

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Tema: “Aplicación de congelación criomecánica en la producción de helados bajos en calorías con probiótico encapsulado y prebiótico”

Trabajo de titulación previa la obtención del
título de Ingeniera en Alimentos

AUTORAS: Rebutty Rojas Patricia Carolina

Villarreal Nicolalde Melannie Roxanna

TUTOR: Domínguez Rodríguez Francisco Javier Msc. PhD.

Tulcán, 2020

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR

Certificamos que la estudiante Rebutty Rojas Patricia Carolina con el número de cédula 2400097206 ha elaborado el trabajo de titulación: “Aplicación de congelación criomecánica en la producción de helados bajos en calorías con probiótico encapsulado y prebiótico.”

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el Reglamento de Titulación, Sustentación e Incorporación de la UPEC, por lo tanto, autorizamos la presentación de la sustentación para la calificación respectiva.



Firmado electrónicamente por:
FRANCISCO JAVIER
DOMÍNGUEZ
RODRÍGUEZ

.....

Domínguez Rodríguez Francisco Javier Msc. PhD Dra. Wilman Jenny Yambay Vallejo Msc.

TUTOR



Firmado electrónicamente por:
0400987350 WILMAN
JENNY YAMBAY
VALLEJO

.....

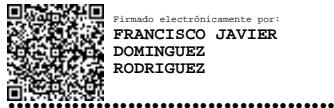
LECTOR

Tulcán, septiembre de 2020

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR

Certificamos que la Villarreal Nicolalde Melannie Roxanna con el número de cédula 2450348152 ha elaborado el trabajo de titulación: “Aplicación de congelación criomecánica en la producción de helados bajos en calorías con probiótico encapsulado y prebiótico.”

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el Reglamento de Titulación, Sustentación e Incorporación de la UPEC, por lo tanto, autorizamos la presentación de la sustentación para la calificación respectiva.



Domínguez Rodríguez Francisco Javier Msc. PhD Dra. Wilman Jenny Yambay Vallejo Msc.

TUTOR

LECTOR

Tulcán, septiembre de 2020

AUTORÍA DE TRABAJO

El presente trabajo de titulación constituye requisito previo para la obtención del título de **Ingeniera** en la Carrera de ingeniería en alimentos de la Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales

Nosotras, Rebutty Rojas Patricia Carolina con cédula de identidad número 2400097206 y Villarreal Nicolalde Melannie Roxanna con cédula de identidad número 2450348152 declaramos: que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal y los resultados y conclusiones a los que hemos llegado son de nuestra absoluta responsabilidad.



.....
Rebutty Rojas Patricia Carolina
AUTORA



.....
Villarreal Nicolalde Melannie Roxanna
AUTORA

Tulcán, septiembre de 2020

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Rebutty Rojas Patricia Carolina y Villarreal Nicolalde Melannie Roxanna declaramos ser autoras de los criterios emitidos en el trabajo de investigación: “Aplicación de congelación criomecánica en la producción de helados bajos en calorías con probiótico encapsulado y prebiótico” y eximimos expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

.....

Rebutty Rojas Patricia Carolina
AUTORA

.....

Villarreal Nicolalde Melannie Roxanna
AUTORA

Tulcán, septiembre de 2020

AGRADECIMIENTO

A través del trabajo duro, perseverancia y fe en Dios, puedes vivir tus sueños (Benjamin Carson)

Con esta frase quiero comenzar agradeciendo a Dios quien nunca me ha abandonado y ha sido mi fortaleza para seguir adelante, tanto en mi vida personal como profesional. A la Universidad Politécnica Estatal del Carchi por permitirme haber formado parte de ella, y darme la oportunidad de crecer y aprender.

A mi tutor de tesis PhD. Francisco Domínguez quien con su dedicación, experiencia y paciencia logró guiar y aportar sus conocimientos en este trabajo de investigación.

También me gustaría agradecer a mi familia, en especial a mis hermanos, madre y abuelita, quienes a pesar de la distancia siempre han estado presentes en los buenos y malos momentos, me apoyaron y animaron para lograr mis sueños.

Agradezco a mi compañera de tesis y mejor amiga, con la que he compartido buenos y malos momentos, llantos y risas, y con la que puedo contar siempre a pesar de todo.

Finalmente quiero agradecer a mis profesores durante toda mi carrera, quienes con dedicación aportaron su conocimiento para mi formación profesional, en especial a la Dra. Jenny Yambay por sus consejos, enseñanzas y sobre todo por su amistad.

En realidad son muchas las personas que formaron y formarán parte de mi vida personal y profesional, a las que agradezco por sus consejos, amistad, compañía y apoyo en los buenos y malos momentos de mi vida.

A todos ustedes, gracias, y nuevamente gracias por dejarme crecer y quererme tal como soy.

Quisiera terminar con una cita de Winston Churchill “Nunca, nunca, nunca te rindas”

Patricia Rebutty

“La fe no hace que las cosas sean fáciles, hace que sean posibles”

Lucas 1:37

Agradezco a Dios por darme la fortaleza necesaria para cumplir una meta más en mi vida, gracias por cubrirnos de tu amor infinito a mi familia y a mí. Sin ti nada hubiese sido posible.

A mi madre Ana Rosa, que a pesar de todos los problemas por los que has pasado, me has dado el amor y el apoyo necesario para hacerme una mujer de bien. Gracias por todo tu esfuerzo para ayudarme, se cuánto te ha costado.

A mis abuelos por ser mis segundos padres, estaré eternamente agradecida por el apoyo incondicional que he recibido de ustedes. Especialmente de mi abuela Piedad, que desde el primer momento que decidí estudiar lejos de casa confió en mí, me apoyó y a pesar de que los años pasen y poco a poco se apaguen para ellos. Siguen siendo fuertes para mí.

A las autoridades de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi por permitirme utilizar las instalaciones y laboratorios para el desarrollo del presente trabajo de titulación.

A los todos los docentes de la carrera que ayudaron a mi formación durante estos cinco largos años, por sus conocimientos, seguridad y por compartir día a día un poco de su experiencia.

A mi tutor de tesis PhD. Francisco Domínguez por su tiempo y ayuda en el transcurso de este trabajo.

A mi amiga y compañera de tesis Patricia Rebutty, por compartir junto a mí las ganas de superación, sueños, tristezas y sonrisas. Pero sobre todo, por ser un soporte importante en mi vida.

Finalmente a mis dos mascotas, compañeritos de vida y de largos viajes. Kenya y Nono, gracias por llenarme de felicidad, por darme cariño incondicional en aquellos momentos en los que me sentía sola y por permitirme ser una mejor persona.

Melannie Villarreal

DEDICATORIA

Quisiera dedicar esta tesis a Dios quien nunca me abandonó, a mi madre Lorena Rojas por siempre darme consejos y apoyarme, y en especial a mi Abuelita Norma Figueroa, que más que eso es mi madre, una extraordinaria mujer que ha sido mi inspiración y ha luchado y nunca se ha rendido, siempre me apoyó y me permitió ser una profesional, este trabajo de investigación y todos mis logros se los dedico a esa gran mujer.

Patricia Rebutty

Dedico mi esfuerzo y entrega total al mismo esfuerzo que mi madre y abuelos han dado día tras día. A pesar de que no estemos juntos su amor me ha permitido lograr este orgullo para nuestro pequeño hogar.

Los ama su hija y nieta.

Roxanna

Melannie Villarreal

ÍNDICE

I. PROBLEMA	20
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	21
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	21
1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	22
1.4.1. Objetivo General.....	22
1.4.2. Objetivos Específicos	22
1.4.3. Preguntas de Investigación	23
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	24
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	24
2.2. MARCO TEÓRICO	27
2.2.1. Leche	27
2.2.1.1. Composición química de la leche.....	27
2.2.1.2. Propiedades físicas de la leche de vaca	27
2.2.1.3. Evaluación sensorial de la leche.....	28
2.2.1.4. Derivados de la leche.....	28
2.2.2. Helado.....	28
2.2.2.1. Clasificación de helados	29
2.2.2.1.1. Helado de leche	29
2.2.2.1.2. Helado de bajo contenido calórico	29
2.2.2.1.3. Cualidades nutricionales de helados.....	29
2.2.2.2. Ingredientes y características sensoriales en helados	29
2.2.2.2.1. Agua	30
2.2.2.2.2. Grasas	30
2.2.2.2.3. Leche en polvo desnatada.....	30

2.2.2.2.4. Ovoproductos	30
2.2.2.2.5. Edulcorantes	31
2.2.2.2.6. Sólidos no grasos de la leche	31
2.2.2.2.7. Emulsificantes	31
2.2.2.3. Punto Overrun	31
2.2.3. Probióticos	31
2.2.3.1. Beneficios que confieren el consumo de probióticos	32
2.2.3.2. Características que deben de tener los microorganismos probióticos	32
2.2.3.3. Clasificación de microorganismos probióticos.....	32
2.2.3.3.1. Lactobacillus.....	33
2.2.3.3.2. Bifidobacterium.....	33
2.2.4. Prebióticos	33
2.2.4.1. Requisitos que deben de cumplir los prebióticos	34
2.2.4.2. Clasificación de prebióticos.....	34
2.2.4.2.1. Oligofruktosa (OF)	35
2.2.4.2.2. Inulina.....	35
2.2.4.2.3. Galactooligosacáridos.....	35
2.2.4.2.4. Lactulosa.....	35
2.2.5. Inulina y características en helados	35
2.2.6. Alimentos funcionales	36
2.2.7. Simbióticos	36
2.2.8. Encapsulación.....	36
2.2.8.1. Principales técnicas de encapsulación de probióticos.	37
2.2.8.2. Materiales empleados en encapsulación.....	37
2.2.8.2.1. Alginato de sodio.....	37
2.2.8.2.2. Goma Gellan y goma xantana	38
2.2.8.2.3. Carrageninas	38

2.2.8.2.4. Quitosano.....	38
2.2.8.2.5. Almidón.....	38
2.2.8.2.6. Proteína del suero.....	38
2.2.8.3. Ventajas del proceso de encapsulación de probióticos.....	39
2.2.9. Congelación.....	39
2.2.9.1. Defectos presentados en la congelación.....	39
2.2.9.2. Velocidad de congelación.....	39
2.2.9.2.1. Congelación Lenta.....	39
2.2.9.2.2. Congelación Rápida.....	40
2.2.9.3. Congelación criogénica.....	40
2.2.9.3.1. Nitrógeno Líquido (N ₂).....	40
2.2.9.3.2. Criogenia alimentaria.....	41
2.2.9.3.3. Ventajas de la criogenia.....	41
2.2.9.4. Congelación criomecánica.....	41
2.2.9.4.1. Primera secuencia.....	41
2.2.9.4.2. Segunda secuencia.....	41
III. METODOLOGÍA.....	42
3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO.....	42
3.1.1. Enfoque.....	42
3.1.2. Tipo de Investigación.....	42
3.2. HIPÓTESIS O IDEA A DEFENDER.....	42
3.2.1. Hipótesis Nula.....	42
3.2.2. Hipótesis Alternativa.....	42
3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	42
3.3.1. Definición de variables.....	42
3.3.1.1. Variables independientes.....	42
3.3.1.2. Variables dependientes.....	43

3.3.2. Operacionalización de variables	43
3.4. MÉTODOS UTILIZADOS	43
3.4.1. Preparación del microorganismo	44
3.4.2. Recuperación de microorganismos.....	44
3.4.3. Encapsulación del microorganismo.....	44
3.4.4. Determinación del tamaño microcápsulas	44
3.4.5. Rendimiento de <i>Bifidobacterium BB-12</i> microencapsulado	45
3.4.6. Conteo de las bacterias libres y encapsuladas.	45
3.4.7. Viabilidad de las bacterias en condiciones simuladas a los jugos gastrointestinales	45
3.4.7.1. Viabilidad de las células libres en jugo gástrico simulado (JGS).....	45
3.4.7.2. Viabilidad de las células encapsuladas en jugo gástrico simulado (JGS)	45
3.4.7.3. Viabilidad de las células libres en jugo intestinal simulado (JIS)	46
3.4.7.4. Viabilidad de las células encapsuladas en jugo intestinal simulado (JIS).....	46
3.4.7.5. Viabilidad de las bacterias probióticas en helado.....	46
3.4.8. Proceso para la elaboración de helado con características simbióticas y congelación criogénica.....	46
3.4.9. Parámetros funcionales.....	47
3.4.9.1. Punto overrun	47
3.4.9.2. Tiempo de caída de la primera gota.....	47
3.4.9.3. Porcentaje de derretimiento	47
3.4.10. Parámetros reológicos.....	47
3.4.10.1. Prueba de textura	47
3.4.11. Análisis de parámetros fisicoquímicos en helado	48
3.4.11.1. Potencial Hidrógeno (pH).....	48
3.4.11.2. Proteína.....	48
3.4.11.3. Grasas	48
3.4.11.4. Cenizas	48

3.4.11.5. Sólidos totales (°Brix)	48
3.4.12. Análisis sensorial	48
3.4.13. Técnica para la recolección de datos	48
3.4.14. Diseño experimental	48
3.4.15. Población y muestra.....	50
3.4.16. Análisis estadístico y procesamiento de datos.....	50
3.5. RECURSOS	50
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. RESULTADOS	52
4.1.1. Observación del probiótico.....	52
4.1.2. Tamaño	52
4.1.3. Rendimiento	53
4.1.4. Conteo de las bacterias libres y encapsuladas.	53
4.1.5. Viabilidad de las bacterias en condiciones simuladas a los jugos gastrointestinales	54
4.1.6. Viabilidad de bacterias encapsuladas en el helado.....	54
4.1.7. Parámetros funcionales del helado con características simbióticas.....	55
4.1.8. Parámetros reológicos.....	55
4.1.9. Análisis de los parámetros fisicoquímicos en helado.....	56
4.1.10. Análisis sensorial.....	57
4.1.11. Análisis microbiológico.....	60
4.2. DISCUSIÓN.....	60
4.2.1. Observación del probiótico.....	60
4.2.2. Tamaño de las microcápsulas	60
4.2.3. Rendimiento del <i>Bifidobacterium BB-12</i> encapsulado	61
4.2.4. Conteo de las bacterias libres y encapsuladas.	61
4.2.5. Viabilidad de las bacterias en condiciones simuladas a los jugos gastrointestinales	61
4.2.6. Viabilidad de bacterias encapsuladas en el helado.....	62

4.2.7. Punto Overrun	63
4.2.8. Tiempo de caída de la primera gota.....	63
4.2.9. Tasa de Derretimiento (%)	64
4.2.10. Parámetros reológicos (Textura)	64
4.2.11. Parámetros fisicoquímicos.....	65
4.1.12. Análisis sensorial.....	66
4.2.13. Microbiológico	66
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
5.1. CONCLUSIONES.....	67
5.2. RECOMENDACIONES	68
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
V. ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de <i>Bifidobacterium BB-12</i> observada con microscopio óptico.	52
Figura 2. Caja y bigote para tamaño de cápsula.	53
Figura 3. Gráfico de barras para Olor.....	58
Figura 4. Gráfico de barras para color	58
Figura 5. Gráfico de barras para sabor	59
Figura 6. Gráfica de barras para cremosidad	59
Figura 7. Recuperación del BB12	77
Figura 8. Almacenamiento de biomasa	77
Figura 10. Liofilización de cápsulas.....	77
Figura 9. Probiótico encapsulado	77
Figura 11. Cápsulas liofilizadas	77
Figura 12. Análisis microbiológico	77

Figura 15. Solución JGS	78
Figura 16. Solución JIS	78
Figura 14. Tamaño de la cápsula	78
Figura 13. Vista interna de la cápsula.....	78
Figura 17. Conteo de m/o probióticos	78
Figura 18. Elaboración de helado	78
Figura 19. Simulaciones en helados	78
Figura 20. Tiempo de caída de la primera gota y % de derretimiento	78
Figura 21. Evaluación sensorial.....	78
Figura 22. Análisis microbiológico de E. Coli	78
Figura 23. Análisis microbiológico de Mohos y Levaduras.....	78
Figura 24. Análisis microbiológico de Aerobios mesófilos	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la leche de diferentes mamíferos en g/100 ml de leche.....	27
Tabla 2. Propiedades físicas de la leche	28
Tabla 3. Características sensoriales de la leche	28
Tabla 4. Cualidades nutricionales de helados.....	29
Tabla 5. Microorganismos probióticos	33
Tabla 6. Sustancias propuestas como prebióticas.....	34
Tabla 7. Técnicas de encapsulación	37
Tabla 8. Propiedades físicas del nitrógeno líquido.....	40
Tabla 9. Operacionalización de variables	43
Tabla 10. Diseño Experimental	49
Tabla 11. Esquema BCA	49

Tabla 12. Recursos necesarios para la elaboración de la investigación	51
Tabla 13. Viabilidad de BB12 libre y encapsulado	53
Tabla 14. Viabilidad de BB12 en simulaciones gastrointestinales.....	54
Tabla 15. Viabilidad de microcápsulas en el helado simbiótico	54
Tabla 16. Parámetros funcionales.....	55
Tabla 17. Prueba de textura	56
Tabla 18. Análisis fisicoquímicos (°Brix, grasa y proteína).....	56
Tabla 19. Análisis fisicoquímicos (pH, sólidos y cenizas).....	57
Tabla 21. Análisis microbiológicos en muestra de helado simbiótico	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Hoja de evaluación sensorial	76
Anexo 2: Proceso de encapsulación	77

RESUMEN

Las industrias heladeras evolucionan constantemente para mejorar la aceptabilidad de estos productos. No obstante, muchas de ellas están dejando a un lado la calidad nutricional y funcional. Por esta razón el presente trabajo determinó la viabilidad de *Bifidobacterium BB-12* microencapsulados tras la aplicación de congelación criomecánica para la producción de helados bajos en calorías con prebiótico (inulina) como sustituto de grasa y de cremosidad. La supervivencia del probiótico libre y encapsulado por extrusión se estimó mediante simulación gástrica (JGS) e intestinal (JIS) a un pH de 1.9 y 8 respectivamente, se incubaron a 37°C muestras de 1ml a los 0, 30, 60, 90 y 100 min. En las células libres se observó una reducción del ciclo logarítmico de 8 UFC, mientras que las encapsuladas presentaron mayor supervivencia con valores de 8.66 en el minuto 0 y 8.91 a los 100 minutos. Para la elaboración del helado se colocó inulina en concentraciones de 2 y 2.4 %, se aplicó congelación con nitrógeno líquido al 40 y 60 % finalmente se almacenó en un congelador tradicional a – 25°C aproximadamente. Se evaluaron parámetros funcionales y fisicoquímicos de los todos tratamientos, mientras que al mejor tratamiento se le realizaron análisis microbiológicos. Los resultados reflejaron niveles altos de proteína y cenizas, niveles bajos de azúcar, grasa y °Brix en comparación con el helado comercial. El tiempo de caída de la primera gota y el porcentaje de derretimiento, no se encontraron en el rango esperado debido a que el helado no contiene azúcar, estabilizantes y gomas. En cuanto al aspecto microbiológico se encontró en los límites establecidos por la INEN 0706. Se demostró que a pesar de sustituir la grasa por el prebiótico, las características sensoriales fueron iguales a las de un helado tradicional, además el nitrógeno mejoró características como cremosidad, volumen, tamaño de cristales y vida útil del helado.

Palabras claves : viabilidad, *bifidobacterium*, microencapsulados JGS y JIS.

ABSTRACT

The ice cream industries constantly evolve to improve the acceptability of their products. However, many of them are aside from nutritional and functional quality. For this reason, the present work determined the viability of microencapsulated Bifidobacterium BB-12 after the application of cryomechanical freezing for the production of low-calorie ice cream with prebiotic (inulin) as a substitute for fat and creaminess. Survival of the free and encapsulated probiotic by extrusion was estimated by gastric simulation (GS) and intestinal simulation (JIS) at a pH of 1.9 and 8 respectively. 1ml samples were incubated at 37 ° C at 0, 30, 60, 90 and 100 min. In the free cells, a reduction in the logarithmic cycle of 8 CFU was detected, while the encapsulated ones showed the highest survival with values of 8.66 at minute 0 and 8.91 at 100 minutes. For the ice cream production inulin was placed in amounts of 2 and 2.4%, freezing with liquid nitrogen at 40 and 60% was applied, finally it was stored in a traditional freezer at approximately -25°C. Functional and physicochemical parameters of all treatments were evaluated, while for the best treatment was analyzed with microbiological analysis. The results showed high level of protein and ash, low levels of sugar and fat and Brix level compared to commercial ice cream. The dropping time of the first drop and the percentage of melting were not in the expected range because the ice cream does not contain sugar, stabilizers and gums. Regarding the microbiological aspect, it was found within the limits established by INEN 0706. It was demonstrated despite of changing fat by the prebiotic, the sensory characteristics were the same as those of a traditional ice cream, in addition to nitrogen improved characteristics such as creaminess, volume, size of crystals and shelf life of ice cream.

Key words: viability, bifid bacteria, JGS and JIS microencapsulate

INTRODUCCIÓN

El encapsulamiento es un método aplicado como barrera física, con la finalidad de atrapar agentes activos dentro de un material portador, que puede estar en diferentes estados: sólidos, líquidos o gaseosos, evitando alteraciones físicas, químicas y biológicas en matrices complejas por condiciones como temperatura y humedad (Chavarri et al., 2012). Chavarri et al., (2012) mencionan que, los polímeros como: carbohidratos, grasas y ceras son los materiales de pared más utilizados en procesos de encapsulación, no obstante el uso de cada polímero va a depender del material a proteger como por ejemplo: proteínas, vitaminas, antioxidantes, lípidos, entre otros.

Se han realizado estudios en cuanto a encapsulación de probióticos con el fin de mejorar la viabilidad de estos microorganismos en productos alimenticios y por el paso del tracto intestinal. Así lo mencionan Krasaekoopt, Bhandari, y Deeth (2004) puesto que, a estos microorganismos se les atribuye que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud, tales como: la inhibición del crecimiento patógeno, el mantenimiento de la microflora intestinal, la estimulación del sistema inmunológico, el alivio del estreñimiento, la síntesis de vitaminas y de agentes antimicrobianos y la predigestión de proteínas.

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deben ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que deben resistir a las condiciones del jugo gástrico e intestinal y poder crecer en presencia de bilis. Estos probióticos son bacterias Gram positivas y se clasifican fundamentalmente en dos géneros; *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Las *Bifidobacterium* han sido ampliamente investigadas por sus propiedades probióticas ya que tienen muchos efectos beneficiosos para el huésped como el alivio de la intolerancia a la lactosa, la reducción de los niveles de colesterol sérico, la síntesis de algunas vitaminas, la prevención de la colonización de patógenos, la reducción de los síntomas de la enfermedad del intestino irritable y la prevención de la diarrea (Prasanna & Charalampopoulos, 2017).

Al considerar cada uno de los beneficios de los microorganismos *Bifidobacterium* en la salud humana, se deben aplicar algunas técnicas para garantizar un correcto proceso de encapsulación, como es la técnica de secado. El liofilizado, consiste en la deshidratación del

material encapsulante junto con el encapsulado mediante la congelación del producto, que luego con la reducción de la presión circundante, permite que el agua congelada sea sublimada, es decir, cambiar de la fase sólida a gas (Suárez, 2019).

En la mayoría de los estudios encontrados en la literatura, agregan cultivos probióticos en productos lácteos y varios de ellos se han llevado a cabo en helados, debido a que los mismos son productos alimenticios con gran potencial para ser transportadores de probióticos en comparación con otros productos fermentados (Lima, Bezerra, Olbrich, y Pinto, 2015). Además, se caracterizan por ser un producto batido constituido por burbujas de aire, que están limitadas por películas de una mezcla de proteínas, azúcares, sales y otros componentes disueltos (Isique, 2014 y Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0706], 2013).

Por otro lado, la inulina es una fibra prebiótica de tipo fructano, que se caracteriza por tener la capacidad de no ser digerida ya que resiste a la hidrólisis de enzimas digestivas y llega a fermentarse en el colon, mejorando los procesos intestinales debido a la fibra dietética que posee. (Zúñiga, 2017). Adicionalmente, es utilizada como aditivo alimentario, ya que puede ser empleada como sustituto de azúcar, grasa, texturizante y estabilizador.

Por ello la industria heladera con el fin de mejorar sus productos contribuyendo a la salud mediante la buena alimentación, ha adicionado la inulina como sustituto de azúcar, grasa, emulsificante y depresor del punto de congelación (González, Velásquez, y Ramírez, 2017 y Krasaekoopt, Bhandari, y Deeth, 2004).

Umaña (2010) indica que, la congelación aplicada en producción de helados es uno de los parámetros más importantes. Además, define dos tipos: la congelación rápida que se caracteriza por tener una cristalización simultánea en los espacios extracelulares e intracelulares, produciendo cristales pequeños y defectos sobre el producto menores en comparación con la congelación lenta, que provoca que la cristalización extracelular aumente por ósmosis, ocasionando la deshidratación de las células, la formación de grandes cristales de hielo y la disminución considerable del volumen del producto a congelar.

I. PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de helados es un negocio global en constante evolución, actualmente existen distintas técnicas para la producción de helados que han permitido mejorar aspectos como sabor y textura, sin embargo, las industrias están dejando a un lado la calidad nutricional y funcional de estos productos. Así lo mencionan Rodríguez, Mejía y Serna (2019) el helado es un producto edulcorado, que en muchos de los casos se lo obtiene de la emulsión de grandes cantidades de azúcares, grasas y aditivos. Hernández (2014) realizando formulaciones de helados con bajo contenido en azúcares menciona que, el helado es uno de los alimentos considerados con más alto contenido calórico ya que para su elaboración se requieren principalmente de ingredientes como grasas y carbohidratos refinados.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Panamericana de la Salud [FAO/OPS], (2017) el consumo de alimentos pobres en fibras y proteínas, altos en azúcares, sales y grasas inciden negativamente en la salud de las personas. Así también lo corroboran Castellanos, Murillo, Ortega, Velásquez y Ramírez (2016) manifestando que, las cifras de obesidad, diabetes y problemas al corazón asociadas al consumo de grasas están en constante aumento. Por esta razón los países desarrollados a fin de satisfacer sus necesidades, han generado alternativas de productos con bajo contenido calórico e incluso sin grasa. En los helados el contenido de materia grasa oscila entre 10 y 16% de la masa total del producto, en algunas industrias consideran imprescindible el uso de este ingrediente no solo para lograr la aceptabilidad del consumidor, sino también porque es un factor importante para aportar características de cremosidad y sabor.

La Organización Mundial de la Salud [OMS], (2014) anunció que en el año 2012 fallecieron 1.5 millones de personas con diabetes y para el año 2030 se cree que será la séptima causa de muerte en todo el mundo. De manera que, se amerita el uso de sustancias que puedan ser utilizadas como sustitutos del azúcar, considerado el principal causante de esta enfermedad (Castellanos, et al., 2016). Una de las alternativas para reducir el contenido calórico, de grasas y de azúcares es la inulina, debido a que es un magnífico ingrediente en la industria de alimentos y eso se debe a su bajo contenido en calorías, 1.5 Kcal por cada gramo. Además, permite la formación de geles, actúa como emulsificante, aporta textura, es depresor del punto de congelación y tiene funcionalidades semejantes a los azúcares y las grasas (Castellanos, et al.,

2016). De igual forma (Rodríguez, Mejía, & Serna, 2019) indican que, la inulina es un buen ingrediente si lo que se intenta es reducir o sustituir el contenido calórico en un producto alto en calorías.

Por otro lado, en muchos de los casos se cree que los helados son productos de grados alimenticios sin mucha ciencia, se encuentran relacionados específicamente al placer y a la diversión. Razón que deja pasar desapercibido los procesos tecnológicos que estos requieren para hacer posible un producto de calidad. Según Ramírez (2017) la industria heladera ha tenido tanto avances tecnológicos como científicos, el primero de ellos en relación al tipo de ingredientes y procesos utilizados, y el segundo en base al análisis de la funcionalidad de cada uno de los ingredientes y procesos empleados.

En este sentido, en la presente investigación además de sustituir crema por la inulina en la fabricación de helados tipos cremosos, se variaron procesos tecnológicos tradicionales como la congelación mecánica por congelación criomecánica (congelación con nitrógeno líquido seguida de la congelación convencional). Para incrementar la funcionalidad del producto se optó por el uso de un probiótico tipo *Bifidobacterium* y con el fin de garantizar la supervivencia de este microorganismo por el paso gastrointestinal, se aplicó un proceso de encapsulación por extrusión con alginato de sodio debido a que la viabilidad de estas exhiben poca o ninguna supervivencia en las etapas de operación e ingestión, además los vehículos alimenticios que transportan y protegen a los microorganismos siguen siendo escasos (Vitaglione, et al., 2015). Cabe recalcar que la investigación indagó en: las características fisicoquímicas, sensoriales y reológicas en los helados tras la aplicación de congelación criomecánica, probiótico encapsulado y prebiótico (inulina).

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cómo incide la aplicación de congelación criomecánica, las concentraciones de probiótico encapsulado y prebiótico en la producción de helados bajos en calorías?

1.3. JUSTIFICACIÓN

La demanda de alimentos que tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana se ha incrementado a nivel mundial. Existe un gran interés en la elaboración de este tipo de alimentos y esto se debe a las particularidades que se les atribuyen en cuanto a cuidado de la salud, mejora de la calidad de vida y prevención de enfermedades crónicas (Villanueva, 2015). Es por ello que la presente investigación tiene como objetivo elaborar un helado de leche de vaca enriquecido con un probiótico (*Bifidobacterium BB-12*) y un prebiótico (inulina), debido a que

los helados son productos alimenticios con gran potencial para ser transportadores de probióticos en comparación con otros productos fermentados (Lima, Bezerra, Olbrich, y Pinto, 2015). No obstante, el desarrollo de helados con bacterias probióticas requiere sustituir la tecnología convencional, razón por la cual se aplicó congelación criomecánica (congelación rápida con nitrógeno líquido seguida de una congelación mecánica), proceso que se caracteriza por evitar la pérdida de líquidos, sabores, aromas y nutrientes, además mantiene las características propias del helado, sus propiedades simbióticas y alarga la vida útil del producto (Mosquera, 2011). Adicionalmente, para asegurar el transporte del probiótico se utilizó un proceso de encapsulamiento por el método de extrusión o goteo, que consistió en proteger a los microorganismos mediante un agente gelificante (alginato de sodio) el cual resiste los altos valores de pH del tracto gastrointestinal haciéndolo un producto apto para personas de todos los grupos etarios.

De acuerdo a Lima et al. (2015) el helado es una matriz relativamente innovadora para la aplicación de probióticos. Por lo tanto, la elaboración de este producto permitió generar nuevas alternativas de producción y conservación de helados, ayudando a la mejora del estilo de vida de muchos de los habitantes de la provincia debido a la reducción de grasas y azúcares considerados como materia prima principal en la producción de este tipo de alimentos, pero también causantes de las principales enfermedades no transmisibles como diabetes, obesidad, osteoporosis, hipertensión y problemas cardiovasculares.

1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo General

Determinar la viabilidad de microorganismos probióticos microencapsulados (*Bifidobacterium BB-12*) tras la aplicación de congelación criomecánica para la producción de helados bajos en calorías con prebiótico (inulina) como sustituto de grasa y de cremosidad.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Estimar la viabilidad de la bacteria probiótica (*Bifidobacterium BB-12*) encapsulada con alginato de sodio como agente gelificante y libre mediante la simulación gástrica e intestinal.
- Establecer la concentración de prebiótico (inulina), necesaria para aportar características de cremosidad en un helado bajo en calorías.
- Realizar tratamientos criomécánicos en la producción de helados simbióticos bajos en calorías.

- Determinar las características fisicoquímicas y sensoriales de los tratamientos realizados.

1.4.3. Preguntas de Investigación

- ¿Cuál es el procedimiento que se utilizará para asegurar la viabilidad de la bacteria tipo *Bifido*?
- ¿Cuál es la diferencia del crecimiento logarítmico (expresado en UFC) entre las células libres y encapsuladas?
- ¿Qué características fisicoquímicas aportará la aplicación de congelación criomecánica al helado, en comparación con la congelación convencional?
- ¿Cuál es la mejor concentración de nitrógeno líquido para asegurar que la congelación criomecánica cumpla las funciones que se desea en el producto final?
- ¿Cómo serán escogidos los mejores tratamientos y mediante qué programa estadístico se tabularán los datos?
- ¿Qué aspectos se considerarán para determinar la factibilidad de la producción de helados bajos en calorías con probiótico encapsulado aplicando congelación criomecánica?

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Dentro de los trabajos de investigación en los que se utiliza *Bifidobacterium* BB-12, se encuentra el trabajo de Holkem et al., (2017) en la producción de microcápsulas de esta bacteria por emulsificación o gelificación, utilizaron alginato de sodio como material de pared del medio de cultivo liofilizado dispersado en aceite de canola y comprobaron que los probióticos encapsulados en condiciones gastrointestinales simuladas a distintos pHs (4.5, 6.0 y 7.5) tuvieron mayor resistencia que las células libres. Además lograron una estabilidad de 120 días. Sin embargo, observaron una pérdida de viabilidad de microorganismos a temperaturas de 7 y 25°C después de los 120 días, mientras que la mejor viabilidad se obtuvo en el almacenamiento congelado a -18°C.

En un estudio de comparación de dos técnicas de encapsulación, extrusión y coextrusión para proteger *Lactobacillus acidophilus* LA3, Silva et al., (2018) utilizan dos formulaciones para el material encapsulante: la primera alginato y la segunda una mezcla de alginato – shellac, empleando como sustrato solidificante al aceite de girasol. Demostraron una mejor viabilidad del probiótico encapsulado por el método de coextrusión con alginato–shellac reflejada en una mayor tasa de supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas de 6.2 y 7.2 log UFC/g, después de 60 días de almacenamiento, mientras que en el encapsulamiento con alginato por extrusión presentó un registro de 5.3 y 6.2 UFC/g.

En la búsqueda de desarrollar un helado funcional que cumpla con las características sensoriales del helado tradicional, Zúñiga (2017), desarrolló un helado con adición de prebiótico (Inulina) al 5% y bacteria probiótica (*L. casei*) en concentraciones de 0.5g y 1g en una unidad experimental de 3 L de leche entera de vaca, Este trabajo permitió determinar la viabilidad de los microorganismos mediante el método de diluciones seriadas por duplicado en agar MRS a 37°C por 72 horas obteniendo un resultado de 10^7 UFC/g en el lapso de 10 días. Además, logró comprobar que la aplicación de probióticos en helados no modifican las características sensoriales. Sin embargo, el uso de la bacteria (*L. casei*) no es la más recomendable en helados por su baja viabilidad.

Silva et al. (2019) en su investigación comprobaron la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei* libres y encapsulados con alginato-quitosano aplicado en helados

mediante la comparación de la eficiencia o supervivencia celular, resistencia a bajas temperaturas y supervivencia en simulaciones gastrointestinales. Para ello utilizaron como material de pared alginato-quitosano al 4% y como material secuestrante una solución de CaCl_2 al 0,005 M, por el método de extrusión o goteo. Para medir la eficiencia utilizaron 1 g de microcápsula y la adicionaron en 9 g de una solución de peptona estéril de igual forma con las células libres. En el caso de la resistencia a bajas temperaturas colocaron 25 g de helado en una solución de 225 ml en NaCl al 9% y luego inocularon en un caldo de Agar MRS e incubaron en condiciones anaerobias por 72 h a 37°C y en la simulación utilizaron 10 ml de células libres y de encapsuladas en una solución de 9.0 g/L de cloruro de sodio y 3.0 g/L de pepsina con pH ajustado a 2.1 y en intervalos de 30, 60 y 120 minutos inocularon para ver la supervivencia, llegando a la conclusión de que la reducción de viabilidad celular de *L. rhamnosus* encapsulado era superior a la de su forma libre.

En otro estudio de encapsulación de *Bifidobacterium* aplicadas en leche de vaca y cabra, Prasanna y Charalampopoulos (2017) tuvieron como objetivo principal crear microcápsulas de *Bifidobacterium longum* mediante el método de extrusión en una variedad de matrices, tales como, alginato de sodio (AS), leche de vaca-alginato de sodio (LVAS), leche de cabra-alginato de sodio (LCAS) y caseína hidrolizada-alginato de sodio (CHAS). Evaluaron el rendimiento de encapsulación, el tamaño y la morfología superficial de las microcápsulas y la supervivencia de las células bacterianas encapsuladas, obteniendo un tamaño promedio para LVAS y LCAS de 2.8 ± 0.3 mm y 3.1 ± 0.2 mm respectivamente. En el caso del rendimiento, las mejores fueron LVAS Y LCAS ya que fueron más densas y en el caso de la supervivencia las células bacterianas encapsuladas en LCAS mostraron mayor tasa de supervivencia en leche de vaca con (7.61 log ufc/g) y en leche de cabra con (8.10 log ufc/g). Este estudio mostró que las LVAS y LCAS son aptas para encapsular *Bifidobacterium longum* utilizando la técnica de extrusión, pero sobre todo la LVAS tiene mayor potencial para ser utilizado como un nuevo material de encapsulación para bacterias probióticas, conservando las altas concentraciones de células probióticas durante el almacenamiento de leche de vaca y cabra en refrigeración.

En la formulación de un helado dietético sabor a arándano con características prebióticas Barrionuevo et al., (2011), evaluaron las características sensoriales y composición fisicoquímica del helado, obteniendo una aceptabilidad de 86% en una concentración de 40% de fruta y 39.25 g de inulina por cada 100 g, lo que dio lugar a la reducción del 49,23 % de las calorías, 55.10 % de los hidratos de carbono y reemplazo del 100% de grasas, su textura fue

cremosa, sin cristales de hielo, de consistencia firme, fusión lenta y cuerpo esponjoso, logrando obtener un producto con una estructura suave, cremosa y estable.

En su investigación de congelación criogénica de frutas frescas para mantener la calidad y conservación durante el almacenamiento, Alhamdan et al (2015) evaluaron dos métodos de congelación, la convencional colocando frutas maduras en almacenamiento durante nueve meses a -20°C y -40°C y la criogénica utilizando nitrógeno líquido. En las muestras congeladas por el sistema convencional se determinó la estabilidad del método cada tres meses midiendo propiedades texturales y nutricionales llegando a la conclusión que, el tiempo de congelación y almacenamiento influyen negativamente en aspectos como color, azúcares (aumento de glucosa, fructuosa y disminución de sacarosa) y actividad enzimática (poli fenol oxidasa y peroxidasa), en cuanto a los tiempos de congelación, las frutas congeladas convencionalmente lograron congelarse totalmente en 1800 minutos, mientras que con la congelación criogénica en 10 minutos, además este método permitió obtener una fruta con mejor calidad textural y estabilidad en color y azúcares.

Alfaro, Siramard, Chouljenko y Sathivel (2018) analizaron los efectos del tratamiento previo de nitrógeno líquido sobre la deshidratación osmótica en arándanos. Para ello, evaluaron los efectos del nitrógeno previo al proceso de deshidratación, obteniendo que la aplicación de un tratamiento de congelación criogénica permite una mayor pérdida de humedad, ganancia de sólidos, mantiene la integridad en la textura y calidad nutricional, en comparación con muestras deshidratadas sin tratamiento de congelación.

Estudiando los efectos de las condiciones de almacenamiento, encapsulación e inclusión de las partículas de chocolate sobre la estabilidad de las bacterias probióticas en el helado, con el fin de mejorar el recuento de bacterias probióticas, Champagne et al (2015), aplicaron el encapsulamiento en dos bacterias *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus rhamnosus* inoculados en polvo MEP, reflejando una mayor viabilidad en *B. longum*, mayor aun con la adición de partículas de chocolate. En cuanto a almacenamiento, la temperatura con menor viabilidad fue de -16°C con ciclos periódicos de descongelación que aquella que se mantuvo constante a -20°C .

2.2. MARCO TEÓRICO

A fin de permitir al lector una mayor comprensión del tema de investigación, se desarrolló la definición de los términos contenidos en el presente trabajo y de la terminología relacionada.

2.2.1. Leche

La leche es un líquido blanquecino constituido por lactosa, grasa, minerales y vitaminas, producida por las glándulas mamarias de todos los animales mamíferos y sirve de alimentación para sus crías luego del parto. Toda leche que sea destinada para el consumo humano debe de provenir de animales sanos, es decir no puede ser procesada ninguna leche proveniente de animales infectados o enfermos (Mourad, Bettache y Samir, 2014).

En la tabla 1 se presenta la composición de la leche de diferentes mamíferos tales como vaca, oveja, cabra, y camello con respecto al contenido de agua, proteínas, grasa, lactosa y ceniza donde se puede evidenciar que la composición de la leche varía de acuerdo a la especie, por ejemplo, la leche de vaca es una de las leches que posee mayor cantidad de agua y lactosa, pero menores cantidades de grasa si es comparada con la oveja y cabra.

Tabla 1. Composición de la leche de diferentes mamíferos en g/100 ml de leche

Especies	Agua	Proteínas	Grasa	Lactosa	Ceniza
Vaca	87,2	3,5	3,7	4,9	0,72
Oveja	82,7	5,5	6,4	4,7	0,92
Cabra	86,5	3,6	4,0	5,1	0,82
Camello	87,7	3,5	3,4	4,7	0,71

Fuente: Mourad et al. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. doi:10.15739/ibspr.005

2.2.1.1. Composición química de la leche

La leche está compuesta principalmente por cuatro elementos en el siguiente orden, agua 85%, lactosa, grasa y proteínas con un contenido medio de 3,3% p/p. La grasa se encuentra en forma de glóbulos grasos con diámetros que varían de 0,1 a 20 μ m, y un diámetro medio de unos 35 μ m, con un total de 10 billones de glóbulos grasos en cada litro de leche. La composición química de la leche varía por algunos factores como genéticos (especies y razas), estaciones, fases de lactancia, enfermedades y alimentación. Además su estructura se vuelve variable en equilibrio termodinámico (Rodrigues, Tuler, Tavares, Schuck y Carvalho, 2019).

2.2.1.2. Propiedades físicas de la leche de vaca

En la tabla 2 se presentan las propiedades físicas de la leche de vaca, entre las que se encuentran: color, conductividad, propiedades térmicas, comportamiento reológico, densidad, propiedades redox, propiedades coligativas y capacidad de amortiguación de la actividad superficial (Fox, Uniacke, McSweeney y Mahony, 2015).

Tabla 2. Propiedades físicas de la leche

Propiedad	Valor
Presión Osmótica	≈ 700kPa
a_w	≈ 0.993
Aumento ebulloscópico	≈ 0.15K
Descenso crioscópico	≈ 0.522 K
E_h	+0.20
Densidad (20°C)	≈ 1,030 kg/m ³
Gravedad específica (20°C)	≈ 1,030
Conductividad específica	0.0040 $\Omega^{-1} m^{-3}$
Fuerza iónica	≈ 0.08M
Tensión superficial (20°C)	≈ 52N m ⁻¹

Fuente: Fox et al. (2015). Physical Properties of Milk. doi:10.1007/978-3-319-14892-2_8

2.2.1.3. Evaluación sensorial de la leche

La evaluación sensorial es una serie de pruebas que se realizan con los órganos de los sentidos y permiten determinar la calidad de la leche a través de su color, olor y aroma. En la tabla 3 se describen las características sensoriales que debe de cumplir una leche de buena calidad (Buendía, 2015).

Tabla 3. Características sensoriales de la leche

Características de la leche	Descripción
Color	Blanco, ligeramente amarillento y opaco
Sabor	Ligeramente dulce
Olor	Delicado y característico de la leche
A simple vista y tacto	Fluido y libre de impurezas

Fuente: Buendía, M (2015). Elaboración, producción y comercialización de derivados lácteos. Editorial Macro.

2.2.1.4. Derivados de la leche

El Sistema Ecuatoriano de Normalización (INEN,1984) en su Norma Técnica 0003, manifiesta que los productos lácteos son alimentos destinados a la alimentación humana, proceden de la vaca u otros mamíferos y se caracterizan por tener un alto valor nutricional.

Entre los derivados lácteos se encuentran: queso, requesón, crema, mantequilla, leche condensada, helados, entre otros.

2.2.2. Helado

Un helado es un producto alimenticio, higienizado, edulcorado, obtenido a partir de una emulsión de grasas y proteínas, con la adición de otros ingredientes y aditivos permitidos en los códigos normativos vigentes o sin ellos, sometidos a congelación con batido o sin él, en condiciones tales que garanticen la conservación del producto en estado congelado o parcialmente congelado durante su almacenamiento y transporte. Técnicamente, es un producto batido constituido por burbujas de aire, que están limitadas por películas de una mezcla de proteínas, azúcares, sales y otros componentes disueltos (Isique, 2014 y Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0706], 2013).

2.2.2.1. Clasificación de helados

El Sistema Ecuatoriano de Normalización (INEN, 2013) en su Norma Técnica 0706 clasifica a los helados de acuerdo a sus componentes que pueden ser: de leche, de crema de leche, de leche con grasa vegetal, de yogur, de yogur con grasa vegetal, de grasa vegetal, no láctico, sorbete o sherbet, de fruta, de agua o nieve y de bajo contenido calórico.

2.2.2.1.1. Helado de leche

Son aquellos helados que contienen materia grasa de origen láctico que representa el 2,5% del total de la masa, así mismo deben de contener un 6% de extracto seco magro lácteo que es la parte de sólidos que contiene la leche al quitarle la grasa, es decir, las proteínas lácteas y la lactosa (Ramírez J. , 2017).

Isique (2014) menciona que este tipo de helados posee entre el 12% y 27% de sólidos totales y una incorporación de aire no mayor que al 100% del volumen de la mezcla.

2.2.2.1.2. Helado de bajo contenido calórico

Su composición media es de 14,4% de azúcar, 9,6% de jarabe o miel, 73% de agua y 3% de base fructosa. Además, pueden contener pulpa en diversos grados (Isique, 2014).

Este helado se caracteriza por la reducción del contenido calórico, poseer menos azúcares, grasas y aditivos en comparación con un helado normal (Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0706], 2013).

2.2.2.1.3. Cualidades nutricionales de helados

En la tabla 4 se señalan las cualidades nutricionales del helado con respecto a las propiedades de sus componentes.

Tabla 4. Cualidades nutricionales de helados

Cualidades nutricionales	Descripción
Energía	Según posean o no cobertura, los helados de base láctea contienen entre 150 y 350 Kcal cada 100 gramos.
Hidratos de carbono	Proceden del azúcar, lactosa y glucosa en concentraciones de 16 a 40% en helados de crema o leche.
Grasa	Es aportada por la leche y sus derivados, son en su mayoría saturados y en algunos casos poseen grasas trans.
Proteína	Proviene de la leche, productos lácteos y aderezos que se añaden al helado.
Vitaminas	Los helados de crema o leche aportan vitaminas liposolubles.
Minerales	Proporcionados por productos lácteos, frutas y frutos secos (calcio, fósforo, potasio y magnesio).

Fuente: Santucho, H (2017). Helados. http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/revista/pdfs/56/56_07_Helados.pdf

2.2.2.2. Ingredientes y características sensoriales en helados

Dentro de los ingredientes permitidos en la fabricación de helados se encuentran: leche, constituyentes derivados de la leche, productos lácteos frescos, concentrados, deshidratados,

fermentados, reconstituidos o recombinados, grasas, aceites vegetales o de animales comestibles, proteínas comestibles no lácteas, edulcorantes naturales y artificiales permitidos, agua potable, huevos y productos de huevo pasteurizados o que hayan sido sometidos a un tratamiento térmico equivalente, frutas y productos a base de fruta y agregados alimenticios, destinados a conferir aroma, sabor o textura. Por ejemplo: café, cacao, miel, nueces, cereales, licores, sal, coberturas entre otros (Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0706], 2013). Los ingredientes utilizados para la elaboración de un helado le dan el valor agregado al producto, disponibilidad y calidad del acabado (Deosarkar et al., 2016).

2.2.2.2.1. Agua

En todos los tipos de helados sorbetes o granizados está presente el agua en un porcentaje variable debido a que puede ser añadido a la mezcla o bien porque está presente en forma natural en el resto de ingredientes empleados en las elaboraciones, por este motivo el agua es imprescindible ya que le confiere al helado su textura característica producida por la congelación de los componentes de la mezcla (López J. , 2017).

2.2.2.2.2. Grasas

La función de la grasa en los helados es dotarlos de cremosidad y cuerpo. Hace que los helados adquieran una textura suave y ligeramente untuosa ayudan a retener el aire introducido durante el proceso de mantecación, además le confiere sabor (López J. , 2017).

Las principales grasas utilizadas en el proceso de elaboración del helado son :

- a) Grasa de origen lácteo: está contenida en la propia leche o se añade en forma de nata líquida, o incluso de mantequilla.
- b) Grasa de origen vegetal: es la grasa que se puede encontrar en el cacao, los frutos secos, y otros vegetales, como el coco, la palma o la colza.

2.2.2.2.3. Leche en polvo desnatada

Es la más utilizada en la industria heladera, ya que al no tener grasa equilibra el porcentaje final de la materia grasa de la mezcla del helado y a la vez aumenta el valor nutricional del mismo. La leche en polvo desnatada tiene la característica de retener el agua, dotando de cuerpo y estructura al helado, reduciendo el agua libre y por lo tanto, minimizando la formación de cristales de hielo. Además, junto a la grasa ayuda a la retención de aire incorporado durante el proceso de mantecación (López J. , 2017).

2.2.2.2.4. Ovoproductos

La utilización de ovoproductos en heladería se lleva a cabo, en primer lugar, para conseguir la seguridad alimentaria en la industria heladera y en segundo lugar, porque ayuda a estabilizar las cualidades sensoriales del helado, ya que la ovoalbúmina es responsable del porcentaje de

espuma que se produce, mientras que la ovomucina actúa como un estabilizador (López J. , 2017).

2.2.2.2.5. Edulcorantes

El edulcorante más empleado es la sacarosa, que se caracteriza por proporcionar dulzor que incide en el punto de congelación, cuerpo, textura y además resalta el sabor del helado. Se considera óptimo el empleo del 15 % de sacarosa. Existen otros tipos de edulcorantes que generalmente son empleados por sus bajos costos como el jarabe de glucosa. Pero también se pueden emplear edulcorantes que no proporcionan calorías significativas como sucralosa, aspartame, sacarina, entre otros (Deosarkar et al., 2016).

2.2.2.2.6. Sólidos no grasos de la leche

La lactosa, caseína, proteínas de suero, minerales, vitaminas, y otros componentes pertenecen al grupo de los sólidos no grasos de la leche. Las proteínas aportan muchos beneficios en el desarrollo de helados, ya que permiten mejorar la emulsificación, la capacidad de retención de agua y por ende la estructura del producto debido a que la viscosidad de la mezcla se realza dando cuerpo el deseado al helado y aumentando el tiempo de fusión (Deosarkar et al., 2016).

2.2.2.2.7. Emulsificantes

Actúan en las grasas empleadas en el helado, es decir, permiten una mezcla homogénea entre la grasa y el agua. Los mono, diglicéridos y polisorbatos son utilizados como emulsificantes (Deosarkar et al., 2016).

2.2.2.3. Punto Overrun

Ramírez, Rengifo y Rubiano (2015) denomina al punto overrun como la reacción que ocurre en helados tras el proceso de batido, donde se da un incremento del volumen de la mezcla por adición de aire. Por otro lado Abrate (2017) señala que, este proceso es utilizado en la elaboración de helados, ya que se ha comprobado que incrementar el volumen en la mezcla permite mejorar la textura, estabilidad y propiedades físicas.

2.2.3. Probióticos

Los probióticos son definidos por la FAO y la OMS como organismos vivos, que cuando son administrados a un huésped en cantidades adecuadas le deparan beneficios para la salud (Villanueva, 2015).

De acuerdo a González, Zacarías, Olivares y Cruchet (2014) Las propiedades probióticas dependen de cepas específicas, por ello se rotula en los productos el nombre de las cepas presentes y la cantidad, con el propósito de que el consumidor pueda identificarlas y asociarlas a los beneficios que desea obtener. Entre los microorganismos probióticos utilizados en el consumo humano se encuentran las bacterias ácido-lácticas (BAL) que comprenden

Lactobacilos y *Bifidobacterias*, pero también se utilizan otras cepas bacterianas no patógenas, como *Streptococcus*, *Enterococcus* y microorganismos no bacterianos, como *Saccharomyces boulardii*, que es una levadura no patógena (Fangueiro, Souto y Silva, 2016).

2.2.3.1. Beneficios que confieren el consumo de probióticos

Entre los beneficios que se le atribuyen se encuentran la inhibición del crecimiento patógeno, mantenimiento de la microflora intestinal que promueve la salud, la estimulación del sistema inmunológico, alivio del estreñimiento, la absorción de calcio, la síntesis de vitaminas, agentes antimicrobianos y la predigestión de proteínas. Cabe mencionar que los efectos de los probióticos son específicos de la cepa, por esta razón es importante especificar el género y la especie de las bacterias probióticas. Los efectos beneficiosos de estas bacterias pueden deberse en gran parte a la producción de ácido y/o bacteriocinas que reducen la presencia de patógenos y mejora el sistema inmune. Los niveles de dosis dependen de la cepa considerada, pero por lo general se acepta de $10^6 - 10^7$ UFC/g de producto por día (Chavarri, Maranon y Villarán, 2012). Existen numerosos reportes que describen sus beneficios para la mejora de la salud entre ellas la reducción de infecciones gastrointestinales, actividad antimicrobiana, mejoría en el metabolismo de la lactosa, reducción en el colesterol sérico, estimulación del sistema inmunológico, propiedades antimutágenas, propiedades anti-cancerígenas, propiedades antidiarreicas, mejoría en la enfermedad inflamatoria intestinal y supresión de la infección por *Helicobacter pylori* mediante la adición de cepas seleccionadas a los productos alimenticios (Fangueiro et al., 2016).

2.2.3.2. Características que deben de tener los microorganismos probióticos

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberán ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que deben ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación [FAO], 2006).

2.2.3.3. Clasificación de microorganismos probióticos

Los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los probióticos más empleados en la industria de alimentos. En la tabla 5 se detalla la clasificación de microorganismos probióticos, su género y especie (Zúñiga, 2017).

Tabla 5. Microorganismos probióticos

Género	Especie
<i>Lactobacillus</i>	<i>Acidophilus</i>
	<i>Casei</i>
	<i>Cripatus</i>
	<i>Johnsonii</i>
	<i>Lactis</i>
	<i>Paracasei</i>
	<i>Fermentum</i>
	<i>Plantarum</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Rhamnosus</i>
	<i>Salivarius</i>
	<i>Adolescentes</i>
	<i>Bifidum</i>
	<i>Essensis</i>
	<i>Infantis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Lactis</i>
	<i>Longum</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Faecalis</i>
	<i>Faecium</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Freudenreichii</i>
	<i>Boulardii</i>

Fuente: Zúñiga, G (2017). Desarrollo de un helado funcional con adición de prebióticos y bacterias probióticas (tesis de maestría). Universidad de Azuay

2.2.3.3.1. Lactobacillus

Son bacterias de tipo ácido lácticas, anaerobias pero toleran condiciones aerobias (Zúñiga, 2017).

2.2.3.3.2. Bifidobacterium

Las *Bifidobacterium* son microorganismos anaerobios Gram positivos que se caracterizan por mejorar la intolerancia a la lactosa. El aumento de este tipo de microorganismos ayuda a mejorar la conversión de carbohidratos en ácidos orgánicos como es el caso del ácido láctico a acético y mejora los movimientos gastrointestinales (Zúñiga, 2017).

2.2.4. Prebióticos

El término “prebiótico” se refiere a los ingredientes fermentados selectivamente que producen cambios específicos en la composición y/o la actividad de la flora gastrointestinal, con los consecuentes beneficios para la salud del huésped. Esta definición se superpone en parte con la de la fibra dietética, pero agrega la selectividad de los prebióticos para algunos microorganismos específicos (por ejemplo, la ingesta de fructooligosacáridos e inulina favorece selectivamente a mejorar la viabilidad de bifidobacterias) (Oliveira y González, 2016). Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto, alcanzando el intestino grueso, donde son degradadas por la microflora bacteriana (Villanueva, 2015).

Según Fuentes, Acevedo y Gelvez, (2015) los prebióticos son carbohidratos de cadena corta, por ejemplo algunos fructooligosacáridos, polidextrosa y oligosacáridos de la soya y la avena, que se encuentran presentes en alimentos como la cebolla, ajo, banano, espárragos y alcachofa. Algunos de estos prebióticos cuando son incorporados en la dieta, alteran la microbiota intestinal disminuyendo los recuentos de coliformes, bacteroides y cocos, aumentando las bifidobacterias hasta en diez veces.

2.2.4.1. Requisitos que deben de cumplir los prebióticos

Deben de cumplirse tres criterios esenciales para que una determinada sustancia sea considerada como un prebiótico viable, ser indigerible o inalterable, servir como sustrato fermentable y permitir una fermentación selectiva, es decir, estimular el crecimiento o la actividad de determinadas bacterias del intestino que provoquen efectos beneficiosos al huésped (Zúñiga, 2017).

2.2.4.2. Clasificación de prebióticos

En la tabla 6 se muestra una lista con sustancias que han sido propuestas como prebióticas y cada una de las características que cumplen para considerarse viable.

Tabla 6. Sustancias propuestas como prebióticas

	Indigerible	Fermentable	Selectivo
Inulina	SI	SI	SI
Oligofruktosas	SI	SI	SI
Transgalacto-oligosacárido	SI	SI	SI
Lactulosa	SI	SI	SI
Isomalto-oligosacáridos	En parte	SI	Probable
Lactosacarosa	ND	SI	Probable
Xilo-oligosacáridos	ND	SI	Probable
Oligosacáridos de soja	SI	SI	ND
Gluco-oligosacáridos	ND	ND	ND
Oligodextrano	ND	ND	ND
Ácido Glucónico	ND	ND	ND
Gentio-oligosacáridos	ND	ND	ND
Oligosacáridos de pectina	SI	ND	ND
Glucomanano	SI	ND	ND
Lactosa	NO	SI	NO
Hemicelulosa	SI	NO	NO
Almidon resistente	SI	SI	ND
Oligosacáridos de melibiosa	ND	ND	ND
N-Acetyl-chito-oligosacárido	ND	ND	ND
Polidextrosa	ND	ND	ND
Alcohol-azúcares	Variable	ND	ND

ND: no definido

Fuente: Zúñiga, G (2017). Desarrollo de un helado funcional con adición de prebióticos y bacterias probióticas (tesis de maestría). Universidad de Azuay

Los prebióticos que cumplen con las condiciones mencionadas son:

2.2.4.2.1. Oligofruktosa (OF)

Son producidas mediante un proceso de hidrólisis parcial de la inulina. Esta sustancia posee un dulzor muy similar al del azúcar y es más soluble que la inulina. La fermentación de la OF ocurre en el colon y provoca efectos fisiológicos como: el incremento de *Bifidobacterium* en el colon, mayor absorción de hierro, magnesio, calcio y fósforo y reducción de los niveles de colesterol (Zúñiga, 2017).

2.2.4.2.2. Inulina

Es de tipo fructano y se caracteriza por tener la capacidad de no ser digerida ya que resiste a la hidrólisis de enzimas digestivas y llega a fermentarse en el colon. Permite el incremento de biomasa fecal mejorando los procesos intestinales debido a la fibra dietética que posee este prebiótico. Además, disminuye las bacterias patógenas e incrementa las beneficiosas tales como los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Zúñiga, 2017).

2.2.4.2.3. Galactooligosacáridos

Es absorbida por el intestino delgado y luego fermentado en el colon proximal. Se obtiene durante la hidrólisis de la lactosa mediante la transglicosilación (Zúñiga, 2017).

2.2.4.2.4. Lactulosa

Este prebiótico proviene de un disacárido sintético derivado de la lactosa, el cual es absorbido por el intestino delgado, pero rápidamente fermentado en la microflora del colon. Tiene la función de disminuir microorganismos patógenos e incrementar aquellos beneficiosos (Zúñiga, 2017).

2.2.5. Inulina y características en helados

La inulina en la producción de alimentos puede ser empleada como sustituto de azúcar, grasa, texturizante y estabilizador. Por ello la industria heladera con el fin de mejorar sus productos contribuyendo a la salud mediante la buena alimentación, ha adicionado la inulina como sustituto de azúcar y grasa, emulsificante y depresor del punto de congelación.

La cantidad de inulina permitida en un alimento es de 10 g/día, y para dosis múltiples hasta 20 g/día. En dosis mayores puede provocar intolerancias, ruidos intestinales y flatulencias como consecuencia del proceso de fermentación.

La inulina puede sustituir hasta el 100% de grasas, contribuir a la palatabilidad y cremosidad en postres lácteos congelados. Adicionalmente se ha comprobado que, 0,25 g de inulina permiten reemplazar 1 g de grasa, es decir, se puede llegar a reducir el contenido energético de 37,6 kJ/g de grasa, a 2,09 kJ/g de la inulina hidratada. Además, inhibe el crecimiento de cristales de hielo en el helado mejorando la viscosidad y el tiempo de derretimiento sin involucrar características sensoriales negativas (González, Velásquez y Ramírez, 2017).

2.2.6. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos y nutricionales básicos en una o varias funciones del organismo y que se traducen en una mejora de la salud o en una disminución del riesgo de sufrir enfermedades. El término Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80 con la publicación de la reglamentación para los “Alimentos de uso específico de salud” (Foods for Specified Health Use” o FOSHU) y se refiere a aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes que desempeñan una función fisiológica específica en el organismo humano, más allá de su contenido nutricional (Fuentes *et al.*, 2015).

2.2.7. Simbióticos

El término “simbiótico” se refiere a los productos que contienen tanto probióticos como prebióticos. Los prebióticos constituyen el sustrato fundamental de las bacterias probióticas. Este término debe reservarse para productos en los que el componente prebiótico favorezca selectivamente al componente probiótico (p.ej. oligofruktosa o inulina y Bifidobacterias, pero no oligofruktosa o inulina con *Lactobacillus (L) casei*, sin embargo, si la sinergia es ampliamente entendida, esta última combinación es posible (Oliveira y González, 2016)

2.2.8. Encapsulación

La encapsulación es el proceso mediante el cual se atrapa una sustancia dentro de otra sustancia. La sustancia encapsulada puede llamarse material principal, agente activo relleno, fase interna o fase de carga útil. Mientras que la sustancia que es encapsuladora se denomina revestimiento, membrana, cáscara, material del portador, material de la pared, fase externa, o matriz (Rodríguez, Rojas y Rodríguez, 2016).

Las bacterias probióticas son empleadas en la producción de alimentos funcionales, sin embargo, para producir beneficios en la salud del huésped, es necesaria la aplicación de un encapsulamiento que permita mantener la viabilidad de los microorganismos desde su elaboración y consumo, hasta el paso por el tracto gastrointestinal. Es decir, el encapsulamiento es empleado como una barrera física, que permite atrapar agentes activos dentro de un material portador para asegurar la resistencia a condiciones adversas. Mediante este proceso se evita que los microorganismos probióticos se multipliquen en los alimentos de modo que cambien las características sensoriales. Es importante que los materiales empleados como cáscara protectora sean de características alimenticias biodegradables y capaces de formar una barrera entre la fase interna y su entorno (Sandoval, Cu, Peraza y Acereto, 2016).

Entre los materiales de pared empleados en el proceso de encapsulación se encuentran algunos polímeros, carbohidratos, grasas, ceras y son empleadas de acuerdo al material a proteger como

por ejemplo compuestos bioactivos como proteínas, vitaminas, antioxidantes y lípidos, con el objetivo de producir alimentos con mayor funcionalidad y estabilidad. Las tecnologías de encapsulación se pueden utilizar con el fin de cumplir con muchos propósitos dentro de la industria alimentaria como el control de la reacción oxidativa, enmascarando sabores, colores y olores, proporcionando una liberación sostenida y controlada, extendiendo la vida útil de un producto, entre otros (Fangueiro et al, 2016).

2.2.8.1. Principales técnicas de encapsulación de probióticos.

En la tabla 7 se presentan las técnicas más utilizadas para la encapsulación de probióticos así como la descripción de cada una de ellas y su metodología.

Tabla 7. Técnicas de encapsulación

Técnica	Descripción	Metodología
Secado por aspersión (Spray drying)	Método de secado efectivo y económico, sin embargo, no útil aplicarlo en encapsulamiento de probióticos, debido a la baja estabilidad y supervivencia durante el almacenamiento.	Consiste en agregar el compuesto activo en el encapsulante aplicando atomización. El disolvente se evapora por contacto con aire caliente logrando que los microorganismos queden atrapados en el encapsulante (Chavarri et al., 2012).
Enfriamiento por aerosol (Spray-cooling)	Las cápsulas producidas no son solubles en agua, debido a las condiciones térmicas del proceso se utiliza raramente en la encapsulación de probióticos.	Se requiere utilizar una matriz fundida con el punto de fusión bajo para encapsular bacterias y la mezcla debe inyectarse por una corriente de aire frío para lograr la solidificación del material portador (Chavarri et al., 2012).
Tecnología de lecho fluidizado (Fluid-bed agglomeration and coating)	Esta técnica es útil para la aglomeración, el flujo de las partículas es contracorriente de la dirección del aerosol donde se aglomeran selectivamente partículas más pequeñas.	Se basa en la separación de partículas individuales en una corriente de gas y en la fijación de la sustancia de la membrana por polimerización, secado o cristalización alrededor de la base (Chavarri et al., 2012).
Liofilización (Freeze and vacuum-drying)	Esta técnica es un proceso de deshidratación.	Consiste en la congelación del producto y luego se reduce la presión para permitir que el agua congelada sea sublimada (Sandoval et al., 2016).
Emulsión (Emulsion-based)	Produce cápsulas con tamaños extremadamente grandes.	Requiere la utilización de dos tipos de emulsiones, pueden ser acuosas o hidrofóbicas. (Araújo Gutiérrez, Ruiz y Montoya, 2015).
Extrusión (extrusion)	Permite la producción de cápsulas, a nivel de laboratorio se realiza con ayuda de jeringas, mientras que escala piloto se utiliza un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de conteo controlada.	El proceso consiste en la preparación de una solución hidrocoloide y la adición de los microorganismos para hacer pasar dicha solución por una aguja con el fin de formar gotas que se dejan caer sobre la solución de iones divalentes para provocar la gelificación (Araújo et al., 2015).

2.2.8.2. Materiales empleados en encapsulación

2.2.8.2.1. Alginato de sodio

El alginato es un polisacárido natural, extraído de varias especies de algas compuestas por β -D manurónico y α -L ácidos gulurónicos. El alginato de sodio es el más utilizado en el

encapsulamiento de probióticos y esto se debe a las características de los mismos como su simplicidad, no son tóxicos y bajo costo. Existen algunas desventajas en la utilización de alginato como sensibilidad al ambiente y condiciones estomacales, es por ello que en muchas ocasiones se recomienda mezclar alginato con otros compuestos poliméricos o la modificación estructural mediante el uso de aditivos (Burgain, Linder y Scher, 2011)

2.2.8.2.2. Goma Gellan y goma xantana

La goma gellan es un polisacárido derivado de *Pseudomonas Elodea* que se constituye en cuatro monómeros que son glucosa, ácido glucorónico, glucosa y ramnosa. Estas gomas han sido ampliamente empleadas para encapsular probióticos y esto se debe a su alta resistencia a medios ácidos a diferencia del alginato (Burgain et al., 2011).

2.2.8.2.3. Carrageninas

Son polisacáridos sulfatados, que provienen de algas rojas, este compuesto es empleado como aditivo alimentario, actúa como espesante, gelificante, reforzador de textura, estabilizador. Requiere altas temperaturas para la disolución entre 60 a 90°C en concentraciones del 2-5%. Sin embargo, debe de considerarse que al encapsular probióticos las temperaturas deben de oscilar entre 40 y 50 °C a la que se añaden las células a la solución polimérica (Chavarri et al., 2012).

2.2.8.2.4. Quitosano

Es un derivado de la quitina, se encuentra principalmente en conchas de crustáceos, hongos, moluscos e insectos. Este polímero es un polisacárido lineal, que se puede considerar como copolímero que consiste en el β -(1,4) ligado aleatoriamente distribuido D-glucosamina y la N-acetil-D-glucosamina. Las propiedades funcionales de quitosano se determinan por el peso molecular, pero también por el grado de acetilación (DA). Quitosano es soluble en ácido a los medios neutrales, pero la solubilidad y la viscosidad de la solución son dependientes en la longitud de cadenas y del DA (Chavarri et al., 2012).

2.2.8.2.5. Almidón

El almidón es un polisacárido que se caracteriza por su estabilidad en medios ácidos como los jugos gástricos, por ello no son digeridos por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado alcanzando el colon donde es fermentado y asegura mayor cantidad de entrega de células microbianas en el intestino grueso (Burgain et al., 2011).

2.2.8.2.6. Proteína del suero

Esta proteína se la obtiene del suero generalmente después de la elaboración del queso. Las proteínas del suero son obtenidas por ultrafiltración, después de este proceso, se pasteuriza, se

evapora, y finalmente se seca por el método de aspersión en las bajas temperaturas para evitar la desnaturalización de la proteína. (Chavarri et al., 2012).

2.2.8.3. Ventajas del proceso de encapsulación de probióticos.

Entre las ventajas que ofrece la microencapsulación se encuentran: aumento de viabilidad y supervivencia, mayor resistencia a altas temperaturas, aumento de la resistencia al ácido y a las condiciones de la sal biliar, protección al microorganismo del ambiente y las microcápsulas se pueden añadir a todo tipo de productos lácteos (Fangueiro et al, 2016).

2.2.9. Congelación

La congelación es un método muy eficiente en la conservación de los alimentos sobre todo en aspectos de color, sabor, valor nutritivo y en pocas cantidades para la retención de la textura. Este proceso consiste en reducir la temperatura del producto por debajo del punto de congelación del agua (0°C) a -18°C de forma que parte del agua del alimento se convierta en hielo, produciendo desecación del alimento y evitando la proliferación de bacterias al momento que el agua libre del producto se congela, sin embargo, mientras menor sea la temperatura de congelación, los cristales de hielo serán más pequeños y se evitarán daños en la estructura del alimento (Willenberg, 2015).

2.2.9.1. Defectos presentados en la congelación.

En los alimentos de alta humedad, la tasa del crecimiento de cristal de hielo no es generalmente limitado por el proceso de transferencia de masa, excepto durante la última etapa de la congelación cuando la temperatura es baja, la viscosidad es alta y el agua no congelada es baja, provocando la formación de grandes cristales de hielo, alterando de forma significativa la calidad de algunos productos alimenticios. Otro de los defectos que se presenta es el tiempo de congelación del producto ya que este es influenciado por el tamaño del producto afectando las propiedades físicas, térmicas y el coeficiente de transferencia de calor, de acuerdo a lo reflejado en la ecuación de Planck (Muthukumarappan, Marella y Sunkesula, 2019).

2.2.9.2. Velocidad de congelación.

Existen diversas maneras de definir la velocidad de congelación siendo estas: el tiempo característico (lenta y rápida), el tiempo nominal y la velocidad media de congelación (Fellows, 2017).

2.2.9.2.1. Congelación Lenta.

La congelación lenta provoca que la cristalización extracelular aumente por ósmosis la deshidratación de las células, es decir permite la formación de grandes cristales de hielo y la disminución considerablemente del volumen de la célula. Este movimiento del agua junto a la

acción mecánica de los cristales de hielo sobre las paredes celulares, ocasiona defectos en la textura dando lugar a la aparición de exudados durante la descongelación (Berk, 2018).

2.2.9.2.2. Congelación Rápida

La congelación rápida produce que la cristalización ocurra simultáneamente en los espacios extracelulares e intracelulares. El movimiento del agua es pequeño, produciéndose cristales pequeños. Por todo ello los defectos sobre el producto son menores en comparación con la congelación lenta. No obstante, velocidades de congelación muy elevadas pueden provocar en algunos alimentos agrietamiento o rotura de sus tejidos, razón por la cual no es recomendable congelar demasiado rápido alimentos con alto contenido de agua (Berk, 2018).

2.2.9.3. Congelación criogénica

Según el NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, Estados Unidos) la criogénica es la ciencia encargada de la producción de los efectos de muy baja temperatura. La palabra se origina del griego "kryos" que significan "helada" y "génico" que significa "producir" (Kumar, Tiwari y Kumar, 2018).

En la tabla 8 se muestran las propiedades físicas del nitrógeno líquido utilizado en la congelación criogénica.

Tabla 8. Propiedades físicas del nitrógeno líquido

Propiedad	N₂(l)
Densidad (kg/m ³)	808
Punto de ebullición (°C)	-196
Conductividad térmica (J)	0.14
Calor específico del líquido (J/kg)	0.5
Calor latente de fusión (kJ/kg)	25.8

Fuente: Kumar, Y., Tiwari, S. y Kumar, Y. (2018). Cryogenic Freezing Technology. International Journal Pure & Applied Bioscience, 6(2), 1343-1346. doi: <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.6458>

2.2.9.3.1. Nitrógeno Líquido (N₂l)

El nitrógeno líquido es una sustancia inerte que tiene la capacidad de congelar a -77 K, convirtiéndose en ultra congelador es decir, congela con mayor rapidez provocando una menor deshidratación de los productos y daños en sus tejidos, manteniendo sus propiedades físicas y químicas.

El uso de este sistema de congelación es autorizado por el Servicio de Seguridad e Inspección de alimentos de Estados Unidos (USFDA) teniendo cada vez más auge en la industria alimentaria, debido a que dentro de la conservación de alimentos este conserva la calidad de los productos y no presenta afecciones en las características nutricionales, ni orgánicas, alarga la vida útil, produce beneficios al producto final y no presenta contaminación al medio ambiente (Kumar, Tiwari y Kumar, 2018).

2.2.9.3.2. Criogenia alimentaria.

Las tendencias actuales de producción de diversos productos, fomentan la utilización de los procesos de ultracongelación mediante líquidos criogénicos capaces de aportar frío de forma intensiva y puntual. “Es un proceso mediante el cual no se pierden líquidos, sabores, aromas ni nutrientes, y no se le agrega ningún tipo de aditivo ni conservante a las recetas originales (Giménez, 2015).

2.2.9.3.3. Ventajas de la criogenia

- Baja inversión inicial y excepcional calidad.
- Congelación IQF (Individual Quick Frozen), los alimentos se congelan individualmente evitando que se congelen pegados unos con otros.
- Mínima deshidratación y conservación de los nutrientes, no existe daño a la estructura celular.
- Fácil limpieza, mínimo mantenimiento.
- Amplio rango de capacidad y producción.
- Posibilidad de acoplamiento a un frío mecánico (Giménez, 2015).

2.2.9.4. Congelación criomecánica

La congelación criomecánica consiste en la asociación de dos sistemas de congelación: una realizada por inmersión criogénica, usando líquidos criogénicos como el líquido N₂ o CO₂ y el segundo es con un congelador mecánico, es decir, un equipo de refrigeración convencional. El proceso implica algunas secuencias para ambos casos (Agnelli y Mascheroni, 2001).

2.2.9.4.1. Primera secuencia.

Cuando el alimento se sumerge en el líquido criogénico, una congelación rápida de las capas externas ocurre formando una corteza delgada. Este tratamiento de congelación de costras proporciona una mayor resistencia al momento de consumirlo y evita que los productos pequeños y/o mojados se peguen entre ellos en el transporte (Agnelli y Mascheroni, 2001).

2.2.9.4.2. Segunda secuencia.

El producto con costra de hielo completa su congelación hasta que el centro del alimento alcanza la temperatura final requerida. El uso del congelador combinado provoca una reducción del tiempo de congelación y de la pérdida de agua durante el proceso. Estas reducciones pueden causar una mejoría en la calidad final del producto. Además, el sistema combinado permite reducir costos y aumentar capacidad de congelación (Agnelli y Mascheroni, 2001).

III. METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

3.1.1. Enfoque

La presente investigación se realizó de manera cuantitativa, ya que se puso énfasis en la obtención de datos experimentales reales que permitieron la viabilidad del estudio del probiótico encapsulado y prebiótico, además de tratamientos criomecánicos aplicados en la producción de helados.

3.1.2. Tipo de Investigación

En esta investigación se desarrollaron dos tipos de estudios, exploratorio y experimental.

Exploratorio, ya que permitió abarcar un tema poco conocido, cuyas variables a trabajar no han sido abordadas anteriormente como la aplicación de nitrógeno líquido y congelación convencional en la producción de un helado con probiótico encapsulado y prebiótico como sustituto de grasa y texturizante.

Experimental, puesto que se investigó la concentración de probiótico y material protector para garantizar su viabilidad en un helado bajo en calorías. Adicionalmente, se formuló la concentración de inulina como sustituto de grasa, texturizante y congelación criomecánica para la reducción de los tamaños de los cristales.

3.2. HIPÓTESIS

3.2.1. Hipótesis Nula

H_0 : Las cantidades de probiótico (encapsulado) y prebiótico empleados, así como el tratamiento de congelación criomecánica no influyen en las características fisicoquímicas y sensoriales de helados bajos en calorías.

3.2.2. Hipótesis Alternativa

H_1 : Las cantidades de probiótico (encapsulado) y prebiótico empleados así como el tratamiento de congelación criomecánica influyen en las características fisicoquímicas y sensoriales de helados bajos en calorías.

3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.3.1. Definición de variables

3.3.1.1. Variables independientes

Concentración de probiótico encapsulado.

Concentración de prebiótico.

Tratamiento criomecánico (Nitrógeno líquido y congelación convencional).

3.3.1.2. Variables dependientes

Helados bajos en calorías.

3.3.2. Operacionalización de variables

En la tabla 9 se especifican cada una de las variables de la investigación con respecto a las dimensiones, indicadores, técnicas e instrumentos que se utilizaron.

Tabla 9. Operacionalización de variables

Variables	Dimensiones	Indicadores	Técnicas	Instrumentos
Variables Independientes				
Concentración de probiótico encapsulado	Propiedades físicas y microbiológicas	Tamaño de capsula Unidades formadoras de colonias	Microscopía (Lima, et al., 2015)	Formato de Registro
Concentración de prebiótico	Propiedades fisicoquímicas	Grasas	AOAC 2000.18 Gerber	Formato de Registro
Tratamiento criomecánico	Propiedades Físicas	Volumen Textura Tamaño de cristales	Overrun Penetrometría (Zúñiga, 2017)	Fichas técnicas Formato de registro
Variable dependientes				
Helados bajos en calorías	Propiedades fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas	Olor Color Sabor pH Proteína Grasas Cenizas °Brix	(Zúñiga, 2017) AOAC 942.15 AOAC 991.2 AOAC 2000.18 Gerber AOAC 930.30.	Formato de Registro Hojas de evaluación sensorial
		Mohos y levaduras Aerobios mesófilos E coli Coliformes totales	NTE INEN 013-014 Y 0706	Placas petrifilm

3.4. MÉTODOS UTILIZADOS

Esta investigación fue realizada en los laboratorios de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi. Las materias primas utilizadas incluyen (*Bifidobacterium BB-12*) como probiótico, el material encapsulante (alginato de sodio) y material criogénico que fueron adquiridos en diferentes laboratorios a nivel nacional, mientras que el prebiótico (inulina) fue importada. El

cacao en polvo para la elaboración del helado bajo en calorías y la leche se adquirieron en la zona 1 del Ecuador.

3.4.1. Preparación del microorganismo

Para el acondicionamiento de la cepa probiótica se siguió la metodología descrita por (Krasaekoopt *et.al*, 2004, Prasanna y Charalampopoulos, 2017) con ligeras modificaciones, donde el *Bifidobacterium BB-12* fue cultivado con relación 1:9 en caldo DIFCO TM NUTRIENT bajo condiciones anaeróbicas en una estufa modelo ECOCELL 55 a 35°C por 48h.

3.4.2. Recuperación de microorganismos

Las células probióticas fueron recuperadas en una centrífuga de mesa marca HETTICH a 6000 rpm por 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con una solución isotónica (cloruro de sodio al 0.9%), tomando en cuenta que el volumen del líquido de lavado agregado en los tubos para centrifuga debe de ser igual al medio descartado. Finalmente la biomasa fue almacenada a 4°C hasta su uso.

3.4.3. Encapsulación del microorganismo

La encapsulación de los microorganismos se realizó por el método de extrusión o goteo. Para ello se preparó una solución de alginato de sodio (2% p/p) en 200 ml de agua desmineralizada. Esta formulación fue mezclada con la suspensión concentrada de células en proporción 4:1 (mezcla de solución de alginato: suspensión concentrada, % v/v).

Las suspensiones de células hidrocoloides fueron expulsadas a través de una aguja de 31G o de 0,25 mm en 400 ml de una solución estéril de CaCl₂ a 0,2 M, la altura de caída fue de 3 cm, las microcápsulas resultantes se dejaron endurecer por 30 min en dicha solución.

Posteriormente, se las lavó con agua destilada y se almacenaron con solución salina en fundas con cierre hermético a 4°C de acuerdo a lo recomendado por (Prasanna y Charalampopoulos, 2017). Para el proceso de liofilización se congelaron las microcápsulas durante 5 horas a -18°C, luego se llevaron al liofilizador marca LABCONCO con una presión de 6 (Pa) a -57 °C durante 68 horas.

3.4.4. Determinación del tamaño microcápsulas

El tamaño de las microcápsulas se lo determinó en un microscopio marca BOECO, en el que previamente se instaló una cámara digital MVV3000 que permitió las capturas de las partículas probióticas encapsuladas. Para ello se seleccionó 30 cápsulas al azar y mediante el programa Future Win Joe se determinó el tamaño aproximado de cada partícula, posteriormente se realizó un promedio general para determinar la talla media de las microcápsulas.

3.4.5. Rendimiento de *Bifidobacterium BB-12* microencapsulado

Se calculó el rendimiento (RE) de las cápsulas liofilizadas de *Bifidobacterium BB-12*, mediante la ecuación (1), el resultado se reflejó en porcentaje (Suárez, 2019).

$$RE = \frac{\text{Peso BB12 encapsulado} - \text{Peso BB12 liofilizado}}{\text{Peso BB12 encapsulado}} * 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

3.4.6. Conteo de las bacterias libres y encapsuladas.

El conteo en células libres o sin encapsular fue realizada por triplicado, para ello se tomó una alicuota de 100 µl, se plantó en placas de Agar MRS. Las placas fueron incubadas en una Incubadora de marca Memmer a 37 °C por 72 h en condiciones anaerobias, posteriormente se cuantificó el número de colonias presentes en cada una de las placas por medio de un contador de colonias de nombre Boeco modelo CC-1.

El conteo de células encapsuladas, al igual que el análisis anterior fue realizado por triplicado. Se tomó una muestra de 1 g de bacterias probióticas encapsuladas y se disolvieron en 9 ml de citrato de sodio, posteriormente se tomó una muestra 1 ml y se plantó en cajas Petri con agar MRS e inoculó a 37 °C por 72 h en condiciones anaerobias, consecutivamente se procedió al conteo de colonias (Prasanna y Charalampopoulos, 2017).

3.4.7. Viabilidad de las bacterias en condiciones simuladas a los jugos gastrointestinales

Las simulaciones de condiciones gastrointestinales se realizaron por triplicado (células libres y encapsuladas sin helado). Para la preparación de los jugos gástricos simulados se aplicó la metodología descrita por (Silva, Bezerra, Olbrich y Pinto, 2015, Silva, *et al.*, 2018, Prasanna y Charalampopoulos, 2017) con algunas modificaciones.

El jugo gástrico simulado (JGS) se preparó en 100 ml de agua destilada con una solución de 0.2% NaCl (p/v) y HCl a 0.08 M ajustando el pH a 1.9. El jugo intestinal simulado (JIS) se obtuvo con 0.835 g/L de KCl, 0.22 g/L de CaCl₂ y 1.386 g/L de NaHCO₃ hasta obtener un pH de 8.

3.4.7.1. Viabilidad de las células libres en jugo gástrico simulado (JGS)

Se añadió 1ml de biomasa de células en un tubo de ensayo con 9 ml de JGS, se incubó a 37°C y se tomaron muestras de 1ml a los 0, 30, 60 y 90 min. Cada muestra fue diluida en 9 ml de citrato de sodio y se recuperó mediante una centrifugación de 6000 rpm por 15 min a 4°C, después se lavó con una solución salina estéril. Finalmente las muestras se plantaron en Agar MRS y se llevaron a incubación por 72 horas a 37 °C.

3.4.7.2. Viabilidad de las células encapsuladas en jugo gástrico simulado (JGS)

Para las células encapsuladas se añadió 1g de muestra en tubos de ensayo con 9 ml de JGS, se incubó a 37°C y se tomaron muestras de 1ml a los 0, 30, 60 y 90 min. Cada muestra de las

microcápsulas fue colocada y diluida en tubos de ensayos con 9 ml de citrato de sodio, se centrifugó a 6000 rpm por 15 min a 4°C, se lavó con solución salina estéril y cada muestra recuperada se plantó en Agar MRS en las mismas condiciones.

3.4.7.3. Viabilidad de las células libres en jugo intestinal simulado (JIS)

Se tomó una muestra de 1 ml de la solución de viabilidad (JGS) libre de los 90 minutos, se colocó en tubos de ensayo con 9 ml de (JIS), se incubó a 37°C durante 4 horas, posteriormente la biomasa fue recuperada por centrifugación, lavada con solución salina y plantada en placas de agar MRS a 37°C por 72 horas.

3.4.7.4. Viabilidad de las células encapsuladas en jugo intestinal simulado (JIS)

Se añadió una muestra de 1 ml de la solución de viabilidad (JGS) encapsulados de los 90 minutos en tubos de ensayos con 9 ml de (JIS) y se siguió con la misma metodología anteriormente indicada.

3.4.7.5. Viabilidad de las bacterias probióticas en helado

Se tomó una muestra representativa de 25 g de helado simbiótico, se diluyó en 225 ml de cloruro de sodio al 0.9%. Posteriormente se tomó 1 ml de la solución, se inoculó en cajas Petri e incubó a 37° C por 48 horas y se contó el número de colonias.

3.4.8. Proceso para la elaboración de helado con características simbióticas y congelación criogénica.

Se han consultado varias referencias con el fin de establecer formulaciones en cuanto a probiótico, prebiótico y aditivos (Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0706], 2013; Zúñiga, 2017, González, Velásquez y Ramírez, 2017).

Para la elaboración de helados bajos en calorías sabor a chocolate con probiótico (*Bifidobacterium BB-12*) encapsulado y prebiótico inulina, se utilizó como unidad experimental 500 ml de leche pasteurizada.

En primer lugar se elevó la temperatura de la leche a 60°C para poder añadir la leche en polvo como emulsionante (10g), se bajó la temperatura a 50°C y se colocó fibra prebiótica (inulina) en concentraciones de 2% y 2.4%. Luego se procedió a bajar la temperatura a 38°C donde se añadió (*Bifidobacterium BB-12*) en formulaciones de 0.08% y 0.16%. Se dejó reposar a esta temperatura por 30 minutos y posteriormente se llevaron las mezclas a maduración por 24 horas a 4°C.

Transcurrido este tiempo, se batieron 100 ml de claras de huevos pasteurizadas AVI+ en una batidora de mano con pedestal marca DAEWOO a una velocidad alta hasta llegar a punto de nieve, considerando que durante este proceso se añaden los endulzantes: azúcar 70 g y panela 60 g. luego se agregaron 55 ml de una mezcla concentrada de chocolate amargo hasta lograr

una distribución homogénea. Seguidamente, se agregó la mezcla inoculada con probiótico y prebiótico mediante movimientos envolventes a velocidad baja y finalmente se aplicó congelación con nitrógeno líquido en una proporciones de 40% y 60% y se almacenaron a temperaturas aproximadas a -25°C en un congelador tradicional de marca CONTINENTAL hasta su evaluación.

En total se realizaron 8 unidades experimentales por triplicado, obteniendo un total de 24 tratamientos.

3.4.9. Parámetros funcionales

3.4.9.1. Punto overrun

Para determinar el punto overrun del helado tras el proceso de batido, se consideró la ecuación (2) (Ramírez, Rengifo y Rubiano, 2015).

$$\% \text{ overrun} = \frac{\text{Peso del volumen de mezcla} - \text{Peso del volumen de helado}}{\text{Peso del volumen de helado}} * 100 \quad [\text{Ec. 2}]$$

3.4.9.2. Tiempo de caída de la primera gota

La evaluación del tiempo de caída de la primera gota se la realizó en 10 muestras de helados. Ocho (con probiótico, prebiótico y congelación criomecánica), un helado base (sin probiótico, sin prebiótico y con congelación convencional) y un helado de marca Pingüino.

Se tomó 35 g de cada muestra de helado y se las colocó sobre una malla con 70 orificios/ cm^2 a 10 cm de altura, finalmente con un cronómetro se tomó el tiempo en el que cayó la primera gota, manteniendo una tolerancia ± 15 segundos (Ortiz, 2016).

3.4.9.3. Porcentaje de derretimiento

El porcentaje de derretimiento se midió al cabo de 20 minutos de iniciada la prueba, controlando el tiempo en el que cada una de las muestras se diluyeron completamente para ello, previamente fueron pesados los vasos de precipitación donde cayeron las gotas de helado y posteriormente se pesó el contenido total de los recipientes.

El derretimiento de las muestras de helados se realizó mediante la ecuación (3) (Ramírez et al., 2015).

$$\% \text{ Derretimiento} = \frac{MD}{MI} * 100 \quad [\text{Ec. 3}]$$

3.4.10. Parámetros reológicos

3.4.10.1. Prueba de textura

La textura se la determinó mediante una prueba de penetración con un penetrómetro digital de marca SHIMPO modelo FGV-50XY con un puntal de penetración de 8 mm de diámetro. Se la realizó por triplicado en cada una de las muestras.

3.4.11. Análisis de parámetros fisicoquímicos en helado

Los parámetros fisicoquímicos se los determinó bajo las condiciones mencionadas en el tiempo de caída de primera gota.

3.4.11.1. Potencial Hidrógeno (pH)

Se midió el pH con un potenciómetro de marca Mettler Toledo SevenMulti aplicando el método de análisis AOAC 942.15.

3.4.11.2. Proteína

Se realizó según la metodología establecida por la AOAC 991.2.

3.4.11.3. Grasas

El porcentaje de grasa se lo determinó mediante el método de AOAC 2000.18 Gerber.

3.4.11.4. Cenizas

Se determinó conforme a lo indicado por la AOAC 930.30.

3.4.11.5. Sólidos totales (°Brix)

Los °Brix de los helados se los midió con un refractómetro digital de marca Hanna.

3.4.12. Análisis sensorial

El análisis sensorial de los helados bajos en calorías fue realizado por un panel de 50 personas no entrenadas entre estudiantes y docentes en edades que comprendían de 18 a 46 años. Se aplicó una prueba de aceptabilidad con escala hedónica de 7 puntos, en donde: me gusta mucho (7), me gusta (6), me gusta ligeramente (5), ni me gusta ni me disgusta (4), me disgusta ligeramente (3), me disgusta (2) y me disgusta mucho (1). Los parámetros evaluados fueron: olor, color, sabor y cremosidad. Las muestras fueron etiquetadas y codificadas con tres dígitos numéricos y entregadas a temperatura y tamaño estandarizado de 8 ± 2 g a -10 ° C, en vasos de polietileno con paletas para helados. Para determinar las diferencias significativas entre tratamientos, se tabularon los datos estadísticamente mediante un ANOVA.

3.4.13. Técnica para la recolección de datos

Para la recolección de datos se consideraron como instrumentos hojas de evaluación sensorial, registros y fichas técnicas.

3.4.14. Diseño experimental

Para el diseño experimental se utilizó un diseño de bloques completamente al azar de tipo factorial con arreglo de 2^3 , el cual está determinado por la siguiente fórmula:

$$Y_{ijkl} = u + A_i + B_j + C_k + (ABC)_{ijk} + R_l + E_{ijk}$$

Dónde:

u = Efecto global

A_i = Efecto del i – ésimo nivel del factor A; $i = 1, \dots, a$

B_j = Efecto del j – ésimo nivel del factor B; $j = 1, \dots, b$
 C_k = Efecto del c – ésimo nivel del factor C; $k = 1, \dots, c$
 $(ABC)_{ijk}$ = Efecto de la interacción entre los factores A, B y C
 R_l = Efecto de la replicación del experimento; $m = 1, \dots, r$
 E_{ijk} = Residuo o error experimental

Siendo el efecto de la interacción entre los factores del diseño experimental A*B*C, donde:

A Concentración de probiótico encapsulado.

a_0 0.08% a_1 0.16%

B Concentración de prebiótico.

b_0 2% b_1 2.4%

C Tratamiento criomecánico (Nitrógeno líquido, congelación convencional).

c_0 40% nitrógeno líquido c_1 60% nitrógeno líquido

En la tabla 10 se presentan todas las combinaciones posibles del diseño experimental correspondientes a las diferentes formulaciones para los tratamientos.

Tabla 10. Diseño Experimental

a*b*c	Ajuste	Repeticiones	TUE (kg)	UE
$a_0*b_0*c_0$	0.08 % probiótico encapsulado + 2 % prebiótico + 40 % nitrógeno líquido	3	1	3
$a_0*b_0*c_1$	0.08 % probiótico encapsulado + 2 % prebiótico + 60 % nitrógeno líquido	3	1	3
$a_0*b_1*c_0$	0.08 % probiótico encapsulado + 2.4 % prebiótico + 40% nitrógeno líquido	3	1	3
$a_0*b_1*c_1$	0.08% probiótico encapsulado + 2.4 % prebiótico + 60% nitrógeno líquido	3	1	3
$a_1*b_0*c_0$	0.16% probiótico encapsulado + 2 % prebiótico + 40% nitrógeno líquido	3	1	3
$a_1*b_0*c_1$	0.16% probiótico encapsulado + 2 % prebiótico + 60% nitrógeno líquido	3	1	3
$a_1*b_1*c_0$	0.16% probiótico encapsulado + 2.4 % prebiótico + 40% nitrógeno líquido	3	1	3
$a_1*b_1*c_1$	0.16% probiótico encapsulado + 2.4 % prebiótico + 60% nitrógeno líquido	3	1	3
Total				24

Nota. T.U.E= Tamaño de unidad experimental

En la tabla 11 se presenta un esquema de bloques completamente al azar (BCA), correspondientes a todas las propiedades analizadas en los tratamientos. (físicoquímicas, y sensoriales).

Tabla 11. Esquema BCA

Tratamientos	pH	Proteína	Grasas	Cenizas	°Brix	Color	Olor	Sabor	Creemosidad
T1									
T2									
Tn									

3.4.15. Población y muestra

La población estuvo definida por 24 unidades experimentales, correspondientes a las formulaciones para la elaboración de un helado de leche bajo en calorías con características simbióticas y congelación criomecánica, considerando un tamaño de unidad experimental de 1 kg de producto con 3 repeticiones.

3.4.16. Análisis estadístico y procesamiento de datos

Para la comparación de los resultados obtenidos se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA SIMPLE) con ($p < 0.05$) y para las muestras significativas se aplicó la prueba de TUKEY HSD con confianza del 95%, tabulado mediante el software estadístico Statgraphics Centurion 16.103. Los resultados se muestran con medias \pm desviación estándar. Y los resultados de las pruebas fisicoquímicas fueron analizados mediante la aplicación de diferentes Normativas técnicas vigentes en Ecuador y documentos bibliográficos citados en la tabla 9.

3.5. RECURSOS

Algunos de los materiales mostrados en la tabla 12 fueron obtenidos del laboratorio de materiales y reactivos de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, mientras que otros como: probiótico *Bifidobacterium BB-12* Chr Hansen fue proporcionado de la casa comercial Descalzi, prebiótico inulina Simply Go importado de SimplySupplements, material criogénico suministrado por Mediairec, alginato de sodio marca Taglerfood de la corporación Codan y la materia prima como leche y cacao en polvo se adquirieron en casas comerciales de la Zona 1 del País.

Recursos humanos, físicos, tecnológicos y económicos se detallan en la tabla 12.

Tabla 12. Recursos necesarios para la elaboración de la investigación

Institucionales	Recursos Físicos	Recursos Humanos	Tecnológicos	Económicos
Laboratorios UPEC Biblioteca	Balanza analítica			
	Balanza gramera			
	Hornilla eléctrica			
	Autoclave			
	Termómetro digital			
	Estufa			
	Caldo nutriente			
	Agar MRS			
	Centrífuga de mesa			
	Tubos para centrífuga			
	Tubos eppendorf			
	Refrigerador			
	Congelador			
	Liofilizador			
	Batidora de acero inoxidable			
	Ecomilk			
	Microscopio Binocular			
	Cubre objetos			
	Porta objetos			
	Cámara MVV3000			
	Brixómetro digital			
	Agitador magnético			
	Hidróxido de sodio			
	Cloruro de Calcio			
	Agua destilada			
	Azul de metileno			
	Aceite de inmersión			
	<i>Bifidobacterium BB-12</i>			
	Alginato de sodio			
	Inulina			
	Nitrógeno líquido			
	Vasos de precipitación			
Pipetas				
Balones aforados				
Matraces				
Cajas Petri				
Placas petrifilm				
Espátulas cucharas				
Vidrio reloj				
Probetas				
Picetas				
Leche				
Cacao en polvo				
Jeringas de 31G				
Tarrinas de polipropileno				
Hojas para análisis sensorial				
Esferos				
		Tutor Lector Docentes Estudiantes Laboratoristas Panelistas	Portátil Software estadístico Internet Fuentes bibliográficas	Costo aproximado 1200 dólares americanos

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Observación del probiótico

En la figura 1 se muestra el *Bifidobacterium BB-12* en diferentes etapas morfológicas, las cuales han sido comparadas con la investigación realizada por Holkem, et al., (2017) observando que existe gran similitud entre las muestras, donde (a, A) corresponden al BB-12 Libre, (b, B) una vista externa del BB-12 encapsulado y (c,C) una vista interna del BB-12 encapsulado observados con aceite de inmersión.

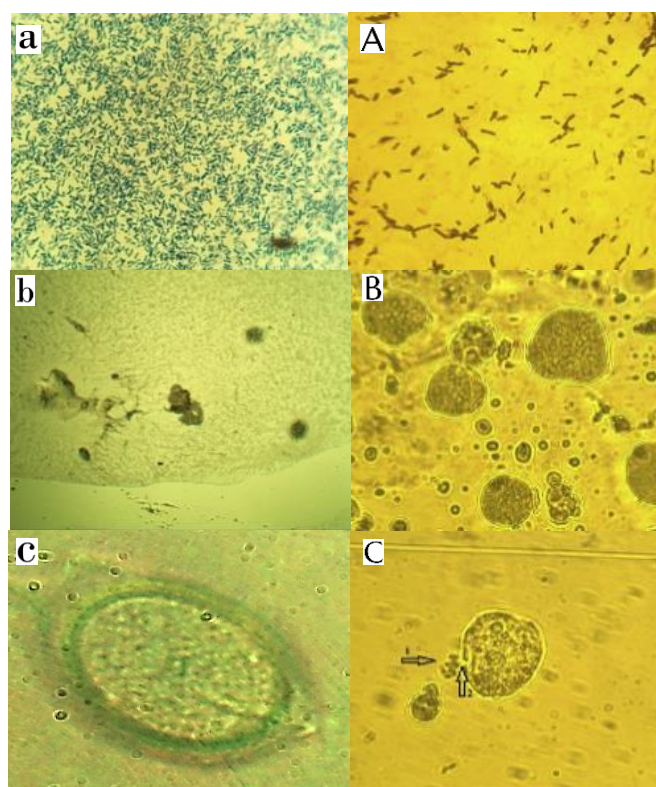


Figura 1. Características de *Bifidobacterium BB-12* observada con microscopio óptico.

abc: indican que la muestra pertenece a esta investigación ABC: muestras bibliográficas observadas por (Holkem, et al., 2017).

4.1.2. Tamaño

En la figura 2 se muestra un gráfico de caja y bigotes que representa los valores en los que oscilan el tamaño de las microcápsulas liofilizadas, cuyos diámetros van de 1 a 3 μm con una media de 1.5 a 2.5 μm y un promedio de 1.98 μm con desviación estándar de ± 0.56 . Cabe mencionar que los valores obtenidos son muy pequeños, ya que el probiótico después de encapsulado pasó por un proceso de pulverización con el fin de disminuir su tamaño y su contenido de humedad.

Gráfico de Caja y Bigotes
Intervalos de confianza del 95%

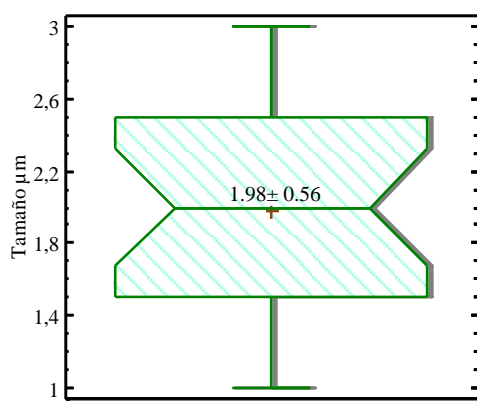


Figura 2. Caja y bigote para tamaño de cápsula.

4.1.3. Rendimiento

Para obtener el rendimiento de las microcápsulas se utilizó la Ec 1 en donde se obtuvo un rendimiento del 48.81%, considerando los siguientes datos:

Peso encapsulado: 13.5 g

Peso liofilizado: 6.91 g

$$RE = \frac{\text{Peso } BB12 \text{ encapsulado} - \text{Peso } BB12 \text{ liofilizado}}{\text{Peso } BB12 \text{ encapsulado}} * 100$$

$$RE = \frac{(13.5 - 6.91)g}{13.5 g} * 100 = 48.81\%$$

Aplicando el programa estadístico se obtuvo que el rendimiento de las microcápsulas fue de 48.77 % con una desviación estándar de ± 0.54 .

4.1.4. Conteo de las bacterias libres y encapsuladas.

En la tabla 13 se muestra los resultados correspondientes al conteo de células viables de *Bifidobacterium BB12* tanto libre, encapsulada húmeda y liofilizada expresado logarítmicamente en UFC, donde se puede observar que no existe diferencias significativas en *BB12* libre y encapsulada húmeda ya que existe una disminución de 0.34 ciclos logarítmicos, mientras que la cápsula liofilizada difiere de la libre y la encapsulada húmeda con una reducción de 2.17 ciclos logarítmicos.

Tabla 13. Viabilidad de *BB12* libre y encapsulado

<i>Bifidobacterium BB12</i>	Viabilidad (Log UFC)
Libre	11.00 \pm 0.10 ^a
Encapsulada húmeda	10.66 \pm 0.57 ^a
Encapsulada liofilizada	8.66 \pm 0.55 ^b

Valores correspondientes a la desviación estándar de cada parámetro que no compartan letra difieren significativamente ($p < 0.05$).

4.1.5. Viabilidad de las bacterias en condiciones simuladas a los jugos gastrointestinales

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a cambios de la viabilidad de células libres y encapsuladas liofilizadas (*Bifidobacterium BB12*) almacenada a 37 °C durante 0, 30, 60 y 90 minutos para el jugo gástrico simulado (JGS) y a los 100 minutos almacenada a 37°C por 72 horas para el jugo intestinal simulado (JIS). Donde, presenta mayor supervivencia y un ligero aumento del ciclo logarítmico las células encapsuladas, con valores alrededor de 8.66 ± 0.07 en el minuto 0 y 8.91 ± 0.20 a los 100 minutos, a diferencia de las células libres, donde sus valores fluctúan considerablemente, mostrando poca supervivencia bajo las condiciones simuladas reduciendo su ciclo logarítmico de 11.00 ± 0.90 a 3.07 ± 0.99 .

Tabla 14. Viabilidad de *BB12* en simulaciones gastrointestinales

Simulación	Tiempo (min)	BB12 Libre UFC	BB12 Encapsulado UFC
JGS	0	11.00 ± 0.90 ^{aA}	8.66 ± 0.07 ^{aB}
	30	9.02 ± 0.10 ^{abB}	7.18 ± 0.27 ^{bC}
	60	8.12 ± 0.57 ^{bC}	7.61 ± 0.60 ^{bcD}
	90	4.61 ± 0.40 ^{cD}	8.28 ± 0.43 ^{acE}
JIS	100	3.07 ± 0.99 ^{dE}	8.91 ± 0.20 ^{aA}

ABCD: en la fila sin letra común difieren significativamente con $p < 0.05$ para BB12 libre y encapsulado. abcd: letras diferentes en la misma columna difieren significativamente con $p < 0.05$ para tiempo y simulación.

4.1.6. Viabilidad de bacterias encapsuladas en el helado

En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos de la viabilidad de la adición de *BB12* encapsulada liofilizada en los helados 30 días después de almacenados. Donde se puede observar que entre los Tratamientos T1, T2, T3 y T4 no existen diferencias significativas ya que los valores oscilan entre $7.03 \cdot 10^7 \pm 0.11$ y $7.43 \cdot 10^7 \pm 0.55$ UFC/g. En los tratamientos T6, T7 y T8 tampoco existen diferencias significativas, a diferencia del tratamiento T5 que difiere significativamente de todos los demás con $8.53 \cdot 10^8 \pm 0.25$ UFC/g, a pesar que existen diferencias entre tratamientos todos son considerados viables, puesto que su ciclo logarítmico es mayor a 6.

Tabla 15. Viabilidad de microcápsulas en el helado simbiótico

Formulación	Viabilidad (UFC/g)
T1	$7.33 \cdot 10^7 \pm 0.55$ ^a
T2	$7.26 \cdot 10^7 \pm 0.47$ ^a
T3	$7.43 \cdot 10^7 \pm 0.55$ ^a
T4	$7.03 \cdot 10^7 \pm 0.11$ ^a
T5	$8.53 \cdot 10^8 \pm 0.25$ ^c
T6	$7.36 \cdot 10^8 \pm 0.37$ ^b
T7	$7.93 \cdot 10^8 \pm 0.15$ ^b
T8	$7.36 \cdot 10^8 \pm 0.37$ ^b

Los valores correspondientes a la desviación estándar de cada parámetro que no compartan letra difieren significativamente ($p < 0.05$).

4.1.7. Parámetros funcionales del helado con características simbióticas.

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros funcionales del helado, en los que se puede observar que:

El punto overrun expresado en porcentaje el cual muestra que el tratamiento base es el único que difiere de los demás tratamientos, ya que este presenta 49.2 % y los otros tratamientos tienen un promedio de 73.65 %.

El tiempo de la caída de la primera gota difiere significativamente entre todos los tratamientos a pesar de que existe similitud entre ellos, siendo los tratamientos T4, T8 y el helado base iguales, mientras que el T1 comparte letras con todos los tratamientos excepto con T2 y T6. Por su parte, el T2 muestra similitud con los tratamientos T5, T6 y T7.

Finalmente, el porcentaje de derretimiento muestra que todos los tratamientos son significativamente diferentes a excepción de T5 con T6 y T4 con T7 que son iguales.

Tabla 16. Parámetros funcionales

Formulación	Overrun (%)	Tiempo de caída de primera gota (min)	Derretimiento (%)
T1	73.8 ± 0.3 ^a	17.2 ± 0.07 ^{cd}	80.88 ± 0.07 ^a
T2	74.2 ± 0.3 ^a	9.2 ± 0.07 ^a	81.93 ± 0.07 ^b
T3	73.9 ± 0.2 ^a	19.1 ± 0.08 ^d	82.24 ± 0.01 ^c
T4	73.8 ± 0.8 ^a	16.1 ± 0.06 ^{bcd}	82.53 ± 0.03 ^d
T5	73.1 ± 0.1 ^a	13.4 ± 0.05 ^{abc}	82.76 ± 0.01 ^e
T6	74.1 ± 0.2 ^a	11.3 ± 0.07 ^{ab}	82.71 ± 0.07 ^e
T7	73.4 ± 0.7 ^a	14.3 ± 0.06 ^{abcd}	82.59 ± 0.07 ^d
T8	73.8 ± 0.1 ^a	15.5 ± 0.08 ^{bcd}	81.13 ± 0.07 ^f
Base	49.2 ± 2.8 ^b	15.8 ± 4.30 ^{bcd}	80.70 ± 0.01 ^g

Los valores correspondientes a la desviación estándar de cada parámetro que no compartan letra difieren significativamente ($p < 0.05$).

4.1.8. Parámetros reológicos

En la tabla 17 se muestran los resultados del parámetro reológico que se evaluó en el helado simbiótico, como es la textura (prueba objetiva, realizada con instrumento de medición) expresada en Newton. Donde se aprecia que los valores obtenidos son significativamente diferentes, sin embargo los tratamientos T3, T6, T7 y T8 son iguales con valores que van de 84.26 ± 0.83 N y 84.93 ± 0.17 N, mientras que los demás tratamientos comparten letras entre sí, a excepción del helado base que difiere de todos los demás tratamientos con valores significativamente menores siendo este de 69.75 N.

Tabla 17. Prueba de textura

Formulación	Textura (N)
T1	87.33 ± 0.10 ^{bc}
T2	89.23 ± 0.25 ^d
T3	84.26 ± 0.83 ^a
T4	85.70 ± 0.55 ^{ab}
T5	88.63 ± 0.55 ^{cd}
T6	84.73 ± 0.50 ^a
T7	84.61 ± 0.42 ^a
T8	84.93 ± 0.17 ^a
Base	69.75 ± 0.52 ^e

Valores medios ± desviación estándar que no compartan letra difieren significativamente.

4.1.9. Análisis de los parámetros fisicoquímicos en helado

En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico para el contenido de °Brix, grasa y proteína del helado simbiótico.

Grados Brix: A pesar de que todos los tratamientos difieren entre sí, comparten letras y se encuentran en rangos similares, mientras que el helado comercial difiere de forma significativa con todos los tratamientos con valores que alcanzan los 36.86 ± 1.02 °Brix.

Grasa: Todos los tratamientos son significativamente iguales con valores que van de $1,88 \pm 0.20$ a 2.40 ± 0.31 gramos de grasa, mientras que en helado comercial tiene 7.35 ± 0.26 gramos de grasa siendo este alto en comparación a los obtenidos en esta investigación.

Proteína: A diferencia del contenido de grasa y grados brix del helado comercial que fue mayor a los de esta investigación el contenido de proteína fue relativamente bajo siendo este de 4.50 ± 0.41 gramos, mientras que en los demás tratamientos incluido el helado base no existió diferencias significativas.

Tabla 18. Análisis fisicoquímicos (°Brix, grasa y proteína)

Formulación	°Brix	Grasa (g)	Proteína (g)
T1	28.76 ± 0.55 ^a	1,88 ± 0.20 ^a	10,02 ± 0.28 ^a
T2	28.66 ± 0.25 ^{ab}	2,36 ± 0.09 ^b	10,55 ± 0.25 ^a
T3	28.53 ± 0.73 ^{ab}	2,13 ± 0.05 ^{ab}	9,95 ± 0.05 ^a
T4	29.16 ± 0.87 ^{abc}	2,11 ± 0.04 ^{ab}	10,99 ± 0.04 ^a
T5	29.20 ± 0.65 ^{abc}	2,09 ± 0.10 ^{ab}	10,12 ± 0.08 ^a
T6	29.30 ± 0.34 ^{bc}	2,15 ± 0.06 ^{ab}	10,36 ± 0.06 ^a
T7	29.83 ± 0.05 ^{bc}	2,22 ± 0.09 ^{ab}	10,35 ± 0.06 ^a
T8	29.30 ± 0.52 ^{bc}	2,14 ± 0.06 ^{ab}	10,14 ± 0.03 ^a
Base	31.47 ± 0.05 ^c	2.40 ± 0.31 ^b	10.19 ± 0.31 ^a
Comercial	36.86 ± 1.02 ^d	7.35 ± 0.26 ^d	4.50 ± 0.41 ^b

Los valores correspondientes a la desviación estándar de cada parámetro que no compartan letra difieren significativamente por la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico para el pH, contenido de sólidos totales y cenizas.

pH: Los valores de pH difieren significativamente entre tratamientos, sin embargo comparten letras, por su parte el helado comercial difiere de todos los demás con 6.93 ± 0.01 .

Sólidos: Todos los tratamientos son significativamente diferentes, sin embargo cabe recalcar que el helado base tiene un contenido de sólidos de 17.39 muy inferior a los demás tratamientos que sobrepasan los 20 gramos de sólidos en el helado.

Cenizas: A diferencia de los demás tratamientos el helado base y comercial difieren significativamente de los demás, puesto que tienen valores de cenizas de 1.82 ± 0.09 y 1.52 ± 0.10 respectivamente, mientras que los tratamiento T6, T7 y T8 son estadísticamente iguales.

Tabla 19. Análisis fisicoquímicos (pH, sólidos y cenizas)

Formulación	pH	Sólidos	Cenizas
T1	6.43 ± 0.05^a	25.40 ± 0.88^a	2.35 ± 0.03^a
T2	6.52 ± 0.03^b	28.50 ± 0.75^b	2.68 ± 0.04^d
T3	6.50 ± 0.05^{ab}	26.04 ± 0.13^c	2.44 ± 0.01^b
T4	6.44 ± 0.03^{ab}	29.25 ± 0.05^d	2.43 ± 0.01^b
T5	6.42 ± 0.02^a	24.55 ± 0.58^e	2.71 ± 0.02^d
T6	6.52 ± 0.03^b	27.67 ± 0.19^f	2.52 ± 0.02^c
T7	6.52 ± 0.03^b	27.01 ± 0.16^g	2.55 ± 0.01^c
T8	6.49 ± 0.05^{ab}	27.07 ± 0.09^h	2.50 ± 0.01^c
Base	6.49 ± 0.01^{ab}	17.39 ± 0.89^i	1.82 ± 0.09^e
Comercial	6.93 ± 0.01^c	22.05 ± 0.29^j	1.52 ± 0.10^f

Los valores correspondientes a la desviación estándar de cada parámetro que no compartan letra difieren significativamente por la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

4.1.10. Análisis sensorial

Los resultados obtenidos en cuanto a olor, color sabor y cremosidad de la evaluación sensorial del helado simbiótico se presentan detalladamente en las siguientes gráficas, donde ponderación representa la calificación de la escala hedónica que va de 1 a 7 y la formulación corresponde a los diferentes tratamientos.

En la figura 3 se muestra el atributo olor representado en un gráfico de barras donde se puede observar que de acuerdo a la prueba de Tukey HSD con $p < 0.05$ existen diferencias significativas entre tratamientos siendo el tratamiento T1 igual a los tratamientos T2, T3, T5, T6, T7 y T8, mientras que el tratamiento T4 muestra similitud con los tratamiento T2, T3, T5, T6 y T7. Además se puede apreciar que el tratamiento con mayor aceptabilidad en cuanto al olor corresponde al T1.

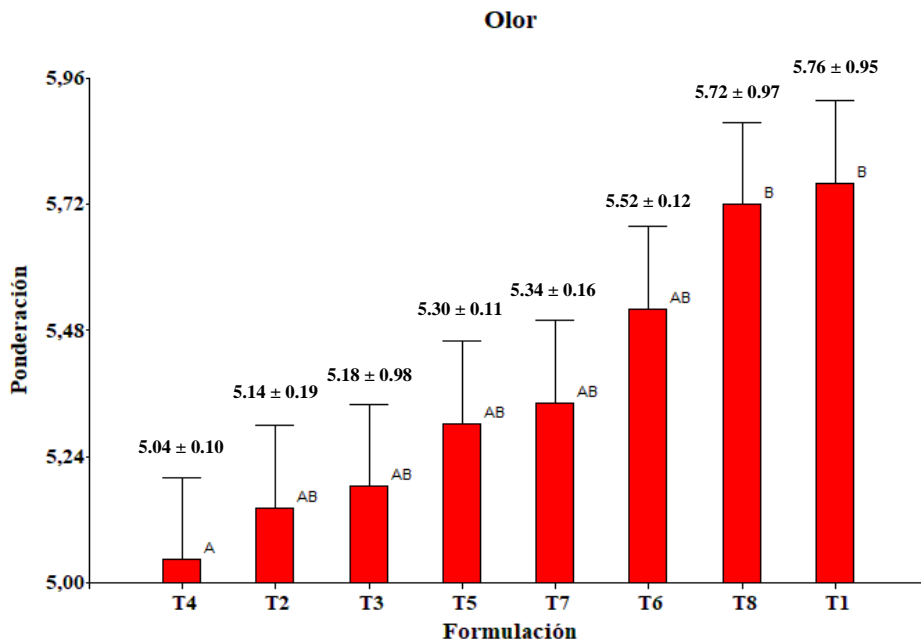


Figura 3. Gráfico de barras para Olor
Barras que no compartan letra difieren significativamente por la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$)

En la figura 4 se presenta otro de los atributos evaluados del helado siendo este el color, donde no se presenciaron diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey HSD con $p < 0.05$, sin embargo para determinar el tratamiento más aceptable se consideró el que tenía mayor media siendo así el tratamiento T6 con una calificación de $5,88 \pm 0,91$

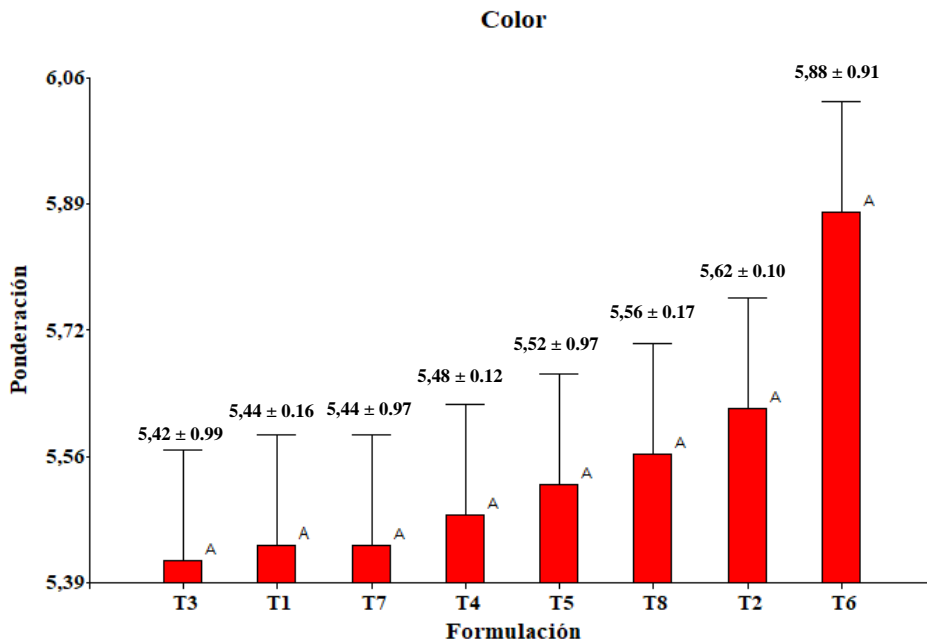


Figura 4. Gráfico de barras para color
No existe diferencias significativas entre tratamientos

En la figura 5 se muestra el gráfico de barras correspondiente al sabor del helado simbiótico que al igual que el color no presentan diferencias significativa entre tratamientos, sin embargo el tratamiento más aceptable fue el T6 con una calificación de $5,92 \pm 0,92$.

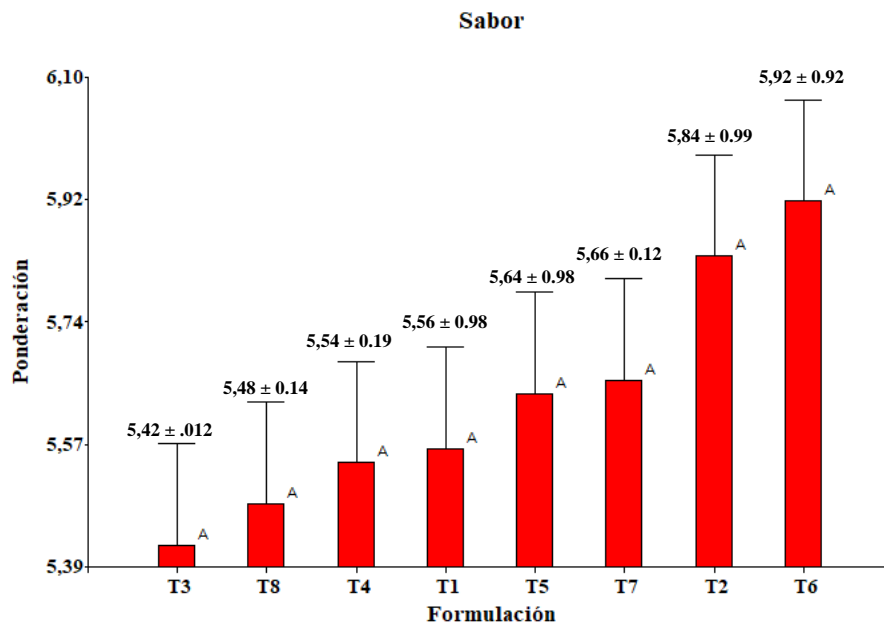


Figura 5. Gráfico de barras para sabor
No existe diferencias significativas entre tratamientos

Los resultados de la cremosidad se presentan gráficamente en la figura 6, a pesar de que existen diferencias significativas entre tratamientos, estas comparten letras y muestran una ligera similitud entre tratamientos, cabe mencionar que este atributo hace énfasis a la suavidad y al tamaño de los cristales del helado, siendo el más aceptable el T6 con $5,70 \pm 1,19$ de calificación.

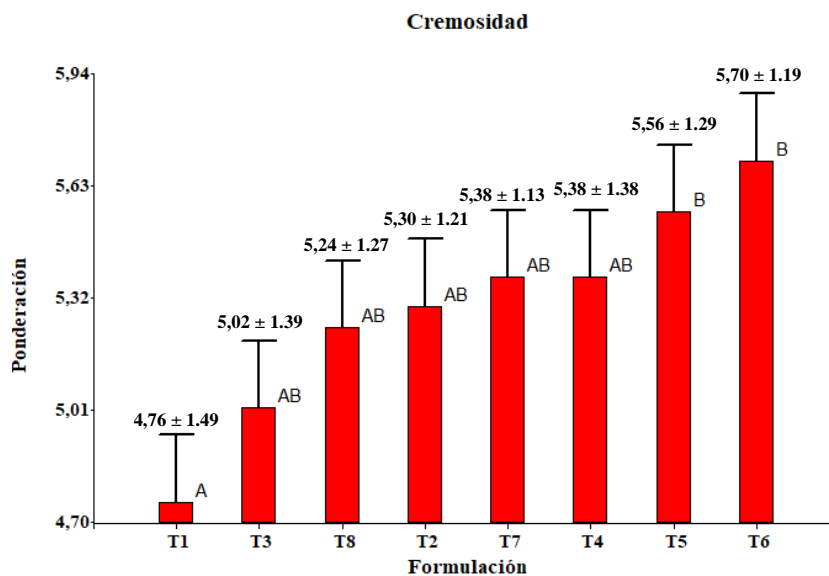


Figura 6. Gráfica de barras para cremosidad
Barras que no compartan letra difieren significativamente por la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$)

4.1.11. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico se realizó al mejor tratamiento el cual fue determinado mediante el análisis sensorial, siendo este el tratamiento 6 (muestra 526). Los parámetros analizados fueron E. Coli, Coliformes totales, Aerobios mesófilos, mohos y levadura los cuales se muestran en la tabla 21.

Tabla 20. Análisis microbiológicos en muestra de helado simbiótico

Requisitos	Datos obtenidos
E. Coli UFC/g	Ausencia
Coliformes totales UFC/g	Ausencia
Mohos y Levaduras UFC/g	Ausencia
Aerobios mesófilos UFC/g	233*10 ¹

*Los requisitos analizados se hicieron en base al Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0706], 2013.

4.2. DISCUSIÓN

4.2.1. Observación del probiótico

En la figura 1 se observan la morfología externa e interna del probiótico encapsulado vistas desde un microscopio óptico, las cuales muestran similitud a las observadas por Holkem, et al., (2017), quienes mencionan que las microcápsulas eran esféricas, con el material de llenado distribuido por toda la matriz. Sin embargo, existe una diferencia entre las muestras de aquellos y las obtenidas en esta investigación, y es que la pared del material encapsulante (alginato de sodio) de esta investigación es gruesa, mientras que la de ellos es delgada.

Esto se debe a que la técnica de extrusión utilizada en esta investigación es de laboratorio es decir una simulación casera del método de extrusión mientras que la otra es mecanizada con un extrusor y un secador de aspersion considerándose así a escala industrial. Cabe mencionar que el BB-12 Libre experimental se encontraba en una concentración de 10¹¹ UFC.

4.2.2. Tamaño de las microcápsulas

Autores como Prasanna y Charalampopoulos (2017), Holkem, et al., (2017) y Silva, et al., (2018), manifiestan que el tamaño de las microcápsulas de probiótico (sin un segundo proceso) oscilan entre 2300 a 3100 μm , 54.82 μm y 1500 a 1900 μm respectivamente, mientras que el tamaño de las capsulas obtenidas en esta investigación tienen un promedio de 1.98 μm con una desviación estándar de ± 0.56 , a pesar de que los valores obtenidos no concuerdan con los autores citados anteriormente, podemos decir que el tamaño se encuentra dentro del rango obtenido por Ordóñez, et al., (2018) donde al encapsular bacterias de *L. plantarum* y *L. rhamnosus* con diferentes matrices aplicando secado por pulverización, los valores del tamaño de la partícula oscilaron entre 2 y 5 μm .

De igual forma Rodríguez, Giraldo y Montes (2016) mencionan que el tamaño de las microcápsulas liofilizadas o secas se encuentran entre 0,5 a 10 μm . Esto se debe a que una vez encapsulado el probiótico, este pasa por un proceso de secado en donde ocurre una reducción del tamaño de las microcápsulas, por eso el valor en tamaño que se obtuvo fue pequeño ya que se aplicó secado por liofilización.

4.2.3. Rendimiento del *Bifidobacterium BB-12* encapsulado

El porcentaje de rendimiento que se obtuvo al encapsular el *Bifidobacterium BB-12* fue de 48.77 con una desviación estándar de 0.54, valor que se encuentra dentro de los rangos establecidos por Molina (2016) donde manifiesta que el porcentaje de rendimiento del probiótico encapsulado debe encontrarse entre 40 – 60 % para que se considere viable. De igual forma otros autores mencionan que el rendimiento o la eficiencia de la encapsulación va a depender del método que se utilice, siendo el de extrusión el más barato, simple y asequible, brindando un porcentaje de rendimiento entre 20 y 50% (Silva, et al., 2019).

4.2.4. Conteo de las bacterias libres y encapsuladas.

En la tabla 13 se puede observar que la cápsula liofilizada difiere significativamente de las demás muestras, puesto que presenta una reducción de 2.17 ciclos logarítmicos, esto se debe a que las *Bifidobacterium* son sensibles al estrés, oxígeno y pH y una vez liofilizadas fueron almacenadas durante 12 horas en fundas con cierre hermético a 4 °C .

Rodríguez, Giraldo y Montes (2016) afirman que el proceso de liofilización puede provocar efectos de adversos a lo que se desea, alterando el estado fisiológico de los microorganismos, la concentración celular inicial y su proceso en la etapa de crecimiento, evidenciando así rápidas disminuciones de la tasa de supervivencia de las bacterias, también manifiestan que la reducción de los ciclos logarítmicos se puede dar por condiciones inadecuadas de almacenamiento como por ejemplo, presencia de oxígeno en el empaque.

A pesar de que la cápsula liofilizada mostró gran reducción de su ciclo logarítmico esta aún se considera probiótica con $10^{8.66}$ UFC (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación [FAO], 2006).

4.2.5. Viabilidad de las bacterias en condiciones simuladas a los jugos gastrointestinales

En la tabla 13 se puede observar que existe diferencias significativas entre tratamientos para las filas ya que hay una gran reducción logarítmica en los diferentes tiempos y diferentes simulaciones, con respecto a la columna del *BB12 libre* se puede decir que existe diferencia significativa entre tratamientos a pesar que comparten letras, la reducción de los ciclos logarítmicos es considerable llegando al punto de no considerarse viable con 10^3 UFC, esto se

debe a que las cepas de Bifidobacterias son muy sensibles y no resisten altos valores de pH haciéndolas vulnerable y poco resistentes.

Prasanna y Charalampopoulos (2017) mencionan en su investigación que el conteo viable de *Bifidobacterium Longum infantis* libre disminuyó significativamente al cabo de los 90 minutos del período de incubación, cayendo a un nivel indetectable con 10^1 UFC después de los 120 min, recalando que las bifidobacterias son organismos fastidiosos sensibles al entorno ácido. En cuanto a la columna del *BB12* encapsulado la diferencia que existe es mínima, a pesar de que disminuyó logarítmicamente al minuto 30 se fue recuperando y manteniendo estable hasta el minuto 100, comprobando así que el proceso de encapsulación proporciona protección significativa a las células, sin embargo Silva, et al., (2019) mencionan que el uso de un solo polímero para encapsular no es suficiente y el alginato solo brinda aproximadamente el 20% del 70% de protección adecuado para que las cepas de *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* puedan cumplir su función.

Cabe aclarar que en esta investigación el alginato si cumplió con el 70 % recomendado, esto se debe a que por aplicar las capsulas en un alimento simbiótico por ende al contener el prebiótico inulina esta cumple la función de crioprotector específicamente para las cepas de *Bífidos* permitiéndole lograr su objetivo (Cayra, Dávila, Villalta, & Rosales, 2017). Además que se considera que el helado es un buen vehículo para el transporte de bacterias probióticas, y el uso de chocolate permite también conservar las bacterias y liberarlas cuando es necesario (Garcia & Serna, 2015)

4.2.6. Viabilidad de bacterias encapsuladas en el helado

En la tabla 15 se muestran los resultados de la viabilidad de las bacterias encapsuladas adicionadas al helado sabor a chocolate, comprobando nuevamente que el proceso de encapsulación protege significativamente la cepa. A pesar de que en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 existe una reducción logarítmica de 1.66 UFC con respecto al conteo inicial, la encapsulación sigue siendo viable.

Cabe mencionar que estos tratamientos son los que tenían menor concentración de probiótico encapsulado (0.08 %) a la hora de la formulación, mientras que los tratamientos T5, T6, T7 y T8 contenían una concentración de 0.16% de probiótico encapsulado, razón por la que presentan una reducción de 0.66 UFC con respecto al conteo inicial. A pesar de que los tratamientos presentan ciclos logarítmicos de 7 y 8 UFC, estos se consideran viables.

Cabe mencionar que la adición del probiótico encapsulado a una matriz alimentaria como el helado y la aplicación de una ultracongelación con nitrógeno líquido, permitieron que el BB12 encapsulado liofilizado fuera más estable y resistente, manteniéndolo latente. La Organización

Mundial de la Salud (2013) manifiesta, que para proteger y preservar una bacteria de cualquier tipo es necesario aplicar liofilización y un ultracongelado (nitrógeno líquido) para que la bacteria permanezca inmóvil y se active cuando es necesario. Por su parte Silva, et al., (2019) mencionan que el helado debido a su alta digestibilidad, textura suave, sabor dulce, pH neutro y alto contenido de sólidos totales, es considerado un entorno favorable para la viabilidad de probióticos y es necesario controlar la congelación puesto que es crucial y puede ocasionar la reducción de bacterias viables.

4.2.7. Punto Overrun

Ortiz (2016) menciona que el porcentaje de overrun es la incorporación de aire a la mezcla, la cual se relaciona al tipo y cantidad de ingredientes utilizados, también afecta al rendimiento, puesto que si el porcentaje de overrun es inferior al 50 % el helado presentará una textura dura y compacta reduciendo así la utilidad. Esto se logra comprobar con los resultados obtenidos para el helado base siendo 49.2 ± 2.8 % (tabla 16) que de acuerdo a la prueba de Tukey HSD con $p < 0.05$ este difiere de los demás tratamientos con un 24.45 % presentando así malas características de suavidad y cremosidad, esto es debido a que no contiene los mismos ingredientes (inulina, probiótico y nitrógeno líquido) que los otros tratamientos.

En cuanto al porcentaje de overrun de los 8 tratamientos, estos oscilan entre 73 y 74 % valores que muestran similitud a lo obtenidos por Bahareh, Rezvan, y Fardin (2014) quienes en su investigación lograron entre 70 y 85 % de overrun en sus helados manifestando que, cuando el porcentaje de overrun en los helados se encuentra entre 70 y 90 % estos tienden a tener buenas características en cuanto a cremosidad, textura y tamaños de cristales, además de ser aptos para aumentar el rendimiento y por ende la utilidad del mismo.

4.2.8. Tiempo de caída de la primera gota.

El tiempo de caída de la primera gota que se obtuvo se encuentra entre 9.2 y 19.1 minutos, datos que concuerdan con Ortiz (2016) en donde en una investigación de elaboración de helados a base de leche de vaca y una mezcla de goma guar con carragenina presentaron tiempos de caída de la primera gota de 16 a 19 minutos, contrario a lo que manifiesta Yépez (2015) que el tiempo adecuado de caída de la primera gota debe de ser mínimo de 30 minutos para que el helado tenga una característica suave.

En esta investigación a pesar de que el helado presentó características suaves, el tiempo de caída no se encuentra dentro del rango establecido, puesto que el helado no contiene estabilizantes ni alto contenido de azúcar y para lograr este tiempo, el contenido de azúcar, el uso de estabilizantes y gomas juegan un papel importante para mejorar aspectos como estabilidad y tiempo de caída de la primera gota (Ramírez, Rengifo, & Rubiano, 2015).

4.2.9. Tasa de Derretimiento (%)

El porcentaje de derretimiento es un parámetro funcional del helado, el cual está relacionado con el aireamiento y con el tiempo de caída de la primera gota siendo este último inversamente proporcional (Chacón, Pineda, & Jiménez, 2016). Bajo esta premisa se presentan los resultados obtenidos de este parámetro los cuales van de 80.70 a 82.76 %, valores que no cumplen los estándares establecidos, ya que de acuerdo a Terán (2017) los valores de la tasa de derretimiento no deben superar el 35 % en 30 minutos para que el helado sea resistente y estable a temperatura ambiente.

En cuanto a los valores que se obtuvieron se puede decir que se deben a que no se utilizaron estabilizantes o gomas que permitieran aumentar la viscosidad y por ende reducir el porcentaje de derretimiento (Ortiz, 2016).

Además, cabe mencionar que el cambio de temperaturas en el proceso de congelación afecta de forma considerable el porcentaje de derretimiento puesto que la temperatura inicial al colocar nitrógeno líquido para congelar la mezcla fue de $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y para almacenarla aumentó a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, debido a que el congelador no contaba con un regulador de temperaturas. A pesar de que la aplicación de nitrógeno líquido en helado es favorable en cuanto a textura, cremosidad, estabilidad en color y sabor es desfavorable para la tasa de derretimiento.

4.2.10. Parámetros reológicos (Textura)

Se aplicó una prueba de penetración con el fin de determinar la dureza del helado (fuerza máxima alcanzada), obteniendo valores superiores a 80 N para los 8 tratamientos, mientras que el helado base presentó un valor de 69.75 N inferior en comparación a los demás (tabla 17). Esto se debe a que la dureza del helado es inversamente proporcional al contenido de sólidos, grasas y tamaño de cristales, además de que la composición de los ingredientes influye en las propiedades fisicoquímicas del helado, por ejemplo, un alto contenido de sólidos produce mayor resistencia existiendo una menor profundidad de penetración, generando así helados más duros (Ramírez, Rengifo, & Rubiano, 2015).

Por otro lado Pintor & Totosaus (2013) manifiestan que la incorporación de aire durante el batido (overrun), la congelación y el tamaño de cristales afectan de forma considerable la textura de los helados, puesto que al presentar un alto contenido de aire el tamaño de cristales es menor y por ende el volumen de la fase dispersa permite generar una menor resistencia, existiendo mayor fuerza y menor dureza. Cabe recalcar que los tratamientos que presentaron una fuerza de penetración superior a 80 N tenían alto porcentaje de overrun y características sensoriales suaves, mientras que el helado base presentó bajo porcentaje de overrun y gran tamaño de cristales.

4.2.11. Parámetros fisicoquímicos

Los grados brix en todas las formulaciones presentaron gran similitud (entre 28 y 29 °Brix), no obstante el helado base y comercial se encontraron por encima de los demás con valores de 31.47 y 36.86 °Brix respectivamente. Esto se debe a que estas dos últimas no contenían inulina, fibra que de acuerdo a Castellanos, et al., (2016) puede ser utilizada como ingrediente para reducir la cantidad de azúcar, ya que esta fibra dietética al tener un sabor un poco dulce permite simular las características del azúcar. Además, menciona que se puede sustituir hasta el 50% de azúcar con inulina, no obstante si se supera este porcentaje se obtendrá un helado muy duro.

En cuanto a la grasa, la normativa INEN 0706 establece que, un helado de leche debe de tener un mínimo de 1.8 gramos de grasa total, valor que concuerda con la presente investigación, puesto que se obtuvieron valores que oscilaron entre 1.8 a 2.40 g en todos los tratamientos incluyendo la muestra base. No obstante en la muestra comercial se obtuvieron 7.35 g, a razón de que este helado contenía entre sus ingredientes crema de leche y esa variedad de helado de acuerdo a la normativa INEN 0706 llega a tener un mínimo de 8% de grasa total.

La cantidad de proteína en todos los tratamientos incluyendo el helado base presentaron gran similitud con rangos entre 9.75 y 10.99 g. Sin embargo, la muestra de helado comercial presentó 4.50 g de proteína. Esto se debe a que todas las mezclas contenían albumina pasteurizada de huevo, la cual se caracteriza de acuerdo a López, Vizuete & Ortega (2017) por tener todos los aminoácidos esenciales, razón por la cual 100 g de albumina pueden llegar a tener 11 g de proteína.

Los valores de pH en todas las muestras fueron levemente ácidos con valores de 6.43 a 6.93, esto se debe a que el pH de la leche es ligeramente ácido, su valor oscila entre 6.6 y 6.8. En cuanto a la similitud de pH en todas las muestras evaluadas, se debe a que todas eran de chocolate, con cantidades similares de azúcar, prebiótico y se trabajó con el mismo volumen de leche. Estos resultados concuerdan con la investigación de Silva, et al., (2015) en la que se evaluaron las características fisicoquímicas de helados de leche de cabra con probiótico y sin probiótico y se obtuvieron valores de pH de 6.62 y 6.45 respectivamente.

En cuanto a la cantidad de sólidos, la normativa INEN 0706 menciona que un helado de leche debe de contener un mínimo de 27 g, esto concuerda con los resultados de los helados con probiótico y prebiótico. Por el contrario, la muestra base tuvo un contenido de sólidos de 17.39 g y la muestra comercial de 22.05 g.

Finalmente el contenido de cenizas es inferior en la muestra base y comercial con 1.82 y 1.52 g respectivamente. Mientras que en los ocho tratamientos en los que se añadió probiótico y

prebiótico presentan un contenido de ceniza que oscila entre 2.35 y 2.75 g. Según Márquez (2014) el contenido de cenizas hace referencia a la cantidad de minerales y microelementos que se encuentran en un alimento. Por esta razón, se puede decir que los ocho tratamientos contienen mayor cantidad de cenizas ya que, a diferencias de la muestra base y comercial contienen prebiótico y panela, ingredientes altos en minerales.

4.1.12. Análisis sensorial

En las figuras 3 a 6 se presentan gráficamente los resultados obtenidos de la evaluación sensorial, siendo los parámetros evaluados el olor, color, sabor y cremosidad. De acuerdo a la prueba de Tukey HSD con $p < 0.05$, no existen diferencias significativas entre tratamientos tanto para color y sabor, mientras que en olor y cremosidad las diferencias que existen son mínimas. Sin embargo, se consideró que el mejor tratamiento corresponde al T6 ya que se encontró más cercano a la máxima valoración de la escala hedónica 7 (me gusta mucho).

Finalmente, se comparó el mejor tratamiento con uno comercial, resultando que no existieron diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. Siendo así que la adición de probiótico encapsulado, prebiótico y nitrógeno líquido no afecta las características sensoriales del helado.

4.2.13. Microbiológico

El límite máximo permitido para el recuento de mohos y levaduras en mezclas en polvo para helados es de 1000 UFC/g. En el caso de helados (mezclas concentradas y líquidas) no debe presentar recuento para E. Coli, mientras que los límites máximos permitidos para Coliformes totales y microorganismos mesófilos son de 200 y 100000 UFC/g respectivamente. Por lo que se aclara que el helado con características simbióticas es un producto inocuo ya que los parámetros microbiológicos evaluados se encuentran dentro de los límites establecidos por El Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0706], 2013.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. El alginato de sodio utilizado como material encapsulante, actuó como barrera para que el *Bifidobacterium* pudiera resistir los valores de pH del jugo gástrico e intestinal simulado entre valores de 1.9 y 8 respectivamente. Además la dilución de alginato en una solución hidrocoloide permitió obtener un tamaño de cápsulas de 1.98 μm .
2. La bacteria probiótica *Bifidobacterium* BB12 encapsulada presentó una viabilidad de 8.91 ciclos logarítmicos en condiciones gástricas e intestinales, a diferencia de la bacteria libre la misma que no cumple con los estándares establecidos para considerarse viable, ya que presenta 3 ciclos logarítmicos.
3. El proceso de encapsulación por extrusión permitió un porcentaje de rendimiento del *Bifidobacterium* encapsulado de 48.77 %, encontrándose dentro de los rangos establecidos por la bibliografía para considerarse viable, esto es, del 20% al 62.42 %.
4. Los resultados de la evaluación sensorial mostraron que el mejor tratamiento fue el T₆ con una formulación de 0.16% de probiótico encapsulado, 2% de prebiótico y 60% de nitrógeno líquido. Este tratamiento tuvo mayor aceptabilidad en cuanto a cremosidad, sabor y color.
5. La evaluación de los parámetros fisicoquímicos determinaron que el helado con probiótico encapsulado y prebiótico presentó niveles altos de proteína y cenizas, niveles bajos de azúcar, grasa y °Brix en comparación con el helado comercial y el helado base. En cuanto al valor del pH se encontró dentro de los límites establecidos en la norma.
6. El tiempo de caída de la primera gota en helados con probiótico encapsulado y prebiótico osciló entre 9.2 y 19.1 minutos, el porcentaje de derretimiento no se encontró dentro de los límites establecidos, presentando rangos entre 80.70% y 82.76%, mientras que el punto overrun se encontró dentro del porcentaje mínimo establecido, con valores entre 73.1 y 74.2 %, mostrando excelentes características de cremosidad, textura y tamaños de cristales. Sin embargo, el helado base tuvo un punto overrun de 49.2 %, por lo que su textura fue dura y compacta.
7. Los análisis microbiológicos realizados en el mejor tratamiento T₆ presentaron ausencia en el recuento de E. Coli, Coliformes totales, Mohos y levaduras. Mientras que, en Aerobios mesófilos se obtuvo $233 * 10^1$, no obstante, se encontró dentro de los límites establecidos por la normativa INEN 0706.
8. La utilización de nitrógeno líquido mejoró características como: cremosidad, volumen, tamaño de cristales y vida útil en el helado.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Si se desea obtener un tamaño de cápsula de mayor tamaño es recomendable utilizar una matriz a base de leche en alginato, ya que esta por el contenido de grasa y proteína permite que los enlaces peptídicos sean de mayor tamaño.
2. Utilizar un congelador con regulador de temperatura para que durante el almacenamiento del producto permita controlar una temperatura específica y evitar variaciones de temperaturas que pueden afectar la calidad funcional y sensorial del producto.
3. Usar un microscopio electrónico de barrido para determinar con mayor precisión el tamaño y forma de las cápsulas.
4. Para facilitar el proceso de encapsulación de bacterias probióticas en cuanto a tiempo y rendimiento, es preferible utilizar la encapsulación por extrusión mecanizada o de manera industrial.
5. Estudiar el proceso de microencapsulación de *Bifidobacterium BB12* con otros materiales encapsulantes como: carragenina, quitosano y proteína de suero.
6. Para disminuir las cantidades de azúcar y grasas en otros tipos de alimentos utilizar inulina en diferentes concentraciones.
7. Estudiar el probiótico *Bifidobacterium BB12* en otras matrices alimentarias.
8. Usar estabilizantes para helados, para permitir que el tiempo de caída de la primera gota y porcentaje de derretimiento se encuentren dentro de los rangos establecidos.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrate, F. (2017). *Evaluación de la estabilidad en helados de crema utilizando diferentes tipos de proteínas (tesis de maestría)*. Universidad Católica de Córdoba: Córdoba. Recuperado de <http://pa.bibdigital.uccor.edu.ar/1453/1/AbrateDeco.FR11.pdf>
- Agnelli, M., & Mascheroni, R. (2001). Cryomechanical freezing. A model for the heat transfer process. *Journal of Food Engineering*, 4(47), 263-270. doi:10.1016/s0260-8774(00)0012-6
- Alfaro, L., Siramard, S., Chouljenko, A., & Sathivel, S. (2018). Effects of liquid nitrogen pretreatment on osmotic dehydration and quality of cryogenically frozen blueberries (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Food Bioscience*, 22, 165-169. doi:10.1016/j.fbio.2018.02.006
- Alhamdan, A., Hassan, B., Alkahtani, H., Abdelkarim, D., & Younis, M. (2015). Cryogenic freezing of fresh date fruits for quality preservation during frozen storage. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(1), 9-16. doi:10.1016/j.jssas.2015.12.001
- Araújo, N., Gutiérrez, L., Ruiz, M., & Montoya, O. (2015). Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: Una revisión. *Alimentos Hoy*, 23(36), 112-126. Recuperado de <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/349/299>
- Bahareh, A., Rezvan, P., & Fardin, M. (2014). Production of Ice Cream by Using Soy Milk, Stevia and Isomalt. *Advances in Environmental Biology*, 8(11), 9-16. Recuperado de https://pdfs.semanticscholar.org/0cda/8083bcc8163c1fd46c4146ad6ed1410e3ef6.pdf?_ga=2.3670768.1962604752.1581479021-2147073202.1581479021
- Barrionuevo, M., Carrasco, J., Cravero, B., & Ramón, A. (2011). Formulación de un helado dietético sabor arándano con características prebióticas. *Diaeta*, 29(134). Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-73372011000100004&lng=es&tlng=es
- Berk, Z. (2018). Refrigeration—Chilling and freezing. En *Food Process Engineering and Technology (Third Edition)* (págs. 439-461). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-812018-7.00019-1
- Buendía, M. (2015). *Elaboración, producción y comercialización de derivados lácteos*. Perú: Macro. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=Q74tDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=d>

- erivados+de+la+leche&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiU8JyzpP3dAhXSk1kKHQtEBw0Q6AEIJjAA#v=onepage&q=derivados%20de%20la%20leche&f=false
- Burgain, J., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031
- Castellanos, L., Murillo, K., Ortega, D., Velásquez, I., & Ramírez, J. (2016). Empleo de Inulina en matrices alimentarias. *La Alimentación Latinoamericana*, 325, 62-68. Recuperado de <http://alaccta.org/wp-content/uploads/2016/09/LAL325web.pdf>
- Cayra, E., Dávila, J., Villalta, J., & Rosales, Y. (2017). Evaluation of the stability and viability of two Probiotic Strains Microencapsulated by Fluidized Bed. *Información Tecnológica*, 28(6), 35-44. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642017000600005>
- Chacón, A., Pineda, M., & Jiménez, C. (2016). Características fisicoquímicas y sensoriales de helados de leche caprina y bovina con grasa vegetal. 27(1), 19-36. doi:<http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i1.21875>
- Champagne, C., Raymond, Y., Guertin, N., & Bélanger, G. (2015). Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. *International Dairy Journal*, 47, 109-117. doi:10.1016/j.idairyj.2015.03.003
- Chavarri, M., Maranon, I., & Villarán, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *INTECH*, 501-540. doi:10.5772/50046
- Deosarkar, S., Khedkar, C., Kalyankar, S., & Sarode, R. (2016). Ice Cream: Uses and Method of Manufacture. *Encyclopedia of Food and Health*, 391-397. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00384-6
- Fangueiro, J., Souto, E., & Silva, A. (2016). Encapsulation of nutraceuticals in novel delivery systems. En A. Mihai, *Nutraceuticals: Nanotechnology in the Agri-Food Industry Volume 4* (págs. 305-342). Romania: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-809436-5.00002-1
- Fellows, P. (2017). *Food Processing Technology 4th Edition: Freezing*. Reino Unido: Woodhead Publishing. doi:10.1016/B978-0-08-100522-4.00022-5
- Fox, P., Uniacke, T., McSweeney, P., & Mahony, J. (2015). Physical Properties of Milk. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 321-343. doi:10.1007/978-3-319-14892-2_8
- Fuentes, B., Acevedo, D., & Gelvez, V. (2015). Alimentos funcionales: Impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. *Bioteología en el Sector Agropecuario*, 13(2), 140-149. doi:10.18684/BSAA(13)140-149

- García, E., & Serna, L. (2015). Viabilidad de una bacteria láctica encapsulada e incorporada en una matriz de cobertura de chocolate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 40-45. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.44824
- García, V., & Terán, G. (2016). Memorias: I congreso Internacional Alternativas para el desarrollo de la provincia del Carchi. En E. Caza, *Tendencias y perspectivas de mercados internacionales para productos lácteos* (págs. 99-118). Ecuador: Universidad Politécnica Estatal del Carchi.
- Giménez, E. (2015). *Podemos regresar de la muerte*. IPS. Recuperado de <https://institutedepoliticassocial.files.wordpress.com/2016/03/dps-n28.pdf>
- González, C., Zacarías, I., Olivares, S., & Cruchet, S. (2014). *¿Qué son los probióticos? ¿Para que sirven?* Chile: Universidad de Chile. Recuperado de <https://inta.cl/wp-content/uploads/2018/05/probioticos.pdf>
- González, S., Velásquez, I., & Ramírez, J. (2017). Empleo de Inulina en helados. *Heladería Panadería Latinoamericana*(250), 70-74. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/318909184>
- Hernández, M. (2014). *Desarrollo de cuatro formulaciones de helados a base de agua con bajo contenido de azúcar y enriquecidos con vitamina C (tesis de grado)*. Universidad Rafael Landívar: Guatemala. Recuperado de <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/09/15/Hernandez-Maria.pdf>
- Holkem, A., Raddatz, G., Barin, J., Moraes, E., Muller, E., Codevilla, C., . . . Ragagnin, C. (2017). Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT-Food Science and Tegnology*, 30, 1-6. doi:10.1016/j.lwt.2016.07.013
- Isique, J. (2014). *Elaboración de helados*. Perú: Macro. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=YQovDgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=que+es+helado+pdf&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjAg9TntIDeAhVRu1MKHaX9BH IQ6AEIODAE#v=onepage&q&f=false>
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737-743. doi:doi:10.1016/j.idairyj.2004.01.004
- Kumar, Y., Tiwari, S., & Kumar, Y. (2018). Cryogenic Freezing Technology. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 6(2), 1343-1346. doi:10.18782/2320-7051.6458
- Lima, P., Bezerra, M., Olbrich, K., & Pinto, R. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated

- gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 452-457. doi:10.1016/j.lwt.2014.02.055
- López, A., Vizuite, A., & Ortega, R. (2017). Papel del huevo en la dieta de deportistas y personas físicamente activas. *Nutrición Hospitalaria*, 34(4), 31-35. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/3092/309253480007.pdf>
- López, J. (2017). *Elaboración y presentación de helados*. España: Parainfo. Recuperado de books.google.com.ec/books?id=t_Y-DwAAQBAJ&pg=PA20&dq=caracter%20de%20helado&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjY-tG10ILeAhWrq1kKHexDAj4Q6AEINjAD#v=onepage&q=caracter%20de%20helado&f=false
- Luna, M. (24 de Junio de 2017). En Espejo se produce yogur que busca posicionarse en el mercado nacional. *La Hora*. Recuperado de <https://lahora.com.ec/carchi/noticia/1102086808/en-espejo-se-produce-yogur-que-busca-posicionarse-en-el-mercado-nacional>
- Márquez, B. (2014). *Cenizas y Grsosas [tesis de grado]*. Universidad Nacional de San Agustín: Perú. Recuperado de <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/4188/IAmasibm024.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mosquera, V. (2011). *Plan de negocio para la creación de una planta de ultra congelación a base de nitrógeno líquido para congelar productos perecederos (tesis de pregrado)*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Mourad, G., Bettache, G., & Samir, M. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(10), 115-122. doi:10.15739/ibspr.005
- Muthukumarappan, K., Marella, C., & Sunkesula, V. (2019). Food Freezing Technology. En M. Kutz, *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering* (págs. 389-415). Academic Press. doi:10.1016/C2017-0-01578-1
- Olveira, G., & González, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición*, 63(9), 482-494. doi:10.1016/j.endonu.2016.07.006
- Ordóñez, J., Fernández, C., Zuasti, E., Landi, M., Moreno, J., & Pereira, G. (2018). *Elaboración de Microencapsulados de Bacterias Probióticas para Mejorar los Efectos Saludables de los Alimentos*. Córdoba: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Recuperado de

<https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/-/action/90004fc0-93fe-11df-8d8b-f26108bf46ad/e5747030-1bb8-11df-b7e2-35c8dbbe5a83/es/02f9e190-faff-11e0-929f-f77205134944/alfrescoDocument?i3pn=contenidoAlf&i3pt=S&i3l=es&i3d=e5747030-1bb8-11df-b7e2>

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación [FAO]. (2006). *Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Panamericana de la Salud [FAO/OPS]. (2017). *Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe*. Chile. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i7914s.pdf>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). *Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica*. Washington: Red PARF. Recuperado de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/Red-PARF-No11Es.pdf>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2014). *Informe sobre lasituación mundial de las enfermedades no transmisibles*. Recuperado de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149296/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf?sequence=1
- Ortiz, L. (2016). *Formulación y elaboración de un helado de mora libre de gluten y lactosa a base de bebida de soya y con contenido medio en azúcar (tesis de grado)*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24330/1/AL618.pdf>
- Pérez, S. (2014). Alimentos funcionales ajustados a la necesidad alimentaria ecuatoriana y técnicas óptimas de procesamiento. *La Técnica*(13), 74-81. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6087630>
- Pintor, M., & Totosaus, A. (2013). Propiedades funcionales de sistemas lácteos congelados y su relación con la textura del helado: Una revisión. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*, 7(2), 56-61. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/4419/441942929009.pdf>
- Prasanna, P., & Charalampopoulos, D. (2017). Encapsulation of Bifidobacterium longum in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. *Food Bioscience*, 21, 72-79. doi:10.1016/j.fbio.2017.12.002

- Ramírez, J. (2017). La Ciencia de los helados. *I Congreso Iberoamericano de Ciencias Agroalimentarias - IV Seminario de Investigaciones Agroindustriales* (págs. 1-6). Colombia: CIBCIA. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/321732635>
- Ramírez, S., Rengifo, C., & Rubiano, A. (2015). Parámetros de calidad en helados. *ReCiTeIA*, 15(1), 79-94. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/281939654_Parametros_de_calidad_en_helados_Quality_Parameters_of_Ice_Cream#pdf
- Rodrigues, I., Tuler, I., Tavares, G., Schuck, P., & Carvalho, A. (2019). Physicochemical Characteristics of Raw Milk. En L. Nero, & A. Carvalho, *Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits* (págs. 29-43). USA: Academic Press.
- Rodríguez, J., Mejía, L., & Serna, L. (2019). Evaluación calórica y sensorial de una mezcla para helado formulado con inulina como sustituto parcial de grasa. *UDCA*, 22(2). doi:10.31910/rudca.v22.n2.2019.1294
- Rodríguez, S., Giraldo, G., & Montes, L. (2016). Encapsulación de alimentos probióticos mediante Liofilización en presencia de prebióticos. *Información tecnológica*, 27(6), 135-144. doi:10.4067/S0718-07642016000600014
- Rodríguez, Y., Rojas, A., & Rodríguez, S. (2016). Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud*, 16(2), 106-115. doi:10.17151/biosa.2016.15.2.10
- Sandoval, M., Cu, T., Peraza, G., & Acereto, P. (2016). Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas. En M. Ramírez, *Propiedades funcionales de hoy* (págs. 181-218). Barcelona: OmniaScience. doi:10.3926/oms.361
- Santucho, H. (2017). *Helados*. Obtenido de http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/pdfs/56/56_07_Helados.pdf
- Savino, P. (2011). Obesidad y enfermedades no transmisibles relacionadas con la nutrición. *Rev Colomb Cir*, 26, 180-195. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcci/v26n3/v26n3a5.pdf>
- Silva, M., Tulini, F., Martins, E., Penning, M., Fávaro, C., & Poncelet, D. (2018). Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 392-399. doi:10.1016/j.lwt.2017.11.008
- Silva, P., Bezerra, M., Olbrich, K., & Pinto, R. (2015). Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated

- gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 452-457. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.055>
- Silva, T., Leite, H., Montenegro, T., Costa, J., Mendoca, B., Stamford, T., & Montenegro, T. (2019). Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin icecream. *LWT-Food Science and Technology*, 100, 391-396. doi:10.1016/j.lwt.2018.10.084
- Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0706]. (2013). *Helados. Requisitos*. Recuperado de http://181.112.149.204/buzon/normas/nte_inen_706-2.pdf
- Sistema Ecuatoriano de Normalización [INEN 0003]. (1984). *Leche. Productos Lácteos*. Recuperado de https://archive.org/stream/ec.nte.0003.1948/ec.nte.0031984_djvu.txt
- Suárez, E. (2019). *Microencapsulación de levadura Saccharomyces cerevisiae como fuente de probióticos (tesis de grado)*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/29733/1/BQ%20187.pdf>
- Umaña, E. (2010). *Conservación de alimentos por frío*. FUSADES: El Salvador. Recuperado de <https://es.slideshare.net/FUSADESORG/conservacion-af-1>
- Villanueva, R. (2015). Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos. *Ingeniería Industrial*, 33, 265-275. Recuperado de https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria_industrial/article/viewFile/545/513
- Vitaglione, P., Troise, D., De Prisco, C., Mauriello, L., Gokmen, V., & Fogliano, V. (2015). Use of Microencapsulated Ingredients in Bakery Products: Technological and Nutritional Aspects. *Elsevier*, 301-311. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00020-0>
- Willenberg, B. (2015). *Food Preservation: Freezing Basics*. University of Missouri-Columbia: Columbia. Recuperado de <http://cels.uri.edu/docslink/foodsafety/GH%201501.pdf>
- Yépez, A. (2015). *Utilización de suero lácteo en polvo en mezclas base para helados con pulpa de mora (tesis de grado)*. UTE: Quito. Recuperado de http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/14400/1/61053_1.pdf
- Zúñiga, G. (2017). *Desarrollo de un helado funcional con adición de prebióticos y bacterias probióticas (tesis de maestría)*. Universidad de Azuay: Azuay.

V. ANEXOS

Anexo 1: Hoja de evaluación sensorial



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Test de evaluación sensorial para trabajo de titulación denominado: “**Aplicación de congelación criomecánica en la producción de helados bajos en calorías con probiótico encapsulado y prebiótico**”.

Nombre de la prueba: Aceptabilidad

Edad:

Género:

Fecha:

Indicaciones antes de la degustación

Frente a usted se encuentran 8 muestras, deguste cada una de ellas de izquierda a derecha y enumere el grado de preferencia en cada uno de los atributos. Por favor limpie su paladar con pan y agua antes y después de cada muestra.

Valoración de atributos: Coloque la valoración que más le parezca para cada muestra, sabiendo que:

- Me gusta mucho (7)
- Me gusta (6)
- Me gusta ligeramente (5)
- Ni me gusta ni me disgusta (4)
- Me disgusta ligeramente (3)
- Me disgusta (2)
- Me disgusta mucho (1)

Muestra	134	731	823	512	772	526	832	515
Atributo								
Olor								
Sabor								
Cremosidad								
Textura								

De acuerdo a la evaluación realizada escriba el código de la muestra que más agradó:

Observaciones: _____

Anexo 2: Proceso de encapsulación

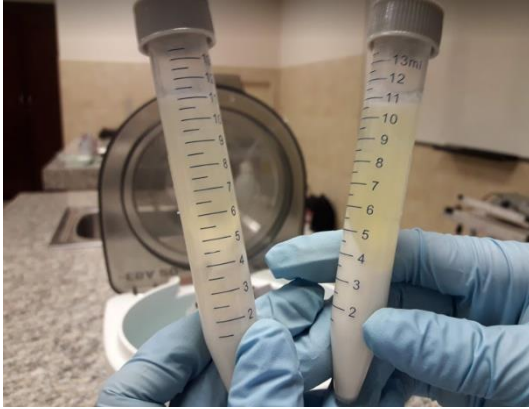


Figura 7. Recuperación del BB12



Figura 8. Almacenamiento de biomasa



Figura 10. Probiótico encapsulado



Figura 9. Liofilización de cápsulas



Figura 11. Cápsulas liofilizadas



Figura 12. Análisis microbiológico

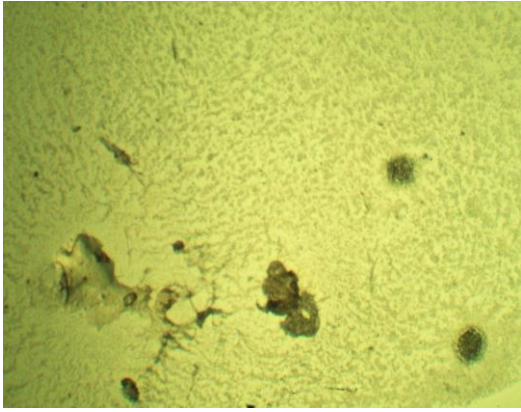


Figura 16. Vista interna de la cápsula

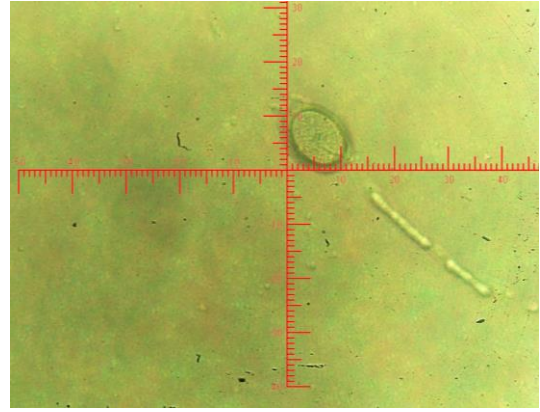


Figura 15. Tamaño de la cápsula

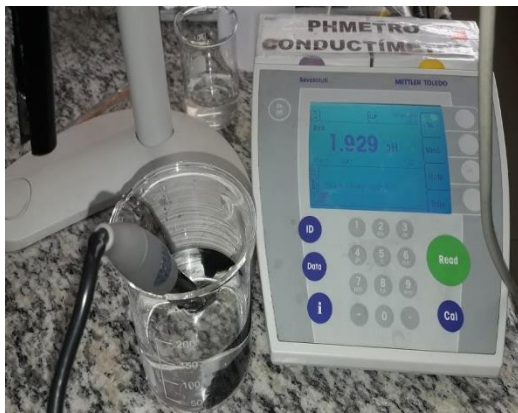


Figura 13. Solución JGS



Figura 14. Solución JIS

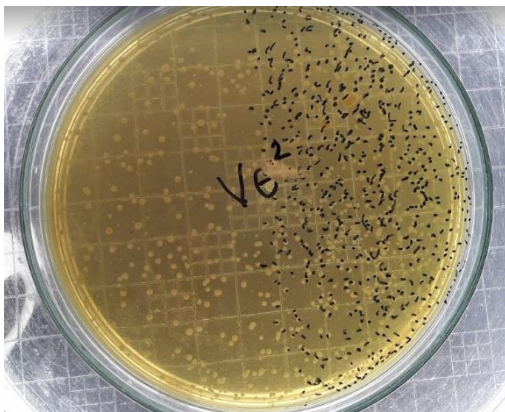


Figura 17. Conteo de m/o probióticos



Figura 18. Elaboración de helado



Figura 19. Simulaciones en helados



Figura 20. Tiempo de caída de la primera gota y % de derretimiento



Figura 21. Evaluación sensorial



Figura 22. Análisis microbiológico de E. Coli



Figura 23. Análisis microbiológico de Mohos y Levaduras



Figura 24. Análisis microbiológico de Aerobios mesófilos