


# Uso de propóleo y $\epsilon$ -polilisina como agentes preservantes en yogurt batido

## Use of propolis and $\epsilon$ -polylysine as preservative agents in beaten yogurt

Nieve Esther Lectong-Cusme<sup>a</sup>  [nieveslectongcusme@gmail.com](mailto:nieveslectongcusme@gmail.com)

Isaac Leonel López-Pinargote<sup>b</sup>  [leoellopezpi@hotmail.com](mailto:leoellopezpi@hotmail.com)

Vicky Yuliana Parrales-Mendoza<sup>a</sup>  [rickyparrales1988@gmail.com](mailto:rickyparrales1988@gmail.com)

Neiva Marcela Quiñonez-Becerra<sup>a</sup>  [neiva\\_quinonez@espam.edu.ec](mailto:neiva_quinonez@espam.edu.ec)

Beatriz María Bravo-Zamora<sup>a</sup>  [beatrizmariabz@hotmail.com](mailto:beatrizmariabz@hotmail.com)

Arnaldo Narcizo Cevallos-Mendoza<sup>c</sup>  [cevallos-arnaldo3484@unesum.edu.ec](mailto:cevallos-arnaldo3484@unesum.edu.ec)

<sup>a</sup>Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López", ESPAM MFL. Ecuador.

<sup>b</sup>Unidad Educativa Fiscal Portoviejo. Ecuador.

<sup>c</sup>Universidad Estatal del Sur de Manabí, UNESUM. Portoviejo, Ecuador.

Recibido: 20/07/2022 Aceptado: 15/12/2022

**Citar, APA:** Lectong-Cusme, N. E., López-Pinargote, I. L., Parrales-Mendoza, V. Y., Quiñonez-Becerra, N. M., Bravo-Zamora, B. M., y Cevallos-Mendoza, A. N. (2023). Uso de propóleo y  $\epsilon$ -polilisina como agentes preservantes en yogurt batido. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 10 (1), 26–40. <https://doi.org/10.23850/24220582.4980>

**Resumen** Este trabajo estudió alternativas para sustituir conservantes convencionales utilizados en la industria alimentaria. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la mezcla propóleo y  $\epsilon$ -polilisina, a través del análisis estadístico, para identificar variaciones en la estabilidad del yogurt, desarrollo microbiano, cambios en las propiedades fisicoquímicas, vida útil, aceptabilidad sensorial y determinar las mejores concentraciones de conservantes. Se realizaron cinco tratamientos (T1: 5 mg  $\epsilon$ -polilisina – 1 mL Propóleo, T2: 10 mg de  $\epsilon$ -polilisina – 0,9 mL de propóleo, T3: 15 mg de  $\epsilon$ -polilisina – 0,8 mL de propóleo, T4: 20 mg de  $\epsilon$ -polilisina – 0,7 mL de propóleo, y T5: 25 mg de  $\epsilon$ -polilisina – 0,6 mL de propóleo) con una mezcla de propóleo y  $\epsilon$ -polilisina en un diseño completo al azar con 3 repeticiones. Se analizaron las propiedades del preservante en la mezcla en términos de pH, acidez, recuento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, mohos y levaduras en yogurt almacenado durante 30 días a 4 °C. Se observó reducción significativa en el pH debido a los conservantes: los valores de T4 - T5 (4,69; 4,63) superiores a los valores de T3 - T1 - T2 (4,39; 4,24; 4,39)) se consideran más adecuados para los estándares internacionales. En las muestras analizadas no se evidenció presencia de *S. aureus*, y *E. coli*. La estabilidad del producto se calculó utilizando como indicador la cantidad de mohos y levaduras según la ecuación de Labuza. El análisis sensorial se llevó a cabo con 75 participantes sin entrenamiento los cuales indicaron que el tratamiento T2 y T3 tienen la aceptabilidad general más alta.

**Palabras clave:** conservación, industria alimentaria, preservante, microorganismos, propóleo,  $\epsilon$ -polilisina.

**Abstract** This work studied alternatives to replace conventional preservatives used in the food industry. The objective of this research was to evaluate the effect of the mixture of propolis and  $\epsilon$ -polylysine, through statistical analysis, to identify variations in yogurt stability, microbial development, changes in physicochemical properties, shelf life, sensory acceptability and determine the better concentrations of preservatives. Five treatments (T1: 5 mg  $\epsilon$ -polylysine – 1 mL Propolis, T2: 10 mg de  $\epsilon$ -polylysine – 0,9 mL de propolis, T3: 15 mg de  $\epsilon$ -polylysine – 0,8 mL de propolis, T4: 20 mg de  $\epsilon$ -polylysine – 0,7 mL de propolis, y T5: 25 mg de  $\epsilon$ -polylysine – 0,6 mL de propolis) were carried out with a mixture of propolis and  $\epsilon$ -polylysine in a completely randomized design with 3 replications. The properties of the preservative in the mixture were analyzed in terms of pH, acidity, count of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, molds and yeasts in yogurt stored for 30 days at 4 °C. Significant reduction in pH due to preservatives was observed: T4 - T5 values (4,69; 4,63) higher than T3 - T1 - T2 values (4,39; 4,24; 4,39) are considered more suitable for international standards. In the samples analyzed there was no evidence of the presence of *S. aureus*, and *E. coli*. The stability of the product was calculated using the amount of molds and yeasts as an indicator according to the Labuza equation. The sensory analysis was carried out with 75 participants without training, which indicated that the treatment T2 and T3 have the highest overall acceptability.

**Keywords:** conservation, food industry, preservative, microorganisms, propolis,  $\epsilon$ -polylysine.

## Introducción

El yogurt es uno de los productos lácteos más comunes y consumidos en gran parte del mundo; la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2395:2011 (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2011), lo define como el producto coagulado obtenido por fermentación láctica de la leche o mezcla de esta con derivados lácteos, mediante la acción de bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Sreptococcus salivaris subsp. thermophilus*, que pueden estar acompañadas de otras bacterias benéficas, que por su actividad le confieren las características al producto terminado; estas bacterias deben ser viables y activas desde su inicio y durante toda la vida útil del producto (Alvarado-Carrasco *et al.*, 2011).

Durante los últimos años, el consumidor a nivel mundial ha desarrollado una marcada tendencia por los productos naturales y saludables (Perdigón *et al.* 2002), tal y como es el caso del yogurt (Norat y Riboli, 2003; Crawford, 2004), que es el más popular de los productos acidificados de la leche (Buttriss, 1997). El consumo del yogurt implica de hecho importantes beneficios para la salud, entre los cuales pueden citarse: el ser una buena fuente de vitamina B12, ácido fólico y potasio (Crawford, 2004); el incremento en la biodisponibilidad de nutrientes como el magnesio, el zinc, calcio y fósforo (Palencia, 2004); la mejor absorción de la lactosa hidrolizada (Perdigón *et al.*, 2002); así como una excelente digestibilidad derivada de lo fácilmente metabolizable que es su fino coágulo por las enzimas digestivas (Palencia 2004) que es fuente de proteínas de excelente calidad (Mora-Newcomer, 1993).

En particular, el yogur muestra problemas durante la etapa de preservación, con desventajas como una acidez excesiva y sabores extraños debido a la presencia de microorganismos deteriorativos, sabor picante derivado de la aplicación de sorbato de potasio (Iriberry, 2014). Un elemento significativo para determinar los posibles orígenes del deterioro en los alimentos son sus características fisicoquímicas, que determinan la capacidad de desarrollo o

proliferación de los microorganismos (Clayton *et al.*, 2016).

Para la conservación de los alimentos se utilizan una amplia gama de métodos (atmosferas modificadas, aplicación de conservantes químicos, pasteuricen, entre otros), cuyo principal objetivo, como se ha demostrado, es prolongar la vida útil y mejorar la estabilidad de los alimentos para el consumo (Carrera, 2016). El deterioro o la pérdida de la calidad de los alimentos puede ser causada por la presencia de microorganismos y/o reacciones fisicoquímicas que ocurren después de la finalización de las etapas de preparación y acondicionamiento del alimento.

Actualmente, existe gran demanda de productos con etiquetas limpias, es decir, que presenten cantidades mínimas de conservantes de origen artificial, ya que estos se relacionan con intoxicaciones y enfermedades como el cáncer y la diabetes por condiciones no controladas de uso (Carrera, 2016). Lo antes indicado ha provocado que la parte industrial investigue nuevas opciones de conservación de alimentos, pero que estas desempeñen funciones semejantes que los conservantes artificiales y que sean compatibles, presentándose como una alternativa viable, el uso de conservador biológico (Gálvez *et al.*, 2011).

La  $\epsilon$ -polilisina es obtenida mediante la fermentación de la bacteria aeróbica *Streptomyces albulus*. Es un compuesto de origen natural muy estable a temperaturas altas, en medios alcalinos y ácidos, y tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana. Las cualidades favorables de la  $\epsilon$ -polilisina la hacen apropiada para ser utilizada en la producción de recubrimientos comestibles con propiedades antibacterianas (Zhang *et al.*, 2015).

Otro conservador biológico es el propóleo, ampliamente conocido por sus propiedades como sustancia antioxidante en el organismo, también se le atribuyen características importantes como promotor de la salud; existe documentación donde se informa que ha sido empleado desde la antigüedad por los egipcios para embalsamar

cadáveres; en Grecia y Roma era empleada por los médicos como agente antiséptico y cicatrizante. Entre las culturas precolombinas, los Incas lo utilizaron como sustancia antipirética (Muñoz-Rodríguez *et al.*, 2011). Además, presenta actividad antimicrobiana (Gutiérrez-Cortés y Suarez-Mahecha, 2014), el potencial conservador biológico del propóleo se asocia a la presencia de ciertos compuestos, incluyendo a los flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres (Carrera, 2016). A través de los flavonoides, tiene actividad contra: *Bacillus subtilis*, *Bacillus de Koch*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus cricetus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Giardia lamblia*, *Bacteroides nodosus*, *Klebsiella pneumoniae*, incluso, contra *Streptococcus pyogenes*, que es resistente a los antibióticos (Mirzoeva *et al.*, 1997). Los flavonoides del propóleo, además de destruir las células bacterianas y micóticas, contrarrestan el efecto de la propagación de las toxinas bacterianas (Harborne *et al.*, 1976). El objetivo del estudio fue evaluar el efecto como conservante de una mezcla de propóleo y  $\epsilon$ -polilisina sobre la estabilidad en el yogurt batido.

**Tabla 1**

*Ingredientes y conservadores utilizados para la elaboración del Yogurt batido*

Componentes	Unidad	T1	T2	T3	T4	T5
Leche semidescremada	G	907,20	907,20	907,20	907,20	907,20
Azúcar	G	90,8	90,8	90,8	90,8	90,8
Yoflex - YF-L812	G	2	2	2	2	2
Total	G	1000	1000	1000	1000	1000
$\epsilon$ -Polilisina	Mg	5	10	15	20	25
Propóleo	G	1	0,9	0,8	0,7	0,6

Nota. Elaboración propia.

El yogurt batido que se elaboró muestra una composición de leche semidescremada 90 %, y azúcar 10 %. Se utilizó YOFLEX YF-L812 (CHR HANSEN) liofilizado como fermento láctico, este se adicionó siguiendo la dosificación recomendada por el fabricante (aproximadamente 0,1 - 0,2 %) en correlación con la mezcla anterior (Tabla 1).

La obtención del propóleo se realizó a partir de un producto comercial de propóleo de Nature's Garden, S.A., el cual se comercializa con 20 % de concentración p/v. La  $\epsilon$ -polilisina

## Materiales y Métodos

El desarrollo de esta investigación se efectuó en la Universidad Técnica de Manabí, Extensión Chone Km 2 1/2 Vía Chone Boyacá, (17 m 597469,14 m E 9923947,68 m S) en el Laboratorio de procesos Agroindustriales y en la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Avenida Circunvalación, Vía San Mateo en la ciudad de Manta, Manabí, Ecuador (17 M 528298,46 m E 9894841,59 m S), en el Laboratorio de Investigación de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

La variable independiente utilizada como conservante del yogurt fue la mezcla de propóleo y  $\epsilon$ -polilisina para formular 5 tratamientos (Tabla 1). Las variables dependientes evaluadas fueron (pH, acidez, recuento de mohos y levaduras, *S. aureus* y *E. coli*) y la evaluación sensorial. Se manejó un diseño completamente al azar con 3 repeticiones de cada tratamiento, las muestras fueron evaluadas en tres intervalos de tiempo 0, 15 y 30 días. Las muestras fueron colocadas en recipientes plásticos de 50 mL y almacenadas a 4 °C.

utilizada fue un producto comercial de Zhengzhou Binafo Bioengineering Co., Ltd, China, polvo de color amarillo claro de pureza  $\geq 95$  %, la extracción proveniente de cepas de *S. albulus* extracto, soluble en agua.

## Producción del yogurt

La leche utilizada en la elaboración del yogurt fue proporcionada por la Universidad Técnica de Manabí, Extensión Chone, la materia prima fue almacenada en tanques de acero inoxidable

de 8 L. Posteriormente, se efectuó un proceso de precalentamiento a  $35 \pm 1$  °C. El descremado de la leche se realizó en una descremadora (CENAPATOP, SICH 100, República Checa), para obtener la materia prima con alrededor del 2 % de grasa aproximadamente. En el proceso de pasteurización, la leche se calentó hasta llegar a  $75 \pm 1$  °C/10 min, y el proceso de enfriamiento se llevó a cabo a una temperatura de  $45 \pm 1$  °C. Enseguida, se agregaron 2 g/L (16 g) de iniciador YOFLEX YF-L812 CHR HANSEN (fermento láctico). Después de la adición del inóculo, la leche se conservó a  $43 \pm 1$  °C hasta alcanzar un pH de 4.6, esta medición se realizó utilizando un potenciómetro (modelo 2221, HANNA, Alemania).

Una vez obtenido el pH óptimo, el yogurt se colocó en tanques de acero inoxidable de 80 L y se refrigeró a  $4 \pm 1$  °C para evitar la fermentación del ácido láctico y reducir su oxidación. Posteriormente, el producto fue colocado en envases de 50 mL y se agregaron los conservadores biológicos en las proporciones indicadas en la Tabla 1. Los conservantes se mezclaron con el yogurt utilizando un batidor de varillas de acero inoxidable (200 rpm durante 4 minutos) hasta obtener una mezcla homogénea. Finalmente, el producto se almacenó durante 30 días a  $4 \pm 1$  °C, tiempo que duro el ensayo.

### Mediciones experimentales

Los parámetros fisicoquímicos (pH y acidez), microbiológicos (recuento de mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) y la evaluación sensorial (sabor, olor, color, textura y evaluación general) se analizaron los días 0, 15 y 30 de almacenamiento.

El análisis de pH se realizó con un potenciómetro de acuerdo con el método 973,41 (AOAC International, 2005). Mientras que, el análisis acidez se realizó siguiendo el método 16267 (AOAC International, 2000), en el cual se utilizó NaOH 0,1 N y como indicador fenolftaleína para la titulación, los resultados fueron expresados como % de ácido láctico.

Para la determinación cuantitativa de hongos y levaduras se realizó el método de acuerdo con la en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1 529-10:2013 (INEN, 2013a) mediante recuento en placa profunda en agar Sabouraud. Para establecer la presencia/ausencia de *Staphylococcus aureus* se manejó el método establecido por la en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1 529-14:2013 (INEN, 2013b). Mientras que, para evaluar la presencia de *E. coli* se utilizó la metodología especificada en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-8:2016 (INEN, 2016).

### Análisis sensorial

Para determinar el efecto de los conservadores en las propiedades sensoriales del yogurt (sabor, olor, color, textura y evaluación general), se eligieron 75 participantes no entrenados mediante la prueba hedónica de 9 puntos. Las muestras se expusieron utilizando vasos transparentes de 50 mL a  $4 \pm 2$  °C, todas las muestras fueron codificadas aleatoriamente (Parra, 2013).

### Estudio de vida útil

La vida útil del yogurt se estimó en base a la densidad de mohos y levaduras, utilizando un análisis de regresión lineal simple, enunciado en la Ecuación 1 (Labuza, 1982):

$$\text{Ecu. 1} \quad \ln(A) = \ln(A_0) - k * t$$

Dónde:

A: representa la calidad del yogurt al tiempo t,

$A_0$ : representa la calidad a tiempo cero,

k: es la constante que representa la velocidad de la reacción, y

t: indica el tiempo de almacenado.

Se realiza despeje de la incógnita tiempo, se obtiene el tiempo de vida útil del yogurt para conservar las características de calidad siendo estas mejores o iguales que A, siendo este el valor estándar mínimo para determinar la calidad admisible para ser consumido (Ecuación 2).



$$\text{Ecu. 2} \quad t = \frac{\ln(A) - \ln(A_0)}{k}$$

Se estimó en 10 UP/g de mohos y levaduras el valor límite de la calidad del yogurt para ser comercializado (A). Este valor corresponde al extremo inferior del intervalo para el contenido de mohos o levaduras en la Norma Venezolana de Yogurt 293.2001 (Comisión Venezolana de Normas Industriales [COVENIN], 2001).

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en la evaluación de las características del yogurt (acidez, pH, presencia de mohos y levaduras) de cada tratamiento, fueron evaluadas utilizando la prueba ANOVA de una vía. Se verificó que los datos cumplieran con el supuesto de normalidad según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, para verificar el de homogeneidad de varianzas se realizó usando la prueba de Levene.

Cuando no se cumplía alguna de estas suposiciones, se intentó corregir los sesgos convirtiendo los datos a base logarítmica 10 (pH y acidez) y a raíz cuadrada (recuento microbiano). Si al realizar este proceso no se corregía la desviación estándar, se utilizó la prueba (no paramétrica) de Kruskal-Wallis (K - W) con su respectiva prueba a posteriori.

Se utilizó regresión lineal simple para estudiar el modelo cinético de las variables acidez y pH, así también se evaluó la variabilidad del conteo de mohos y levaduras durante el tiempo de almacenado, empleando el modelo matemático de Labuza (1982).

Los cambios en los recuentos de mohos y levaduras en las muestras de los tratamientos y el tiempo de almacenado se valoraron mediante el análisis de varianza bidireccional y la prueba post hoc de Tukey-Kramer. La valoración de los resultados del análisis sensorial se efectuó utilizando el coeficiente de conformidad de Kendall. Los datos se procesaron con la versión gratuita de Infostat (Infostat, 2020), SPSS (IBM, 2020) y el paquete estadístico Microsoft Excel.

## **Resultados y Discusión**

Tanto la variable de pH como la de acidez no cumplieron con la normalidad (Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0,05$ ) (datos no mostrados). Sin embargo, la varianza de la variable pH entre tratamientos fue heterogénea (Levene,  $p < 0,001$ ), y la varianza de acidez ( $p = 0,23$ ). Se realizó la conversión de los datos de pH y acidez a logaritmos decimales, y este no logró corregir los defectos presentados en los supuestos de normalidad y la heterogeneidad de las varianzas. Por lo tanto, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las variables de pH y la acidez entre tratamientos.

### **Efecto de los preservantes sobre las variables pH y acidez**

El pH presentó diferencia significativa entre los tratamientos (K - W,  $p = 0,042$ ). T1, T2, y T3 mostraron los valores más bajos de pH, con respecto a los tratamientos T4 - T5, los cuales no presentaron diferencias entre si (Figura 1).

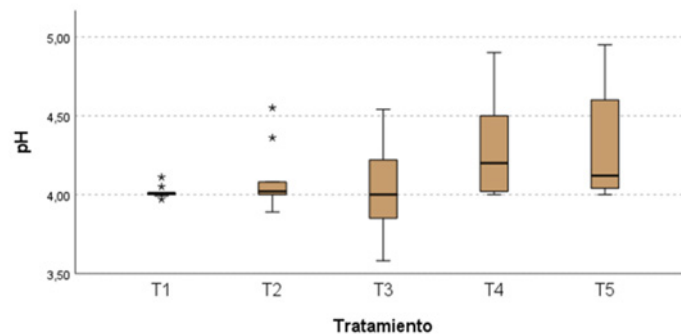
Los valores de pH para los tratamientos T1, T2 y T3 son los más acordes a los especificados en las normativas internacionales mencionadas a continuación: Norma Técnica Peruana [NTP] 202.092 de 2014 (Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales no Arancelarias -Perú, 2014), y el Real Decreto 271/2014 (Ministerio de la Presidencia de España, 2014), las cuales indican como requisito un  $\text{pH} \leq 4,6$ . Varias muestras en los tratamientos T4 y T5 sobrepasaron este valor de referencia.

Los datos reportados en la variable acidez no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (K - W,  $p = 0,749$ ) (Figura 2).

En este estudio se encontró que el pH no fue estable en las muestras adicionadas con los conservadores. Los tratamientos T1 y T2, adicionados con el porcentaje más alto de propóleo, reportaron los niveles de pH más bajos.

Este comportamiento propone que el propóleo causa una caída significativa en el pH el primer día de mezclarlo con el yogurt, lo que puede deberse a algunas interacciones químicas de sus componentes (flavonoides, ácidos aromáticos y diterpenoides). Sin embargo, es difícil atribuir

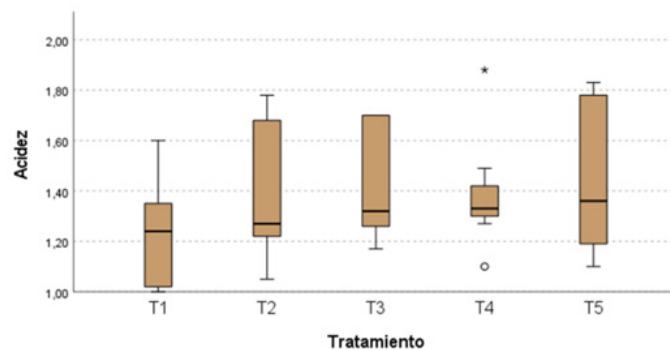
esta propiedad a uno de los ingredientes, debido a la gran variabilidad en la composición de los propóleos y al predominio de determinados ingredientes entre ellos (Guaraca y Palomino, 2018; Barreto y Constantino, 2019).



**Figura 1**

*Efecto de la adición de propóleo y  $\epsilon$ -polilisina sobre el pH de yogurt batido almacenado durante 30 días a  $4 \pm 1$  °C*

*Nota. \*Mayor diferencia estadística. Elaboración propia.*



**Figura 2**

*Efecto de la adición de propóleo y  $\epsilon$ -polilisina sobre la acidez de yogurt batido almacenado durante 30 días a  $4 \pm 1$  °C*

*Nota. Elaboración propia*

Por el contrario, los tratamientos con niveles altos de  $\epsilon$ -polilisina T4 y T5 mostraron un efecto bacteriostático fuerte, lo que contribuiría a que se presente una ligera disminución del pH del yogurt en relación con el inicial. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lafta (2019) quien reportó que la adición de 0,007 % de  $\epsilon$ -polilisina en una bebida de yogurt incrementó los valores de pH y redujo la acidez titulable.

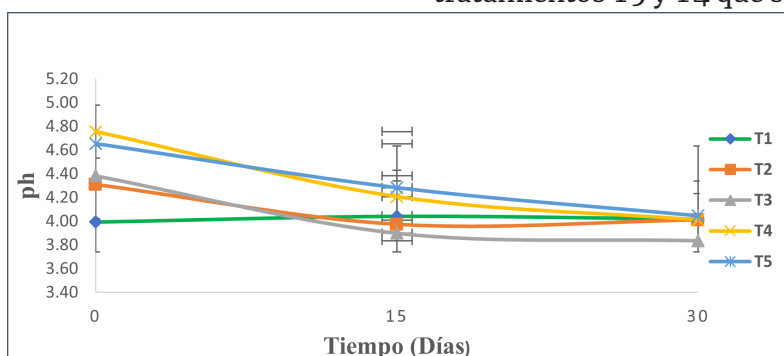
### **Efectos del tiempo de almacenado sobre las variables pH y acidez**

En la Figura 3, se muestra el comportamiento cinético del pH de yogurt adicionado con propóleo y  $\epsilon$ -polilisina. Los valores en el tratamiento T3 indican que el pH disminuyó significativamente con el tiempo de almacenamiento (K - W,  $p < 0,001$ ). El valor del pH promedio inicial (4,3)

difirió significativamente de los valores a los 15 días (4,16) y 30 días (3,95), pero estos últimos no difirieron entre sí, por lo que el pH del yogurt parece estabilizarse luego de 15 días de almacenamiento (Figura 3).

En la Tabla 2 se presentan los resultados del ajuste a dicho modelo para cada tratamiento. En esta, se registra la demostración de que el pH en los tratamientos T4 y T5 concordó mejor con el modelo lineal ( $r^2$ : 0,9305 y 0,9842, respectivamente). De la misma forma, los valores

iniciales de pH, reflejados por el intercepto en cada tratamiento, siendo T3 (pH = 4,1564), T2 (pH = 4,2478) y T1 (pH= 4,1564), estos resultados se encuentran dentro de los niveles determinados en las normas internacionales: Norma Técnica Peruana [NTP] 202.092 de 2014 (Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales no Arancelarias –Perú, 2014) y el Real Decreto 271/2014 (Ministerio de la Presidencia de España, 2014), las mismas requieren un pH  $\leq$  a 4,6, en discrepancia con los tratamientos T5 y T4 que sobrepasan ese valor.



**Figura 3**

*Efecto de la adición de propóleo y  $\epsilon$ -polilisina sobre el pH de yogurt batido almacenado durante 30 días a  $4 \pm 1$  °C*

Nota. Elaboración propia

**Tabla 2**

*Valores para el modelo cinético de pH del yogurt batido adicionado con propóleo y  $\epsilon$ -polilisina en relación al tiempo de almacenamiento*

TRATAMIENTOS	CONSTANTE	INTERCEPTO	$r^2$
T1	0,0008	4,005	0,25
T2	-0,01	4,2478	0,6595
T3	-0,0182	4,3078	0,8135
T4	-0,0249	4,6978	0,9305
T5	-0,0202	4,6311	0,9842

Nota. Elaboración propia.

Con referencia a lo que se ha expresado anteriormente, el pH y la acidez han cambiado durante el tiempo debido a la presencia de bacterias ácido-lácticas. De esta forma, se confirma que los conservantes tienen efectos bacteriostáticos y antifúngicos. Barreto y Constantino (2019) adicionó un extracto etanólico de propóleo como preservante de yogurt, a concentraciones de 0,4 y 1,6 %, se

observó una disminución gradual del pH a los 42 días de almacenamiento a una temperatura de 4 - 5 °C. Este autor señala que la disminución del pH llegó a alcanzar un rango de pH de 3,75 donde se observó una estabilización de este parámetro; la disminución del pH fue más marcada en las concentraciones más bajas de propóleo, por lo que atribuye este comportamiento como conservante, por su actividad bacteriostática en

los microorganismos que transforman la lactosa en ácido láctico.

Por otro lado, en el presente estudio, se encontró que el pH alcanzó valores más altos en tratamientos con menor concentración de propóleo, pero alta de  $\epsilon$ -polilisina. En acuerdo, otros estudios en los que utilizan preservantes naturales en yogurt (Rajapaksha *et al.*, 2013; Cedeño-Carpio, 2018; Lafta, 2019; Barreto y Constantino, 2019), sugieren que estos no evitan la caída del pH durante el almacenamiento, pero si logran mantener un pH más alto que el yogurt

sin conservantes, lo que indica que prolongaría la vida útil del yogurt.

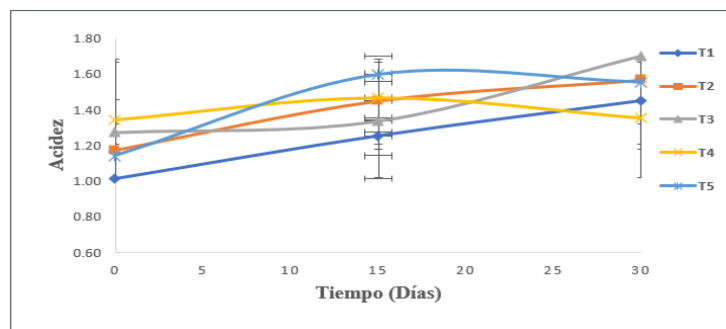
La Tabla 3 resume los resultados referentes al modelo cinético de acidez en el que los tratamientos T1, T2 y T3 se adaptan mejor al modelo lineal ( $r^2$ : 0,82; 0,39; 0,69) (Figura 4), donde los valores de los tratamientos T1 (% acidez = 1,008), T2 (% acidez = 1,19) y T3 (% acidez = 1,21) mostraron la acidez durante los 30 días de almacenamiento, y confirmaron la similitud entre tratamientos en la prueba de Kruskal-Wallis (Figura 5).

**Tabla 3**

Valores para el modelo cinético de acidez del yogurt batido adicionado con propóleo y  $\epsilon$ -polilisina en relación al tiempo de almacenamiento

TRATAMIENTOS	CONSTANTE	INTERCEPTO	$r^2$
T1	0,015	1,008	0,818
T2	0,014	1,190	0,385
T3	0,015	1,210	0,689
T4	0,0003	1,384	0,002
T5	0,014	1,218	0,337

Nota. Elaboración propia.



**Figura 4**

Efecto de la adición de propóleo y  $\epsilon$ -polilisina sobre la acidez de yogurt batido almacenado durante 30 días a  $4 \pm 1$  °C

Nota. Elaboración propia.

### Recuento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

En las muestras evaluadas en el estudio no se detectó la presencia de *S. aureus* y *E. coli*. Esto puede estar asociado a que los conservantes empleados inhibieron el crecimiento de dichas bacterias, aunque su ausencia en las muestras al inicio del estudio (día 0) revela que el inóculo no estuvo presente en la materia prima con la cual se elaboró el yogurt.

La no presencia de microorganismos contaminantes en las muestras puede ser atribuida a la composición química de los propóleos, numerosas investigaciones han demostrado su complejidad, se reportan más de trescientos diferentes constituyentes químicos, tales como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres), terpenoides, esteroides, aminoácidos, etc. ( Li *et al.*, 2016 ); se considera a los flavonoides, ácidos aromáticos,



diterpenoides y compuestos fenólicos como los principales constituyentes químicos responsables de las propiedades biológicas del propóleo ( Siripatrawan *et al.*, 2012 ).

El propóleo es una mezcla compleja de sustancias naturales que contiene una gran variedad de compuestos químicos (Chaillou *et al.*, 2004); entre las moléculas farmacológicamente activas se destacan flavonoides y ácidos fenólicos y sus ésteres (Kalogeropoulos *et al.*, 2009). No obstante, en muestras provenientes de países del trópico, que también presentan una actividad biológica similar, se han encontrado moléculas del tipo terpenoide, derivados prenilados de ácidos r-cumáricos, lignanos, y benzofenonas

preniladas, lo cual sugiere que la actividad es debida a la combinación y sinergias de diferentes compuestos (Londoño-Orozco *et al.*, 2008).

### Período de validez del yogurt

El estudio de determinación de la vida útil del yogurt con conservantes naturales ε-polilisina – propóleo se realizó a partir del recuento de mohos y levaduras como indicador de deterioro progresivo en 30 días a 4 °C de temperatura de almacenamiento (Tabla 4). Se observa como el número de UP de mohos y levaduras en el yogurt disminuye de manera significativa (ANOVA 1 vía, p < 0,001) durante el almacenamiento para el conjunto de todos los tratamientos.

**Tabla 4**

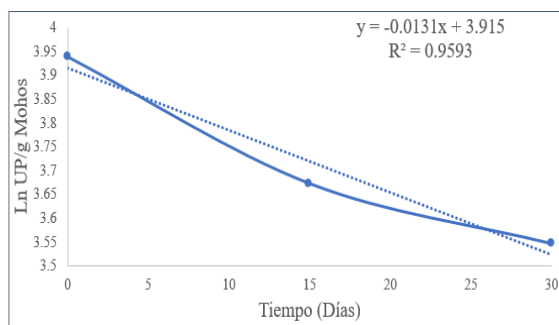
*Número de UP de mohos y levaduras (promedio) en los tratamientos con propóleo y ε-polilisina durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C*

TRATAMIENTOS	Días de almacenamiento a 4 °C		
	0	15	30
T1	51,3	39,3	34,7
T2	51,7	47,3	15,7
T3	50,7	29,3	27,7
T4	52,7	37,3	28,0
T5	51,0	32,7	25,7

Nota. Elaboración propia.

Todos los estudios predictivos superaron los 30 días de vida útil que con normalidad sustenta el yogurt comercial a una temperatura de 4 °C. Cabe indicar que este estudio se lo realizó solamente con UP de mohos, debido a la ausencia de *E. coli* y *S. aureus* en las muestras evaluadas.

Se observó el decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento en el tratamiento T1 y se determinó que el tiempo de vida útil del producto alcanzaría 123 días (Ecuación 3), cuando se tengan 10 UP/g (Figura 5).



**Figura 5**

*Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 1 de yogurt con conservantes naturales de ε-polilisina y propóleo*

Nota. Elaboración propia.

Ecuación 3

$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k}$$

$$t = \frac{\ln(10) - 3,915}{-0,0131} = 123 \text{ días}$$

En el tratamiento T2 se observó el decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento, y se determinó que el tiempo de vida útil del producto sería de 83 días (Ecuación 4), para alcanzar 10 UP/g (Figura 6).

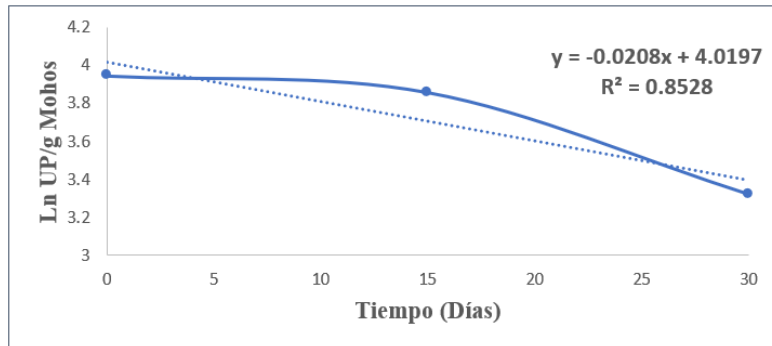


Figura 6

Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 2 de yogurt con conservantes naturales de ε-polilisina y propóleo

Nota. Elaboración propia.

Ecuación 4

$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k}$$

$$t = \frac{\ln(10) - 4,0197}{-0,0208} = 83 \text{ días}$$

En el tratamiento T3 se observó un decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento, estimándose el tiempo de vida útil del producto en 76 días (Ecuación 5), para que se alcancen las 10 UP/g (Figura 7).

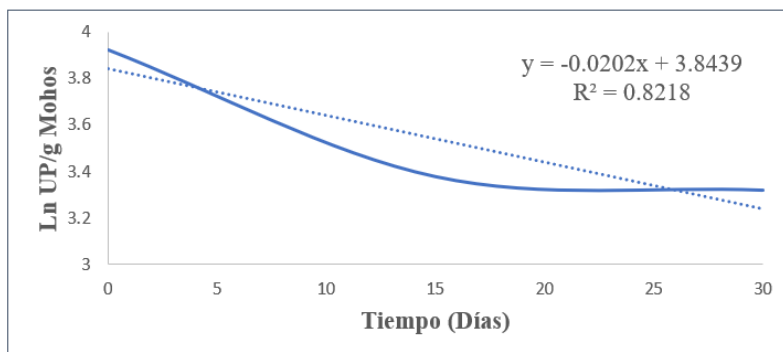


Figura 7

Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 3 de yogurt con conservantes naturales de ε-polilisina y propóleo

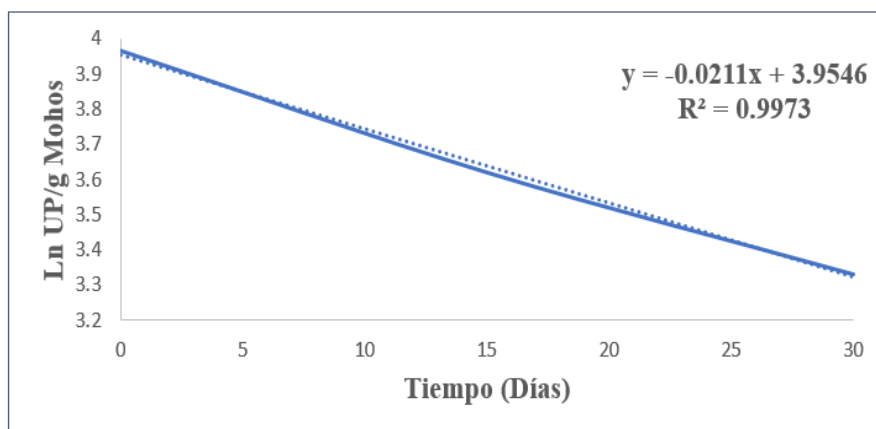
Nota. Elaboración propia.

Ecuación 5

$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k}$$

$$t = \frac{\ln(10) - 3,8439}{-0,0202} = 76 \text{ días}$$

En el tratamiento T4 se observó un decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento, estimándose el tiempo de vida útil del producto en 78 días (Ecuación 6), para que se alcancen las 10 UP/g (Figura 8).



**Figura 8**

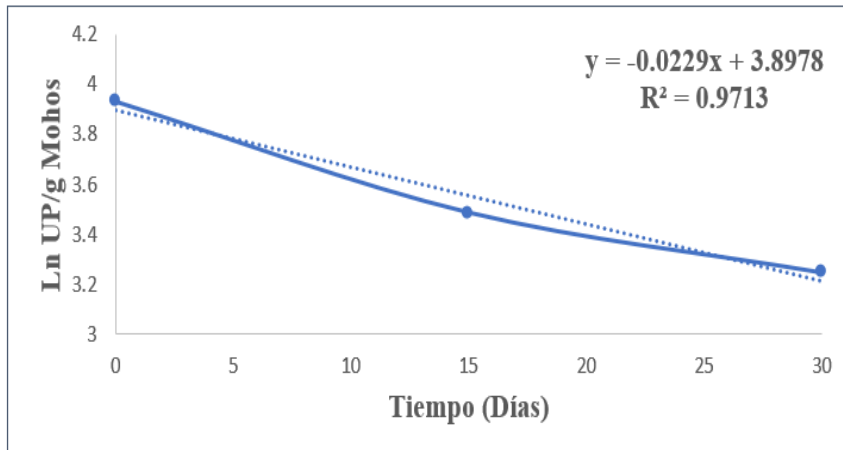
*Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 4 de yogurt con conservantes naturales de ε-polilisina y propóleo*

Nota. Elaboración propia.

Ecu. 6 
$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k}$$

$$t = \frac{\ln(10) - 3,9546}{-0,0211} = 78 \text{ días}$$

En el tratamiento T5 se observó un decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento, estimándose el tiempo de vida útil del producto en 70 días (Ecuación 7), para que se alcancen las 10 UP/g (Figura 9).



**Figura 9**

*Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 5 de yogurt con conservantes naturales de ε-polilisina y propóleo*

Nota. Elaboración propia.

Ecu. 7 
$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k}$$

$$t = \frac{\ln(10) - 3,8978}{-0,0229} = 70 \text{ días}$$

Se evidencia que las combinaciones de los conservantes evaluados en el presente estudio lograron reducir el crecimiento de mohos y elevar substancialmente el tiempo de vida útil del yogurt, entre 70 y 123 días, en comparación con el tiempo esperado de anaquel de un yogurt (30 días).

## Valoración sensorial

Los panelistas evaluadores consideraron que las muestras de yogurt correspondientes a tres tratamientos con combinación de distintas proporciones de conservantes (T1, T2 y T3) y almacenadas durante 30 días a  $4 \pm 1$  °C, mostraron diferencias significativas en cuanto a las cinco características evaluadas (Tabla 5).

Análisis de los resultados de la evaluación de expertos no capacitados sobre muestras de yogurt que se sometieron a 3 tratamientos

con una combinación de conservantes de  $\epsilon$ -polilisina y propóleos después de 30 días de almacenamiento a 4 °C.

En la prueba no paramétrica de Kendall, se estableció que todas las características organolépticas en estudio presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos, siendo los tratamientos T2 y T3 los mejores; T3 presentó mejores características en cuanto a color, olor, textura y aceptabilidad general, mientras que el T2 mostró mejores propiedades en cuanto a olor y sabor.

**Tabla 5**

*Valores para el modelo cinético de pH del yogurt batido adicionado con propóleo y  $\epsilon$ -polilisina en relación al tiempo de almacenamiento*

Característica	WK	Tratamiento*			
		p	T1	T2	T3
Color	0,304	0,0001	1,81a	1,72a	2,47b
Olor	0,874	0,0001	1,39a	2,26b	2,35b
Sabor	0,169	0,0001	1,94b	2,32c	1,74a
Textura	0,264	0,0001	1,51a	2,09b	2,29c
Aceptabilidad general	0,169	0,0001	1,83a	1,93a	2,23b

Nota. Elaboración propia.

El uso de propóleo podría atribuir cambios en las características sensoriales del producto final, debido a la cantidad y al tipo de compuestos fenólicos de que está constituido, los que pueden estar representados por las agliconas de flavonoides, ácidos fenólicos o sus ésteres (Adellman, 2005; Modak *et al.*, 2002; Samara-Ortega *et al.*, 2011). Numerosas investigaciones han demostrado su complejidad, se reportan más de trescientos diferentes constituyentes químicos, tales como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres), terpenoides, esteroides, aminoácidos, etc. (Li *et al.*, 2016); se considera a los flavonoides, ácidos aromáticos, diterpenoides y compuestos fenólicos como los principales constituyentes químicos responsables de las propiedades biológicas del propóleo (Siripatrawan *et al.*, 2012).

Debido a su constitución química, el propóleo tiene en general un sabor amargo y astringente, desagradable al gusto de los consumidores, en especial en los niños, incrementándose su rechazo cuando sus extractos están basados en solventes como el etanol. Disfrazar su sabor ha sido el objetivo de algunos investigadores, proponiendo mezclas con otros ingredientes tales como la miel de abeja (Osés *et al.*, 2016), o bien realizando extractos acuosos en lugar de los tradicionales etanólicos, buscando en todo caso que las propiedades antimicrobianas no se pierdan (Bucio y Martínez, 2017).

Desde su aprobación como aditivo seguro ha aumentado su demanda en alimentos, en Japón se utiliza para conservar carnes y

pescados para sushi (15 mg/g), arroz y vegetales cocidos (0,01 – 0,5 mg/g) (Zhang *et al.*, 2015), en arroz de sushi (550 ppm) y en leche condensada (Paredes–Pantoja, 2017).

## Conclusiones

El tratamiento 1 (5 mg de  $\epsilon$ -polilisina y 1 mL de propóleo) proporcionó el tiempo de vida útil más largo (123 días). Cabe señalar que todas las muestras de los tratamientos superaron los (30 días) de vida útil del yogurt comercial. La acidez y el pH se correlacionaron inversamente en el yogurt, siendo los tratamientos (T1: 5 mg  $\epsilon$ -polilisina – 1 mL Propóleo, T2: 10 mg de  $\epsilon$ -polilisina – 0,9 mL de propóleo y T3: 15 mg de  $\epsilon$ -polilisina – 0,8 mL de propóleo) en términos de pH y acidez los de mejor adaptación a los estándares internacionales. La aceptabilidad sensorial del yogurt conservado mediante la combinación de propóleo +  $\epsilon$ -polilisina valorada por 75 catadores no capacitados, mostró que los mejores tratamientos fueron T2 (sabor y olor) y T3 (olor, color, aceptabilidad general y textura).

## Referencias

Adellman, J. (2005). *Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/ antioxidante*. [Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Federal de Paraná]. Curitiba, Brasil, 176 p. <https://hdl.handle.net/1884/1249>

Alvarado-Carrasco, C. E. A., Coronado, M., Prósperi, F., y Guerra, M. (2011). Desarrollo de yogurt con capacidad antioxidante elaborado con leche de cabra (*Capra hircus*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendtn.). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2 (2), 293–312. <https://sites.google.com/site/1rvcta/v2-n2-2011/r5>

Association of Official Analytical Chemistry [AOAC] International. (2005). Dairy Products. En Horwitz, W., y Latimer, G. (Eds.) *Official methods of analysis*. AOAC International, Washington D.C.

Association of Official Analytical Chemistry [AOAC] International. (2005). *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemistry, Washington D.C. capítulo 33:844.

Barreto, I. y Constantino, J. (2019). *Caracterización de los propóleos del distrito de Huaraz y su efecto conservante en yogurt frutado*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional Federico Villareal]. Repositorio Institucional, Lima Perú. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/3732>

Bucio-Villalobos, C. M., y Martínez-Jaime, O. A. (2017). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28 (1), 223–227. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v28i1.24253>

Buttriss, J.L. (1997). Alimentación y nutrición: actitudes, creencias y conocimientos en el Reino Unido. *Revista Americana de Nutrición Clínica*, 65 (6), 1985S–1995S.

Carrera, Q. R. (2016). *Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña*. [Tesis de pregrado, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano]. Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/913c8004-5f67-498c-85e4-164318d5feaf/content>

Cedeño-Carpio, X.A. (2018). *Evaluación de propóleo como conservante natural en la leche chocolatada*. [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico de Leiria]. Repositorio Institucional. España. <https://iconline.ipleria.pt/bitstream/10400.8/3476/1/Evaluaci%C3%B3n%20de%20prop%C3%B3leo%20como%20conservante%20natural%20en%20la%20leche%20chocolatada.pdf>

Chaillou, L. L., Herrera, H. A., y Maidana, J. F. (2004). Estudio del propóleo de Santiago del Estero, Argentina. *Food Science and Technology*, 24 (1), 11–15. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000100003>

Clayton, K., Bush, D. y Keener, K. (2016). *Emprendimientos alimentarios: Métodos para la conservación de alimentos*. Purdue Extension Education. <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/FS/FS-15-S-W.pdf>

Crawford, F. (2004). *Yogurt: alimento poderoso (en línea)*. Cuernavaca, México. [www.williams-cuernavaca.edu.mx](http://www.williams-cuernavaca.edu.mx)

Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales no Arancelarias –Perú. (2014). Norma Técnica Peruana NTP 202.092 2014. Leche y Productos Lácteos. Leches fermentadas. Yogurt. Requisitos. 5a. ed. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual [INDECOPI].

Comisión Venezolana de Normas Industriales [COVENIN]. (2001). Norma Venezolana de Yogurt 2393. Servicio Desconcentrado de Normalización, Calidad, Metrología y Reglamentos Técnicos [SENCAMER], Ministerio del Poder Popular de Comercio Nacional, Caracas, Venezuela. <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/2393-01.pdf>

Gálvez, H. J., Montalvo, R. C., Ramírez, T. C. R., y Bolívar, G. (2011). Efecto de bioconservación de carne molida de cerdo, tipo hamburguesa con *Lactobacillus acidophilus* cepa ATCC 4356 y *Staphylococcus carnosus* NRRLO2. *Alimentos Hoy*, 16 (16), 33–42. <https://alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/90/84>

Guaraca, M. A. L., y Palomino, C. D. L. (2018). *Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica*. [Tesis de Maestría, Universidad Politécnica Salesiana, Unidad de Posgrados]. Cuenca, Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15371/1/UPS-CT007559.pdf>



- Gutiérrez-Cortés, C., y Suarez-Mahecha, H. (2014). Antimicrobial Activity of Propolis and its Effect On The Physicochemical And Sensorial Characteristics In Sausages. *Vitae*, 21 (2), 90-96. <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v21n2/v21n2a3.pdf>
- Harborne, J. (1976). La isopentenil isoflavona luteona como agente antifúngico preinfeccioso en el género *Lupinus*. *Fitoquímica* 15 (10), 1485-1487.
- IBM (2020). IBM SPSS Statistics. <https://www.ibm.com/products/spss-statistics>.
- Infostat. (2020). Infostat software estadístico. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37>.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2011). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2395:2011. Leches fermentadas. Requisitos. 2da revisión. Servicio Ecuatoriano de Normalización, Quito, Ecuador. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-2395-2r.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2013a). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-10:2013. Primera revisión. Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad. Servicio Ecuatoriano de Normalización, Quito, Ecuador. [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_1529-10-1.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-10-1.pdf)
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2013b). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-14:2013. Primera revisión. Control microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie. Servicio Ecuatoriano de Normalización, Quito, Ecuador. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-14-1R.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2016). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1529-8:2016. Primera revisión. Control microbiológico de los alimentos. detección y recuento de *Escherichia coli* presuntiva por la técnica del número más probable. Servicio Ecuatoriano de Normalización, Quito, Ecuador. [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_1529-8-1.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-8-1.pdf)
- Iriberry, A. (2014). Los Defectos más comunes en los Yogures y sus posibles soluciones. Chr. Hansen. <http://www.tecnocarnicos.com/project/tecnocarnicos/resumen/vortrag/Defectos%20en%20yogures%20-%20Tecnolacteos%202014.pdf>
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtziinos, I. y Karathanos, V.T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food chemistry*, 116 (2), 452-461. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.060>
- Labuza, T. P. (1982). *Shell-life dating of foods*. Food & Nutrition Press. ISBN: 0917678141, 9780917678141.
- Lafta, S. S. (2019). Effect of the e-polylysine utilization on the physicochemical, microbiological, and rheological properties of the drinking yogurt. *Plant Archives*, 19 (1), 870-874. [http://plantarchives.org/PDF%2019-1/870-874%20\(4889\).pdf](http://plantarchives.org/PDF%2019-1/870-874%20(4889).pdf)
- Li, A., Xuan, H., Sun, A., Liu, R. y Cui, J. (2016). Separación preparativa de polifenoles de la fracción soluble en agua de propóleo chino utilizando resina absorbente macroporosa junto con cromatografía líquida preparativa de alta resolución. *Revista de cromatografía B*, 1012, 42 - 49.
- Londoño-Orozco, A., Pinieres-Carrillo, J. G., García-Tovar, C. G., Carrillo, L., Quintero-Mora, M. L., García-Vásquez, S. E., Mendoza-Saavedra, M. A., y Cruz-Sánchez, To N. A. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Revista Tecnología en Marcha*, 21 (1), 49-55. [https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/1338](https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1338)
- Ministerio de la Presidencia de España (abril 11 de 2014). Real Decreto 271/2014, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. *Boletín Oficial del Estado*, 102 (BOE-A-2014-4515). <https://www.boe.es/boe/dias/2014/04/28/pdfs/BOE-A-2014-4515.pdf>
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., y Calder, P.C. (1997). Antimicrobial Action of Propolis and Some of Its Components: The Effects on Growth, Membrane Potential and Motility of Bacteria. *Microbiological Research*, 152, 239-246. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80034-1)
- Modak, B., Arrieta, A., Torres, R., y Urzua, A. (2002). Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: efecto del tipo de estructura. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 47 (1), 19-23. <http://dx.doi.org/10.4067/S0366-16442002000100005>
- Mora-Newcomer, L. (1993). Evaluación del efecto del contenido de sólidos lácteos y de la velocidad de enfriamiento sobre las características del yogur natural batido (No. 637.1476 M827e). Sistema Integrado de Información Documental Centroamericano (SIIDCA). San José, Costa Rica. <https://catalogosiidca.csuca.org/Record/UCR.000020514>
- Muñoz-Rodríguez, L. C., Linares-Villalba, S. E., y Narváez-Solarte, W. (2011). Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud* 10 (2), 101-111. <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v10n2/v10n2a10.pdf>
- Norat, T. y Riboli, E. (2003). Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Revista europea de nutrición clínica*, 57 (1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601522>
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muñoz, M., López-Díaz, T. M., y Sancho, M. T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196, 1215-1223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.050>. PMID:26593609
- Paredes-Pantoja, V. E. (2017). Efecto de un recubrimiento comestible de gelatina y epsilon-polilisina en la calidad microbiológica de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*). (Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato). Repositorio Institucional. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/25294>

Parra, H. R. A. (2013). Efecto del té verde (*Camellia sinensis* L.) en las características físicoquímicas, microbiológicas, proximales y sensoriales de yogurt durante el almacenamiento bajo refrigeración. @limentech, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 11 (1), 56-64. <http://dx.doi.org/10.24054/16927125.v1.n1.2013.383>

Perdigon, G., De Moreno de LeBlanc, A., Valdez, J., y Rachid, M. (2002). Role of yoghurt in the prevention of colon cancer.. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (3), S65-S68. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601490>

Rajapaksha, D. S. W., Kodithuwakku, K. H. T., Silva, K. S. T., y Rupasinghe, R. J. L. (2013). Evaluation of potassium sorbate and ε-polylysine for their inhibitory activity on post-acidification of set yoghurt under cold storage for 20 days. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3, 6, 16-20. <https://www.ijsrp.org/research-paper-0613/ijsrp-p1814.pdf>

Samara-Ortega, N. S., Benitez-Campo, N. E., y Cabezas-Fajardo, F.A. (2011). Actividad antibacterial y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9 (1), 8-16. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v9n1/v9n1a02.pdf>

Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W., y Sanguandeeikul, R. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of T hai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science & Technology*, 48 (1), 22-27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x>

Zhang, L., Li, R., Dong, F., Tiang, A., Li, Z. & Dai, Y. (2015). Physical, mechanical and antimicrobial properties of starch films incorporated with ε-poly-l-lysine. *Food Chemistry*, 166, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.008>