



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Determinación de la viabilidad de *bifidobacterium spp.* microencapsulado presente en un yogurt griego probiótico

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Ingeniería Agroindustrial

AUTOR:

Saavedra Chapilliquen Gregory Martin (ORCID: 0000-0002-9076-8712)

ASESOR:

Mg. Cruz Escobedo, Antis Jesús (ORCID: 0000-0001-6371-7138)

ASESORA TÉCNICA:

Mg. León Marrou, María Elena (ORCID: 0000-0002-5083-296X)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Procesos Agroindustriales

TRUJILLO – PERÚ

2020

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones. A mi padre, que, con su apoyo incondicional, amor y confianza permitieron que logre culminar mi carrera profesional.

Agradecimiento

Quiero utilizar este espacio de este trabajo para agradecer a Dios por todas sus bendiciones, a mis Padres que han sabido darme su ejemplo de trabajo y honradez y a mi enamorada por su apoyo y paciencia en este proyecto de estudio.

También quiero agradecer a la Universidad César Vallejo, directivos y profesores por la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada una de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Índice

Carátula.....	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento.....	iii
Página del jurado	iv
Declaración de autenticidad	v
Índice.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MÉTODO.....	10
2.1.Tipo y diseño de investigación.....	10
2.2.Operacionalización de variables	10
2.3.Población, muestra y muestreo	19
2.4.Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	11
2.5.Procedimiento	12
2.6.Método de análisis de datos	16
2.7.Aspectos éticos.....	16
III. RESULTADOS	17
IV. DISCUSIÓN	22
V. CONCLUSIONES.....	24
VI. RECOMENDACIONES.....	25
REFERENCIAS	26
ANEXOS	35

RESUMEN

El *Bifidobacterium* es un microorganismo pro biótico que al ser consumidos mejoran el equilibrio microbiano en el intestino humano. En la actualidad se están incorporando como cultivos vivos en productos lácteos fermentados, incluido el yogurt, para su consumo. Debido a la sensibilidad que presenta el *Bifidobacterium* a la alta acidez, su viabilidad en el yogurt tiende a ser limitada. El objetivo del presente estudio fue determinar el tiempo de la viabilidad del *Bifidobacterium* micro encapsulado en el yogurt griego durante el almacenamiento refrigerado 4°C durante 30 días. Las células de *Bifidobacterium* vivas se encapsularon en xantano. El conteo viable de las células vivas presentes en el yogurt se llevó a cabo en las muestras preparadas de yogurt (1 muestra control y 1 con el microorganismo encapsulado, con 3 repeticiones para cada día de análisis). Los resultados del recuento viable microbiológicos mostraron una disminución de 2 Log en la población de *Bifidobacterium* sin micro encapsular, en cambio en el yogurt que contenía el *Bifidobacterium* micro encapsulado presentó un aumento de 0.6 Log, esto indicando que la micro encapsulación funciona para la preservación de estos microorganismos pro bióticos, haciendo mucho más lento su ciclo biológico, influyendo directamente en el contenido final luego de 30 días de almacenamiento.

Palabras claves: microencapsulación, probiótico, yogurt griego.

ABSTRACT

Bifidobacterium is a probiotic microorganism that, when consumed, improves the microbial balance in the human intestine. At present, they are being incorporated as live cultures in fermented dairy products, including yogurt, for consumption. Due to the sensitivity of Bifidobacterium to high acidity, its viability in yogurt tends to be limited. The objective of the present study was to determine the viability time of the microencapsulated Bifidobacterium in Greek yogurt during refrigerated storage at 4 ° C for 30 days. Live Bifidobacterium cells were encapsulated in xanthan. The viable count of the living cells present in the yogurt was carried out in the prepared yogurt samples (1 control sample and 1 with the encapsulated microorganism, with 3 repetitions for each day of analysis). The results of the viable microbiological count showed a decrease of 2 Log in the population of Bifidobacterium without microencapsular, however in yogurt that contained the microencapsulated Bifidobacterium presented an increase of 0.6 Log, this indicating that the microencapsulation works for the preservation of these probiotic microorganisms, making its biological cycle much slower, directly influencing the final content after 30 days of storage.

Keywords: microencapsulation, probiotic, Greek yogurt.

I. INTRODUCCIÓN

Los productos lácteos fermentados son una parte crucial de la dieta humana en muchas regiones del mundo. Las leches fermentadas más populares, predominantemente yogures, están hechas principalmente de leche de vaca. Sin embargo, se ha observado una creciente demanda de productos lácteos alternativos, como la leche de cabra fermentada complementada con varios ingredientes, como frutas, cereales o pro y prebióticos (1) (2). Estos alimentos funcionales que contienen prebióticas han experimentado un rápido crecimiento en el campo de los alimentos fortificados (3).

Los pro bióticos constituyen un grupo destacado dentro de los compuestos funcionales, el término probiótico solo puede usarse para productos que entregan una cantidad adecuada de microorganismos vivos bien definidos que benefician el bienestar del huésped. Los cultivos vivos incluyen organismos prebióticos y no pro bióticos. El primero incluye medicamentos prebióticas, alimentos médicos prebióticos, alimentos prebióticas y pro bióticos no orales, entre otros, mientras que los cultivos no prebióticas incluyen alimentos fermentados con un contenido microbiano indefinido (4). Estos microorganismos activos están presentes en el intestino del huésped y tienen efectos beneficiosos, como mantener el equilibrio microbiano intestinal, inhibir la invasión de patógenos y reducir la permeabilidad intestinal. En base a las importantes funciones fisiológicas de los prebióticas, los productos a base de pro bióticos se están volviendo cada vez más comunes (5) (6) (3). Se ha estudiado el efecto beneficioso de los alimentos funcionales y algunos de sus componentes en la salud del consumidor (7).

Para que se logren los efectos beneficiosos asociados con el consumo de pro bióticos, estos deben estar en cantidades apropiadas en la comida y debe consumirse diariamente (8). La federación internacional de lácteos recomienda que la concentración mínima de pro bióticos sea de alrededor de 10^6 - 10^7 UFC/ml al final de la vida útil del producto (9) (10). La compensación por posibles pérdidas durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, así como la pérdida durante el paso a través del tracto gastrointestinal pueden influir directamente en este recuento (11). Sin embargo, factores como los altos niveles de oxígeno, pH, acidez, tiempo y temperatura de almacenamiento y procesamiento causan sensibilidad y afectan directamente la viabilidad de las bifidobacterias (12). El consumo de alimentos con pro bióticos requiere de que el

consumidor esté bien informado acerca del producto, para lo cual es de gran importancia que éste lleve una descripción adecuada en su etiqueta que incluya: identificación de género y especie con sus nombres científicos reconocidos, designación de la cepa, recuento de microorganismos viables de cada cepa al final de la vida útil, condiciones de almacenamiento recomendadas, seguridad en las condiciones de uso recomendadas, dosis recomendada y la información del contacto para la vigilancia pos comercialización (13).

Ante esto, hoy en día ha habido un creciente interés mundial por la supervivencia de las bacterias prebióticas en el yogur, varios estudios han investigado la capacidad de supervivencia de los cultivos pro bióticos durante el almacenamiento refrigerado (14). (15) Informaron que la adición de ciertos ingredientes como el cacao en polvo y estabilizadores (goma guar y la dextrosa) en el helado mejoraron la viabilidad de los prebióticos al proporcionar cierta protección. Otro estudio mostró que la presencia de *Allium sativum* o *Cinnamomum verum* en el yogur mejoraba el crecimiento de las bacterias de los ácidos lácticos (16). La supervivencia y el suministro de prebióticas a tasas mejoradas, como en la matriz de queso, por ejemplo, se han mejorado mediante la aplicación de tecnologías como los métodos de micro encapsulación (17) que están disponibles industrialmente en la actualidad. El micro encapsulación por secado por pulverización se utiliza como método de protección para agregar pro biótico en varios productos lácteos. El papel protector del micro encapsulación es formar una membrana (material de pared) alrededor de las bacterias prebióticas, es decir, causando su encapsulación. (18) Señalaron que la mejora de la eficiencia de la micro encapsulación es uno de los propósitos más importantes de esta tecnología, donde el recuento de células pro bióticas viables es uno de los parámetros más importantes evaluados, por lo tanto, el proceso de secado por atomización para hacer micro cápsulas pro bióticas tiene efectos potenciales de beneficios para la salud. El sistema de encapsulación se ha desarrollado para mejorar la supervivencia de las bacterias pro biótica en consecuencia (19). En este sistema de liberación controlada por hinchamiento, el transporte de solutos a través de la red de polímeros está controlado por varios fenómenos fisicoquímicos como la formación de la capa de gel, la absorción de agua del polímero y la relajación de la cadena polimérica (20). Se ha demostrado con éxito que la encapsulación en material de pared especializado protege las células bacterianas vivas en muchos productos lácteos fermentados (21). En la micro encapsulación de bacterias pro bióticas,

es posible usar diferentes tipos de materiales encapsulan tés, también conocidos como agentes transportadores, por ejemplo, polisacáridos, proteínas y lípidos, entre otros, para protección contra las condiciones adversas mencionadas anteriormente (22) (23). Entre todos los materiales encapsulan tés, el que se usa con mayor frecuencia es la leche de vaca desnatada. Además, (24) enfatizan que la micro encapsulación mediante secado por atomización puede mejorar la supervivencia de los cultivos prebióticas durante el procesamiento y el almacenamiento y también durante su paso por el sistema gastrointestinal humano. (25) Informaron que la leche de cabra se puede utilizar con éxito como agente encapsulan te para *Bifidobacterium BB-12*, sin embargo, el uso de leche de cabra con toda la grasa en asociación con agentes prebióticos (inulina y oligofructosa) aún no se ha informado en la literatura. (26) También afirmó que la matriz de encapsulación ofrece una buena protección para los microorganismos prebióticas durante el tránsito gastrointestinal, así como de los tratamientos térmicos que pueden usarse en el procesamiento de alimentos. Además, (27) afirman que las preguntas actuales sobre la supervivencia de los microorganismos prebióticos mientras pasan por el sistema gastrointestinal o cuando se someten a tratamientos térmicos son un tema importante.

Expuesto todo lo anterior el objetivo del presente trabajo fue la evaluación del yogur griego probiótico con *Bifidobacterium spp* para garantizar el efecto funcional del micro encapsulado con quito sano y xantano mediante la viabilidad *Bifidobacterium spp* durante el almacenamiento a lo largo de 30 días.

El yogur es un producto lácteo popular que se consume comúnmente por sus beneficios nutricionales y para la salud. El yogurt consiste en proteínas de leche coagulada, principalmente caseína. Se produce tradicionalmente a partir de la fermentación de ácido láctico de la leche por acción de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus termophilus*, lo que conduce a una disminución del pH, generalmente a un valor de 4.6 o inferior, lo que induce la gelificación de las micelas de caseína. (28).

Según la Norma Técnica Peruana (202.092:2008 Leche y productos lácteos. Yogurt. Requisitos). Aplica las siguientes definiciones:

“Yogurt: El producto obtenido por fermentación láctica mediante, la acción de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus y Streptococcus salivarius subsp.

thermophilus a partir de leche pasteurizada y/o productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en su composición, pasteurizados; pudiéndose o no agregarse otros cultivos de bacterias adecuadas productoras de ácido láctico, además de los cultivos esenciales. Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto, hasta la fecha de duración mínima. Si el yogurt es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables”

La densidad de los derivados lácteos oscila entre 1.028 – 1.032 g/cm³ (29). La densidad es una característica que permanece estable durante toda la vida útil del yogurt, de acuerdo a lo reportado por (28).

El pH es la medida de la acidez o alcalinidad de un producto (concentración de iones de hidrogeno presentes). La leche tiene un pH entre 6,5–6,7 (29). Los valores de pH de un yogurt están en un rango de 3,7 a 4,5 según mencionan diversos autores, donde se produce el acetaldehído, sustancia que le confiere al yogur su sabor característico. El pH del yogurt es una de las propiedades primordiales, ya que en su elaboración se llega a disminuir el pH de la leche (6,5 - 6,7) y llegar al pH del yogurt lo cual contribuye al olor y sabor característico (29).

La acidez del yogurt varía entre 0,6-1,8% de ácido láctico (30). Este incremento de la acidez del yogurt por la producción de ácido láctico provoca la coagulación de la caseína, además afecta la textura y el sabor en el producto (30). La acidez puede expresarse en distintos grados, pero el más usado es el grado Dornic (°D); cada grado Dornic equivale a un decigramo de ácido láctico por litro (31).

La humedad es la porción de agua dispuesta en el alimento. El contenido de humedad del yogurt es de 87,8% según (32), pero el valor varía según el tipo de leche y sólidos solubles en ella.

La formación de ácido láctico proporciona al yogurt un sabor ligero y finalmente la producción de acetaldehído y de diacetilo dándole el aroma característico (31).

Un yogurt probiótico es aquel que tiene microorganismos vivos que promueven la salud y se incorporan de manera directa. Varios estudios en humanos han demostrado claramente que el yogurt que contiene bacterias viables (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus*) mejora la digestión de la lactosa y elimina

los síntomas de intolerancia a la lactosa. Las bacterias pro bióticas, son un componente de los cultivos iniciadores "termofílicos", utilizados en productos comerciales hoy en día, son principalmente miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (33). Los pro bióticos producen una amplia gama de metabolitos antimicrobianos, es decir, ácidos orgánicos, diacetil, acetona, peróxido de hidrógeno y bacteriocitas. Estas actividades contribuyen a la seguridad microbiológica al controlar el crecimiento de otros microorganismos y la inhibición de bacterias patógenas (34).

Bifidobacterium ssp. Es una de las cepas pro bióticas bien establecidas con numerosos beneficios para la salud en los seres humanos profundos (35), se ha utilizado como probiótico desde su descubrimiento durante medio siglo y se han realizado muchos estudios para aclarar su efectividad. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C a 41°C y su pH óptimo está entre los 6.5 -7. Degrada exclusivamente la glucosa y produce ácido acético y ácido láctico en una proporción de 3:2, respectivamente.

La encapsulación se refiere a un proceso que atrapa una sustancia (agente activo) en otra sustancia que conforma el material de la pared dando como resultado partículas en la escala manométrica (nano encapsulación), micrométrica (micro encapsulación) o milimétrica. La sustancia encapsulada corresponde al "núcleo", mientras que la sustancia que rodea el núcleo corresponde al "material de la pared", "agente encapsulante", "recubrimiento", "membrana", "cubierta", "cápsula", "material portador", "Fase externa" o "matriz" (36).

El micro encapsulación está destinada a proteger los compuestos bioactivos de sufrir reacciones indeseables al tiempo que mejora su funcionalidad y biodisponibilidad (37). El rendimiento de la micro encapsulación depende de las propiedades físicas y químicas del material a micro encapsular. El material del núcleo determina en gran medida la morfología de las micro cápsulas. La morfología de la estructura interna de una micro cápsula depende de los materiales de la pared y del método de micro encapsulación. Los micros cápsulas pueden ser mononucleares con múltiples capas (como capas de capas), o pueden formar grupos de micro cápsulas (38).

El objetivo principal de la encapsulación es proteger el material del núcleo de las condiciones ambientales adversas, como los efectos indeseables de la luz, la humedad y el oxígeno, lo que contribuye a un aumento en la vida útil del producto y promueve una liberación controlada del encapsulado (39). En la industria alimentaria, el proceso de

micro encapsulación puede aplicarse por una variedad de razones, que han sido resumidas por (40) de la siguiente manera: (i) protección del material del núcleo contra la degradación al reducir su reactividad a su entorno externo; (ii) reducción de la velocidad de evaporación o transferencia del material del núcleo al ambiente exterior; (iii) modificación de las características físicas del material original para permitir un manejo más fácil; (iv) adaptar la liberación del material del núcleo lentamente con el tiempo, o en un momento particular; (v) para enmascarar un sabor o sabor no deseado del material del núcleo; (vi) dilución del material del núcleo cuando solo se requieren pequeñas cantidades, mientras se logra una dispersión uniforme en el material del huésped; (vii) para ayudar a separar los componentes de la mezcla que de otra forma reaccionarían entre sí. Los ingredientes alimentarios de acidulantes, aromatizantes, edulcorantes, colorantes, lípidos, vitaminas y minerales, enzimas y microorganismos, se encapsulan utilizando.

Los materiales de encapsulación generalmente se reconocen como ingredientes seguros que se pueden usar en aplicaciones alimentarias (21). Polímeros de grado alimenticio, como alginato, quitosano, carboximetilcelulosa, la goma de xantano, el almidón, la carragenina, la gelatina y la pectina se aplican en gran medida utilizando diferentes técnicas de micro encapsulación (41) (42) (24) (43) (44). Además, existe una tendencia en desarrollo hacia el uso de la encapsulación en proteínas de la leche como la caseína (45) (46) y proteína de suero (47). El alginato es un polímero natural que se aplica con éxito como material sensible al pH para la micro encapsulación de bacterias pro bióticas (48). Sin embargo, para cumplir con muchas demandas de una encapsulación exitosa de pro bióticos, se han aplicado diferentes técnicas para aumentar la resistencia de estos microorganismos sensibles contra las condiciones gástricas, incluida la incorporación de algunos polímeros de calidad alimentaria en la matriz de alginato (42) (43) (44). (39) indica que un material de cobertura ideal debe reunir las siguientes características: (i) buenas propiedades reológicas a una concentración alta y fácil manipulación durante la encapsulación; (ii) capacidad de dispersar o emulsionar el material activo y estabilizar la emulsión producida; (iii) no reaccionar con el material a ser encapsulado tanto durante el procesado como en el almacenamiento prolongado; (iv) capacidad de sellar herméticamente y sostener el material activo dentro de su estructura durante el procesamiento y almacenamiento; (v) capacidad para impartir la máxima protección al núcleo frente a las condiciones ambientales; (vi) solubilidad aceptable en disolventes

admitidos por la industria de alimentos; (vii) carencia de reactividad química con el material activo; (viii) propiedades de solubilización de las capsulas y con propiedades de liberación del material activo de la capsula; (ix) de bajo costo y de grado alimentario. En la actualidad no existe un material de cobertura que satisfaga todos estos requerimientos, por lo cual en la práctica los materiales de pared se emplean en combinación o con adición de modificadores como secuestradores de oxígeno, antioxidantes, quelatos y surfactantes.

Existen diferentes métodos disponibles para producir micro cápsulas, en general entre los más conocidos tenemos: atomización, enfriamiento y refrigeración de aspersiones, cobertura en lecho fluidizado, liofilización, extrusión, coacervación, cristalización. Sin embargo, las principales técnicas utilizadas para micro encapsular son atomización, coacervación y extrusión (36).

La encapsulación por secado por pulverización se ha utilizado en la industria alimentaria desde finales de la década de 1950. Debido a que el secado por aspersión es una operación económica, flexible y continua, y produce partículas de buena calidad, es la técnica de micro encapsulación más utilizada en la industria alimentaria y se usa típicamente para la preparación de aditivos y sabores secos, estables (40). Para fines de encapsulación, el almidón modificado, la malto dextrina, la goma u otras sustancias se hidratan para usarse como materiales de la pared. El material del núcleo para la encapsulación se homogeneiza con los materiales de la pared. La mezcla se alimenta luego a un secador por atomización y se atomiza con una boquilla o rueda giratoria. El agua caliente se evapora en contacto con el material atomizado. Las cápsulas se recogen luego de que caen al fondo del secador (49). La forma típica de las partículas secadas por pulverización es esférica, con un rango de tamaño medio de 10-100 μm .

El concepto detrás de la microencapsulación de coacervación es la separación de fases de uno o varios hidrocoloides de la solución inicial y el depósito posterior de la fase de coacervato recién formada alrededor del ingrediente activo suspendido o emulsionado en el mismo medio de reacción (50). La encapsulación de coacervación se puede lograr simplemente con un solo soluto coloidal como la gelatina, o mediante un proceso más complejo, por ejemplo, con gelatina y goma arábiga. La coacervación compleja generalmente se asocia con formas no definidas y se considera un método costoso para encapsular ingredientes alimenticios (50); sin embargo, este proceso debería estar

relacionado con los beneficios potenciales que podría ofrecer, especialmente a los ingredientes funcionales lábiles de alto valor, como la encapsulación de polifenoles.

La cocrystalización es un proceso de encapsulación en el que la estructura cristalina de la sacarosa se modifica de un cristal aglomerado perfecto a uno irregular, para proporcionar una matriz porosa en la que se puede incorporar un segundo ingrediente activo (51). La cristalización espontánea del jarabe de sacarosa supe saturada se logra a alta temperatura (superior a 120 ° C) y baja humedad (95-97 Brix). Si se agrega un segundo ingrediente al mismo tiempo, la cristalización espontánea da como resultado la incorporación del segundo ingrediente en los espacios vacíos dentro de los aglomerados de los cristales de micro tamaño, con un tamaño inferior a 30 µm (52). Las principales ventajas de la cristalización son una mejor solubilidad, humectabilidad, homogeneidad, dispersabilidad, hidratación, anti aglomerante, estabilidad y fluidez de los materiales encapsulados (53). Otras ventajas son que los materiales centrales en forma líquida se pueden convertir en una forma de polvo seco sin secado adicional, y los productos ofrecen características de formación de tabletas directas debido a su estructura aglomerada, y por lo tanto ofrecen ventajas significativas para las industrias farmacéuticas y de dulces (40).

La tecnología de emulsión se aplica generalmente para la encapsulación de bioactivos en soluciones acuosas, que se pueden usar directamente en estado líquido o se pueden secar para formar polvos (por ejemplo, por pulverización, rodillo o liofilización) después de la emulsificación. Por lo tanto, en realidad es parte del proceso de encapsulación. Básicamente, una emulsión consiste en al menos dos líquidos inmiscibles, generalmente como aceite y agua, y uno de los líquidos se dispersa como pequeñas gotas esféricas en el otro (54). Típicamente, los diámetros de las gotitas en los sistemas alimentarios varían de 0.1 a 100 mm (55). Para obtener una solución cinéticamente estable, comúnmente se agregan estabilizadores como emulsionantes o modificadores de textura en los sistemas de emulsión. (55) Revisaron exhaustivamente el uso de esta tecnología para suministrar componentes alimenticios y nutrientes.

(56) Realizó estudios sobre el desarrollo de cultivos pro biótico deshidratado por secado spray para aplicación en alimentos. Habló que la supervivencia al secado spray y la estabilidad durante el almacenamiento son procesos complejos que resultan de la combinación de varios parámetros. La matriz alimentaria, así como muchas otras variables tecnológicas involucradas en la fabricación de cultivos pro biótico, han sido

señaladas como responsables de los cambios en su funcionalidad. Decía que las cepas ensayadas tenían mínima diferencia en la viabilidad por efecto del secado spray cuando utilizó la combinación de LPD y almidón, alcanzando valores próximos a 70 %.

(57) Realizó estudios sobre la evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como prebiótico en jugo de guayaba, la viabilidad y propiedades químicas de *L. casei* libre y encapsulado fueron evaluadas en los tiempos de 0, 4, 24, 72 y 192 horas. Las pruebas de viabilidad consistieron en almacenar jugo con bacteria libre y encapsulada (8 Log ufc/mL y 8 Log ufc/g) con el fin de observar la variación de concentración de las células bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Se demostró que después de 8 días de almacenamiento del jugo a 4 °C, las cápsulas mantuvieron una concentración de bacteria de 7,06 Log ufc/g y que almacenando un grupo por separado durante 15 días conservan una vida de anaquel en la que no se reduce su concentración.

(58) Hizo estudios sobre la micro encapsulación, vía de protección para microorganismos prebióticos. En este sentido, su investigación fue enfocada al empleo del proceso de micro encapsulación como estrategia, para mejorar la viabilidad de los prebióticos en productos y durante su paso por el tracto gastrointestinal. Dio a conocer a su vez los beneficios de la micro encapsulación de pro bióticos están dados por la facilidad de producir cultivos sensibles al oxígeno, mejorar la supervivencia cuando se exponen a soluciones gástricas, bilis, acidificación, calor, congelación, estabilidad durante el almacenamiento.

Después de revisar y analizar toda la información obtenida, y ante la siguiente problemática ¿Cuál será la viabilidad de *Bifidobacterium spp?* mediante una técnica de micro encapsulamiento de cepas en un yogurt griego prebiótico durante un almacenamiento de 30 días?; se planteó como hipótesis que el micro encapsulamiento de *Bifidobacterium spp* en yogurt griego pro biótico tendrá efecto significativo en la viabilidad de las células alcanzado así un tiempo de vida del producto mucho más largo.

Se propone el siguiente objetivo general: Determinar la viabilidad del *Bifidobacterium spp.* Micro encapsulado en un yogurt griego pro biótico durante 30 días; y al mismo tiempo 0se determinó como objetivos específicos: Micro encapsular las cepas de *Bifidobacterium spp.*; elaborar un yogurt griego pro biótico; determinar el conteo viable de UFC de *Bifidobacterium spp.* Durante 30 días cada 5 días.

II. MÉTODO

2.1. Tipo y diseño de investigación

El trabajo aplica un método cuantitativo de investigación tipo experimental-aplicada,

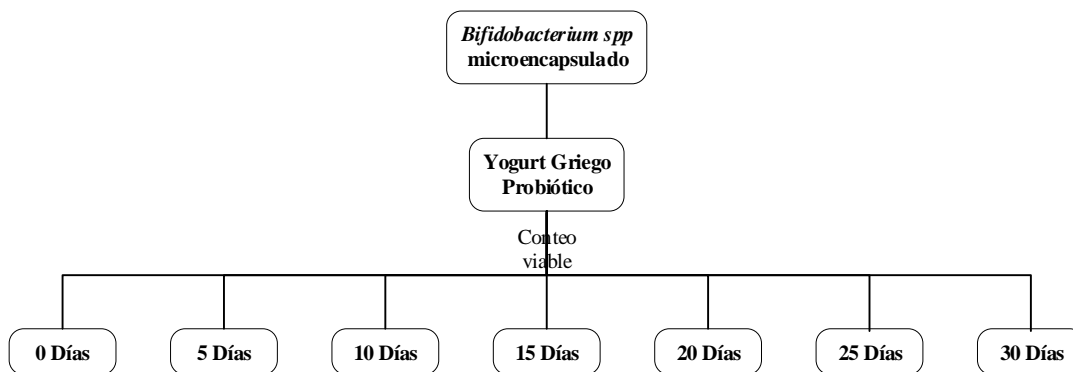


Fig. 01: Diseño de investigación

2.2. Operacionalización de variables

2.2.1. Variable dependiente

Yogurt griego probiótico inoculado con cepas de *Bifidobacterium spp* microencapsuladas.

2.2.2. Variable independiente

Concentración de *Bifidobacterium spp* durante 30 días. Ver: Anexo 1.

2.3. Población, muestra y muestreo

2.3.1. Población

Se tomó como población el yogurt griego pro biótico producido con cepas de *Bifidobacterium spp* micro encapsuladas.

2.3.2. Muestra

Se utilizó 3.150 litros de yogurt griego pro biótico inoculados con la cepa micro encapsulada, almacenado en recipientes de 150 ml cada uno. También se usó 3.150 litros de yogurt griego pro biótico sin cepa micro encapsulada y de igual manera almacenara en recipientes de 150 ml, las cuales sirvieron como muestras control.

2.3.3. Muestreo

El conteo viable se realizó desde el día 0 hasta el día 30, cada 5 días, teniendo un total 7 evaluaciones.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

Para el estudio se recolectó trabajos referentes a investigaciones como: tesis, artículos, revistas, informes, medios electrónicos, libros, etc. Todo esto se realizará para contribuir con la investigación.

❖ Análisis de la calidad de la leche para la elaboración de yogurt griego probiótico

- ✓ **Determinación de la Acidez titulable.** La acidez titulable se determinó por el método 942.15 de la Association of Official Agricultural Chemical 1997 (A.O.A.C.). Con la Titulación (AOAC 1997).
- ✓ **Determinación del PH.** Se realizó por el método del pH-metro (AOAC 1997).

Cuadro 01. Instrumentos de recolección para pH y acidez

Días	pH						Acidez (%Ac. Láctico)					
	Control			Micro encapsulado			Control			Micro encapsulado		
0	4.846	4.852	4.847	5.335	5.341	5.338	0.994	0.999	1.003	0.797	0.793	0.802
5	4.582	4.574	4.583	5.157	5.149	5.149	1.121	1.127	1.126	0.845	0.844	0.85
10	4.359	4.365	4.362	4.991	5.012	5.006	1.206	1.211	1.213	0.889	0.89	0.886
15	4.227	4.227	4.225	4.856	4.858	4.856	1.321	1.328	1.319	0.921	0.917	0.918
20	4.194	4.196	4.199	4.801	4.804	4.802	1.376	1.381	1.379	0.935	0.938	0.936
25	4.133	4.137	4.134	4.717	4.698	4.712	1.404	1.399	1.403	0.95	0.955	0.952
30	4.085	4.091	4.082	4.668	4.663	4.664	1.423	1.419	1.428	0.989	0.993	0.993

❖ Método para la encapsulación del *Bifidobacterium spp*

- ❖ Para encapsular el *Bifidobacterium spp* se siguió el método aplicado por Chen et al. (2017) con algunas modificaciones.

❖ Método para realizar el conteo viable de *Bifidobacterium spp*

- ✓ Se utilizó el procedimiento realizado por Leon (2011). Ver anexo: 02

2.5. Procedimiento

2.5.1. Microencapsulación de cepas de *Bifidobacterium spp*

Se preparó la solución de quitosano (0,7% p / v, pH 5,3), se esterilizó por autoclave (120 ° C durante 15 min) y se enfrió a 38-40 ° C. El xantano se disolvió en agua desionizada para obtener una solución madre al 0,7% (p / v), seguido de esterilización a 110 ° C durante 10 min. El cultivo de cepas que contenía x UFC/ml se suspendió en solución de xantano hasta una concentración final del 14% (v / v). Las suspensiones se extruyeron en una matriz de quitosano mediante una jeringa de tobera de 450 µm según Chen (Chen, Song, Wan, Wang y Shu, 2014). Después de 40 minutos de agitación magnética, se recogieron en micro cápsulas (XC), se enjuagaron con solución salina estéril, se filtraron y sellaron en tubos cónicos esterilizados. Se añadió la solución de xantano al 0,1% (p / v) y se mezcló con las micro cápsulas mencionadas anteriormente durante 30 minutos. Finalmente, se formaron las perlas de xantano-quitosano recubiertas con xantano y se lavaron con solución salina estéril tres veces.

2.5.2. Preparación de cultivos.

Los inóculos de cultivos pro bióticos y de iniciación se prepararon por separado, un día antes de la producción de yogur. Para hacerlo, la leche en polvo desnatada se reconstituyó en agua a 80 ° C y se enfrió a 42 ° C. Posteriormente, los cultivos se añadieron según la cantidad de yogurt que se producirá. La mezcla se incubó a 42 ° C hasta que se alcanzó el pH 4,8. Todos los inóculos se almacenaron a 4 ° C durante 12-14 h hasta la producción de yogur.

2.5.3. Producción del yogurt griego.

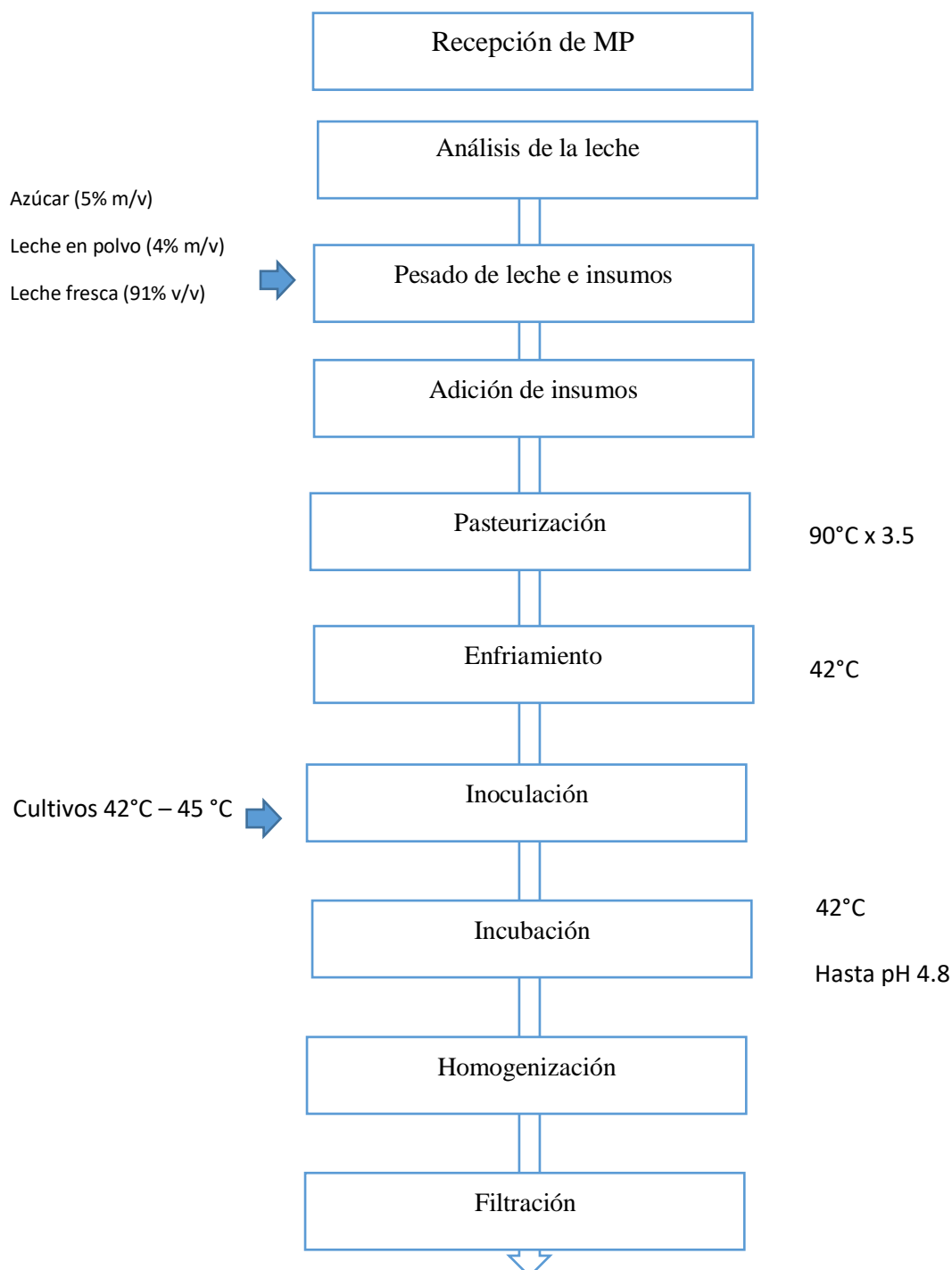
Se prepararon 2 tratamientos de yogur: Control) sin cepas encapsuladas y T1) con cepas encapsuladas. La leche se calentó a 40°C y se añadió leche desnatada en polvo al 4% para aumentar la materia seca y, en consecuencia,

mejorar la consistencia del yogur y 5% de azúcar. La mezcla se trató térmicamente a 90 ° C durante 3,5 minutos para destruir los microorganismos que podrían competir con los cultivos probados y promover la desnaturalización de las proteínas del suero, lo que reduce la contracción del coágulo y, en consecuencia, reduce la sinéresis. Después de enfriar a 42°C, los cultivos (pro bióticos y / o iniciadores) se agregaron según las diferentes formulaciones, de acuerdo con lo descrito en capítulos anteriores. La mezcla se incubó a 42 ° C hasta alcanzar un pH de 4,8. Para este propósito, el pH se verificó durante el proceso de fermentación cada 30 minutos durante dos horas y cada 15 minutos hasta pH 4.8. Después de este paso, el producto se homogeneizó manualmente, se filtró, enfrió, se envasó en los recipientes de 250 ml y se mantuvo a 4 ° C.

Descripción del proceso del yogurt griego

- **Recepción de materia prima.** – La recepción de la leche se realizó en depósitos previamente lavados y esterilizados para evitar que la leche se corte o contamine.
- **Análisis de Calidad.** – Se realizó los análisis previos (acidez, pH, °Brix) de la leche a fin de determinar la calidad de esta misma.
- **Pesado de la materia prima e insumos.** El pesado se realizó para calcular la cantidad de insumos a utilizar en la elaboración del yogurt.
- **Adición de insumos.** –Se adicionó los insumos (azúcar, leche en polvo, ácido cítrico, otros) y estos se disolvieron en su totalidad por el calor.
- **Pasteurización.** – Se mantuvo la leche a una temperatura de 90°C durante tiempo de 3.5 minutos.
- **Enfriamiento.** – Luego de la pasteurización, se hizo un cambio brusco de temperatura para que los microorganismos persistentes en la leche de tal manera sean eliminados. La leche se bajó de forma controlada, a temperaturas de 45 a 42°C.
- **Inoculación.** - Se adicionó la dilución de las bacterias lácticas (*Lactobacillus bulgáricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*). Previamente a ello se tuvo que activar las bacterias en una leche pasteurizada y pura, sin ningún tipo de insumo.
- **Incubación.** – Luego de la inoculación se llevó a reposo de incubación hasta pH de 4.8, es aquí donde se desarrolló la acidez láctica, y se formó el coagulo de las proteínas.

- **Homogenización.** – Se realizó una homogenización suave para evitar la formación de coágulos y dar un aspecto homogéneo y consistente en la mezcla.
- **Filtración.** - La filtración se realizó con mayas para separar el suero de la leche, con la finalidad de dar más color crema y consistencia al yogurt.
- **Enfriamiento.** – El Cuajo se llevó a bajas temperaturas entre 5 - 8 °C, esto se realiza con la finalidad de bajar la acidez y pH.
- **Envasado.** – Este subproceso proporcionó hermeticidad al yogurt mediante un llenado y sellado, además se realizó para que el producto sea inocuo.
- **Almacenamiento.** – El yogurt griego se almacenó a una temperatura de 4 °C, y esto permitió prolongar la vida útil.



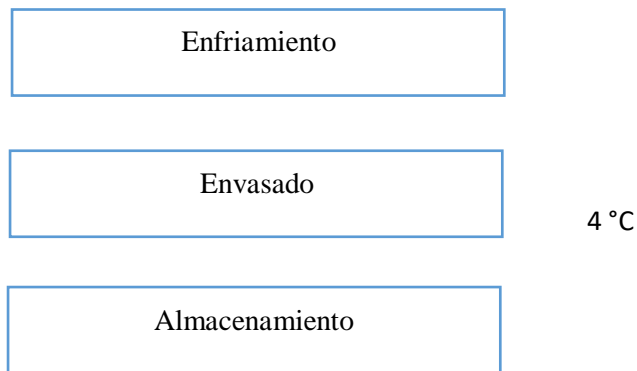


Figura 02. Diagrama de flujo para la elaboración del Yogur Griego

2.5.4. Identificación y conteo (recuento) de *Bifidobacterium spp.*

Para la identificación de *Bifidobacterium spp.* se utilizó el método de recuento en placa por siembra en profundidad, empleando como medio de cultivo agar MRS. Se agregó 5 % de antibiótico NNL compuesto por ácido nalidíxico, sulfato de neomicina y cloruro de litio, para inhibir el crecimiento de otras cepas pro bióticas y el procedimiento que se utilizó fue descrito por León (2012). Se realizó una primera dilución utilizando 90 mL de agua peptonada tamponada a la que se le añadieron 10 mL de yogurt pro biótico; a partir de la ahí, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} en tubos de 9 mL que contenían agua peptonada estéril, luego se procedió a pipetear a las placas de Petri estériles alícuotas de 1 mL de las diluciones previamente preparadas. Se preparó el medio de cultivo (esterilizó y atemperó a $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$) y se agregó a las placas de Petri en cantidad aproximada de 12 mL e inmediatamente se procedió a mezclar las alícuotas con el medio de cultivo mediante movimientos de vaivén y rotación de las placas. Una vez solidificado el agar, las placas se invirtieron e incubó en condiciones anaeróbicas a temperatura de 35 °C a 37 °C durante 72 horas. Finalmente, se realizó el recuento en placa. El recuento de *Bifidobacterium spp.* se realizó cada 5 días, durante 30 días.

2.6. Método de análisis de datos

El análisis de datos se realizó comparando cada uno los valores obtenidos durante los 30 días de análisis, para finalizar con el análisis de la curva de supervivencia de las células.

2.7. Aspectos Éticos

Las materias primas e insumos deberán tener un estricto manejo de las buenas condiciones higiénicas, al igual que al momento de elaborar el producto y de efectuar los análisis fisicoquímicos reales, esto a fin de respetar la propiedad intelectual de cada información por parte de la investigación y también se respetará los datos obtenidos por los equipos.

III. RESULTADOS

7.1. Calidad del yogurt

En la producción y almacenamiento del yogurt es importante controlar puntos críticos como el pH y la acidez, en este trabajo se midió estos valores en el yogurt preparado, aplicando una prueba ANOVA a los resultados obtenidos en 0, 15 y 30 días, para identificar si existe variación entre el yogurt con cepas libres y el yogurt con las cepas microencapsuladas. Comparando con los valores considerados por (29) en su libro como óptimos en la elaboración del yogurt, los valores reportados en el Cuadro 04 están dentro del estándar para la elaboración del yogurt griego, sin necesidad de adicionar ningún aditivo alimenticio.

Cuadro 03. Resultados ANOVA para pH

Tiempo (días)	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
0	Entre grupos	0.35966	1	0.35966	37206.22	0.0000
	Intra grupos	3.8667E-05	4	9.6667E-06		
	Total (Corr.)	0.359699	5			
15	Entre grupos	0.59598	1	0.59598	446985.12	0.00
	Intra grupos	5.3333E-06	4	1.3333E-06		
	Total (Corr.)	0.595985	5			
30	Entre grupos	0.502862	1	0.502862	35918.68	0.000000
	Intra grupos	0.000056	4	0.000014		
	Total (Corr.)	0.502918	5			

Cuadro 04. Resultados ANOVA para Acidez

Tiempo (días)	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
0	Entre grupos	0.0608027	1	0.0608027	2990.3	0.0000
	Intra grupos	8.1333E-05	4	2.0333E-05		
	Total (Corr.)	0.060884	5			
15	Entre grupos	0.244824	1	0.244824	18361.8	0.0000
	Intra grupos	5.3333E-05	4	1.3333E-05		
	Total (Corr.)	0.244877	5			
30	Entre grupos	0.279504	1	0.279504	21779.55	0.00000
	Intra grupos	5.1333E-05	4	1.2833E-05		
	Total (Corr.)	0.279556	5			

7.2. Viabilidad celular en el yogurt

En la prueba ANOVA que se ha realizado a las muestras analizando la viabilidad del *Bifidobacterium* a los 0, 15 y 30 días, se ha podido observar que en el día 0 existe diferencia significativa, esto puede deberse al lento proceso de crecimiento del *Bifidobacterium* microencapsulado, comprobando esto con el pH 5.3 a diferencia del libre que tuvo un pH 5.8. En el día 15 no existen diferencias significativas, esto debido a que uno ya había empezado la muerte celular, y en el microencapsulado aún había crecimiento microbiano. Por lo tanto, en el día 30, debido a la tendencia de crecimiento existen diferencias

significativas, pues el *Bifidobacterium* libre tiene una muerte celular más rápida.

Cuadro 05. Resultados ANOVA para Viabilidad del *Bifidobacterium*

Tiempo (días)	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
0	Entre grupos	3.22667	1	3.22667	27.66	0.0063
	Intra grupos	0.466667	4	0.116667		
	Total (Corr.)	3.69333	5			
15	Entre grupos	0.0266667	1	0.0266667	0.4	0.5614
	Intra grupos	0.266667	4	0.0666667		
	Total (Corr.)	0.293333	5			
30	Entre grupos	2.535	1	2.535	27.16	0.0065
	Intra grupos	0.373333	4	0.0933333		
	Total (Corr.)	2.90833	5			

Después de analizar cada 5 días durante un mes la viabilidad del *Bifidobacterium* (libre y micro encapsulado) en yogurt griego pro biótico, logrando obtener la curva de viabilidad (Figura 02), en la cual se denota una gran diferencia entre la viabilidad *Bifidobacterium* libre y la del *Bifidobacterium* microencapsulado, donde el *Bifidobacterium* libre presenta un crecimiento más rápido llegando hasta una media de $9.53 \cdot 10^6$ UFC/ml, pero a la vez un decaimiento en su población bastante acelerado a partir del día 10.

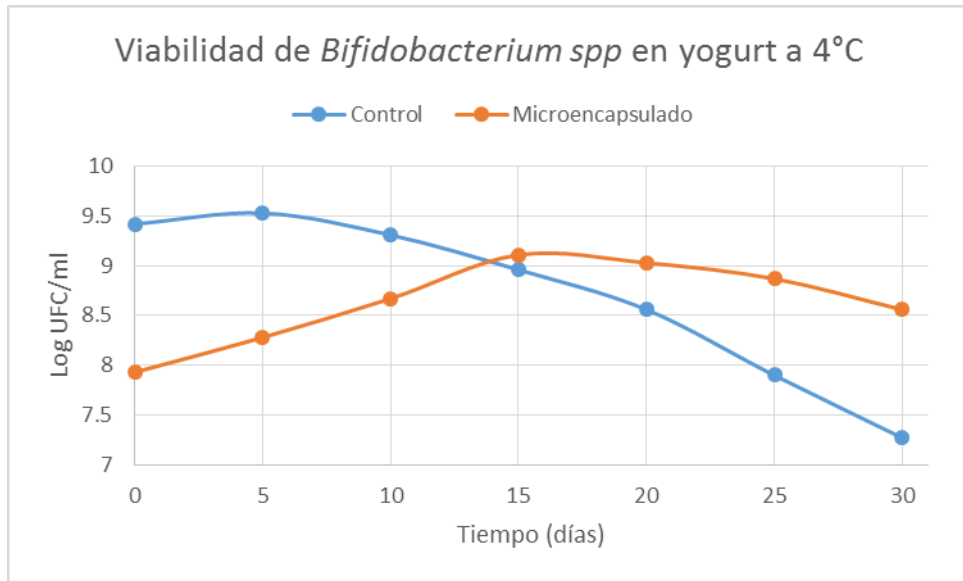


Figura 03. Relación comparativa del recuento de *Bifidobacterium* presentes en un yogurt pro biótico, analizado cada 5 días.

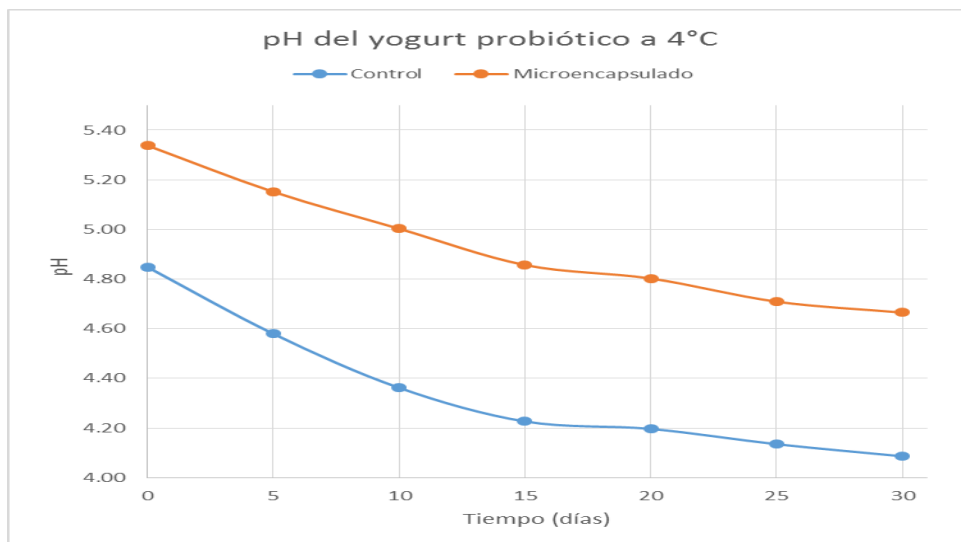


Figura 04. Relación comparativa del recuento de *Bifidobacterium* presentes en un yogurt pro biótico, analizado PH cada 5 días.

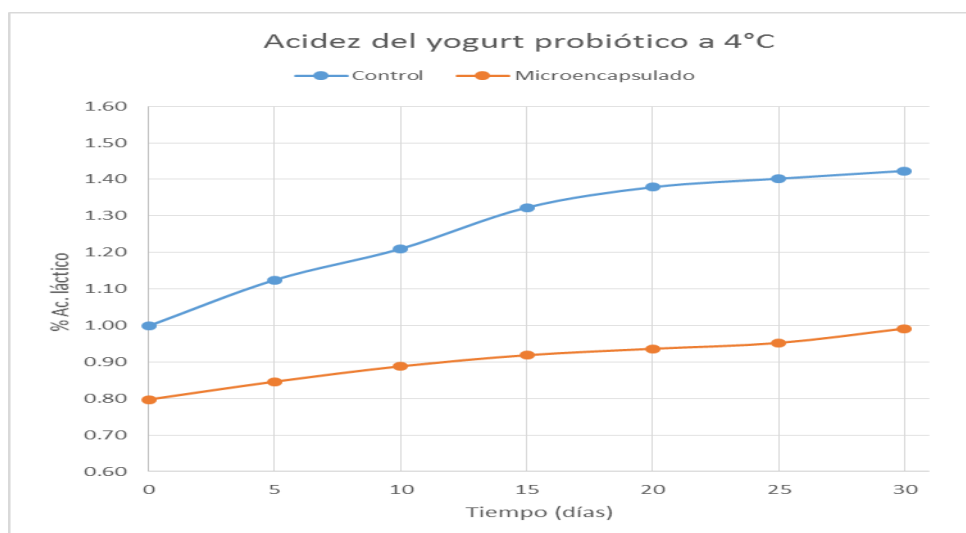


Figura 05. Relación comparativa de la acidez del yogurt pro biótico, analizado cada 5 días.

En cambio, el *Bifidobacterium* micro encapsulado denota un crecimiento de su población más lento llegando a su punto máximo en 15 días con $9.11 \cdot 10^6$ UFC/ml, y con decaimiento de su población mucho más lento a lo largo de los 30 días. El control final arrojó como resultado que, a los 30 días, *Bifidobacterium* libre presentó una media poblacional de $7.27 \cdot 10^6$ UFC/ml, en cambio el *Bifidobacterium* micro encapsulado se mantuvo en $8.56 \cdot 10^6$ UFC/ml, demostrando así la eficacia del micro encapsulado en los microorganismos.

IV. DISCUSIÓN

Para verificar la supervivencia de *Bifidobacterium* añadido en el yogurt durante 30 días de almacenamiento a temperatura controlada (4°C), se evaluaron el recuento de células viables a intervalos de 5 días. Durante el almacenamiento de 30 días, se observaron diferencias en cada una de las muestras analizadas, diferenciando entre el yogurt con *Bifidobacterium* libre y el yogurt con *Bifidobacterium* micro encapsulado. Los resultados de viabilidad en el almacenamiento de 30 días se muestran en la Figura 02. Demostrando así, que las micro cápsulas fueron efectivas para mantener la viabilidad de *Bifidobacterium*, mejorando su supervivencia en comparación con el *Bifidobacterium* libre en yogurt. Se reconoció que, aunque el recuento de pro biótico en los sistemas sin micro encapsulado era mayor que al micro encapsulado, este presenta un decaimiento de su población mucho más rápido, los micros cápsulas aumentaron la supervivencia de las células atrapadas. Al comparar ambos tratamientos, las células micro encapsuladas proporcionaron mejores resultados durante el almacenamiento, con una disminución de las células atrapadas tan bajas que a los 30 días su población llegó a ser $8.56 \cdot 10^6$ UFC/ml, mientras que se observó una reducción de hasta $7.27 \cdot 10^6$ UFC/ml en el yogurt con *Bifidobacterium* libre. Esto puede haber ocurrido por factores que afectan la supervivencia de los pro bióticos en el yogurt, como la competencia de las células por los cultivos de yogurt y las células pro bióticas, las sustancias inhibitoras producidas por el cultivo de yogurt o un exceso de oxígeno disuelto (59) (60). Además de la reducción en la supervivencia de los pro bióticos, se han reportado características sensoriales pobres y cambios indeseables para *L. acidophilus* libre agregado en yogurt (61), lo que justifica la importancia de los sistemas de encapsulación para la protección y entrega de estos pro bióticos.

Las micro cápsulas protegen a las células de los productos de yogurt como ácidos orgánicos, microorganismos fermentativos y otros, ya que las micro cápsulas resisten el ambiente de pH bajo, presentando recuentos de células viables superiores al nivel terapéutico (10^6 UFC/ml). La mayor supervivencia de micro cápsulas podría atribuirse a la adición de alginato, debido a la fuente prebiótica, que actuó como un sustrato, impartiendo una interacción sinérgica

con el cultivo pro biótico (62). Además, también puede haber promovido la formación de una red más reforzada e interconectada, con poros más pequeños, como lo explica (63) que pueden haber conducido a la protección adicional de los encapsulados *Bifidobacterium*. Del mismo modo, se observó esta tendencia para las microcápsulas probióticas de alginato y almidón modificado, que actuaron sinérgicamente en la gelificación, lo que resultó en una protección adicional para las bacterias atrapadas, mejorando su supervivencia en comparación con la matriz de alginato puro en los trabajos de (41). Resultados similares fueron reportados por (41), quienes observaron reducciones de 0.75 y $0.57 \cdot 10^6$ UFC/ml en los números de *Lb. acidophilus* libre y encapsulado durante 4 semanas de almacenamiento refrigerado, respectivamente. En contraste, (60) informaron que la encapsulación aumentó la viabilidad de *Lb. acidophilus* durante 4 semanas de almacenamiento refrigerado de yogures de tipo agitado. En nuestro experimento, sin embargo, las reducciones en el número de *Bifidobacterium* libres y encapsulados excedió $1 \cdot 10^6$ durante 28 días de almacenamiento refrigerado de yogures para los primeros y para los encapsulados fue menor a $0.6 \cdot 10^6$, como se mencionó anteriormente, obtuvimos una supervivencia relativamente mejor *Bifidobacterium* micro encapsulado. (64) Informó que agregar micro cápsulas pro biótica a los yogures congelados proporciona mejores condiciones para la supervivencia del pro biótico a largo plazo en la producción, distribución y almacenamiento.

También es importante resaltar que el proceso de micro encapsulación es un método que presenta una gran aplicabilidad en la industria láctea, principalmente porque ayuda en la protección de los pro bióticos cuando cruza las duras condiciones del sistema gastrointestinal (65) (26) (66). Varios estudios han demostrado que los productos lácteos son buenas matrices para el suministro de pro bióticos al intestino grueso (67) (68) (69).

V. CONCLUSIONES

Se logró micro encapsular las cepas de *Bifidobacterium* en pequeñas perlas de tamaño variando entre 1-3mm, a partir de estas cepas se elaboró el yogurt griego pro biótico con un pH inicial de 5.3. Se logró realizar el conteo viable durante 30 días de almacenamiento refrigerado del yogurt que contiene *Bifidobacterium* libre observamos una reducción de 2×10^6 , en cambio en los yogures que tienen el *Bifidobacterium* micro encapsulado observamos una elevación de 0.7×10^6 . La encapsulación de la cepa pro biótica en cápsulas de alginato de 5 mm aumentó la capacidad de supervivencia, logrando así alargar el tiempo de vida útil del yogurt griego pro biótico, ya para ser considerado apto para el consumo este debe tener una población mayor a 10^6 UFC/ml. Con todo esto podemos decir que el encapsulamiento de microorganismos pro bióticos ayuda a aumentar su tiempo de viabilidad de estos, dándoles un valor agregado y conservando su valor nutricional durante mucho más tiempo.

VI. RECOMENDACIONES

Para trabajos futuros se recomienda evaluar, diversos métodos de encapsulación, verificando cual sería el más óptimo para cada uno de los microorganismos pro bióticos usados en la producción de yogurt. También, según la información recopilada, podría evaluarse el momento indicado en el cual colocar las micro cápsulas durante la elaboración del yogurt, pues diversos autores indican que es una variable que puede influenciar en la viabilidad del microorganismo.

Referencias Bibliográficas

1. *Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties.* **Coda, Rossana, y otros.** 3, 2012, International Journal of Food Microbiology, Vol. 155, págs. 120-127.
2. *PHYSICOCHEMICAL AND FLOW PROPERTIES OF LOW-FAT YOGURT FORTIFIED WITH CALCIUM AND FIBER.* **Velez-Ruiz, Jorge F, Hernandez-Carranza, Paola y Sosa-Morales, Maria.** 3, 2013, Journal of Food Processing and Preservation, Vol. 37, págs. 210-221.
3. *Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods.* **Champagne, Claude P, Gomes da Cruz, Adriano y Daga, Monica.** 2018, Current Opinion in Food Science, Vol. 22, págs. 160-166.
4. *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.* **Hill, Colin, y otros.** 2014, Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, Vol. 11, págs. 506-514.
5. *A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products.* **Aryana, Kayanush J y Olson, Douglas W.** 12, 2017, Journal of Dairy Science, Vol. 100, págs. 9987-10013.
6. *Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review.* **Sarao, Loveleen Kaur y Arora, M.** 2, 2017, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 57, págs. 344-371.
7. *Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics.* **Annunziata, Azzurra y Vecchio, Riccardo.** 1, 2013, Food Quality and Preference, Vol. 28, págs. 348-355.
8. *Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage.* **Tripathi, M K y Giri, S K.** 2014, Journal of Functional Foods, Vol. 9, págs. 225-241.
9. *Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions.* **Madureira, A Raquel, y otros.** 1, 2011, Food Research International, Vol. 44, págs. 465-470.
10. *Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria.* **Ding, W K y Shah, N P.** 2, 2008, International Food Research Journal, Vol. 15, págs. 219-232.
11. *Probiotics—From Metchnikoff to bioactives.* **Vasiljevic, T y Shah, N P.** 7, 2008, International Dairy Journal, Vol. 18, págs. 714-728.
12. *Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation.* **Holkem, A T, y otros.** 2017, LWT-Food Science and Technology, Vol. 76, págs. 216-221.
13. *World Gastroenterology Organisation Practice Guideline : Probiotics and Prebiotics.* **Guarner, F, y otros.** 2, 2008, South African Gastroenterology Review, Vol. 6, págs. 14-25.
14. *Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage.* **Ramchandran, Lata y Shah, Nagendra P.** 5, 2010, LWT - Food Science and Technology, Vol. 43, págs. 819-827.
15. *Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk.* **Ranadheera, C Senaka, y otros.** 3, 2012, Food Chemistry, Vol. 135, págs. 1411-1418.

16. *Viability of lactic acid bacteria and sensory evaluation in Cinnamomum verum and Allium sativum-bio-yogurts made from camel and cow milk.* **Shori, Amal Bakr y Baba, Ahmad S.** 1, 2012, Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences, Vol. 11, págs. 50-55.
17. *Effect of stage of lactation on the immune competence of goat mammary gland.* **Albenzio, M, y otros.** 5, 2016, Journal of Dairy Science, Vol. 99, págs. 3889-3895.
18. *Microencapsulation of walnut oil by spray drying: Effects of wall material and drying conditions on physicochemical properties of microcapsules.* **Shamaei, Samira, y otros.** 2017, Innovative Food Science & Emerging Technologies, Vol. 39, págs. 101-112.
19. *Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions.* **Kanmani, Paulraj, y otros.** 6, 2011, Biotechnology and Bioprocess Engineering, Vol. 16, págs. 1106-1114.
20. *Drug release from carbomer:carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system.* **Llabot, Juan M, Manzo, Ruben H y Allamandi, Daniel A.** 1-2, 2004, International Journal of Pharmaceutics, Vol. 276, págs. 59-66.
21. *Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: a review.* **Ei-salam, M H y Ei-shibiny, S.** 2012, International Journal of Dairy Technology, Vol. 65, págs. 13-21.
22. *Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution.* **Nguyen, TK Thanh, Maclean, N y Mahiddine, S.** 15, 2014, Chem. Rev., Vol. 114, págs. 7610-7630.
23. *Development and characterization of iron-pectin beads as a novel system for iron delivery to intestinal cells.* **Ghibaud, F, y otros.** 1, 2018, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 170, págs. 538-543.
24. *An Improved Method of Microencapsulation of Probiotic Bacteria for Their Stability in Acidic and Bile Conditions during Storage.* **Ding, W K y Shah, N P.** 2, 2009, Journal of Food Science, Vol. 74, págs. 53-61.
25. *Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus LA-5, Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 and Propionibacterium jensenii 702 by spray drying in goat's milk.* **Ranadheera, C Senaka, y otros.** 1, 2015, Small Ruminant Research, Vol. 123, págs. 155-159.
26. *Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium-BB-12 microencapsulated by spray drying.* **Pinto, S S, y otros.** 2015, Food Res. Int., Vol. 67, págs. 400-408.
27. *Effects of texture diameter and depth on the tribological performance of DLC coating under lubricated sliding condition.* **Arslan, A, y otros.** 2015, Appl. Surf. Sci., Vol. 356, págs. 1135-1149.
28. **O'Rell, K y Chandan, R C.** Manufacture of Various Types of Yogurt. [ed.] John Wiley and Sons. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks.* Second. 2013, págs. 263-295.
29. **Harper, W J y Hall, C W.** *Dairy technology and Engineering.* 2da. E.U.A : AVI. Publishers, 1981. págs. 89-93.
30. **Fennema, O.** *Química de los Alimentos.* Segunda. España : Acricbia, 1993.

31. Tesis. *Métodos de Control de Acidez en el yogur*. **Gómez, J C**. México : Universidad Autónoma de Chapingo, 1999.
32. *Mineral and trace elements in some Italian dairy products*. **Gambelli, L, y otros**. 199, Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 12, págs. 27-35.
33. **Graciela, F. V D y Maria, P T**. *Food microbiology protocols. Probiotic properties of Lactobacilli*, Spence. Totowa : Humana Press Inc, 2001.
34. *Characterization and identification of Lactobacillus acidophilus using biolog rapid identification system*. **Hassan, Pyar y Peh, K K**. 1, 2014, Int J Pharm Pharm Sci, Vol. 6.
35. **Xiao, J**. Probiotic Bifidobacterium longum BB536. [aut. libro] Y K Lee y S Salminen. [ed.] John Wiley & Sons. *Handbook of probiotics and prebiotics*. s.l. : Hoboken, 2009, pág. 488.
36. *Encapsulation of polyphenoles-a review*. **Fang, Z y Bhandari, B**. 2010, Trends Food Sci. Technol., Vol. 21, págs. 510-523.
37. **Lakkis, J**. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Second. s.l. : Wiley Blackwell, 2016. pág. 411.
38. **Mishra, M**. *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*. Boca Ratón : Taylor & Francis Group, 2016. pág. 1516.
39. *Encapsulation of food ingredients*. **Shahidi, F y Han, X Q**. 1973, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 33, págs. 501-547.
40. *Recent developments in microencapsulation of food ingredients*. **Desai, K G. H y Park, H J**. 2005, Drying Technology, Vol. 23, págs. 1361-1394.
41. *Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt*. **Sultana, K, y otros**. 2000, Int J Food Microbiol, Vol. 62, págs. 47-55.
42. *Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery*. **Anal, A K y Singh, H**. 2007, Trends Food Sci Technol, Vol. 18, págs. 240-251.
43. *Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria*. **Cook, M T, y otros**. 2012, Biomacromolecules, Vol. 12, págs. 2834-2840.
44. *Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration*. **Cook, M T, y otros**. 2013, J Mat Chem B, Vol. 1, págs. 52-60.
45. *Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells*. **Heidebach, T, Först, P y Kulozik, U**. 2009, Int Dairy J, Vol. 19, págs. 77-84.
46. *Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins*. **Heidebach, T, Först, P y Kulozik, U**. 2009, Food Hydrocoll, Vol. 23, págs. 1670-1677.
47. *Survival of entrapped Lactobacillus rhamnosus GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit*. **Doherty, S B, y otros**. 2012, Int Dairy J, Vol. 22, págs. 31-43.

48. *Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation.* **Allan-Wojtas, P, Hansen, L T y Paulson, A T.** 2008, LWT Food Sci Technol, Vol. 41, págs. 101-108.
49. *Encapsulation in the food industry: a review.* **Gibbs, B F, y otros.** 1999, International Journal of Food Sciences and Nutrition, Vol. 50, págs. 213-224.
50. *Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends.* **Gouin, S.** 2004, Trends in Food Science and Technology, Vol. 15, págs. 330-347.
51. *Cocrystallization: an encapsulation process.* **Chen, A C, Veiga, M F y Rizzuto, A B.** 1998, Food Technology, Vol. 11, págs. 87-90.
52. *Cocrystallization of honey with sucrose.* **Bhandari, B R, y otros.** 1998, Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie, Vol. 31, págs. 138-142.
53. *Encapsulation of orange peel oil by co-crystallization.* **Beristain, C I, y otros.** 1996, Lebensmittel-Weissenchaft Und-Technologie, Vol. 29, págs. 645-647.
54. **McClements, D J.** . *Food emulsions: Principles, practice, and techniques.* 2nd. Boca Raton : CRC Press, 2005.
55. *Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods.* **McClements, D J, y otros.** 2009, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 49, págs. 577-606.
56. **Pález, Roxana Beatriz.** *Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para la aplicación en alimentos.* Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos; INTA; Instituto de Lactología Industrial (INLAIN). 2014.
57. **De La Cruz-Molina, Aimara Victoria y Terán-Ratti, Angelo Renato.** *Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus casei libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba.* Escuela Agrícola Panamericano, Zamorano. Honduras : s.n., 2013.
58. *Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos.* **Pérez-Leonard, Heidy, y otros.** 1, 2013, ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar , Vol. 47, págs. 14-25.
59. *Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage.* **Cruz, A G, y otros.** 2, 2013, Food Research International, Vol. 51, págs. 723-728.
60. *Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice.* **Krasaekoopt, W y Watcharapoka, S.** 2, 2014, LWT - Food Science and Technology, Vol. 57, págs. 761-766.
61. *Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan.* **García-Ceja, A, y otros.** 1, 2015, LWT - Food Science and Technology, Vol. 63, págs. 482-489.

62. *The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices.* **Rodríguez, D, y otros.** 1, 2011, LWT - Food Science and Technology, Vol. 44, págs. 100-108.
63. *Biopolymer gels containing fructooligosaccharides.* **Silva, K C. G y Sato, A C. K.** 2017, Food Reserach International, Vol. 101, págs. 88-95.
64. *Ice-cream como portador de alimentos probióticos.* **Cruz, A G, y otros.** 9, 2009, Food Research International, Vol. 42, págs. 1233-1239.
65. *Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments.* **Fritzen-Freire, C B, y otros.** 1, 2013, LWT - Food Science and Technology, Vol. 50, págs. 39-44.
66. *Survival of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments.* **Verruck, S, y otros.** 2017, Small Ruminant Research, Vol. 153, págs. 48-56.
67. *Probiotic Mascarpone-type cheese: Characterisation and cell viability during storage and simulated gastrointestinal conditions.* **de Almeida, J. dos S. O, y otros.** S1, 2017, International Journal of Dairy Technology, Vol. 71, págs. 195-203.
68. *The use of soft fresh cheese manufactured from freeze concentrated milk as a novelty protective matrix on Bifidobacterium BB-12 survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions.* **Muñoz, I de B, y otros.** 2018, LWT - Food Science and Technology, Vol. 97, págs. 725-729.
69. *Effect of the incorporation of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with sweet whey and inulin on the properties of Greek-style yogurt.* **Pinto, S S, y otros.** 9, 2017, Journal of Food Science and Technology, Vol. 54, págs. 2804-2813.

Anexos:

Anexo: 01

Cuadro 01. Operacionalización de variables

Variable independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Escala de medición
Concentración en el tiempo	Para que un yogurt deba considerarse probiótico debe contener como mínimo 10^6 UFC/ml	Se realizó conteos viables cada 5 días durante un mes	UFC/ml	C. Razón
pH	El pH es una característica física de los alimentos que da una idea de la acidez del alimento	Se realizó con un pH-metro.	-	C. Razón
Acidez Titulable	La determinación de la acidez titulable es una prueba fisicoquímica de control de calidad de la leche	Se utilizará el método (A.O.A.C., 1995)	%	C. Razón
Variable dependiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Escala de medición
Yogurt probiótico con <i>Bifidobacterium spp</i> microencapsulado	Bebida nutricional cuya ingesta en cantidades adecuadas son beneficiosas para la salud del ser humano	Se realizó un tratamiento con un tratamiento control	gr/%	C. Razón

Anexo: 02

Instrumentos de recolección de datos para conteo de viable

Conteo Viable (10^6 UFC/ml)						
Días	Control			Microencapsulado		
0	9.4	9.7	9.1	8.2	7.5	8.1
5	10.1	9.1	9.4	7.9	8.5	8.4
10	9.4	9.1	9.5	9	8.3	8.7
15	8.7	9.2	9	9.3	8.8	9.2
20	8.8	8.3	8.5	9	9.1	9
25	7.8	7.9	8	8.9	8.8	8.9
30	7.6	7.2	6.9	8.8	8.3	8.5

