayo. Las muestras se mantuvieron en refrigeración y se llevaron a una temperatura de 10°C para su análisis.

#### 4.14 Reología

El barrido de deformación de los yogurts se llevó a cabo con un reómetro Anton Paar (Rheoplus/ 32V3.4) equipado con un recirculador para mantener la temperatura constante de la muestra (10°C), con una geometría de placas paralelas de 25 mm de diámetro y 1 mm de espacio entre ellas. Se realizó una prueba dinámica oscilatoria. La deformación se incrementó de 0.01 a 100% con una frecuencia constante de 1 Hz modificando la metodología utilizada por Ghorban et al. (2012).

#### 4.15 Análisis de los datos experimentales

Los tratamientos fueron aleatorizados y analizados por triplicado. Se analizaron los datos de sobrevivencia de los microorganismos microencapsulados y libres durante el almacenamiento y durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal mediante un análisis de varianza, comparando las medias utilizando la prueba de Tukey.

Los datos de sinéresis y de textura fueron analizados para tres muestras de yogurt estilo griego: control (sin adición de probióticos), con células del probiótico libres y células microencapsuladas de forma similar a la descrita para la sobrevivencia de las células. Los datos fueron analizados con el programa Mini Tab versión 17.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis Bromatológicos

Se hizo un análisis a la formulación del yogurt y de acuerdo a la NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018, los valores obtenidos son los adecuados para este tipo de producto. (Ver Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis bromatológico del yogurt formulado.

Parámetros	Resultados
Humedad (%)	76.16± 0.805*
Cenizas (%)	0.91 ± 0.110*
Proteína (%)	15.61 ±0.515*
Grasa (%)	3.0 ± 0.0

\*Promedio ± DE (n=3)

### 5.2 Secado por aspersión

La viabilidad de las bacterias *L. casei* ATCC 334 en la suspensión de aislado de proteína de suero fue de 8.94 ciclos logarítmicos y después del secado, la viabilidad de las bacterias fue de 8.45 ciclos logarítmicos. Por lo que el proceso de secado por aspersión redujo en solamente 0.49 ciclos logarítmicos la viabilidad de las células en suspensión. El rendimiento y sobrevivencia de microencapsulación fue de 94.51%. En la Figura 5 se observa una ligera pendiente en la gráfica que muestra la reducción de viabilidad.

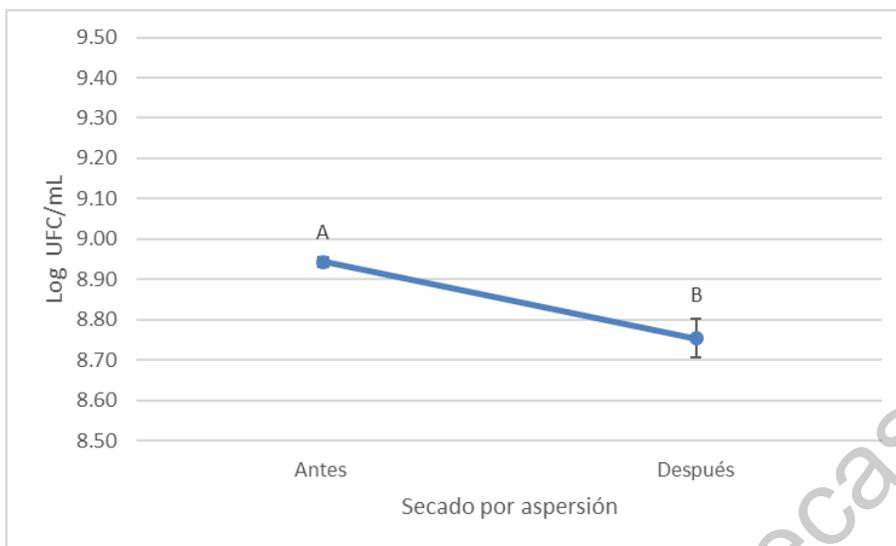


Figura 5. Viabilidad de *L. casei* ATCC 334 durante su exposición al secado por aspersión. Resultados expresados como las medias (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

### 5.3 pH y acidez titulable

Tanto el pH como la acidez titulable del yogurt fueron determinados a lo largo de tres semanas de almacenamiento. En el Cuadro 6 se muestran los valores de ambos parámetros determinados. Se puede observar que, a mayor tiempo de almacenamiento, el pH disminuye y el porcentaje de acidez aumenta, debido a un proceso de post-acidificación producido por las bacterias iniciadoras y el probiótico. La muestra de yogurt adicionada de bacterias libres mostró un descenso más pronunciado en el pH y mayor porcentaje de acidez comparado con las muestras control y la adicionada de probióticos microencapsulados.

Cuadro 6. Efecto del almacenamiento en el pH y la acidez de las muestras de yogurt

Muestra	Tiempo de almacenamiento	pH	Acidez (%)
Control	24 horas	4.76 <sup>AB</sup>	10.5 <sup>J</sup>
	1 semana	4.40 <sup>C</sup>	13.5 <sup>H</sup>
	2 semanas	4.33 <sup>D</sup>	14.5 <sup>F</sup>
	3 semanas	4.24 <sup>F</sup>	16 <sup>D</sup>
Libres	24 horas	4.74 <sup>B</sup>	10 <sup>L</sup>
	1 semana	4.05 <sup>G</sup>	17 <sup>C</sup>
	2 semanas	3.88 <sup>H</sup>	21.5 <sup>B</sup>
	3 semanas	3.80 <sup>I</sup>	25 <sup>A</sup>
Microencapsulados	24 horas	4.79 <sup>A</sup>	10 <sup>K</sup>
	1 semana	4.33 <sup>D</sup>	13 <sup>I</sup>
	2 semanas	4.31 <sup>DE</sup>	14 <sup>G</sup>
	3 semanas	4.29 <sup>E</sup>	15.5 <sup>E</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %

#### 5.4 Sinéresis

Se determinó el porcentaje de sinéresis en los 3 diferentes tratamientos como se muestra en la figura 6. En la muestra control y con bacterias microencapsuladas se registraron valores similares a lo largo del almacenamiento, tendientes a disminuir ligeramente, aunque no se hubo una diferencia significativa entre las mediciones desde el inicio al final del almacenamiento. La muestra con bacterias libres mostró un comportamiento contrario al aumentar el porcentaje de sinéresis durante el almacenamiento, mostrando una diferencia significativa en la segunda semana.

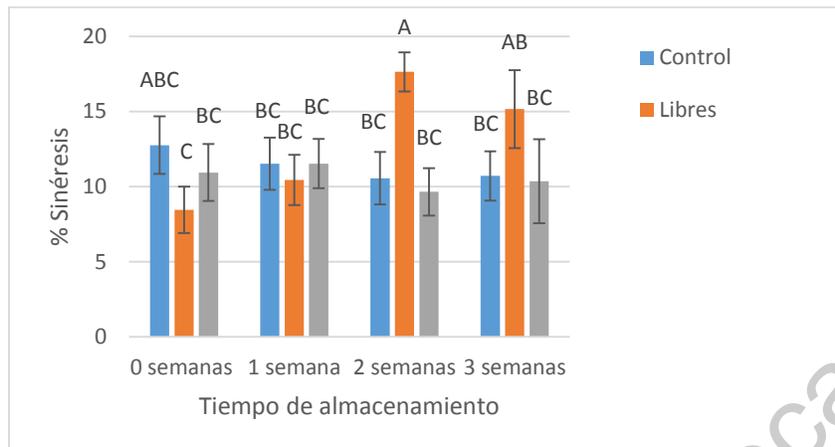


Figura 6. Efecto del almacenamiento en la sinéresis de las muestras de yogurt con diferentes semanas de almacenamiento. Resultados expresados como las medias ( $n=3$ )  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %

#### 5.4 Evaluación de la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en muestras de yogurt estilo griego almacenadas a 4°C.

Se determinó el número de bacterias viables del probiótico durante tres semanas de almacenamiento. En el Cuadro 7 se muestran los datos registrados y en la Figura 7 se puede observar que hubo una tendencia a incrementar el número de bacterias durante la primera semana de almacenamiento, descendiendo ligeramente a las dos semanas, no mostrándose diferencias significativas en el número de bacterias entre el inicio y final del almacenamiento en ambos tratamientos.

Cuadro 7. Viabilidad de las bacterias durante el tiempo de almacenamiento.

Muestra	Semana 0 (log UFC/mL)	Semana 1 (log UFC/mL)	Semana 2 (log UFC/mL)	Semana 3 (log UFC/mL)
Libres	10.50 ± 0.03 <sup>D</sup>	10.83 ± 0.05 <sup>A</sup>	10.60 ± 0.08 <sup>BCD</sup>	10.39 ± 0.20 <sup>D</sup>
Microencapsuladas	10.40 ± 0.01 <sup>CD</sup>	10.93 ± 0.03 <sup>AB</sup>	10.64 ± 0.07 <sup>BC</sup>	10.73 ± 0.05 <sup>ABC</sup>

Promedio ± DE (n=3), Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

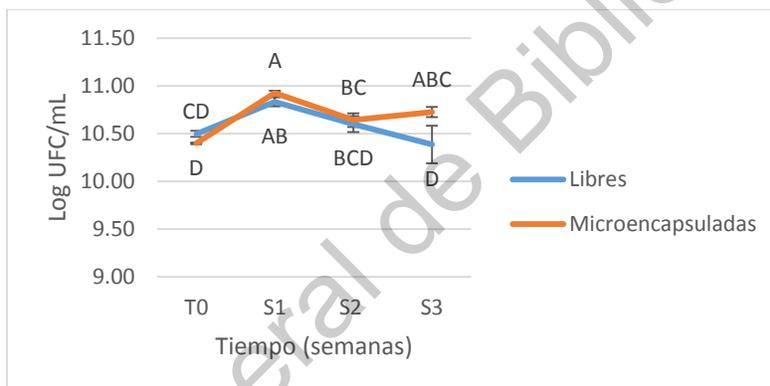


Figura 7. Viabilidad de *L. Casei* ATCC 334 encapsulado y sin encapsular en yogurt almacenado a 4°C durante 3 semanas. Resultados expresados como las medias (n=3) ± DE. Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

### 5.6 Tolerancia a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Se puede observar en la Figura 8 el comportamiento de las bacterias en el yogurt durante la exposición de las muestras a condiciones gastrointestinales simuladas. Al exponerlas a condiciones gástricas simuladas (pH 2), no se observó un efecto adverso del medio en la viabilidad de las bacterias, debido a la tolerancia

intrínseca de las bacterias a pH ácido. En el Cuadro 8 se reporta la disminución de la viabilidad de las bacterias al final de la exposición a condiciones simuladas del TGI.

Cuadro 8. Viabilidad de las bacterias durante la prueba de simulación del tracto

Muestra	TG 0h (log UFC/mL)	TG 2h (log UFC/mL)	TI 2h (log UFC/mL)	TI 4h (log UFC/mL)	TI 6h (log UFC/mL)	Diferencia después del TGI
Libres	8.99 ± 0.13 <sup>A</sup>	9.11 ± 0.01 <sup>A</sup>	7.18 ± 0.46 <sup>C</sup>	4.87 ± 0.04 <sup>E</sup>	4.67 ± 0.02 <sup>E</sup>	4.32 log UFC/mL
Microencapsuladas	8.61 ± 0.06 <sup>B</sup>	8.35 ± 0.07 <sup>B</sup>	6.79 ± 0.15 <sup>C</sup>	6.16 ± 0.11 <sup>D</sup>	6.26 ± 0.01 <sup>D</sup>	2.35 log UFC/mL

gastrointestinal después de 3 semanas de almacenamiento

Promedio ± DE (n=3), Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

Los cambios de pH (y la presencia de sales biliares tuvieron un efecto adverso en la viabilidad del probiótico cuando fueron expuestas al medio simulador de las condiciones intestinales. Se determinó la viabilidad de las bacterias recién adicionado el jugo intestinal simulado a pH básico (8.0) y se registró una disminución drástica de la viabilidad de las bacterias probióticas en ambos tratamientos con el cambio de pH. Las bacterias microencapsuladas mostraron mayor estabilidad durante su exposición al jugo intestinal durante 4 horas.

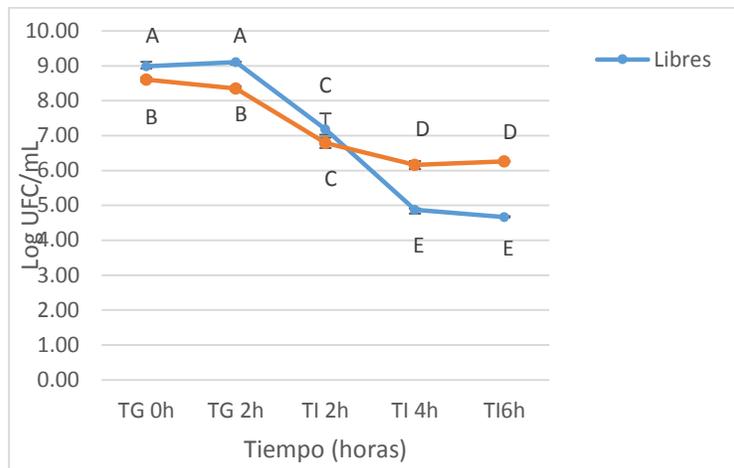


Figura 8. Viabilidad de *L. casei* ATCC 334 encapsulado y sin encapsular en yogurt durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.

Resultados expresados como las medias ( $n=3$ )  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencia significativa mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

Al final de la prueba se registró una disminución de 4.32 Log UFC mL<sup>-1</sup> en el yogurt con bacterias libres y una disminución de 2.35 Log UFC mL<sup>-1</sup> en el yogurt con bacterias microencapsuadas, dejando evidente el efecto protector de la microencapsulación del probiótico.

### 5.7 Viscosidad aparente

Como se puede observar en las Figuras 9 y 10, los valores de viscosidad aparente de las muestras de yogurt disminuyeron a medida que se incrementó la tasa de corte (s<sup>-1</sup>) lo que indica que las muestras tienen un comportamiento de fluido no Newtoniano (Pinto et al, 2017). Las mediciones de viscosidad del tiempo cero se realizaron después de 24 horas del proceso de fermentación. En este punto se observó una diferencia significativa en la viscosidad de los tres tratamientos (con células encapsuladas, células libres y control sin células adicionadas). El yogurt adicionado de células sin encapsular exhibió la mayor viscosidad. En general se

observó una tendencia en los tres tratamientos a incrementar la viscosidad aparente (Fig. 9). Después de 2 semanas de almacenamiento el control mostró la mayor viscosidad seguido del tratamiento con células microencapsuladas (Fig. 10).

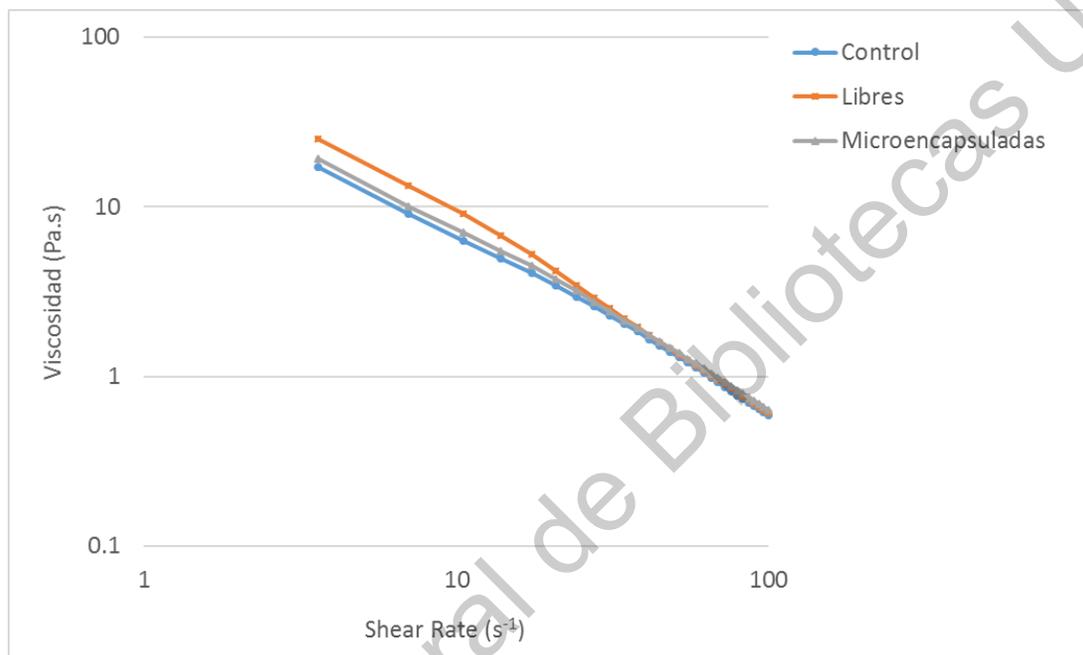


Figura 9. Viscosidad aparente vs tasa de corte (Shear Rate) de las diferentes muestras de yogurt almacenado 24 h a 4°C.

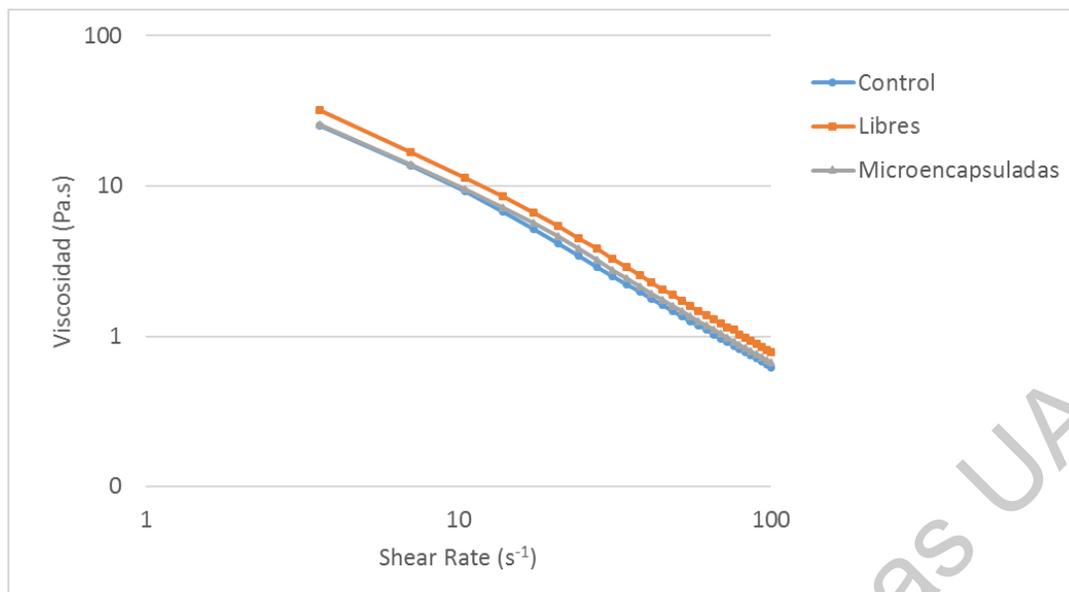


Figura 10. Viscosidad aparente vs velocidad de corte (Shear Rate) de las diferentes muestras de yogurt almacenado 2 semanas a 4°C.

### 5.8 Textura

Se determinaron los valores de firmeza y adhesividad de las muestras de yogurt a las 24 horas y después de 14 días de almacenamiento a 4°C, los cuales se presentan en el Cuadro 9. En general, la firmeza aumentó significativamente en los tres tratamientos durante el almacenamiento. La muestra de yogurt adicionada de probióticos libres mostró una diferencia significativa tanto en la firmeza y la adhesividad a las 24 horas con respecto a los otros tratamientos, pero no se observaron estas diferencias al final del período de almacenamiento.

Cuadro 9. Efecto del almacenamiento en la firmeza y adhesividad de los yogures (sin probióticos y con probióticos libres y microencapsulados).

Muestra	Firmeza (N)	Adhesividad (J)
Semana 1		
Control	2.27 ± 0.24 <sup>B</sup>	-0.79 ± 0.056 <sup>B</sup>
P. Libres	1.88 ± 0.13 <sup>C</sup>	-0.63 ± 0.023 <sup>C</sup>
P. Microencapsulados	2.54 ± 0.20 <sup>B</sup>	-0.84 ± 0.049 <sup>B</sup>
Semana 2		
Control	2.34 ± 0.13 <sup>A</sup>	-1.01 ± 0.081 <sup>A</sup>
P. Libres	2.02 ± 0.12 <sup>A</sup>	-0.88 ± 0.044 <sup>A</sup>
P. Microencapsulados	2.67 ± 0.14 <sup>A</sup>	-1.03 ± 0.101 <sup>A</sup>

Resultados expresados como los promedios ± DE (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa entre los yogures mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

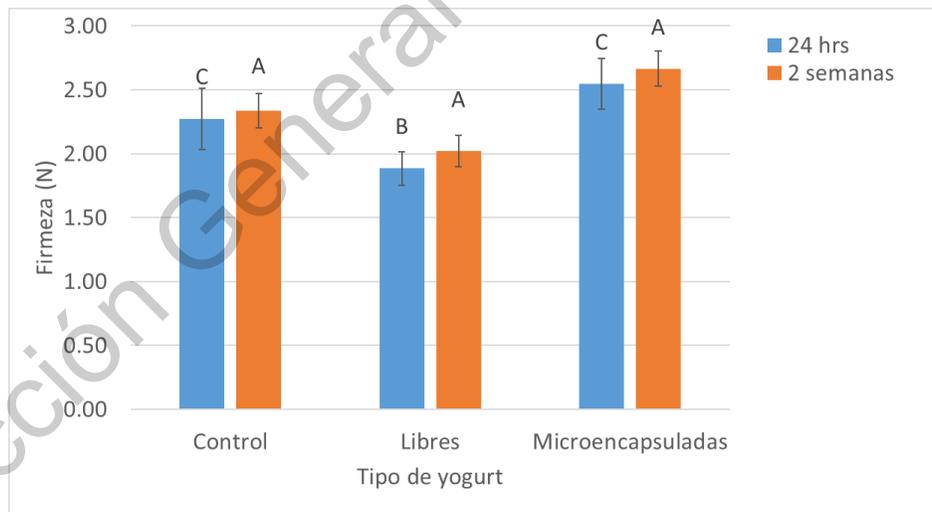


Figura 11. Firmeza de los diferentes yogures, con diferentes tiempos de almacenamiento. Resultados expresados como las medias (n=3) ± DE. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los yogures mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

## 5.9 Reología

Se llevó a cabo un estudio reológico del yogurt estilo griego. Se obtuvieron barridos de frecuencia y de deformación a las 24 horas de preparación de las muestras y a las dos semanas de almacenamiento a 4°C tomando en cuenta para el estudio de su comportamiento, que este alimento es considerado como una matriz tipo gel. Saha y Bhattacharya (2010) definen a un gel como un sistema viscoelástico con un "módulo de almacenamiento" ( $G'$ ) mayor que el "módulo de pérdida" ( $G''$ ).

En las Figuras 12 y 14 se presentan curvas de deformación. En general todos los tratamientos presentan un comportamiento no-Newtoniano ya que  $G'$  es constante a velocidades bajas de cizallamiento ("strain") pero a velocidades altas disminuyen los valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ). En las Figuras 13 y 15 se presentan curvas de frecuencia, en las cuales se observa que hay una caída en los valores de  $G'$  a mayores valores de frecuencia, mientras que a frecuencias más bajas se observa una  $G'$  más estable.

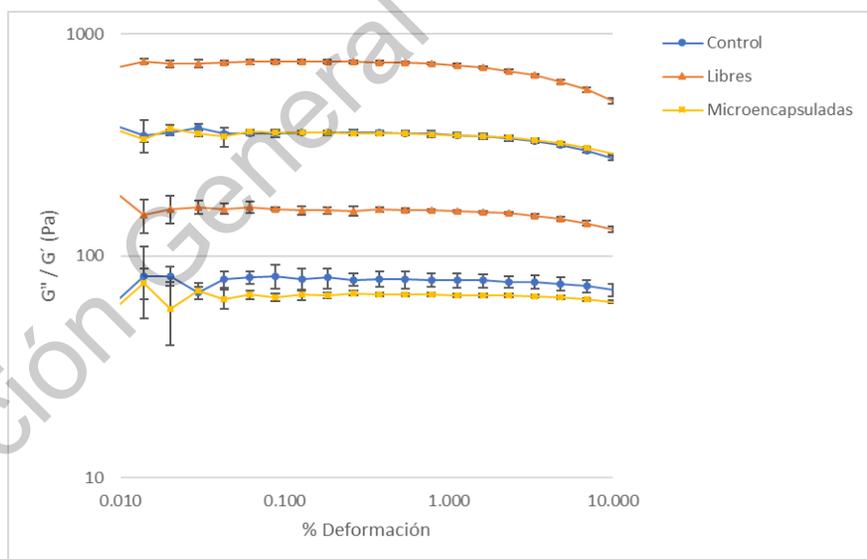


Figura 12. Barrido de deformación de las muestras de yogurt a las 24 h de su preparación. Resultados expresados como los promedios de tres réplicas  $\pm$  DE.

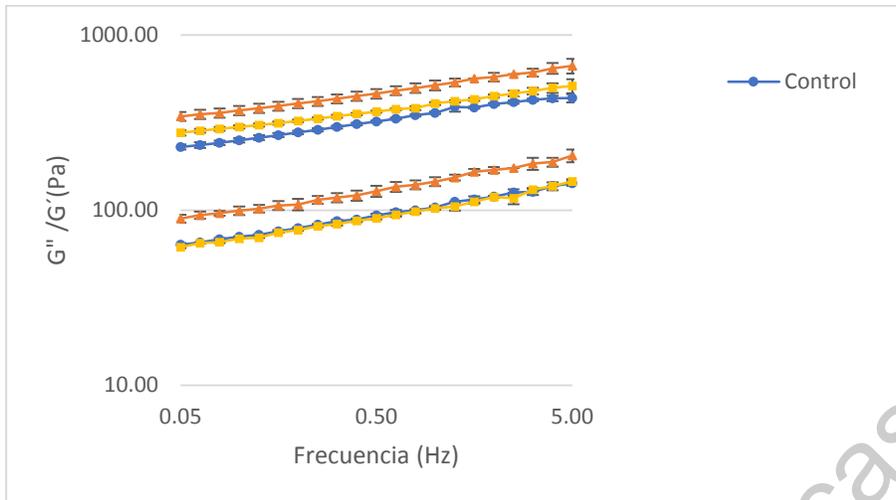


Figura 13. Barrido de frecuencia para las muestras de yogurt a las 24 h de su preparación. Resultados expresados como los promedios de tres réplicas  $\pm$  DE.

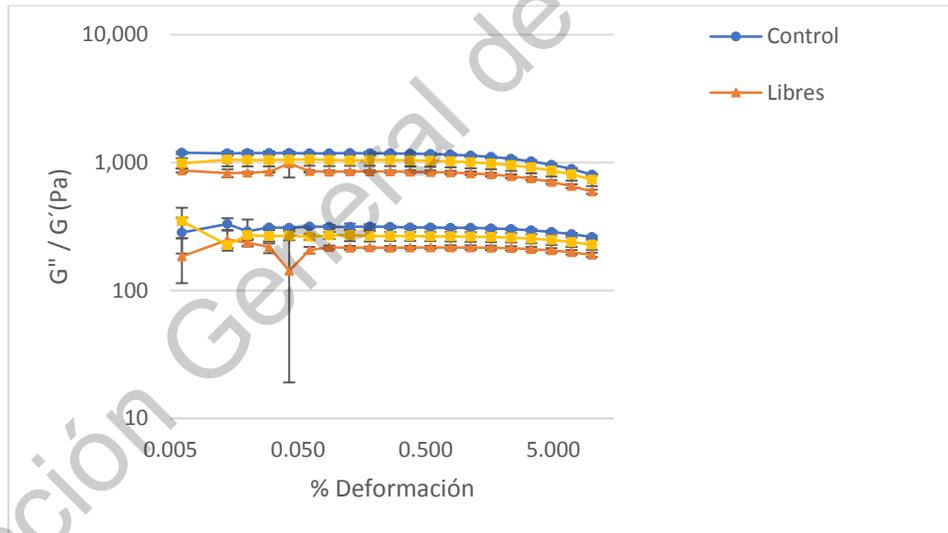


Figura 14. Barrido de deformación para las muestras de yogurt a las 2 semanas de almacenamiento. Resultados expresados como los promedios de tres réplicas  $\pm$  DE.

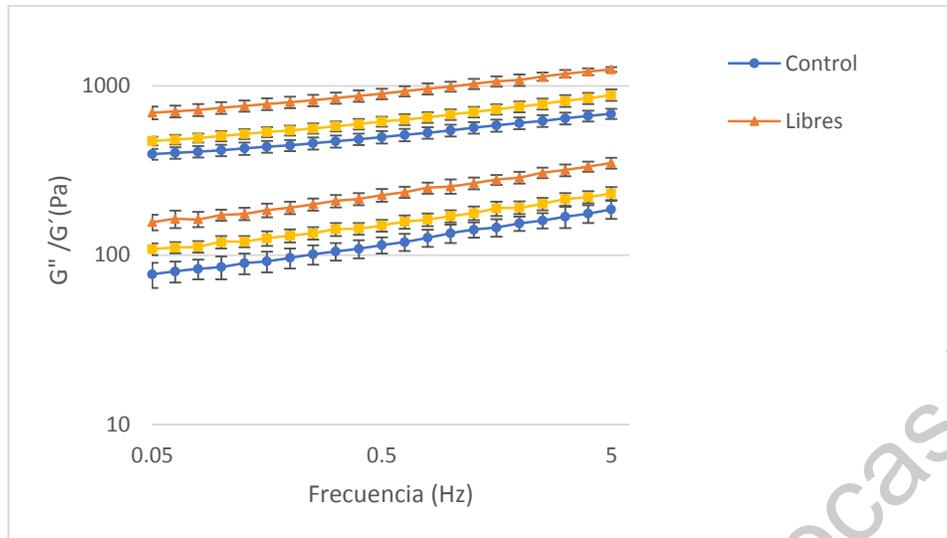


Figura 15. Barrido de frecuencia para las muestras de yogur a las 2 semanas de almacenamiento. Resultados expresados como los promedios de tres réplicas  $\pm$  DE.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis Bromatológicos

En el Cuadro 5 se puede observar que los parámetros obtenidos cumplen con las especificaciones para un yogurt de acuerdo a la NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018 ya que los valores que da la norma no son excedidos. Según Mayer et al. (2012), el porcentaje de proteína es similar a lo reportado para este tipo de productos, pero el porcentaje de grasa que tiene el yogurt formulado en este trabajo es mucho menor a lo reportado por los autores para un yogurt griego con 12 % de grasa. Esta diferencia se debe al proceso de elaboración del yogurt, ya que, en vez de concentrar los sólidos tanto grasos como no grasos mediante filtración, al yogurt formulado se le agregaron sólidos de leche (concentrado de proteína de leche). Los parámetros de humedad y cenizas comparado con los yogurts griegos tradicionales analizados por Serafeimidou et al. (2012), son similares y dentro del rango de estos productos (humedad: 79.4- 87%, cenizas: 0.71-1.1%). El valor de

humedad fue ligeramente menor debido a los sólidos añadidos para elaborar el yogurt estudiado.

## 6.2 Secado por aspersión

De acuerdo a la Figura 5, la bacteria *L. casei* ATCC 334 tuvo una ligera pérdida en su viabilidad después del secado por aspersión (0.49 ciclos logarítmicos), esto es debido a la deshidratación y la inactivación térmica de las células durante el proceso de secado.

No se encontraron registros del uso de esta técnica con el material encapsulante utilizado en este trabajo para la encapsulación de *L. casei*, sin embargo, según lo reportado por Caicedo (2010) utilizando la técnica de extrusión con alginato de sodio para la encapsulación de *L. acidophilus*, la mayor cantidad de células obtenidas fueron 6 ciclos logarítmicos con una pérdida de 0.4 unidades logarítmicas durante el tratamiento.

Gevara et al. (2009) encapsularon dos microorganismos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en una solución de maltrodextrina a 25 y 30% y se observó que la reducción de la viabilidad del microorganismo fue mucho menor para *L. reuteri* que para *L. casei* siendo la reducción de 0.62 y 2.00 ciclos logarítmicos, respectivamente.

Ivanoska et al. (2012), reportaron una pérdida de viabilidad de células de *L. casei* de 1.2 ciclos logarítmicos por gramo utilizando alginato de sodio y fructooligosacáridos como materiales encapsulantes mediante secado por aspersión, resultando en una sobrevivencia del microorganismo con ambos materiales mayor a 8 ciclos logarítmicos, similar a lo registrado en este estudio utilizando aislado de proteína de suero como matriz encapsulante.

Con estas comparaciones se puede observar que los resultados reportados por diferentes autores confirman que *L. casei* ATCC 334 soporta el proceso de secado por aspersión sin pérdidas excesivas en la viabilidad. Jiménez (2009) reportó que

esta especie en particular es muy resistente a rangos muy amplios de pH y temperatura.

### 6.3 pH y acidez titulable

De acuerdo a la NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018, el porcentaje mínimo de acidez para un yogurt es de 0.5%, por lo que el producto está dentro de lo establecido por dicha norma.

De acuerdo a lo evaluado por Serafeimidou et al. (2012), algunos yogurts griegos tradicionales tienen un rango de pH entre 4.19 y 4.64 y un porcentaje de acidez entre 0.92 y 1.3. Estos valores son comparables con los obtenidos en el yogurt control y el adicionado con probióticos microencapsulados.

Es importante tener en cuenta estos valores ya que la textura del gel de yogurt es una consecuencia del desarrollo de una red tridimensional de proteínas de la leche provocada por la reducción del pH. La disolución del fosfato de calcio coloidal y la reducción de la carga negativa neta en las micelas de caseína mejoran las atracciones y la agregación de proteínas. Las micelas de caseína crean enlaces covalentes con proteínas de suero desnaturalizadas, que junto con la disminución del pH, conducen a la formación de cadenas y la agrupación a través de enlaces hidrofóbicos y electrostáticos durante la fermentación que finalmente dan como resultado la creación de la estructura del yogurt (Lee y Lucey, 2010).

A las 24 horas del proceso de fermentación las muestras de yogurt registraron valores de pH similares (alrededor de 4.7). En el Cuadro 6 se puede observar una disminución progresiva en el pH y un aumento en la acidez titulable de las muestras de yogurt conforme aumenta el tiempo de almacenamiento. Esto es debido a una post-acidificación por la actividad metabólica de las bacterias iniciadoras del yogurt, que se ve aumentada por el metabolismo del probiótico *L. casei* ATCC 334 microorganismo que ha sido reportado como productor de ácido láctico (Velázquez et. al., 2015).

Mani-López et al. (2014) evaluaron el tiempo de fermentación y la post-acidificación en leches fermentadas con diferentes mezclas de probióticos, entre ellos *L. casei*. Según lo reportado por los autores, las bacterias probióticas retrasan el crecimiento de los cultivos iniciadores observándose una post-acidificación durante el tiempo de almacenamiento. Ellos registraron disminuciones en el pH (0.17 a 0.50 unidades) y aumentos en la acidez titulable (0.09 a 0.29%) durante un período de 35 días a 5 °C. De acuerdo a los autores la disminución del pH puede atribuirse a la actividad residual de los microorganismos.

El yogurt con probióticos sin encapsular mostró una mayor disminución de pH y un mayor aumento de acidez, mostrando diferencias significativas con los otros dos tratamientos. La microencapsulación del probiótico previno una mayor post-acidificación en el producto, comparable a la del control sin probiótico.

#### 6.4 Sinéresis

La sinéresis espontánea es un defecto visible importante, que aparece como una acumulación de suero en la superficie de los geles de yogurt y puede afectar adversamente la aceptabilidad del producto por parte del consumidor. La sinéresis es un defecto común en el procesamiento de productos lácteos fermentados. La evaluación de la sinéresis es especialmente importante durante el almacenamiento. Las causas más importantes de su aparición en productos fermentados incluyen el uso de altas temperaturas de incubación, bajo contenido de sólidos o temperaturas de almacenamiento inadecuadas (Bosena et al., 2017).

Se midió el grado de sinéresis de las muestras de yogurt adicionadas de probióticos y el control durante un tiempo de almacenamiento de tres semanas a 4°C. Todas las muestras de yogur mostraron un grado variable de sinéresis inducida mediante centrifugación, entre 8 y 10% (Figura 6). Siendo la muestra de yogurt adicionada de bacterias libres la que mostró la menor sinéresis a las 24 horas de almacenamiento, sin embargo, esta muestra tuvo una tendencia a

incrementar el porcentaje inicial de sinéresis, de casi el doble, cuando este parámetro fue medido al final del almacenamiento (3 semanas). Las muestras de yogurt control y adicionada de bacterias microencapsuladas no mostraron diferencias significativas en este parámetro durante el tiempo de prueba.

La reducción del pH durante el almacenamiento resulta en una mayor contracción de la red de caseína debido a la reducción en la carga negativa neta de las micelas que la forman, lo que lleva a una disminución en la repulsión electrostática entre las moléculas cargadas y un aumento en las atracciones de caseína debido a las interacciones hidrófobas, lo que resulta en consecuencia, en una mayor expulsión de suero de la red proteica (Sah et al., 2016).

Los resultados de sinéresis muestran una correlación con los valores de pH y acidez registrados durante el almacenamiento de las muestras de yogurt. Como se mencionó anteriormente la muestra adicionada de probióticos libres presentó el mayor porcentaje de sinéresis al final del período de prueba alcanzando un valor de pH de 3.8. Una liberación acelerada de fosfato de calcio coloidal de las micelas de caseína debido a una velocidad de acidificación más rápida induce la liberación temprana de las caseínas individuales de las micelas, lo que facilita el desarrollo temprano de la red de caseína (Lee y Lucey, 2010). Esto conduce a una rápida agregación de proteínas que da como resultado la formación de un pequeño número de enlaces de proteínas y un extenso reordenamiento de las partículas / agrupaciones y, en consecuencia, un gel débil con poros grandes y una mayor separación de suero (Sah et al., 2016).

#### 6.5 Evaluación de la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en muestras de yogurt estilo griego almacenadas a 4°C.

En la Figura 7 se muestra el comportamiento de la viabilidad de las bacterias probióticas encapsuladas y sin encapsular en el yogurt durante su almacenamiento a 4°C por 3 semanas. En general el recuento de las células

mostró que el probiótico mantuvo su viabilidad durante el almacenamiento en ambos tratamientos. Se observó una estabilidad mayor de las bacterias probióticas microencapsuladas que incrementaron su número al final del almacenamiento, mostrando una diferencia significativa con respecto a las bacterias libres.

Un comportamiento similar lo obtuvieron Dimitrellou et al. (2016), al evaluar la sobrevivencia de *L. casei* ATCC 393 microencapsulado mediante secado por aspersión con leche descremada reconstituida y el probiótico sin encapsular, en leche fermentada. Los autores obtuvieron niveles más altos de células microencapsuladas en comparación con las células libres, especialmente después de 3 semanas de almacenamiento a 4 °C.

Aunque se mantuvo la viabilidad de las bacterias al final del almacenamiento, en la segunda semana hubo una ligera disminución en el número de bacterias en ambas muestras. Esto es comparable con los resultados obtenidos por Mani-López (2014), quienes reportaron disminución de *L. acidophilus* en yogur y leche fermentada de 1,5 y 1 ciclos logarítmicos respectivamente, durante el almacenamiento (35 días a 5°C). Los autores atribuyeron esta disminución al cese de la actividad metabólica de las bacterias debido al almacenamiento prolongado.

Cabe mencionar que, por los valores obtenidos, el producto tiene las propiedades para ser considerado como un alimento funcional al final del almacenamiento de tres semanas, ya que para que un alimento probiótico tenga un efecto benéfico en la salud deberá contener una población mínima de  $10^6$  células viables por gramo de producto. Esta capacidad es posible gracias a factores como el almacenamiento en frío (4°C), que hace que las células entren en un estado de latencia. (Bernal et al, 2017).

## 6.6 Tolerancia a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal

Las muestras de yogurt con los probióticos fueron expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas después de 21 días de almacenamiento. Se puede observar en la Figura 8 que a condiciones gástricas simuladas (pH 2) no hubo diferencias significativas en la viabilidad de las bacterias en ambos tratamientos después de 2 horas de exposición. Este comportamiento fue descrito por Castro (2010), quien reportó que las bacterias se encuentran adaptadas a un pH ácido dentro del alimento vehículo (el yogurt tiene un pH entre 4.7 y 3.8 durante el almacenamiento) antes de la adición del jugo gástrico.

Al exponer las muestras de yogurt a condiciones intestinales simuladas (pH 8), se puede observar que si hubo una disminución significativa en la viabilidad de las bacterias, la cual fue más pronunciada en la muestra de yogurt con bacterias sin encapsular. Al término del período de exposición las bacterias probióticas libres y microencapsuladas mostraron una disminución general de 4.32 y 2.35 ciclos logarítmicos respectivamente. Estos datos muestran el efecto protector del proceso de microencapsulación sobre las bacterias probióticas.

Los resultados del ensayo muestran que las bacterias sufren un estrés debido al cambio drástico de pH a condiciones alcalinas y adicionalmente *Lactobacillus casei* fue vulnerable a las fases de ensayo que contienen bilis. La bilis tiene el potencial de influir en los fosfolípidos y las proteínas de las membranas celulares y distorsionar la homeostasis celular, además de socavar la estabilidad de las macromoléculas, lo que evidenció una disminución en la supervivencia de bacterias libres. (Gheisari et al., 2018).

En este estudio se manejaron condiciones extremas con respecto al cambio de pH, lo que resultó en una disminución considerable de bacterias con la adición del jugo gástrico intestinal simulado. Es importante considerar que esto no necesariamente es lo que corresponde a las condiciones gastrointestinales reales en humanos, en donde los cambios de pH durante el proceso de digestión gradual. Los cambios graduales de pH durante la exposición de probióticos a

condiciones simuladas del tracto gastrointestinal han resultado en una menor disminución en la viabilidad de las bacterias. Madueira et al. (2011) evaluaron la sobrevivencia de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en queso fresco al ser sometido in vitro a condiciones secuenciales que son paralelas a los cuatro pasos principales de la digestión: boca (saliva artificial, pH 6.9), esófago-estómago (jugo gástrico artificial, pH de 5.5 a 2), duodeno (jugo intestinal artificial, pH 5) e íleon (pH 6.5). En el estudio realizado por los autores se observó una disminución (ambas cepas tuvieron una disminución de 2 ciclos logarítmicos después de ser sometidas a las condiciones de digestión).

Considerando que *L. casei* ATCC 394 microencapsulado (este estudio) tuvo una reducción de 2.34 ciclos logarítmicos durante su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas aún con los cambios drásticos de pH del jugo gástrico y jugo intestinal simulados, un cambio gradual de pH puede tener como resultado una menor reducción en la viabilidad de las bacterias, lográndose una tasa de sobrevivencia mayor.

### 6.7 Viscosidad aparente

Al evaluar la viscosidad aparente en las muestras de yogurt a las 24 horas y a las 2 semanas de almacenamiento (Figuras 9 y 10) los valores de viscosidad aparente de las muestras de yogurt disminuyeron a medida que se incrementó la tasa de corte ( $s^{-1}$ ) lo que indica que la muestra tiene un comportamiento de fluido no Newtoniano (Pinto et al., 2017). Una disminución en la viscosidad aparente con un incremento en la tasa de corte (pseudoplasticidad) también ha sido observada previamente en otros estudios, para yogurt enriquecido con ácidos grasos poli-insaturados, yogur con calcio y fibra, así como yogur con cajeta, entre otros muchos estudios (Reyes y Vélez-Ruíz, 2015).

Las mediciones de viscosidad del tiempo cero se realizaron después de 24 horas del proceso de fermentación. En este punto se observó una diferencia significativa en la viscosidad de los tres tratamientos (con células microencapsuladas, células

libres y control sin células adicionadas). El tratamiento adicionado de células microencapsuladas exhibió la mayor viscosidad seguido del tratamiento control. (Ruiz y Ramírez, 2009).

También se pudo observar que hubo un incremento de la viscosidad en las muestras de yogurt después de 2 semanas de almacenamiento, lo cual coincide con las curvas de deformación realizadas. El incremento de viscosidad en el yogurt se debe a la agregación de las proteínas provocada por el incremento de acidez formando así un producto cremoso (Pinto et al., 2017). Algunos autores han establecido que la influencia de varios factores durante el almacenamiento, tales como la capacidad de retención de agua y formación de pequeños agregados de microcristales pueden tener cierto efecto en el comportamiento reológico de los sistemas alimentarios. (Reyes y Vélez-Ruiz, 2015).

#### 6.8 Textura

La textura es un atributo importante de la calidad del yogurt. La estructura del gel de yogurt es el resultado de la agregación de caseína por la reducción del pH y la unión de disulfuro entre las k-caseínas y las proteínas de suero desnaturalizadas. (Sah et al., 2016).

Los valores de firmeza y adhesividad del yogurt durante 14 días de almacenamiento a 4 °C se presentan en el cuadro 9. Se puede observar una tendencia de los tres diferentes tratamientos, yogurt adicionado de probióticos microencapsulados y sin encapsular, así como el control, a incrementar ambos parámetros con el transcurso del tiempo de almacenamiento. Los datos registrados del control y yogurt adicionado de bacterias microencapsuladas no mostraron diferencias significativas al inicio y final del tiempo de prueba, mientras que el yogurt con probióticos sin encapsular mostró diferencias significativas entre las dos mediciones, incrementando los valores de ambos parámetros evaluados. Al final del almacenamiento ya no se registraron diferencias significativas entre los tres tratamientos en ambos parámetros.

Un aumento en la firmeza durante el almacenamiento podría estar relacionado con una mayor reducción del pH que probablemente resultó en la contracción de la estructura del gel, con la consiguiente elevación de la resistencia. El gel de yogurt semisólido que resulta de la fuerza del gel elevada, puede mostrar propiedades de red relativamente dinámicas que son susceptibles de reordenación estructural. (Sah et al., 2016).

En el caso de la adhesividad, los valores de firmeza más grandes generalmente se asocian con valores de adhesión bajos, esta variación se debe al mismo motivo que la firmeza ya que la adhesividad está fuertemente vinculada a la firmeza. Mani-López et al. (2014) reportaron en un estudio acerca de la estabilidad de distintos probióticos en yogurt y leches fermentadas durante el almacenamiento, que valores de adhesividad de  $-0.024$  a  $-0.049$  N · s, se relacionan con geles blandos. Los geles con adhesividad de  $-0.073$  a  $-0.147$  N · s se perciben como consistentes, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el yogurt estilo griego de este estudio.

## 6.9 Reología

En las Figuras 12 y 14 se presentan curvas de deformación. En ellas se observa para los tres tratamientos, que  $G'$  es más estable a valores de cizalla menores. El comportamiento anterior es el resultado de rearrreglos microestructurales, ya que a velocidades bajas de cizallamiento existen interacciones partícula-molécula que dan como resultado la formación de una red que ofrece una mayor resistencia (valores más altos de  $G'$ ), sin embargo, a velocidades altas de cizallamiento se pueden superar estos efectos y como consecuencia las moléculas y polímeros se reorganizan, mostrando una tendencia de los agregados a descomponerse. Una consecuencia de estos reordenamientos será una disminución en la interacción molécula-partícula, que contribuyen a una disminución de  $G'$  (Malver, 2016).

En las Figuras 13 y 15 se presentan curvas de frecuencia, se puede apreciar que existen diferencias cuantitativas en las gráficas para las magnitudes de los

parámetros viscoelásticos de las muestras de yogurt y un incremento en ambos módulos al ir aumentando la frecuencia siguiendo un comportamiento constante; este comportamiento también fue apreciado por Ramírez-Sucre y Vélez-Ruiz, (2013) en yogurts adicionados con caramelo.

Los valores de  $G'$  y  $G''$  mostraron dependencia de la frecuencia,  $G'$  fue mayor que  $G''$  en el rango de frecuencias estudiadas (0.05 – 5.0 Hz) para las 3 muestras de yogurt, lo que es característico de un gel débil, que es típico del yogurt (Meyer et al. 2011). Los mayores valores de  $G'$  se encontraron en el yogurt elaborado con los probióticos libres; esto concuerda con los valores obtenidos en la curva de deformación a las 24 horas (Figura 12) para este tratamiento.

En general se observó que los valores de  $G'$  y  $G''$  para todos los tratamientos se incrementaron después de las 2 semanas de almacenamiento. Este comportamiento también fue observado por Sah et al. (2016). al analizar muestras de yogurt fortificado con fibra en polvo de cáscara de piña durante su almacenamiento por 28 días.

En la Figura 14 se muestran las curvas de deformación a las 2 semanas de almacenamiento de los tres tratamientos, en las cuales se puede apreciar que los valores mayores de  $G'$  y  $G''$  corresponden a las muestras de yogurt control y la adicionada de probióticos microencapsulados respectivamente. Mayores valores de  $G'$  representan que estas muestras de yogurt tienen una estructura que requiere de mayores esfuerzos de cizalla para su deformación. En la figura 15 se muestran las curvas de frecuencia a las 2 semanas de almacenamiento, en ellas se puede observar que los valores mayores de  $G'$  y  $G''$  corresponden a la muestra de yogurt con los probióticos libres, por lo que se puede decir que es un gel más compacto. Este comportamiento se debe a que hubo una mayor disminución de pH en esta muestra, y al tener el pH más bajo se tiene un gel más firme ya que la reducción del pH resulta en una mayor contracción de la red de caseína (Sah et al., 2016). Este comportamiento también fue observado por Acevedo et al. (2014) en sueros costeños elaborados en zonas de Colombia, estos autores atribuyen

esta conducta a la formación de un gel por parte de las caseínas de la leche que atrapa la grasa presente.

## 7. CONCLUSIONES

A través de este trabajo se pudo demostrar que el secado por aspersión es una técnica adecuada para microencapsular el microorganismo *L. casei* ATCC 334 en una matriz polimérica de aislado de proteína de suero, registrándose una reducción de la cuenta viable de sólo 0.45 ciclos logarítmicos, con una sobrevivencia > a 94%.

El yogurt tipo griego fue un buen alimento vehículo para *L. casei* ATCC 334 en su forma libre y encapsulada, registrándose un número de bacterias viables mayor a  $10^{10}$  UFC/g después del almacenamiento a 4°C durante tres semanas en ambos tratamientos. Durante este período se registró una disminución de pH y aumento de acidez en las muestras que corresponde a una post-acidificación después del período de fermentación, siendo la muestra adicionada de probióticos libres la que mostró los mayores valores de acidez y de sinéresis.

La microencapsulación del probiótico mediante secado por aspersión en una matriz polimérica de aislado de proteína de suero confirió protección al microorganismo durante su exposición a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal mostrando diferencias significativas con el probiótico no encapsulado. La muestra con el microorganismo microencapsulado conservó la propiedad de ser un alimento probiótico ( $>10^6$  UFC por gramo).

El análisis de textura mostró que los tres tratamientos incrementaron los valores de firmeza y adhesividad durante el almacenamiento. El tratamiento adicionado de probióticos microencapsulados exhibió valores ligeramente más altos en ambos parámetros comparado con los otros tratamientos, no observándose una diferencia significativa entre los tres tratamientos al final del almacenamiento.

Los valores de viscosidad aparente mostraron un incremento de este parámetro en los tres tratamientos a lo largo del almacenamiento.

El análisis reológico confirmó que el yogurt estilo griego es un fluido no Newtoniano. Las curvas de deformación mostraron un incremento en los parámetros de  $G'$  y  $G''$  a las dos semanas de almacenamiento en las muestras de yogurt adicionado de probióticos sin microencapsular, microencapsulados y control.

Las características de textura, viscosidad y propiedades reológicas registradas en la muestra del probiótico microencapsulado mostraron propiedades deseables de un yogurt estilo griego, las cuales no se vieron afectadas por la adición del microorganismo, conservándose la firmeza y consistencia del producto final. Esta muestra de yogurt exhibió características similares al control.

## 8. REFERENCIAS

**Acevedo**, D. y otros dos autores. Caracterización reológica del suero costeño de Turbaco, Arjona, El Carmen de Bolívar y uno comercial (Colombia). *Inf Tecnol.* **2014**; 25(3): 3-10

**ADA**. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J Am Diet Assoc.* **2009**; 109: 735-746.

**Al-Kadamany**, E., Khattar, M., Haddad, T., & Toufeili, I. Estimation of shelf-life of concentrated yogurt by monitoring selected microbiological and physicochemical changes during storage. *Food Science and Technology.* **2003**; 36(4): 407–414.

**Alvídrez-Morales**, A., González-Martínez, B.E., Jiménez-Salas, Z. Tendencias en la producción de alimentos: Alimentos Funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición.* **2002**; 3 (3).

**Araya**, H., Lutz, M. Alimentos Funcionales y Saludables. *Revista Chilena de Nutrición.* **2003**; 30 (1).

**Baeza Vallejo**, M.A. Determinación del efecto prebiótico de la harina de semilla de linaza (*Linum usitatissimum* L.), evaluado a través de dos microorganismos probióticos, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en aerobiosis. Universidad Austral de Chile. **2008**.

**Barnes**, H., A handbook of elementary rheology, 1a edición, Cardiff, Wales UK: University of Wales, Institute of non Newtonian fluid mechanics. **2000**; 83-88.

**Bernal** Castro C., Díaz-Moreno C., Gutiérrez-Cortés C. Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Rev. chil. nutr.* **2017**; 4(4):384-392

**Bosnea**, L. A., Kopsahelis, N., Kokkali, V., Terpou, A., & Kanellaki, M. Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of L. casei enriched fresh apple pieces,

dried raisins and wheat grains. Food and Bioproducts Processing. **2017**; 102: 62–71.

**Caicedo**, Y.M. Estudio de la viabilidad de la incorporación de bacterias probióticas microencapsuladas en helados. Universidad Nacional de Colombia. **2010**.

**Campora** C. Alimentos funcionales: tecnología que hace la diferencia. RIA. **2016**; 42: 131-137.

**Castro**, A.L. 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. Universidad Autónoma de Querétaro. **2010**.

**Champagne**, C. P., y N.J. Gardner. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. Crit Rev Food Sci Nutr. **2005**; 45:61-84.

**Charteris** W., Kelly P., Morelli L., Y Collins J.. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Lactobacillus Species. J.F.P. **1998**; 61(12): 1636-1643.

**Chávarri**, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. del C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. International Journal of Food Microbiology, **2010**; 142(1-2): 185–189.

**Chávez**, C., Noguez, M., Rubio M.,& Burgos, J. Reología y sistemas farmacéuticos. 1a. edición. México: Asociación Farmacéutica Mexicana A.C. **2003**.

**Dalel Pineda**,M.C., Zambrano Esguerra, C. Evaluación del efecto conservador de la aplicación directa de *Lactobacillus casei* y de sustancias blis sobre carne bajo condiciones de refrigeración. Universidad de la Sabana. **2002**.

**De Prisco**, A., Mauriello, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. Trends in Food Science & Technology. **2016**; 48: 27-39.

**Desai, N. T.,** Shepard, L., & Drake, M. A. Sensory properties and drivers of liking for Greek yogurts. *Journal of Dairy Science*. **2013**; 96(12): 7454–7466.

**Dimitrellou, D.,** Kandyliisa, P., Petrović, T., Dimitrijević-Branković, S., Lević, S., Nedović, V., Kourkoutas, Y. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. *LWT - Food Science and Technology*. **2016**; 71: 169-174.

**Domínguez-Soberanes, J.,** García Garibay, M., Casa Alencaster, N. B., & Martínez Padilla, L. P. Instrumental texture of set and stirred fermented milk. Effect of ropystrain of *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* and an enriched substrate. *Journal of Texture Studies*. **2002**; 32(3): 205-217.

**El-Salam, M.H.A. y** El-Shibiny, S. Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. *Dairy Science and Technology*. **2015**; 95:393-414.

**Farnsworth, J.;** Hendricks, G.; Gotcheva, V.; Akuzawa, R.; Guo, M. Effects of enzymatic crosslinking on the consistency and structure of probiotic goat milk yogurt. *Journal of Dairy Science*. **2002**; 85(Suppl.1): 120.

**Ferrer Lorente, B.,** Dalmau Serra, J. Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediátrica Española*. **2001**; 59: 150-155.

**Gardini, F.,** Lanciotti, R., Guerzoni, M. E., y Torriani, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii sub sp. bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *International Dairy Journal*, **1999**; 9(2):125-134.

**Gharsallaoui, A.,** Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. **2007**; 40(9): 1107–1121.

**Gheisari, H.,** Davar, M., & Shekarforoush, S. Stability of Microencapsulated *Lactobacillus Casei* in Mango Fruit Juice and its Survival at Simulated Human

Gastro-Intestinal Condition. International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences. **2018**; 7(1):64-71.

**Ghorban** Shiroodi, S., Amin Mohammadifar, M., Ghorbani Gorji, E., Ezzatpanah, H., & Zohouri, N. Influence of gum tragacanth on the physicochemical and rheological properties of kashk. Journal of Dairy Research, **2012**; 5(143): 93-101.

**Goin**, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends Food Sci Tech. **2004**; 15: 330-347.

**González**, R., Pérez, J, & Urbina N. Efecto de la Microencapsulación sobre las Propiedades Reológicas y Fisicoquímicas del Yogurt Blando, información tecnológica. **2014**; 25(6), 45-56.

**Guevara**, A., López, A., Jiménez, T. Optimización de la encapsulación de *L. casei* y *L. reuteri* con maltodextrina en un secador por atomización. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en Puebla. **2009**.

**Hernandez**, A. Microbiología Industrial. EUNED. 1ª ed, **2003**; Mexico: 66-68.

**Hernández-Rojas** M. & Vélez-Ruiz, J.F. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. Temas selectos de ingeniería de alimentos. **2014**; 8-12: 13-22.

**Huang**, S., Vignolles, M., Dong-Chen X., Le-Loir, Y., Schuck, G., Jeantet, R. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. Trends in Food Science & Technology. **2017**; 63: 1-17.

**Huq**, T., Khan, A., Khan, R., Riedl, B. y Lacroix, M. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. Critical Review Food Science Nutrition. **2013**; 53:909-916.

**Illanes**, A. Alimentos funcionales y biotecnología. Revista Colombiana de Biotecnología. **2015**; 17(1): 5-8.

**Ivanovska**, T.P., Petrusevska, L., Dabevska, M., Geskovski, N., Grozdanov, A., Stain, C., Stafilov, T., Mladenovska, K. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in chitosan-Ca-alginate microparticles using spray-drying method. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. **2012**; 31, 1: 115-123.

**Jimenez**, A. Efectos de diferentes farmacos sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei*. Instituto Politecnico Nacional, Escuela de Ciencias Biologicas. **2009**.

**Kailasapathy**, K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. Curr. Issues Intest.Microbiol.**2002**; 3: 39-48.

**Kailasapathy**, K. Y Chin, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunol Cell Biol.* **2000**; 78: 80–88.

**Karam**, M. C., Gaiani, C., Hosri, C., Burgain, J., & Scher, J. Effect of dairy powders fortification on yogurt textural and sensorial properties: a review. Journal of Dairy Research, **2013**; 80:400–409.

**Krasaekoopt**, W., Bhandari, B., y Deeth, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt: a review. International Dairy Journal. **2003**; 13(1):3–13.

**Lange**, G. Development of a yogurt powder formulation that can produce a recombined product with physicochemical and rheological properties similar to those found in commercial Greek-style yogurts. Tesis de Maestría. University of Alberta, Alberta, Canada. **2013**

**Lee**, W. J. & Lucey J. A. Formation and Physical Properties of Yogurt. Asian-Aust. J. Anim. Sci. **2010**; 23(9):1127-1136.

**Madureira**, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. Food Research International. **2011**; 44(1): 465–470.

**Magenis**, R. B., Prudencio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Cerqueira Junior, N. G., Oliveira, R. V. B., Soldi, V., & Benedet, H. D. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science and Technology*, **2006**; 41: 560–568.

**Malvern**. A basic introduction to reology. Worcestershire, UK: Malvern Instruments Limited. **2016**.

**Mani-López**, E., Palou, E., & López-Malo, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **2014**; 97(5): 2578–2590.

**Maragkoudakis**, P., Miaris C., Rojez P., Manalis N., Magkanari F., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. *Inter. Dairy Jour.* **2006**; 16: 52–60.

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

**Mayer**, S. De compras para la salud: Yogurt, publicaciones del Departamento de FoodScience and Human Nutrition. **2012**: 12(1): 5.

**Méndez**, M., Nuñez, M., & Solorza, J. Introducción a la reología, 1a. edición. México D.F: Instituto Politécnico Nacional. **2001**; 79-90.

**Meyer**, D. y otros tres autores. Inulin as texture modifier in dairy products. *Food Hydrocol.* **2011**; 25: 1881–1890.

**Mezger**, T. The Rheology Handbook. Vincentz Network, Hanover. **2014**

**Millone**, M.V., Olagnero, G.F., Santana, E.C. Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria. *DIAETA*. **2011**; 29 (134): 7-15.

**Moineau-Jean**, A., Champagne, C. P., Roy, D., Raymond, Y., & LaPointe, G. Effect of Greek-style yoghurt manufacturing processes on starter and probiotic bacteria populations during storage. *International Dairy Journal*. **2019**; 93: 35-44

**Mortazavian**, A., R.S. Hadi, M.R. Ehsani y S. Sohrabvandi. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran J Biotechnol*. **2007**; 5 (1): 1-18.

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

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

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

Norma Mexicana **NMX-F-387-1982**. Alimentos. Leche fluida determinación de grasa butírica por el método de Gerber.

Norma Oficial Mexicana **NOM-181-SCFI-2010**, Yogurt-denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.

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

**Nsabimana**, C., Jiang, B. O., Kossah, R. Manufacturing, properties and shelflife of labneh: a review. *International Journal of Dairy Technology*. **2005**; 58(3): 129–137.

**Ozer**, B. Production of concentrated products In Tamime, A. Y. Fermented milks. Ames, Iowa, United States. **2006**; 4:128-155.

**Parra Huertas**, R.A. Review. Bacterias Acido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. **2010**; 8 (1): 93-105.

**Philips**, G.O., & Williams, P.A. Handbook of Hydrocolloids. Boca Raton (Florida): CRC press. **2000**.

**Picot**, A. y Lacroix, C. Production of Multiphase Water-Insoluble Microcapsules for Cell Microencapsulation Using an Emulsification Spray-drying Technology. *J. Food Sci.* **2003**; 68(9): 2693-2700.

**Pinto** S., Cavalcante B., Verruck S., Alves L., Prudencio E. y Amboni R. 2017. Effect of the incorporation of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with sweet whey and inulin on the properties of Greek-style yogurt. *J Food Sci Technol.* **2017**; 54(9): 2804–2813.

**Ramírez**, C., Pérez, A.S., Portando, C.A. Alimentos funcionales: prebióticos y probióticos, una nueva alternativa para la salud. *Rev. C. C. Méd.* **2006**; 9: 49-52.

**Ramírez-Sucre**, M. y F. Vélez-Ruiz. Physicochemical, rheological and stability characterization of a cheramel flavored yogurt. *Food Sci Technol.* **2013**; 51:233-241.

**Reyes**, C., Vélez-Ruiz, J. Propiedades Fisicoquímicas y de Flujo de un Yogur Asentado Enriquecido con Microcápsulas que Contienen Ácidos Grasos Omega 3 *Información Tecnológica.* **2015**; 26 (5): 87-96.

**Rocha**, C. M., Souza, H. K., Magalhães, N. F., Andrade, C. T., & Gonçalves, M. P. Rheological and structural characterization of agar/whey proteins insoluble complexes. *Carbohydrate Polymers.* **2014** ; 110: 345-353.

**Rodríguez** R., Y. A., Rojas G., A. F., & Rodríguez B., S. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Biosalud.* **2016**; 15(2): 106–115.

**Romero**, S. y Mestres, J. Productos lácteos: Tecnología, Ediciones UPC. **2004**.

**Ross**, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., y Stanton, C. Over coming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology.* **2005**; 98(6): 1410–1417.

**Ruiz**, J.A., Ramírez, A.O. Elaboración de yogurt con probióticos (*Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus acidophilus*) e inulina. Rev. Fac. Agron. **2009**; 26(2).

**Sah**, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. LWT - Food Science and Technology. **2016**; 65: 978–986.

**Saha**, D., & Bhattacharya, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. Journal Food Science Technology. **2010**; 47(6): 587-597.

**Sanz**, Y., Collado, M.C., Dalmau, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta Pediátrica Española. **2003**; 61: 476-482.

**Sbodio** O, Revelli G. Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el “monitoreo” online del proceso. Avances en la Argentina. Rev. investig. agropecu. **2012**; 38: 236-246.

**Serafeimidou**, A., Zlatanov, S., Laskaridis, K. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. Food Chemistry. **2012**; 1: 134.

**Serna-Cock**, L. y Vallejo-Castillo, V. Probiotic encapsulation. African Journal of Microbiology Research. **2013**; 7(40): 4743-4753.

**Shah**, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science. **2000**; 83: 894-907.

**Sieuwerts** S. Microbial Interactions in the Yoghurt Consortium: Current Status and Product Implications. SOJ Microbiology & Infectious Diseases. Symbiosis. **2016**; 4: 1-5.

**Silva**, E.R., Verdalet, I. Revisión: alimentos e ingredientes funcionales derivados de la leche. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. **2003**; 53 (4).

**Spreer, E.** Acidified milk products. Milk and dairy product technology. **1995** .Ed. Marcel Dekker Inc. New York : 339-363.

**Sultana, K.,** Godward, K., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, R. y Kailasapathy, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology. **2000**; 62:47-55.

**Tabilo-Munizaga, G. &** Barbosa-Cánovas, G., Rheology for the food industry. J. Food Eng. **2005**; 67: 147-156.

**Tamime, A., y** Robinson, R. Tamime and Robinson's Yoghurt (Science and technology. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited. **2007**

**Tripathy, MK y** Giri, SK. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. Journal of Functional Foods. **2014**; 9:225-241.

**Velásquez, J.,** Giraldo, G., Padilla, L., Giraldo, Y. Crecimiento de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 en suero clarificado. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. **2015**; 13: 19-27.

**Vergara Sobarzo, A.O.** Estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei* en Jugo de Pera. Universidad Austral de Chile. **2007**.

**Villena, M.J.,** Morales M.E., Gallardo V. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. ARS Pharma. **2009**; 50: 43-50.