

Micro-encapsulación de *Lactobacillus casei* y el efecto sobre la supervivencia durante el procesamiento del yogurt y bajo condiciones simuladas del estómago humano

por

JASON JESÚS DRAGONI ROSADO

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para:

MAESTRO EN CIENCIAS
en
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO DE MAYAGÜEZ
2014

Aprobado por:

Lynette E. Orellana Feliciano, PhD
Presidente, Comité Graduado

Fecha

María de Lourdes Plaza, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Leyda Ponce de León, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Matías J. Cafaro, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Aixa Rivera, MS
Coordinadora
Programa Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha

*Derechos de Autor Reservados ©
Jason Jesús Dragoni Rosado
2014*

ABSTRACT

The viability of *Lactobacillus casei* ATCC 393 encapsulated and non-encapsulated in a calcium alginate matrix at different concentrations (1% and 2%) was evaluated. The microorganism was exposed to the yogurt conditions and the simulated conditions of the human stomach. The prepared yogurt was stored at 4°C for 28 days and samples of it were taken to assess the viability of the microorganism at days 1, 14 and 28. Viability was assessed using the techniques of serial dilutions and pour plate with the culture media MRSA (de Man, Rogosa and Sharpe Agar), which was adjusted to pH 5.7 and incubated at 15°C for 15 days. Measurements of pH, titratable acidity, viscosity and yogurt microscopy were performed during this investigation. Also, a sensory analysis was performed to determine whether people could identify differences between the yogurt containing unencapsulated bacteria and the yogurt containing encapsulated bacteria in calcium alginate. The viability study determined that the organism tends to have a higher count of CFU / g when is unencapsulated in comparison with the encapsulated under both conditions studied. The pH and titratable acidity measurements showed that the unencapsulated microorganism is metabolically more active than the encapsulated one. The capsules formed were irregular in shape with an average size of 670µm that could be classified as micro-capsules. The sensory panel could not find differences between yogurt that contain 1 % alginate capsules and control. *Lactobacillus casei* ATCC 393 is a highly adaptive organism, which does not require an encapsulation process to improve their viability under conditions of yogurt as well as the human stomach.

RESUMEN

Se evaluó la viabilidad de *Lactobacillus casei* ATCC 393 encapsulado y no encapsulado en una matriz de alginato de calcio a distintas concentraciones (1 y 2%). El microorganismo fue expuesto a las condiciones del yogurt y a las condiciones simuladas del estómago humano. El yogurt preparado fue almacenado a 4°C durante 28 días y se tomaron muestras del mismo para evaluar la viabilidad del microorganismo a los días 1, 14 y 28. La viabilidad se evaluó cultivando la bacteria en medio MRSA (de Man, Rogosa y Sharpe), al cual se le ajustó el pH a 5.7 y se incubó a 15°C por 15 días. Medidas de pH, acidez titulable, viscosidad y microscopía del yogurt fueron realizadas en los días 1, 14 y 28 durante esta investigación. Además se realizó un análisis sensorial para determinar si las personas podían percibir diferencias entre el yogurt que contenía bacterias sin encapsular y el que contenía bacterias encapsuladas en alginato de calcio. El estudio de viabilidad determinó que el microorganismo tiende a tener un conteo de CFU/g más alto al estar sin encapsular que encapsulado en ambas condiciones. Las medidas de pH y acidez titulable demostraron que el microorganismo no encapsulado está metabólicamente más activo que los que están encapsulados. Las cápsulas formadas mostraron tener forma irregular y un tamaño promedio de 670µm que les permite ser clasificadas como micro-cápsulas. El panel sensorial no encontró diferencias significativas entre el yogurt que contenía cápsulas de 1% de alginato y el control. *Lactobacillus casei* ATCC 393 es un microorganismo sumamente adaptable el cual no necesita de un proceso de encapsulación para mejorar su viabilidad bajo condiciones del yogurt así como las del estómago humano.

DEDICATORIA

A Dios por todas las experiencias vividas durante estos años.
A todas las personas que de una manera u otra me dieron sus palabras
de aliento durante los momentos difíciles.
A mi familia y personas cercanas a mi vida, gracias por el continuo apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme las fuerzas y la salud necesaria para culminar esta etapa en mi vida.

A mis padres y hermanos por preocuparse por mí y siempre preguntarme: ¿nene cuando te piensas graduar?

A Benjamin Ortíz, por ayudarme desde que comencé en el programa, por estar junto a mí en el laboratorio hasta largas horas de la noche y por ayudarme en los procedimientos de mi trabajo de investigación.

A mi Presidenta del Comité Graduado, Dra. Lynette Orellana por sus consejos y apoyo en los momentos difíciles durante mi maestría en CITA. Por siempre ayudarme con los materiales que necesitaba. Muchísimas gracias!

A la Dra. Edna Negrón, al principio no entendía su forma de trabajar y el gran compromiso que usted cargaba, luego de trabajar por mucho tiempo con usted me di cuenta que sin usted el Programa CITA no fuera lo que es hoy día. Gracias mil por todo lo que aprendí en todos los seminarios que tomé con usted!

A la Dra. María Plaza, gracias por ser como es con los estudiantes, su forma de ser es única. Le agradezco por nunca decir que no cuando necesitaba algún material de su laboratorio.

A la Dra. Leyda Ponce de León, gracias por explicarme y ayudarme con la preparación del yogurt, con los documentos para el sensorial y por aclarar todas mis dudas con respecto a la tesis.

A la Sra. Magaly Zapata, gracias por ser excelente coordinadora de los laboratorios de microbiología general, al trabajar con usted como instructor aprendí a que uno debe enseñar y a su vez ayudar a que los estudiantes salgan bien. Gracias por todo lo aprendido y los consejos que me daba para mi tesis.

A Elsa Collazo, gracias por compartir muchos momentos conmigo en CITA: Chicago, Lab. de Química, HSI, RISE, etc. Además gracias por tus consejos de comidas saludables.

A todo el personal administrativo del Programa CITA, gracias por su ayuda y disposición cuando más uno la necesitaba.

A todas las personas que conocí durante el transcurso de estos años: amigos, profesores, empleados y estudiantes. Gracias por las experiencias vividas.

TABLA DE CONTENIDO

1 Introducción	1
1.1 Justificación	2
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivos generales	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
2 Revisión de literatura.....	5
2.1 Probióticos	5
2.1.1 Aspectos generales	5
2.1.2 Probióticos en los alimentos	5
2.1.3 Beneficios terapéuticos.....	6
2.2 Yogurt	8
2.2.1 Aspectos generales	8
2.2.2 Aspectos nutricionales.....	8
2.2.3 Organismos fermentadores	9
2.2.4 Relación con microorganismos probióticos	10
2.3 Tracto gastrointestinal humano y su ecosistema microbiano.....	11
2.3.1 Aspectos generales	11
2.3.2 Tracto gastrointestinal y los microorganismos.....	11
2.4 Micro-encapsulación y alginatos	14
2.4.1 Aspectos generales de la micro-encapsulación.....	14
2.4.2 Alginatos.....	16
2.5 Género <i>Lactobacillus</i>	17
2.4.2 <i>Lactobacillus casei</i>	18
3 Materiales y Métodos	20
3.1 Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	21
3.2 Preparación del inóculo de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	22
3.3 Encapsulación de <i>Lactobacillus casei</i> en una matriz de alginato de calcio.....	23
3.4 Preparación del yogurt e inoculación con <i>Lactobacillus casei</i>	24
3.4.1 Determinación del porcentaje de grasa de la leche	24

3.4.2 Determinación de humedad de la leche	26
3.4.3 Preparación del yogurt.....	26
3.4.4 Medidas de pH	28
3.4.5 Acidez titulable	28
3.5 Enumeración de microorganismos viables.....	29
3.6 Condiciones simuladas del estómago.....	30
3.7 Viscosidad del yogurt.....	31
3.8 Microscopía.....	32
3.9 Análisis sensorial	33
3.10 Análisis estadístico.....	34
4 Resultados y discusión	36
4.1 Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	36
4.2 Microscopía de las cápsulas	37
4.3 Apariencia del yogurt	38
4.4 Condiciones del yogurt y condiciones simuladas del estómago	39
4.4.1 Concentración de <i>Lactobacillus casei</i> bajos las condiciones del yogurt y condiciones simuladas del estómago humano	39
4.4.2 Acidez titulable del yogurt.....	42
4.4.3 Medidas del pH del yogurt.....	43
4.5 Viscosidad aparente del yogurt.....	45
4.6 Análisis sensorial: yogurt de vainilla con granola	46
4.6.1 Primer sensorial: yogurt con células sin encapsular (0% de alginato) vs yogurt con células encapsuladas (1% de alginato).....	46
4.6.2 Segundo sensorial: yogurt con células sin encapsular (0% de alginato) vs yogurt con células encapsuladas (2% de alginato).....	47
5 Conclusiones.....	49
6 Recomendaciones.....	51
7 Referencias.....	52
8 Apéndice	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Algunos probióticos utilizados en alimentos y su fuente de manufactura	6
Tabla 2: Posibles beneficios a la salud y mecanismos de acción de las bacterias probióticas	7
Tabla 3: Procesos metabólicos llevados a cabo por microorganismos intestinales.....	12
Tabla 4: Datos para el primer análisis sensorial: 0% vs 1% de alginato de calcio.....	47
Tabla 5: Datos para el segundo análisis sensorial: 0% vs 2% de alginato de calcio	48
Tabla 6: Números críticos de respuestas correctas en una prueba triángulo	48

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> a 35°C	36
Gráfica 2: Interacción entre la concentración de alginato de calcio de las cápsulas (0,1 y 2%) con las condiciones de muestreo (yogurt y estómago humano)	39
Gráfica 3: Interacción entre los días de almacenamiento del yogurt y la concentración de alginato de calcio en la acidez titulable del yogurt	43
Gráfica 4: Interacción entre los días de muestreo y la concentración de alginato de calcio utilizado en la encapsulación del microorganismo	44
Gráfica 5: Viscosidad aparente del yogurt con diferentes concentraciones de alginato de calcio	45

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1: Función de cada parte del tracto gastrointestinal y la distribución de los microorganismos	14
Imagen 2: Ejemplo de proceso de encapsulación llevado a cabo en la investigación: (a) sistema de encapsulación, (b) proceso de adicionar el alginato de sodio al cloruro de calcio y (c) formación de cápsulas con material encapsulado	16
Imagen 3: Diagrama del resumen de los procesos llevados a cabo durante la investigación	20
Imagen 4: Tinción Gram de <i>Lactobacillus casei</i> : bacilos en cadenas Gram positivos .	22
Imagen 5: Proceso de preparación del inóculo de <i>Lactobacillus casei</i> : (a) medio de cultivo en caldo de MRS fresco, (b) medio de cultivo inoculado con el microorganismo e incubado con agitación, (c) cultivo del microorganismo luego de las 18 horas de incubación, (d) proceso de centrifugación del cultivo, (e) suspensión del microorganismo en solución salina al 0.85%.....	23
Imagen 6: Diagrama del sistema utilizado para la micro-encapsulación del microorganismo.....	24
Imagen 7: Proceso de determinación del porcentaje de grasa utilizando Mojonnier: (a) muestra de leche, (b) muestra de leche con hidróxido de amonio y fenolftaleína, (c) muestra con etanol, éter etílico y éter de petróleo, (d) separación de capas (incolores es la orgánica), (e) evaporación de los solventes en cámara de extracción de gases	25
Imagen 8: Fórmula utilizada para determinar el porcentaje de humedad.....	26
Imagen 9: Algunos pasos de la preparación del yogurt: (a) pesado de la leche fresca, (b) pesado de la leche en polvo y de la gelatina sin sabor, (c) adición de los ingredientes secos a la leche, (d) mezclado de leche y otros ingredientes, (e) incubación de la mezcla del yogurt a 35°C	27
Imagen 10: Cuadrado de Pearson para estandarizar la leche para la producción de yogurt: SNG (sólidos no grasos)	28
Imagen 11: Procedimiento de acidez titulable del yogurt analizado	29
Imagen 12: Enumeración de microorganismos viables	30
Imagen 13: Viscosidad del producto preparado	32
Imagen 14: Panel Sensorial: (a) preparación de las mezclas de yogurt, (b) incubación de la mezcla de yogurt, (c) cuarto de análisis sensorial, (d) materiales utilizados en el panel sensorial, (e) y (f) muestras de yogurt refrigeradas para los panelistas	33
Imagen 15: Diagrama de los días de muestreos de la investigación.....	35

Imagen 16: Micrografía de las cápsulas de alginato de calcio pasados los 28 días de almacenamiento: (a) cápsula de 1% de alginato de calcio, (b) cápsulas de 2% de alginato de calcio	37
Imagen 17: Superficies de los yogurts preparado: (a) % de alginato, (b) 1% de alginato y (c) 2% de alginato	38
Imagen 18: Proceso de gelificación del alginato cuando se le adiciona iones de Ca^{2+} o de Mg^{2+}	41

LISTA DE APENDICES

Apéndice 8.1: Datos para la curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> , 35°C en caldo MRS	57
Apéndice 8.2: Hoja de contestaciones de los panelistas: análisis sensorial de yogurt de vainilla con granola.....	57
Apéndice 8.3: Carta de exención del Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación: análisis sensorial de yogurt de vainilla con granola	58
Apéndice 8.4: Análisis estadístico de los resultados de la investigación	59

1 INTRODUCCIÓN

Algunos microorganismos contribuyen al desarrollo de las características organolépticas, fisicoquímicas y reológicas de los alimentos. Otros microorganismos pueden contribuir en el mejoramiento de la salud de los consumidores. Muchas de las bacterias beneficiosas que pueden ser añadidas en nuestros alimentos promueven el bienestar y el mejoramiento de la salud de los comensales, pero la mayor parte de estas habitan el tracto gastrointestinal (TGI) de los humanos (Doyle et al., 2001). Estos microorganismos llamados probióticos, cuando se ingieren en suficientes cantidades confieren beneficios a la salud del huésped (FAO/WHO, 2001). Entre los beneficios se encuentran: la supresión del crecimiento de bacterias patógenas, prevención de diarreas, constipación, alergias alimentarias, síntesis de nutrientes, entre otros (Rafter, 2003; Salminen et al., 1998). En los últimos años, varios estudios han determinado los beneficios específicos a la salud por el consumo de bacterias probióticas, las cuales son consumidas en su mayoría a través de tres importantes fuentes: productos de leche fermentada, suplementos alimenticios como comida o bebidas que contienen varios tipos de cepas de microorganismos y productos farmacéuticos en forma de tabletas, cápsulas o gránulos (Chandan, 2011). Existe un interés considerable en el desarrollo de suplementos dietéticos que beneficien la salud de la microflora del intestino.

Es por esto que la industria de alimentos realiza una constante investigación sobre los beneficios a la salud que proveen dichos microorganismos y como se puede alargar el periodo de supervivencia de los mismos una vez se encuentran en el sistema digestivo de la persona. La concentración de estos microorganismos probióticos puede

disminuir al ser congelados, almacenados, secados, expuestos a pH bajos, al oxígeno, a altas concentraciones de sales y al ser expuestos a compuestos químicos. Muchos de los microorganismos que logran sobrevivir suelen estar en un estado de estrés y posteriormente morir al exponerse a los jugos gástricos del estómago, sales biliares y lisozimas del mismo (Chandan, 2011). Para esto es necesario que los microorganismos sean protegidos por una barrera física que evite la exposición a las condiciones adversas del entorno. La micro-encapsulación es un proceso químico o mecánico en el cual las partículas que contienen el ingrediente activo son cubiertas por una capa que le provee protección y controla la liberación de los ingredientes primarios (Chen et al., 2005).

1.1 Justificación

La adición o incorporación de probióticos a un alimento, sirve como un vehículo para transportar los mismos hacia el sistema digestivo, lo cual es muy beneficioso para la salud del ser humano. El establecimiento de este tipo de flora bacteriana es importante para prevenir el crecimiento de patógenos potenciales, lo cual contribuye a un desarrollo adecuado del sistema inmune; el tener un desbalance en la composición de la microflora intestinal ha sido constantemente asociado con ciertas enfermedades (Amdekar et al., 2010), tales como estreñimiento, diarreas, gases e hinchazón abdominal (Guarner, 2007). Investigaciones realizadas sobre la viabilidad y supervivencia de los probióticos en el tracto gastro-intestinal (TGI) y en los productos alimenticios (especialmente productos lácteos fermentados), han probado que en general su viabilidad disminuye cuando son expuestos a factores ambientales detrimentales tales como: pH bajos, tiempo y temperaturas bajas de almacenamiento y

condiciones del estómago (Adhikari et al., 2000; Chandramouli et al., 2004; Sheu & Marshall, 1993; Mandal et al., 2006; Chen et al., 2005). Al momento de añadir un probiótico a un alimento, el problema que se enfrenta es la escasa resistencia de los mismos a las condiciones del producto y de producción. La micro-encapsulación es un buen método para proteger a los microorganismos de estas condiciones (Martín et al., 2009). Esta técnica es de gran interés porque permite aislar a las bacterias mediante una cubierta, evitando así su exposición a las condiciones adversas del ambiente y permitiendo la administración de estos microorganismos en una gran variedad de productos (Martín et al., 2009). La micro-encapsulación puede ser utilizada como un método importante para mejorar la viabilidad de las bacterias probióticas en los productos acidificados ayudando también a transportar bacterias viables a través del tracto gastrointestinal del huésped (Vidhyalakshmi et al., 2009). Varios estudios demuestran que el proceso de microencapsulación mejora el porcentaje de supervivencia de los microorganismos en comparación con los que no se sometieron al tratamiento de encapsulación (Ding & Shah, 2009; Mandal et al., 2006; Nazarro et al., 2009; Adhikari et al., 2000; Sheu & Marshall, 1993).

Los resultados de estos estudios sobre la microencapsulación nos demuestran que podemos garantizar que el consumidor tenga un producto con la concentración de microorganismos necesaria para que le provea así un beneficio a su salud. En este estudio se pretende explorar cómo el proceso de micro-encapsulación mejora la supervivencia de *Lactobacillus casei* en el yogurt y bajo las condiciones simuladas del estómago, a través del uso de una matriz que lo proteja de las condiciones tanto del alimento como del sistema digestivo de la persona.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos generales

- Evaluar viabilidad del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 393 luego de microencapsulación en alginato de calcio.
- Evaluar viabilidad del probiótico encapsulado luego del suceso de producción del yogurt bajo en grasa y exposición a condiciones simuladas del estómago.

1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar las características químicas del yogurt, a través de medidas de pH y acidez titulable.
- Evaluar el proceso de micro-encapsulación de un microorganismo probiótico en una matriz de alginato de calcio a diferentes concentraciones.
- Observar microscópicamente el tamaño y la estructura de la cápsula producida.
- Exponer a las células encapsuladas y el grupo control (no encapsuladas) a las condiciones del yogurt y del estómago humano, para evaluar el porcentaje de supervivencia luego de la incubación y observar la posible presencia de cápsulas luego del tratamiento.

2 REVISIÓN LITERARIA

2.1 Probióticos

2.1.1 Aspectos generales

Los probióticos han sido definidos como una preparación o un producto que contiene microorganismos específicos viables y en suficiente concentración, los cuales alteran la microbiota normal del intestino y proveen beneficios gastrointestinales a las personas que los consumen (Tamine et al., 2005). Eli Metchnikoff fue el primer científico en proponer que los productos lácteos fermentados por microorganismos tienen propiedades beneficiosas para las personas que los consumen (Parvez et al. 2006). Además en el 1908 la teoría de Metchnikoff era que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* podía crecer en el tracto gastrointestinal de los humanos y desplazar cualquier bacteria dañina que pudiera crecer allí (Gilliland, 1998). El desplazamiento de este tipo de bacteria reduce la producción de compuestos tóxicos que afectan adversamente el cuerpo humano (Gilliland, 1998).

2.1.2 Probióticos en los alimentos

Cuando se utilizan probióticos para conferir al huésped beneficios para su salud deben indicarse los regímenes de dosificación y de duración recomendados por el fabricante de cada cepa o producto, tomando en consideración datos científicos (FAO/WHO, 2001). Los productos que contienen probióticos pueden incluir desde bacterias deshidratadas en tabletas o en forma de cápsulas, hasta productos lácteos fermentados como el yogurt, leches fermentadas y leches acidófilas (Salminen et al., 1993). El número de productos que contienen probióticos ha ido en aumento durante la última década. Actualmente se estima que existen más de 500 productos

comercializados alrededor del mundo (Ashraf & Shah, 2011). Existen una gran variedad de microorganismos que pueden ser utilizados como probióticos en los alimentos comercialmente, como se puede observar en la Tabla 1 bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las de mayor utilización.

Probiótico	Fuente de manufactura
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	Nestlé (Lausanne, Switzerland)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio Dairy (Helsinki, Finland)
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen Inc. (Milwaukee, Wisc.)
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co, Ltd. (Zama-City, Japan)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Rhodia, Inc. (Madison, Wisc)

Tabla 1: Algunos probióticos utilizados en alimentos y su fuente de manufactura (adaptado de Yeung et al., 2002).

Los roles de las bacterias probióticas en las fermentaciones lácteas son: (i) preservación de la leche a través de la generación de ácido láctico y posibles compuestos antimicrobianos, (ii) producción de compuestos de sabor (acetaldehídos) y otros metabolitos (polisacáridos extracelulares) que pueden proveer al producto propiedades organolépticas deseables para el consumidor, (iii) mejorar el valor nutricional del alimento, como por ejemplo, la liberación de aminoácidos para sintetizar vitaminas y (iv) sus efectos terapéuticos (Reddy et al. 1973; Fernandes et al. 1987; Gilliland 1990; O'Sullivan et al. 1992).

2.1.3 Beneficios terapéuticos

Una serie de propiedades son requeridas para que una bacteria ácido láctica pueda ser utilizada como probiótico: (i) debe conferir un efecto beneficioso en el

hospedero, (ii) mantenerse en el alimento en altas concentraciones y permanecer viable a través del largo de vida útil del producto, (iii) sobrevivir al pasaje desde la boca, estómago, intestino delgado e intestino grueso, (iv) debe tener la capacidad de adherirse a las células de la mucosa intestinal y propagarse, (v) producir sustancias anti-microbiales en contra de patógenos, (vi) estabilizar la micro-flora intestinal y estar asociado con beneficios a la salud y (vii) no crear sabores no deseados y cambios en la textura del alimento (Chen et al., 2005; Ortakci et al., 2012; Parvez et al., 2006; Salminen et al., 1993). En la Tabla 2 se pueden observar otros posibles beneficios a la salud que se obtienen al ingerir bacterias probióticas.

Efecto a la salud	Posibles mecanismos de acción
Promueven la habilidad para digerir lactosa	Probióticos producen enzimas para la utilización de lactosa
Ayuda contra las enfermedades transmitidas por alimentos	Ocupan lugares de colonización, promueven inmunidad, disminuyen la severidad de las diarreas
Efecto Anti-cáncer	Se enlazan con compuestos causantes de cáncer, disminuyen los niveles de enzimas naturales que promueven el cáncer, estimulan la función inmune
Mejoramiento del sistema inmune	Fortalecen las defensas en contra de infecciones y tumores, aumentan la respuesta inmune a un antígeno específico, disminuye la respuesta inflamatoria
Combatir problemas cardíacos	Aumentan la actividad de la bilis y puede reducir el colesterol
Reducir la presión sanguínea	La acción bacteriana en las proteínas de la leche produce compuestos que disminuye la presión sanguínea en animales
Reducir las úlceras	Producción de inhibidores en contra de <i>Helicobacter pylori</i>
Limitar las infecciones urogenitales	Adhesión al tracto urinario y a las células vaginales, exclusión competitiva, producción de inhibidores (agentes surfactantes, peróxido de hidrógeno).

Tabla 2: Posibles beneficios a la salud y mecanismos de acción de las bacterias probióticas (adaptado de Montville & Matthews, 2005).

2.2 Yogurt

2.2.1 Aspectos generales

El yogurt se considera una leche fermentada, la cual por medio de la acción de microorganismos adecuados se le reduce el pH y se produce la coagulación de la misma (FAO/WHO, 2011); además este tipo de leche se estandariza y se trata térmicamente. Luego de calentada, la misma es enfriada hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 40°C. En este punto se le añade una porción de yogurt sin sabor que contiene los inóculos fermentadores y un agente gelificante para evitar que ocurra sinéresis y mejorar la firmeza del coágulo formado (Walstra et al., 2005). La leche utilizada para su producción puede ser entera, baja en grasa, descremada o leche en polvo baja en grasa reconstituida. Para asegurar que el desarrollo de estos cultivos fermentadores sea el óptimo, la leche a utilizarse debe cumplir con los siguientes criterios: (i) tener bajo conteo de microorganismos, (ii) estar libre de antibióticos, agentes químicos, leche con mastitis, calostro, no oxidada, y (iii) no estar contaminada con bacteriófagos (Fatih, 2009).

2.2.2 Aspectos nutricionales

El yogurt es un alimento altamente nutritivo, con una gran cantidad de nutrientes provenientes de la leche, tales como proteínas, riboflavina, vitaminas B6/B12 y minerales como el calcio, fósforo y potasio (Ashraf & Shah, 2011). Además provee otros beneficios según nos dice Walstra y colaboradores (2005): es un alimento que provee energía, los intolerantes a la lactosa pueden digerir mejor una leche acidificada como el yogurt en vez de una leche regular, el consumo de este alimento acidificado aumenta un poco la acidez del estómago disminuyendo así el paso de posibles

patógenos y los microorganismos ácido lácticos pueden producir compuestos como los antibióticos que pueden afectar a los posibles patógenos que estén presentes. Las personas que son intolerantes a la lactosa pueden tener una opción para consumir un producto lácteo, ya que algunas bacterias ácido lácticas utilizadas como cultivos iniciadores de fermentación y algunos probióticos pueden producir la enzima lactasa (Lourens & Viljoen, 2001). Esta enzima es la que se encarga de hidrolizar la lactosa, ciertos grupos raciales como los hispanos, asiático-americanos, nativo-americanos y personas con ascendencia de Europa del sur, no tiene el gen responsable de producirla, por lo cual si consumen productos lácteos pueden sufrir de severos problemas gastrointestinales (NIDDK, 2012).

2.2.3 Organismos fermentadores

El yogurt es un producto hecho mediante la adición de cepas bacterianas específicas a la leche, las cuales luego fermentarán la misma bajo temperaturas controladas (Fatih, 2009). Estos microorganismos consumen los azúcares naturales de la leche y liberan ácido láctico como desperdicio metabólico. El incremento de la acidez de la leche produce que las proteínas presentes en especial la caseína, cambien su carga de negativa a neutral, provocando que se precipiten y se forme una masa semi-sólida conocida como cuajada (Fatih, 2009). *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* son las especies de microorganismos comúnmente responsables de la fermentación del producto (Chandan, 2011). Estos microorganismos crecen mejor en leche cuando ambos están juntos (sinergismo), al contrario de cuando están solos; ya que los bacilos proteolíticos mejoran el crecimiento de los estreptococos a través de la liberación de pequeños péptidos y aminoácidos

provenientes de las proteínas que se encuentran en la leche (Walstra et al., 2005). Por su parte, los cocos mejoran el crecimiento de los bacilos a través de la formación de ácido fórmico por medio de la utilización del ácido pirúvico bajo condiciones anaeróbicas y con la rápida producción de CO₂ (Walstra et al., 2005). Debido a esta estimulación mutua entre ambos microorganismos durante su crecimiento en la leche, la producción de ácido láctico es mucho más rápida (Walstra et al., 2005). Sin embargo, estos organismos tienen poca resistencia al ácido y a las sales biliares, no sobreviven al pasaje del estómago o no colonizan el tracto intestinal por consiguiente no juegan ningún rol en el sistema digestivo (Montville et al., 2012; Ashraf & Shah, 2011).

2.2.4 Relación con microorganismos probióticos

Actualmente los productos basados en leche son los más utilizados como vehículos para transportar bacterias ácido lácticas (BAL) al sistema digestivo humano. Entre los productos se encuentran el queso y el yogurt (Oberg et al., 2010). El yogurt es el mejor ejemplo de un alimento suplementado con probióticos empleando una baja temperatura para preservar la viabilidad de los probióticos (Gerdes, 2005). Según sea el cultivo de probiótico, así será la tasa de supervivencia del mismo, las bacterias probióticas deben permanecer viables, activas y abundantes en el producto a través del tiempo de vida útil del producto y posteriormente sobrevivir al trayecto a través del ambiente ácido del estómago y de los jugos biliares antes de llegar al colon (Gerdes 2005; FAO/WHO, 2011). Además, los probióticos en los productos lácteos deben ser capaces de sobrevivir a bajas temperaturas de almacenamiento, ya sea, bajo refrigeración y congelamiento.

2.3 Tracto intestinal humano y su ecosistema microbiano

2.3.1 Aspectos generales

El tracto digestivo es un pasaje continuo que comienza en la boca, donde la comida es masticada y termina en el ano, en donde los desperdicios sólidos producto de la digestión son eliminados del cuerpo. El proceso de digestión comienza inmediatamente cuando la comida entra a la boca y llega al estómago. Los microbios presentes en el TGI tienen el potencial de actuar de manera favorable, detrimental o neutral. Un ejemplo de esto lo son los microorganismos que se encuentran en el intestino delgado y grueso que completan el proceso de digestión (Parvez et al. 2006).

2.3.2 Tracto gastrointestinal y los microorganismos

El tracto intestinal se compone de la boca, esófago, estómago, intestino delgado y el intestino grueso, y a su vez se subdivide en varias estructuras anatómicas las cuales poseen diferentes concentraciones y géneros de microorganismos. Al nacer, el ser humano se encuentra parcialmente estéril en su interior. Al comenzar el proceso de lactancia ocurre la colonización de las bifidobacterias y los lactobacilos cuando son alimentados con leche de vaca y de los anaerobios estrictos cuando se alimentan con comida sólida (Montville et al., 2012; Lourens & Viljoen, 2001). Al final, la microbiota normal del humano se compone principalmente de dos poblaciones de microorganismos: (i) las bacterias nativas que han colonizado al hospedero por medio de la adhesión en el intestino y (ii) las bacterias transmitidas por los alimentos que solo pasan a través del sistema digestivo y son expulsadas del sistema (Montville & Matthews, 2005).

Generalmente el estómago contiene pocas bacterias 10^3 CFU/mL (FAO/WHO, 2001), al igual que en la parte superior del intestino delgado, ya que en el duodeno está presente la bilis que inhibe el crecimiento microbiano. En el yeyuno y en el íleo se puede encontrar una mayor variedad de microorganismos (Burton & Engelkirk, 2004). El intestino grueso y el colon contienen grandes números y variedad de microorganismos. Se estima entre 500 a 600 diferentes especies, entre estas se encuentran bacterias anaeróbicas obligadas, aerotolerantes y anaeróbicas facultativas (Burton & Engelkirk, 2004). La microflora intestinal de una persona influye en una gran variedad de reacciones metabólicas necesarias para el organismo, en la Tabla 3 se pueden observar algunas de estas reacciones. De ocurrir un disturbio en el balance de la microflora intestinal se puede dar paso a que microorganismos no deseados dominen en el intestino y como resultado se desarrollen infecciones (Lourens & Viljoen, 2001).

Proceso metabólico	Productos
Síntesis de Vitaminas	Tiamina, riboflavina, piridoxina, B ₁₂ , K
Producción de gas	CO ₂ , CH ₄ , H ₂
Producción de olor	H ₂ S, NH ₃ , aminas, indol, escatol (ácido biliar), ácido propiónico, ácido butírico
Producción de ácidos	Ácidos acético, propiónico, butírico
Reacciones glicosidasa	β- glucoronidasa, β-galactosidasa, β-glucosidasa, α- glucosidasa, α-galactosidasa
Metabolismo esteroide	Esterificación, deshidroxilación, oxidación, reducción, inversión.

Tabla 3: Procesos metabólicos llevados a cabo por microorganismos intestinales (adaptado de Madigan et al., 2003).

El punto crítico de supervivencia de las bacterias probióticas en el TGI se encuentra en el estómago. El estómago es un órgano que funciona como una bolsa en

donde se almacena y se digiere la comida. El estómago puede considerarse como una barrera microbiológica contra la entrada de bacterias extrañas en el tracto gastrointestinal (Madigan et al., 2003). El mismo secreta varias sustancias que constituyen el jugo gástrico de pH 1.5 (aproximadamente) donde se inicia la digestión de la comida. Entre las principales se encuentra el ácido clorhídrico (HCl) y las enzimas digestivas, que en conjunto ayudan a descomponer proteínas y a destruir organismos extraños (Janson & Taylor 2005; Burton & Engelkirk, 2004), es por esto que el recuento de bacterias del contenido gástrico es generalmente bajo (Madigan et al., 2003). En la Imagen 1 se puede observar que a medida que se avanza por el tracto intestinal el pH comienza a aumentar, haciendo así que la cantidad de microorganismos sea mucho mayor en el intestino grueso (pH 7), en comparación al intestino delgado (pH 4-5). La colonización de los microorganismos está influenciado por la acidez gástrica, la concentración de sales biliares, la peristalsis, las enzimas digestivas y la respuesta inmune (Montville & Matthews, 2005). Es por esto que continuamente se estudian diferentes métodos por los cuales se pueda prolongar la supervivencia de estos microorganismos a través del paso por el estómago y el tracto intestinal. Una de las técnicas más recomendada es la microencapsulación que es la formación de una capa continua alrededor de los microorganismos que los previene de las condiciones poco favorables a las cuales son expuestos durante su paso a través del sistema digestivo.

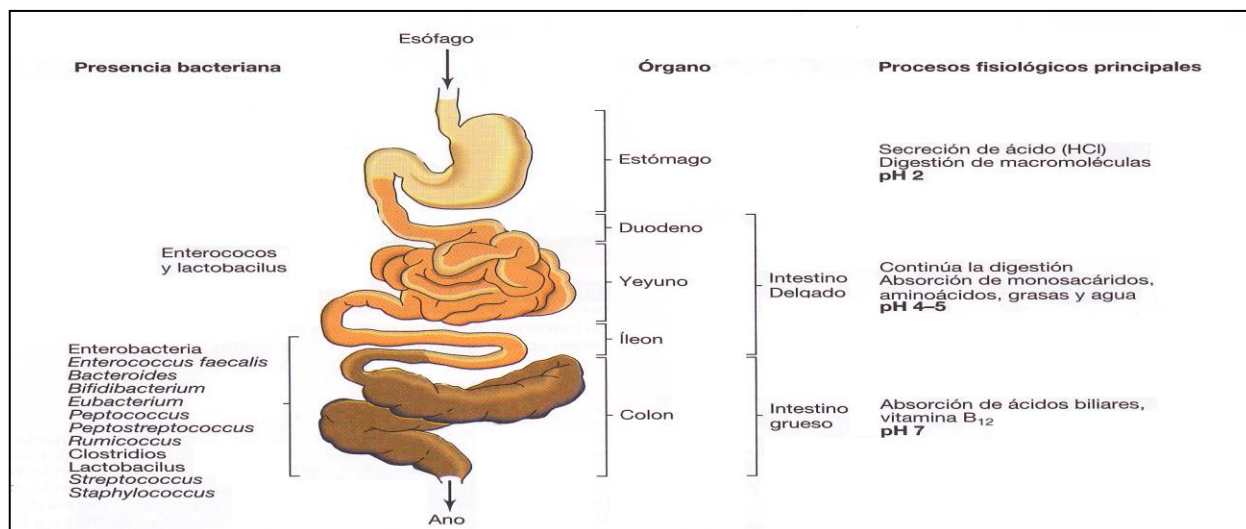


Imagen 1: Función de cada parte del tracto gastrointestinal y la distribución de los microorganismos (adaptado de Madigan et al., 2003).

2.4 Micro-encapsulación y alginatos

2.4.1 Aspectos generales de la micro-encapsulación

La encapsulación es el proceso químico/ mecánico (Chen et al., 2005), el cual consiste en formar una capa continua alrededor de una matriz interior que está formada de material encapsulado, ayudando a separar el material del ambiente exterior hasta que sea liberado en el lugar deseado (Kailasapathy, 2002). La micro-cápsula consiste de una capa fuerte, semi-permeable, esférica y fina que rodea a un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que varía desde varios micrones hasta un milímetro (Kumar & Singh, 2007). Para realizar esta técnica se deben utilizar polímeros de calidad alimentaria como los alginatos, chitosano, carboxymetil celulosa, carragenina, gelatinas y pectinas, los cuales son mayormente utilizados en técnicas de encapsulación (Kumar & Singh, 2007). Esta técnica se ha utilizado con mucho éxito para mejorar la fermentación de productos lácteos, en la producción de concentrados de bacterias ácido-lácticas y en mejorar la supervivencia de los microorganismos en los productos

lácteos y la mayonesa (Lee et al., 2004; Krasaekoopt et al., 2006). La micro-encapsulación protege a los probióticos de los bacteriófagos y de los ambientes adversos como la congelación y las soluciones gástricas y facilita la manufactura de productos fermentados (Martín et al., 2009). La encapsulación tiende a estabilizar las células, mejorar su viabilidad y estabilidad durante la producción, almacenamiento y el manejo del producto (Gbassi & Vandamme, 2012). Existen varias técnicas que se han utilizado para llevar a cabo la encapsulación de distintos microorganismos, entre las más estudiadas se encuentran las llevadas a cabo bajo extrusión y las de emulsión (Gbassi & Vandamme, 2012), en este trabajo se utilizó la de extrusión (Imagen 2). En este proceso se utiliza una mezcla de un hidrocoloide con un probiótico, la misma se coloca en un extrusor (casi siempre es una jeringa), utilizando presión las gotas de la mezcla caen en una solución gelificante, la cual se encuentra en movimiento constante (Gbassi & Vandamme, 2012). El tamaño y la forma de las cápsulas a producirse depende del diámetro de la aguja y de la distancia entre la jeringa y la solución gelificante (Gbassi & Vandamme, 2012). Para que sean efectivas, las cápsulas deben mantener su integridad en el alimento y durante el proceso de digestión. Una vez llegan al intestino las mismas se deben desintegrar, liberando así su contenido (Ortakci et al., 2012).

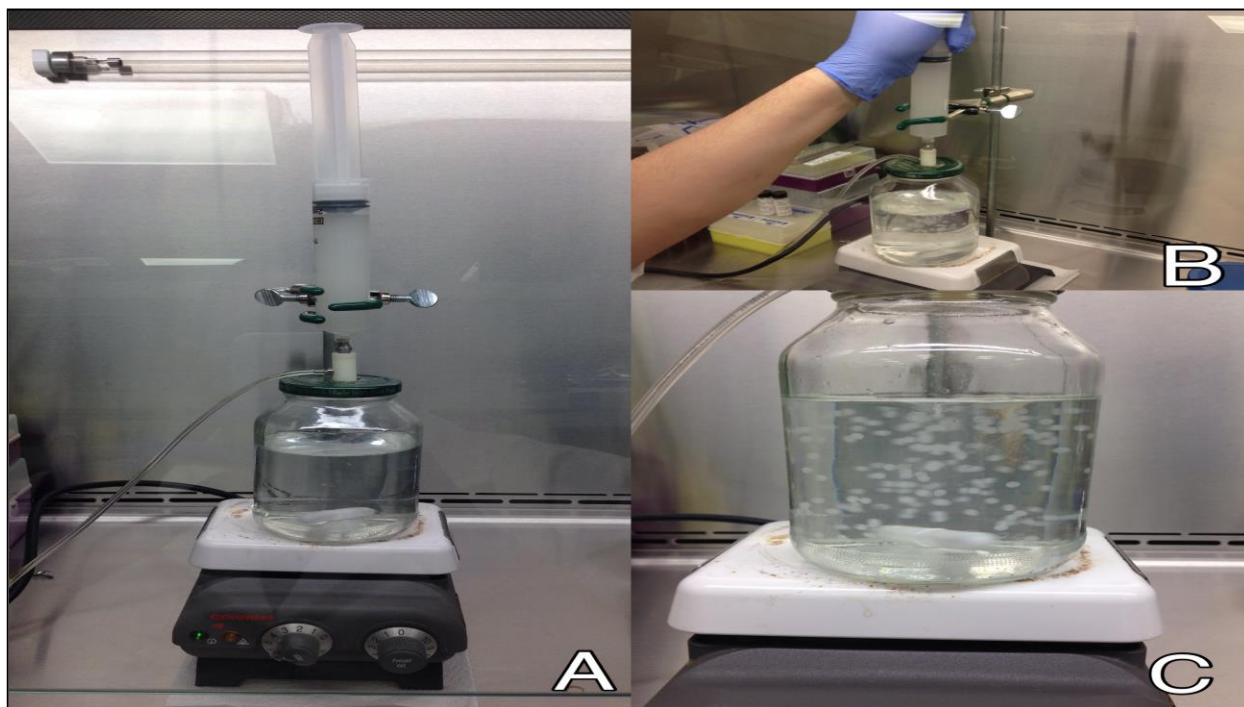


Imagen 2: Ejemplo del proceso de encapsulación llevado a cabo en la investigación: (a) sistema de encapsulación, (b) proceso de adicionar el alginato de sodio al cloruro de calcio y (c) formación de cápsulas con material encapsulado.

2.4.2 Alginatos

Los alginatos son los polímeros de mayor utilización en la micro-encapsulación. Los alginatos son polisacáridos lineales no ramificados, no tóxicos, bio-compatibles (extraídos de varias especies de algas) y son de bajo costo. Los mismos pueden ser utilizados en la industria de alimentos como agentes espesantes, gelificantes y como estabilizadores. Según la SCOGS (Comité Selecto de Sustancias GRAS, por sus siglas en inglés) la información disponible sobre los alginatos revela que no existen efectos toxicológicos significativos cuando son consumidos por humanos en cantidades ampliamente superiores a las consumidas en la dieta diaria (FDA, 2013). El 21CFR582.7187 establece que el alginato de calcio es una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS) y utilizado en alimentos, si se siguen las

especificaciones del código (FDA, 2013). Los alginatos permiten que la encapsulación se lleve a cabo a temperatura ambiente, no requieren el uso de solventes orgánicos, tienen un elevado grado de porosidad y se disuelven y degradan bajo condiciones fisiológicas normales (Martín et al., 2009). Los geles de alginato son razonablemente estables al calor y muestran poca o ninguna sinéresis, no requieren refrigeración y pueden ser usados en postres que no se derritan (Fenema et al., 2008). Además son insolubles en medios ácidos (Harnsilawat et al., 2006). La fácil solubilización del gel de alginato y la liberación de las células atrapadas en el intestino son uno de los beneficios asociados a este polímero (Chen et al., 2005; Nazzaro et al., 2009).

Existen investigaciones que evalúan como el uso del alginato en el proceso de microencapsulación puede mejorar la supervivencia de un microorganismo en condiciones del producto y bajo las condiciones del sistema gastrointestinal humano (Sheu & Marshall, 1993; Adhikari et al., 2000; Kourkoutas et al., 2005; Mandal et al., 2006; Parra-Huertas & Medina-Vargas, 2012). Entre los microorganismos estudiados se encuentran *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus* L2, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus* siendo los del género *Lactobacillus* los más estudiados.

2.5 Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es uno no-patogénico, que consiste de sobre 100 especies con una gran variedad de propiedades fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas (JHeimbach, 2012). Este género es de importancia significativa en la industria de alimentos debido a su participación en la producción de varios alimentos fermentados de carnes, lácteos y de vegetales. También son utilizados en la industria de la salud,

como probióticos que promueven beneficios al hospedero (Van Tassell & Miller, 2011). Actualmente existen varios medios de cultivo selectivos para la enumeración de bacterias del género *Lactobacillus*, el de mayor utilización lo es el MRS, estas siglas provienen de los nombres de los inventores (de Man, Rogosa, and Sharp) (De Man et al., 1960). Este medio de cultivo es utilizado para aislar y enumerar especies de lactobacilos, el mismo contiene acetato de sodio, citrato de amonio y sulfatos de magnesio y manganeso que actúan como agentes inhibidores de crecimiento de otras especies de microorganismos (De Man et al., 1960).

2.5.1 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un estreptobacilo alargado, Gram positivo (imagen 4), no mótil, anaeróbico aerotolerante, no formador de esporas y estrictamente fermentador (JHeimbach, 2012). Este microorganismo puede crecer a una temperatura de 15°C, a diferencia de otros microorganismos probióticos, este no puede crecer a una temperatura de 45°C (Weather, 1955). Esta bacteria ácido láctica es ácido tolerante y posee un metabolismo estrictamente asociado a la producción de ácido láctico como producto de su proceso de fermentación. La producción de ácido láctico ayuda a mantener los niveles de pH en el sistema digestivo e impide el crecimiento y desarrollo de la gran mayoría de las bacterias patogénicas y tóxicas para el cuerpo. *Lactobacillus casei* es una especie sumamente adaptable y puede ser encontrada tanto en leche cruda como productos lácteos fermentados y es utilizada como probiótico en dichos productos. La mayoría de los nuevos productos con probióticos contienen bifidobacterias y cepas de *Lactobacillus acidophilus*, pero actualmente existe un auge en el uso de *Lactobacillus casei* en productos como el yogurt (Erdoğrul & Erbiril, 2006).

Este microorganismo ayuda a proteger el cuerpo humano de enfermedades y condiciones asociadas al crecimiento de varios tipos de bacterias peligrosas que pueden causar infecciones y ser perjudiciales para la salud del individuo.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

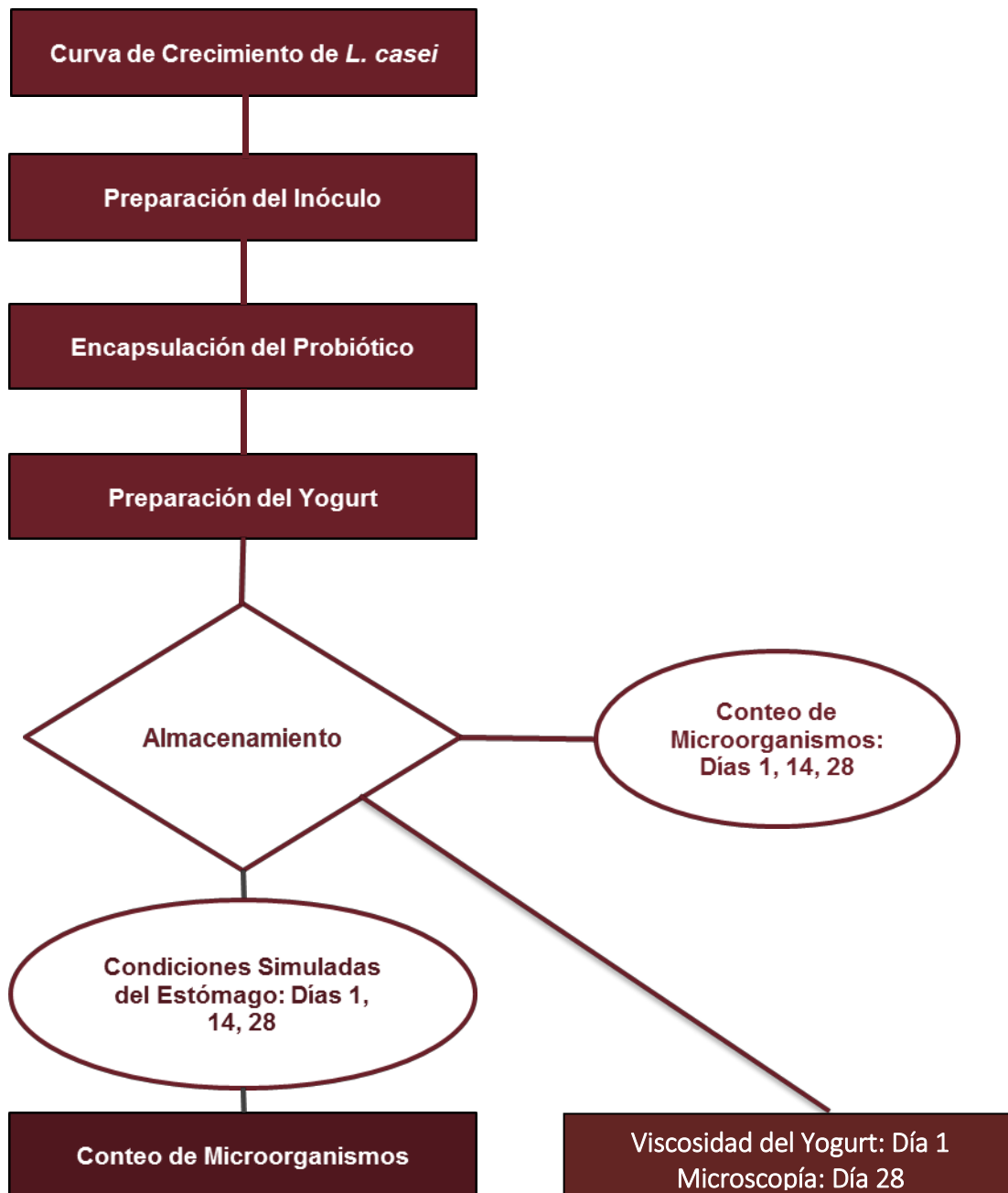


Imagen 3: Diagrama del resumen de los procesos llevados a cabo durante la investigación.

3.1 Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 393

El diseño experimental de este estudio constó de varias partes (Imagen 3), la primera de ella fue realizar una curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 393. La misma se realizó según el procedimiento descrito por Harley & Prescott (1999) con algunas variaciones. Previo a realizar la curva de crecimiento del microorganismo, el mismo se cultivó en caldo de MRS a 35°C por 18 horas para obtener un cultivo en fase logarítmica. Utilizando una pipeta estéril se transfirieron 5mL del cultivo de *Lactobacillus casei* en fase logarítmica a un matraz Erlenmeyer que contenía 100mL del medio de cultivo MRS en caldo. Luego de añadir el cultivo al caldo se procedió a tomar una alícuota de 1ml para tomar la absorbancia (600nm) con el espectrómetro (Genesys™ 8 - ThermoSpectronic) en el tiempo 0 y se tomó 1 mL para hacer diluciones seriadas 10^{-2} a 10^{-7} y cultivarlas en platos Petri con agar MRS utilizando la técnica de vertido en plato. El matraz Erlenmeyer con el cultivo se colocó en una incubadora (C24 Incubator Shaker- New Brunswick Scientific) con agitación constante (80rpm) a 35°C y se tomaron muestras en intervalos de 6 horas para medir la absorbancia hasta que el microorganismo alcanzó la fase logarítmica. Además se le realizó una tinción Gram para confirmar la forma y arreglo del microorganismo (Imagen 4).

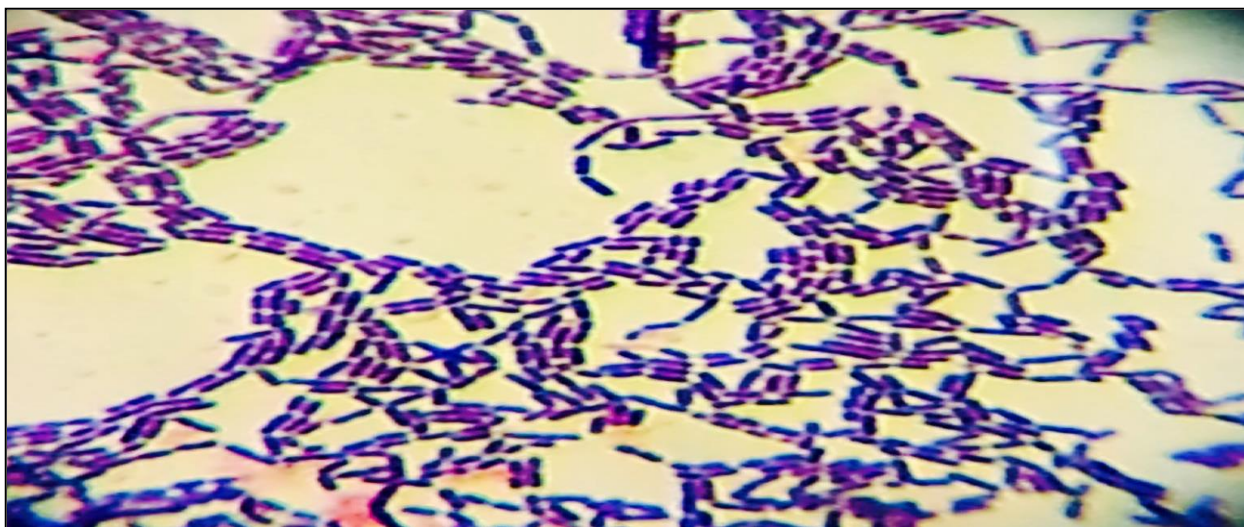


Imagen 4: Tinción Gram de *Lactobacillus casei*: bacillos en cadenas Gram positivos.

3.2 Preparación del inóculo de *Lactobacillus casei* ATCC 393

Los microorganismos probióticos fueron preparados transfiriendo el contenido de un tubo de almacenamiento que contenía glicerol y el inóculo de *Lactobacillus casei* a un matraz Erlenmeyer de 250mL que contenía 100mL de caldo MRS estéril (Pereira et al., 2011). El matraz se incubó a 35°C por 18 horas bajo condiciones aeróbicas para obtener un pre-inóculo en fase logarítmica tardía. Luego se transfirió 1% (v/v) del pre-inóculo a 300mL de caldo MRS estéril (Bigetti et al., 2010) y se incubó bajo las mismas condiciones (35°C por 18 horas) para obtener la biomasa que se utilizó como inóculo para el yogurt (Imagen 5). La biomasa fue obtenida centrifugando el volumen (300mL caldo de MRS) a 3,000 x g por 15 minutos (Sheu & Marshall, 1993) utilizando la centrífuga IEC HN-SII (Damon/IEC Division), lavadas tres veces con solución salina al 0.85% y luego resuspendidas en la misma solución (Bigetti et al., 2010).

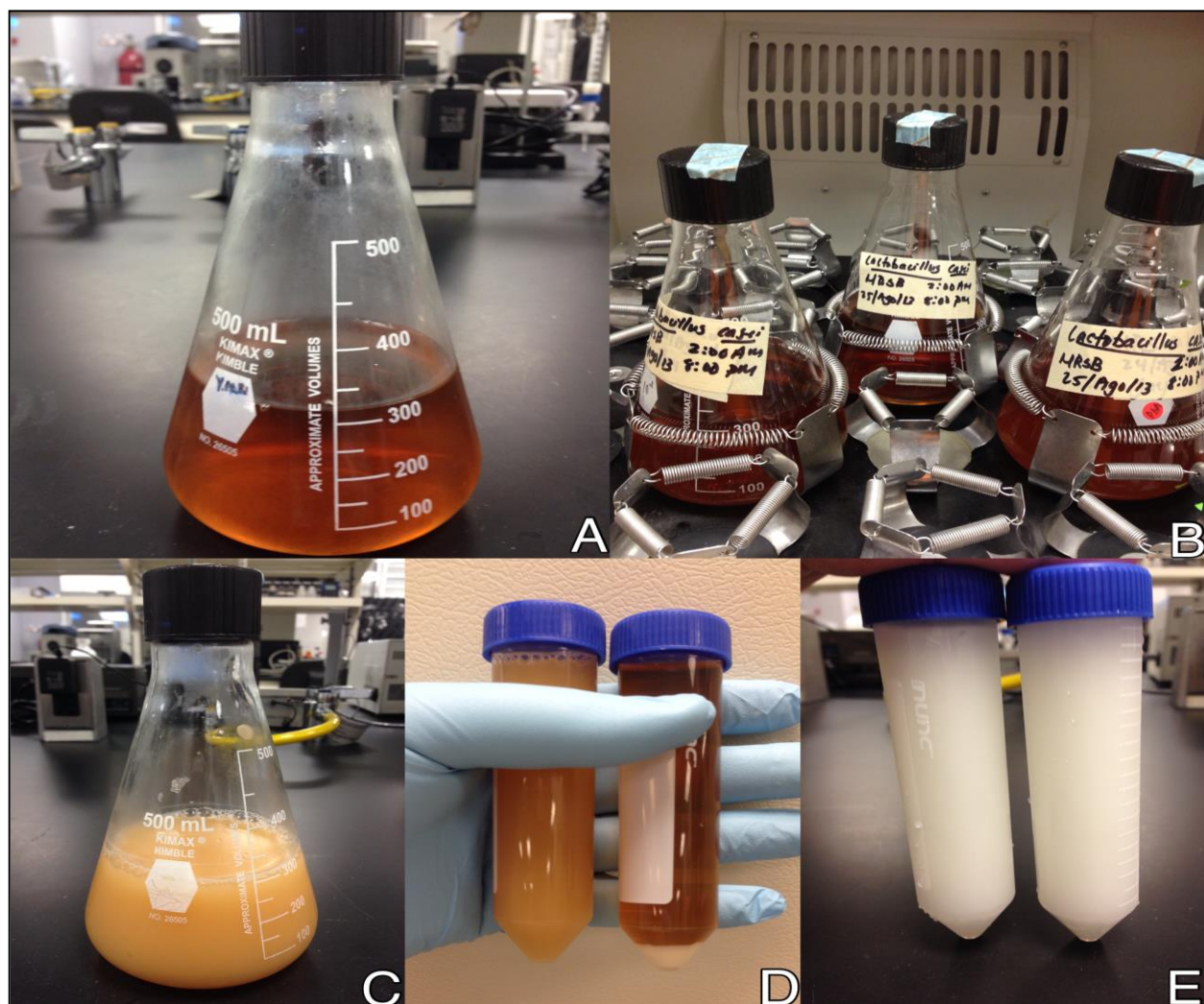


Imagen 5 : Proceso de preparación del inóculo de *Lactobacillus casei*: (a) medio de cultivo en caldo de MRS fresco (b) medio de cultivo inoculado con el microorganismo e incubado con agitación (c) cultivo del microorganismo luego de las 18 horas de incubación (d) proceso de centrifugación del cultivo (e) suspensión del microorganismo en solución salina al 0.85%.

3.3 Encapsulación de *Lactobacillus casei* en una matriz de alginato de calcio

Para la encapsulación se tomó una alícuota de la suspensión del microorganismo y se mezcló con el alginato de sodio estéril a una razón de 25%. Dependiendo del tratamiento, fue la concentración del alginato (1% y 2%) utilizada. La solución se mezcló a 400rpm por 10 minutos (Ortakci et al., 2012). El contenido se transfirió asépticamente a una jeringa la cual se conectó a un encapsulador de células (Modelo CE-01 de Biorep Technologies). El equipo fue conectado a un flujo de gas

(grado médico) de 3.0 L/min a una presión de 10psi. El propósito de la corriente de gas es provocar una turbulencia para que las gotas formadas del polímero/células caigan y sean lo más pequeñas posible. Las gotas cayeron en la solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 0.1M estéril, (Chen et al., 2005) la cual contenía un agitador para evitar que las cápsulas formadas se peguen unas a las otras (Imagen 6). Las cápsulas formadas fueron recolectadas luego de centrifugarlas a 350 x g por 10 minutos y lavadas dos veces con agua destilada estéril (Sheu & Marshall, 1993). Todo el procedimiento se llevó a cabo en un gabinete bacteriológico (Labconco® - Purifier® Biological Safety Cabinet) para minimizar el riesgo de contaminar la muestra.

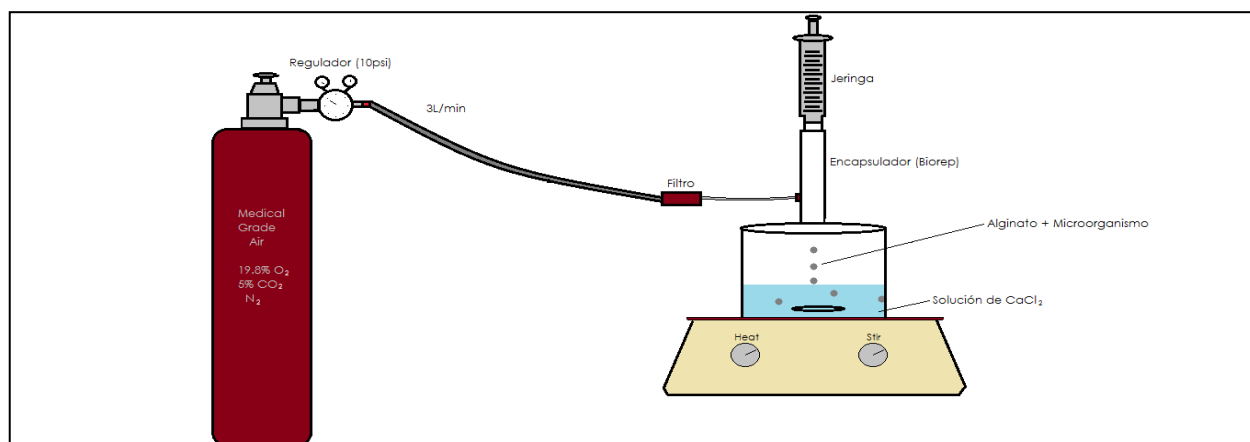


Imagen 6: Diagrama del sistema utilizado para la micro-encapsulación del microorganismo.

3.4 Preparación del yogurt e inoculación con *Lactobacillus casei*

3.4.1 Determinación del porcentaje de grasa de la leche

Para determinar el porcentaje de grasa de la leche comercialmente pasteurizada se utilizó el método Mojonnier 989.05 descrito por la AOAC (Association of Official Analytical Chemist, por sus siglas en inglés) (1998). Para esto se utilizaron los frascos de Mojonnier, platos profundos de cristal y tapones de goma. Previo a determinar el porcentaje de grasa, se secaron los platos en un horno (Napco- Model 630) a 100°C

por 24 horas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador y se tomó su peso en una balanza analítica (TE214S, Sartorius®). En los frascos se pesaron 5 gramos de la muestra de leche líquida a 20°C, se le añadió 2mL de hidróxido de amonio con tres gotas del indicador fenolftaleína y se mezcló. Luego se le adicionó 10mL de etanol, 25mL de éter etílico y 25mL de éter de petróleo, tapando el frasco y mezclando la muestra entre la adición de cada uno de los solventes. Se dejó reposar la muestra hasta que se observara la presencia de dos capas (Imagen 7), la capa orgánica (incolora) es la que se transfirió a los envases de cristal previamente pesados. Luego los mismos se colocaron en un “hot plate” para evaporar los solventes y una vez evaporada la muestra se colocó en el horno (Napco- Model 630) a 100°C por 5 minutos. Una vez se enfrió la muestra en el desecador, se pesaron y se calculó el porcentaje en base al peso de la grasa extraída con el peso de la muestra inicial.

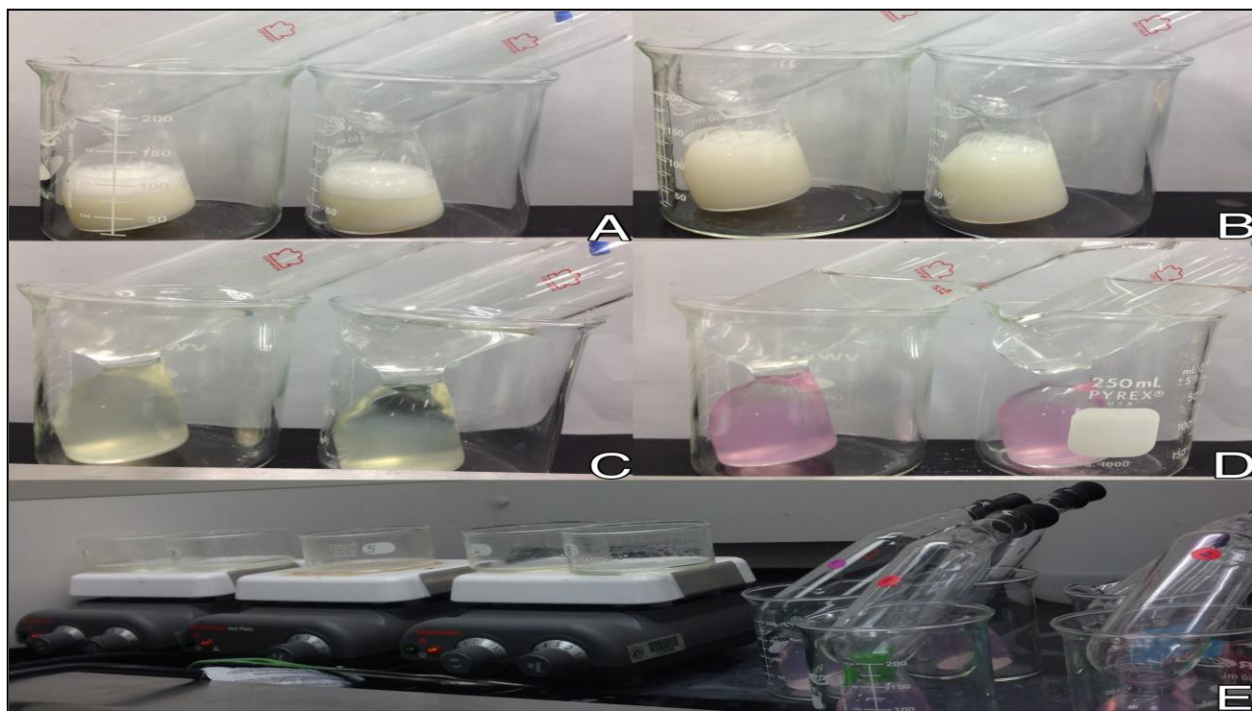


Imagen 7: Proceso de determinación de porcentaje de grasa utilizando Mojonnier: (a) muestra de leche, (b) muestra de leche con hidróxido de amonio y fenolftaleína, (c) muestra con etanol, éter etílico y éter de petróleo, (d) separación de capas (incolora es la orgánica), (e) evaporación de los solventes en cámara de extracción de gases.

3.4.2 Determinación de humedad

Para la preparación del yogurt se requiere utilizar leche en su estado natural (líquida) y en polvo. Previo a preparar el yogurt se debe saber el porcentaje de humedad que contienen ambos tipos de leche para poder calcular en conjunto con la grasa, el porcentaje de sólidos no grasos que contienen las mismas. Para este análisis se utilizaron crisoles con tapas, los cuales previamente fueron lavados y secados en un horno (Napco- Model 630) a 100°C por 24 horas. Pasado el tiempo se colocaron en un desecador a enfriar y se le tomó el peso a cada crisol. Luego se colocaron nuevamente por 1 hora en el horno y se le tomo el peso. Este paso se repitió hasta que cada uno de los crisoles llegara a un peso constante. Una vez en peso, se le añadió 5 gramos de la muestra de leche (líquida y/o en polvo) y se colocaron por toda la noche en el horno a la misma temperatura. Los crisoles con la muestra fueron pesados y se calculó el porcentaje de humedad utilizando la siguiente fórmula (Imagen 8):

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(\text{Peso de la muestra húmeda} - \text{Peso de la muestra seca})}{\text{Peso de la muestra húmeda}} * 100$$

Imagen 8: Fórmula utilizada para determinar el porcentaje de humedad.

3.4.3 Preparación del yogurt

Para la preparación del yogurt (Imagen 9), se utilizó leche fresca pasteurizada baja en grasa a la cual se le aumentaron los sólidos no grasos a 15% con leche en polvo sin grasa. Para estimar cual es la cantidad de leche en polvo que debe ser añadida se procedió a realizar un cuadrado de Pearson (Imagen 10). Luego de añadida

la leche en polvo se mezcló y la gelatina se calentó a 85°C por 30 minutos, pasado el tiempo la mezcla fue enfriada en un baño de agua fría hasta alcanzar una temperatura de 40°C. Posteriormente se añadió yogurt Dannon® sin sabor al 1% (p/v), el mismo contenía los cultivos fermentadores de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Tamine et al., 2005) y el probiótico al 3% (Tamine et al., 2005) encapsulado y sin encapsular según el tratamiento. La mezcla fue homogenizada e incubada a 35°C. El pH fue monitoreado hasta que descendió a 4.4 aproximadamente. Posteriormente se registró la acidez titulable y se almacenó a 4°C hasta el día 28.



Imagen 9: Algunos pasos de la preparación del yogurt: (a) pesado de la leche fresca, (b) pesado de la leche en polvo y de la gelatina sin sabor, (c) adición de los ingredientes secos a la leche, (d) mezclado de leche y otros ingredientes, (e) incubación de la mezcla del yogurt a 35°C.

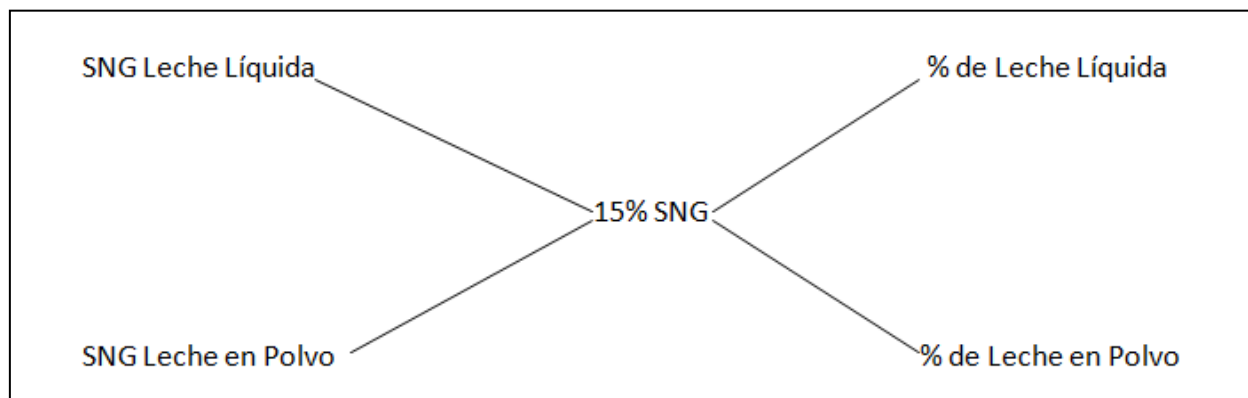


Imagen 10: Cuadrado de Pearson para estandarizar leche para la producción de yogurt: SNG (sólidos no grasos).

3.4.4 Medidas de pH

Luego de preparar el yogurt este se incubó a 35°C y se le tomaron medidas de pH en intervalos de tres horas hasta alcanzar un pH de 4.4. Para esto se utilizó el medidor de pH (Sartorius® Docu-pH meter) previamente calibrado. Se tomaron 10 gramos de la muestra se colocaron en un vaso de cristal y se tomaron los datos. Medidas de pH fueron tomadas al momento de llevar a cabo el conteo de microorganismos para cada uno de los tratamientos.

3.4.5 Acidez titulable

Durante la incubación del yogurt además de tomar las lecturas del pH también se tomaron los datos de acidez titulable del mismo. Para esto se tomaron 10 gramos de la muestra, se le añadió 50mL de agua destilada y se tituló utilizando NaOH 0.1N previamente estandarizado. Se utilizó un medidor de pH (Sartorius® Docu-pH Meter) para la titulación, el punto final de la titulación fue al alcanzar un pH de 8.1. También se le determinó la acidez titulable al yogurt al momento de llevar a cabo el conteo de microorganismos para cada uno de los tratamientos (Imagen 11).



Imagen 11: Procedimiento de acidez titulable del yogurt analizado.

3.5 Enumeración de microorganismos viables

Para este procedimiento se utilizaron 4 muestras de yogurt, que se procedieron a mezclar en parejas para al final tener 2 muestras que analizar. Antes de comenzar la enumeración se tomó el pH y la acidez titulable (imagen 11) de la muestra del yogurt. Los microorganismos no encapsulados y encapsulados fueron enumerados tomando 25 gramos del yogurt y mezclando esa cantidad con 225mL de una solución de citrato de sodio al 2% con pH 7 en un digestor (Seward Laboratory Blender Stomacher 400) por 10 minutos (Ferreira & Fávaro-Trindade, 2004). Para llevar a cabo el conteo de microorganismos se llevaron a cabo diluciones seriadas (10^2 - 10^7) de las muestras. Se

vertió 1mL de la dilución correspondiente en un plato Petri por duplicado para luego llevar a cabo la técnica de plato vertido utilizando el medio de cultivo de Man, Rogosa and Sharpe (MRS). Al medio de cultivo MRS se le ajustó el pH a 5.7 utilizando ácido acético glacial (Erdoğan & Erbilir, 2006), y se esterilizó en autoclave (121°C, 15 libras de presión, 15 minutos). Luego de inoculados, los platos fueron colocados en una incubadora de baja temperatura (Low Temperature Incubator 146E- Fisher Scientific) con parafina a 15°C por 15 días para luego realizar un conteo de colonias. La incubadora contenía un vaso con agua para asegurar que la humedad de la misma fuera alta y que el medio de cultivo no perdiera su humedad (Imagen 12).



Imagen 12: Enumeración de microorganismos viables.

3.6 Condiciones simuladas del estómago

En este procedimiento se utilizaron 4 muestras de yogurt que se procedieron a mezclar en parejas para al final tener 2 muestras que analizar. Para simular el fluido gástrico se preparó una solución que contenía 9 g/L de NaCl, 3 g/L de pepsina y un pH

ajustado de 1.8 utilizando HCl (Gbassi et al., 2009). Bajo estas condiciones se tomó 1 gramo de las muestras de yogurt con microorganismos encapsulados y libres y se añadió respectivamente a 9mL del fluido gástrico (Lian et al., 2003). Luego las soluciones con los microorganismos fueron colocadas en una incubadora (C24 Incubator Shaker- New Brunswick Scientific) a 37°C a 200rpm por 2 horas, para simular las condiciones del estómago (Gbassi et al., 2009). Pasado el tiempo de incubación, tanto las muestras del yogurt que contienen células no encapsuladas y las encapsuladas se centrifugaron por 15 minutos. Pasada la centrifugación se procedió a decantar la solución gástrica y se les añadieron 9mL de la solución de citrato de sodio pH 7 al 2 % (Ferreira & Fávaro-Trindade, 2004) y se mantuvieron en agitación continua a 200rpm por 10 minutos. Luego se procedió a centrifugar y a realizar diluciones seriadas 10^{-2} – 10^{-7} con la misma solución de citrato de sodio. Un mililitro de cada una de las diluciones fueron transferidos a platos Petri por duplicado para realizar la técnica de plato vertido con el medio de cultivo MRSA con un pH ajustado de 5.7 (Erdoğan & Erbilir, 2006). Estos platos fueron incubados con parafina para evitar la evaporación del medio de cultivo en una incubadora a 15°C por 15 días. En el interior de la incubadora se colocó un vaso con agua para crear condiciones de humedad altas y evitar así que el medio perdiera su contenido de agua.

3.7 Viscosidad del yogurt

Se deseaba saber si la presencia de cápsulas dentro del producto afectaba la viscosidad del mismo. Para evaluar la viscosidad del producto se utilizó un viscosímetro (Brookfield DV-II+) (Imagen 13). Se prepararon muestras de yogurt en un vaso de cristal de 600mL, luego se calibró el equipo a 30rpm con un “spindle” #4. El “spindle”

fue colocado dentro de la muestra del yogurt (batido por 30 segundos) por uno de los lados y luego se movió horizontalmente para colocarlo en el centro del producto (Denin-Djurdjevic et al., 2002). Las lecturas fueron tomadas a los 30 segundos a una temperatura de 20°C (Denin-Djurdjevic et al., 2002).

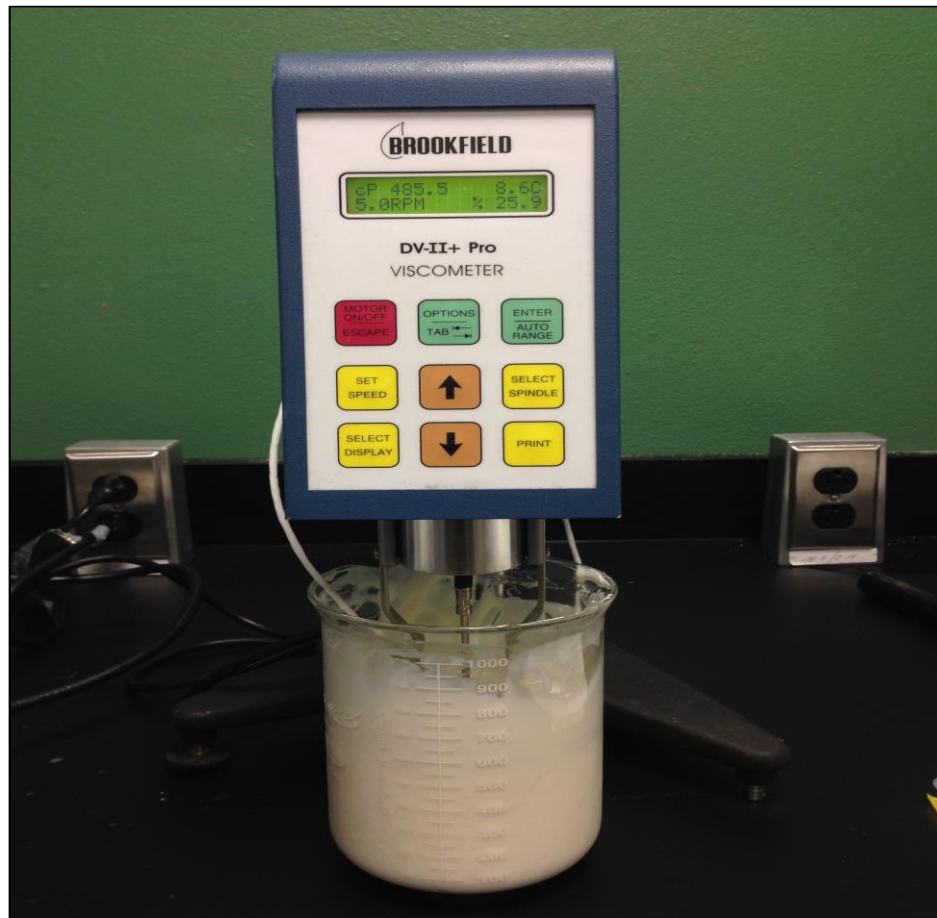


Imagen 13: Viscosidad del yogurt preparado

3.8 Microscopía

Se observó la morfología de las cápsulas de 1% y 2% de alginato, bajo un microscopio (BK Plus Lab System™) con un lente de 40X y una magnificación total de 400 veces, después de pasados los 28 días bajo las condiciones del yogurt (n=3 para determinar tamaño de la cápsula).

3.9 Análisis sensorial

Para el análisis sensorial (Imagen 14) se utilizó una prueba triángulo para determinar si existen o no diferencias sensoriales entre dos productos. Este método es muy utilizado cuando los efectos de los tratamientos producen cambios en el producto. Para el mismo se mostraron a los panelistas tres muestras codificadas, se les notificó que dos eran iguales y una diferente y que debían probarlas de izquierda a derecha y seleccionar la muestra que era diferente (apéndice 8.2). El yogurt preparado fue saborizado con vainilla y contenía granola para ocultar la presencia de las cápsulas en la superficie del mismo. Se realizaron dos paneles sensoriales simultáneamente: (a) yogurt sin cápsulas vs yogurt con cápsulas de 1% de alginato y (b) yogurt sin cápsulas vs yogurt con cápsulas de 2% de alginato. Se recolectaron las respuestas y se analizaron estadísticamente, para ver si se pudo detectar diferencia entre los productos.

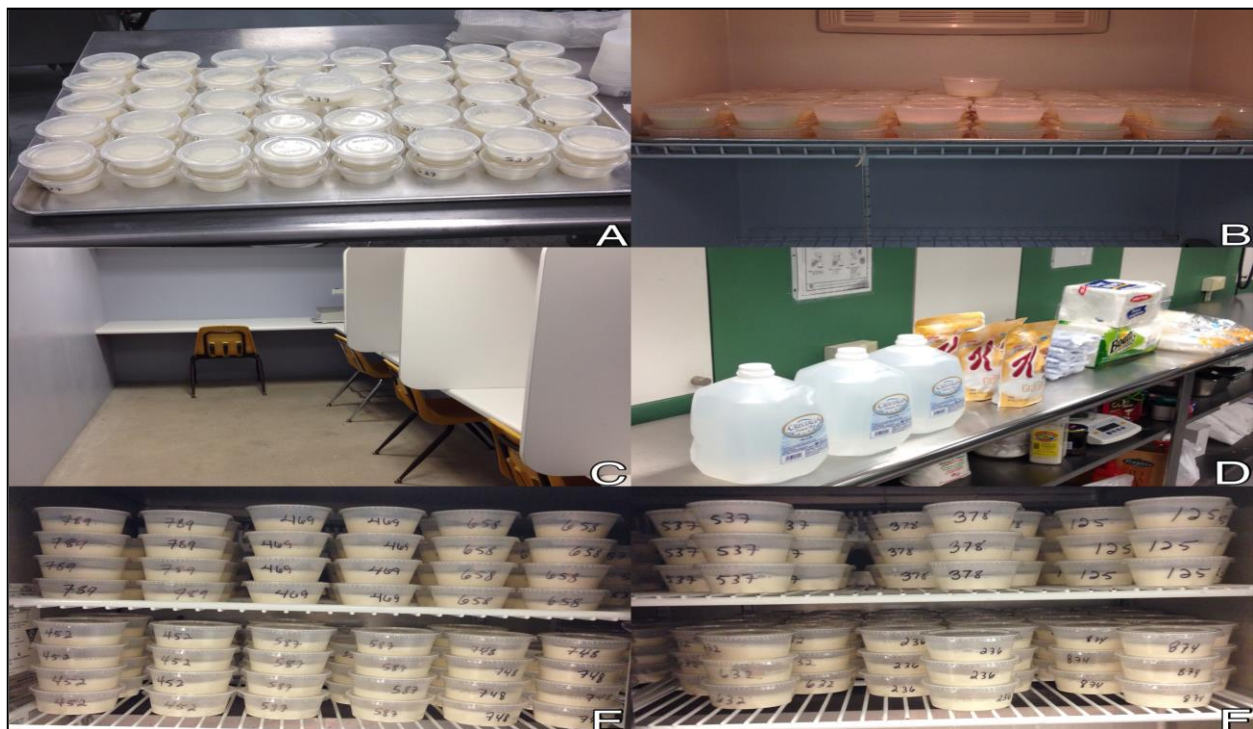


Imagen 14: Panel sensorial: (a) preparación de las mezclas de yogurt, (b) incubación de la mezcla de yogurt, (c) cuarto de análisis sensorial, (d) materiales utilizados en el panel sensorial, (e) y (f) muestras de yogurt refrigeradas para los panelistas.

3.10 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un diseño factorial para evaluar el número de células de *Lactobacillus casei* en tres concentraciones de alginato de calcio (factor A, 0= 0% de alginato, 1= 1% de alginato, 2= 2% de alginato), expuesto a dos condiciones de tratamiento (factor B, 1= condiciones del yogurt, 2= condiciones simuladas del estómago humano) y en diferentes días de almacenamiento (factor C, 1= día 1, 2= día 14, 3= día 28). El diseño de bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones fue utilizado en este experimento.

El modelo lineal utilizado para el análisis de los resultados fue:

$$Y_{ijkm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \theta_l + \alpha\beta_{ij} + \alpha\delta_{ik} + \beta\delta_{jk} + \alpha\beta\delta_{ijk} + \theta_m + E_{ijkm}$$

Y_{ijkm} : Observación para la i-ésima concentración en la j-ésima condición en el k-ésimo día en el m-ésimo bloque

μ = media general del experimento

α_i = Efecto de la i-ésima concentración, donde i= 0 (0% alginato de calcio), 1 (1% alginato de calcio), 2 (2% de alginato de calcio)

β_j = efecto del j-ésima condición, donde j= 1(condiciones del yogurt), 2 (condiciones simuladas del estómago)

δ_k = efecto del k-ésimo día, donde k=1 (día 1), 2 (día 14), 3 (día 28)

θ_l = efecto del l-ésimo bloque, donde l= 1,2,3

$\alpha\beta_{ij}$ = efecto de la interacción entre la i-ésima concentración y la j-ésima condición

$\alpha\delta_{ik}$ = efecto de la interacción entre la i- ésima concentración y el k- ésimo día

$\beta\delta_{jk}$ = efecto de la interacción entre la j- ésima condición y el k- ésimo día

$\alpha\beta\delta_{ijk}$ = efecto de la interacción entre la i- ésima concentración y la j- ésima condición y k- ésimo día.

Todos los datos obtenidos del procedimiento experimental fueron analizados utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2011e (2011) (Imagen 15).

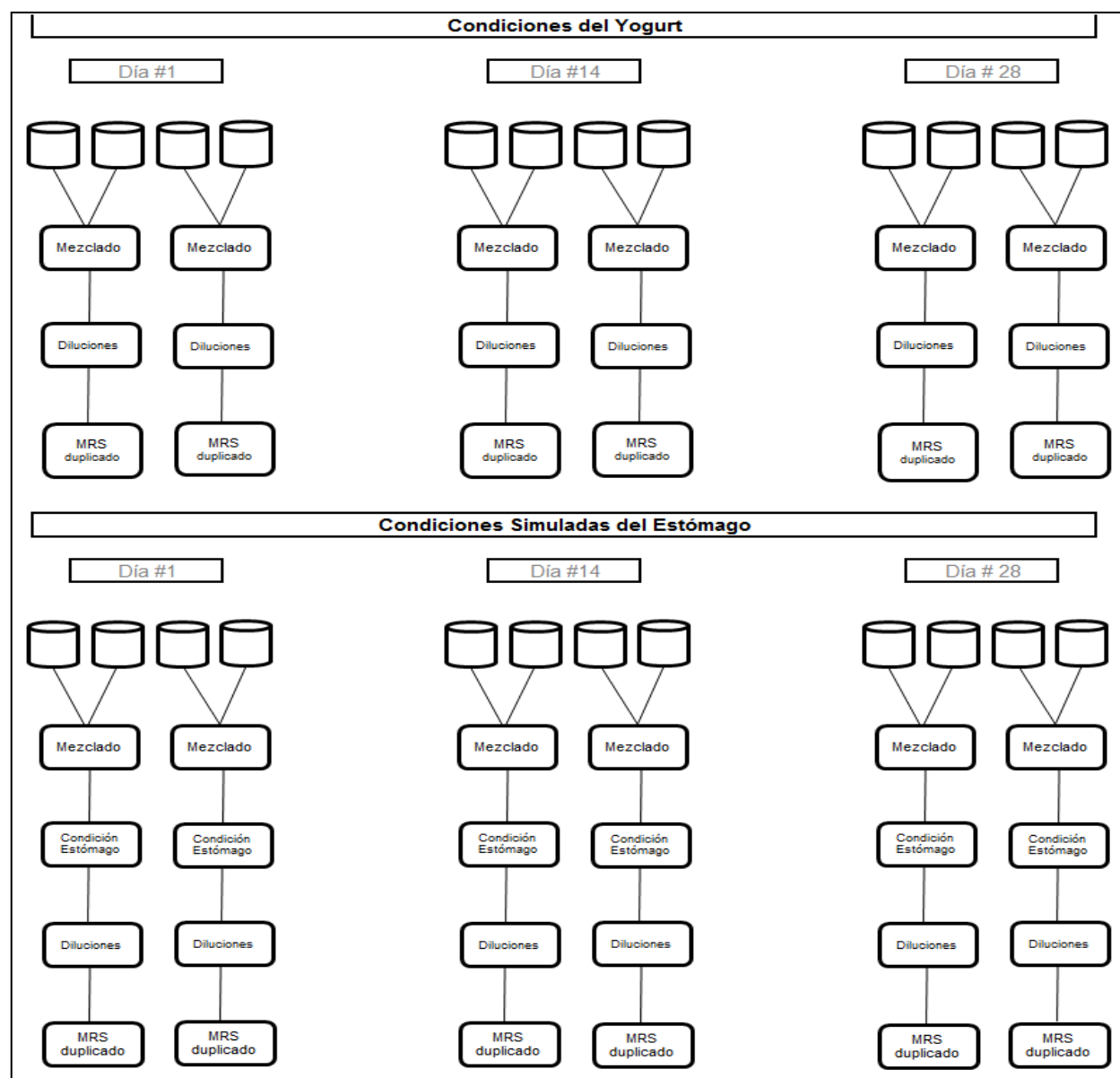
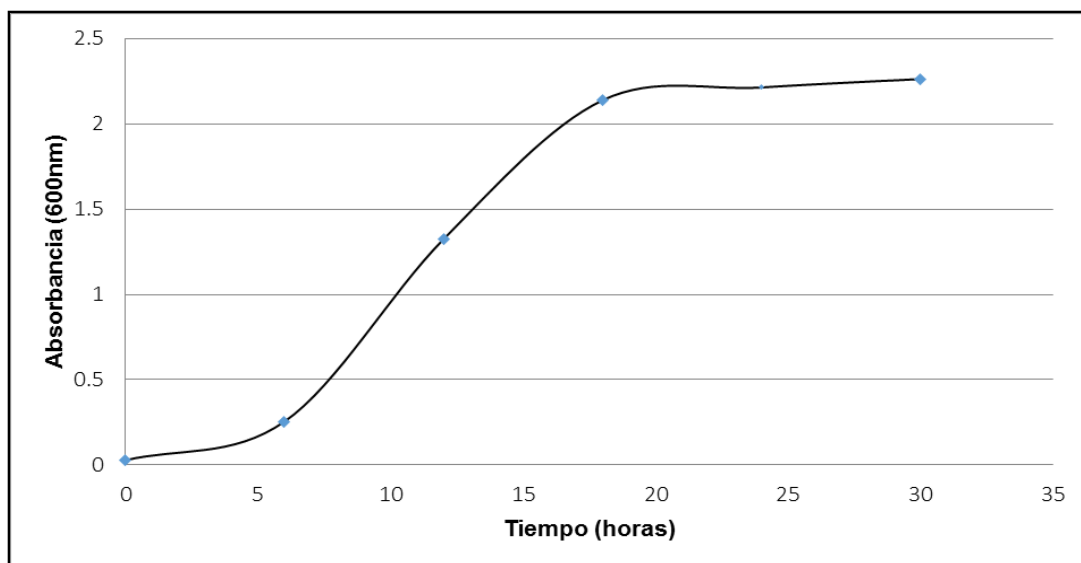


Imagen 15: Diagrama de los días de muestreos de la investigación

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei*

Se realizó una curva de crecimiento para evaluar las condiciones y la concentración del microorganismo probiótico deseado al momento de ser añadido al yogurt. La curva de crecimiento fue realizada tomando muestras de absorbancia cada 6 horas y a su vez haciendo conteo de microorganismos en platos con el medio de cultivo MRS. En curvas de crecimiento preliminares (llevadas a cabo con lecturas de absorbancia cada 30 minutos) y como se puede observar en la Gráfica 1, el microorganismo permanece en la fase latente aproximadamente durante las primeras 5 horas luego de ser inoculado en el caldo de MRS. Luego el mismo comienza a entrar a la fase logarítmica y permanece en la misma hasta aproximadamente 18 horas. A las 18 horas el organismo presenta una concentración de 10^9 UFC/mL (Apéndice 8.1). Teniendo estos parámetros (18 horas a 35°C) en consideración fue que se procedió a preparar el inóculo necesario para ser añadido al yogurt.



Gráfica 1: Curva de crecimiento de *Lactobacillus casei* a 35°C

4. 2 Microscopía de las cápsulas

Pasado los 28 días del tratamiento se realizó una microscopia del yogurt para ver si pasado el tiempo aún la integridad de las cápsulas permanecía. Como se puede observar en la Imagen 16, las cápsulas formadas en promedio tienen un diámetro de aproximadamente 0.67mm (670 μ m), lo cual cae en el rango del tamaño de microcápsulas (200-1000 μ m) utilizado por Chandramouli y colaboradores (2004). La cápsula de 1% de alginato es más clara si se compara con las de 2% de alginato. Esto se debe a que mientras más concentrado sea el alginato, más pequeños y compactos serán los poros de la pared. La forma irregular es la más predominante en las cápsulas formadas. Muy pocas presentan una forma circular como se puede observar en la de 1% de alginato.

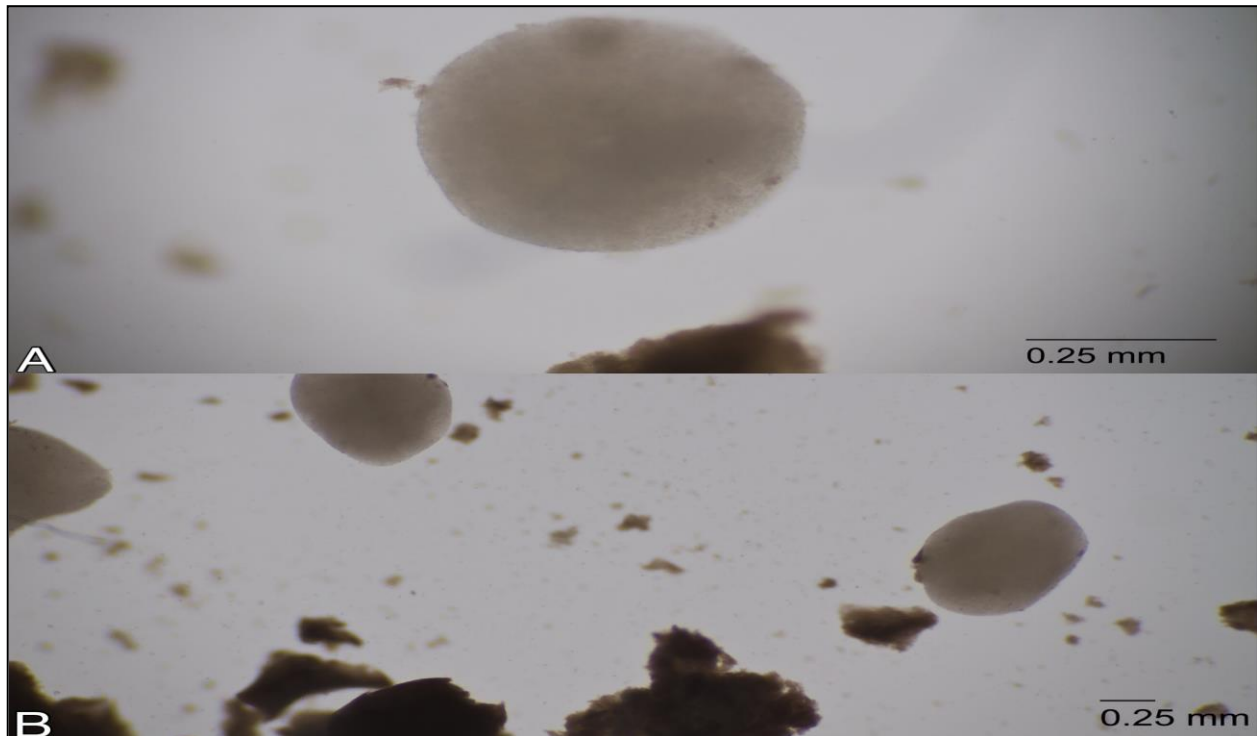


Imagen 16: Micrografía de las cápsulas de alginato de calcio pasados los 28 días de almacenamiento: (a) cápsula de 1% de alginato de calcio (b) cápsulas de 2% de alginato de calcio.

4.3 Apariencia del yogurt

Una vez preparado el yogurt su superficie tiende a ser homogénea. El yogurt preparado para esta investigación, presentó un aspecto poroso debido a la presencia de las cápsulas en la superficie. Se puede interpretar que las cápsulas son menos densas que el yogurt y es por esto que las mismas se mantendrán en la superficie del producto. Esto guarda relación con un estudio realizado por Salsac y colaboradores (2009) en donde estudiaron la densidad de las cápsulas formadas de 2% de alginato y encontraron que las mismas eran de 1.089 g/cm^3 . Si se compara esta densidad con la densidad de las muestras de yogurt analizado por Alakali y colaboradores (2011) que eran de 1.633 a 1.655 g/cm^3 , podemos inferir que las cápsulas de alginato son menos densas y por ende tienden a irse a la superficie del yogurt. En la Imagen 17 se puede apreciar las superficies de los tres tipos de yogurt preparados. La parte A no contiene bacterias encapsuladas, la parte B y C contienen bacterias encapsuladas con 1% y 2% de alginato de calcio, respectivamente.

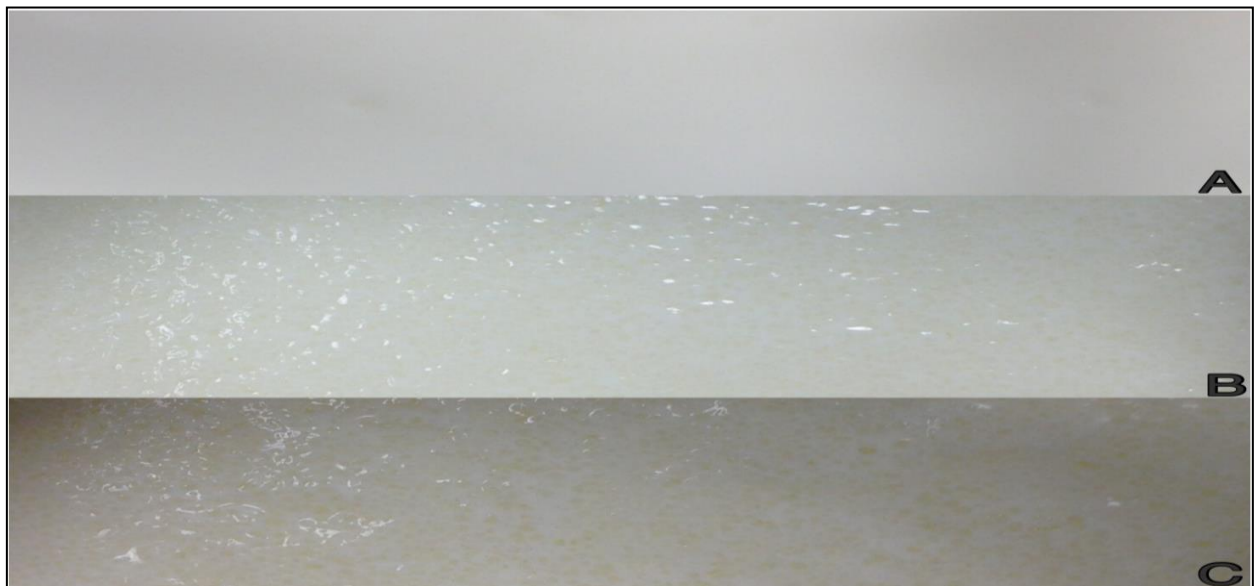
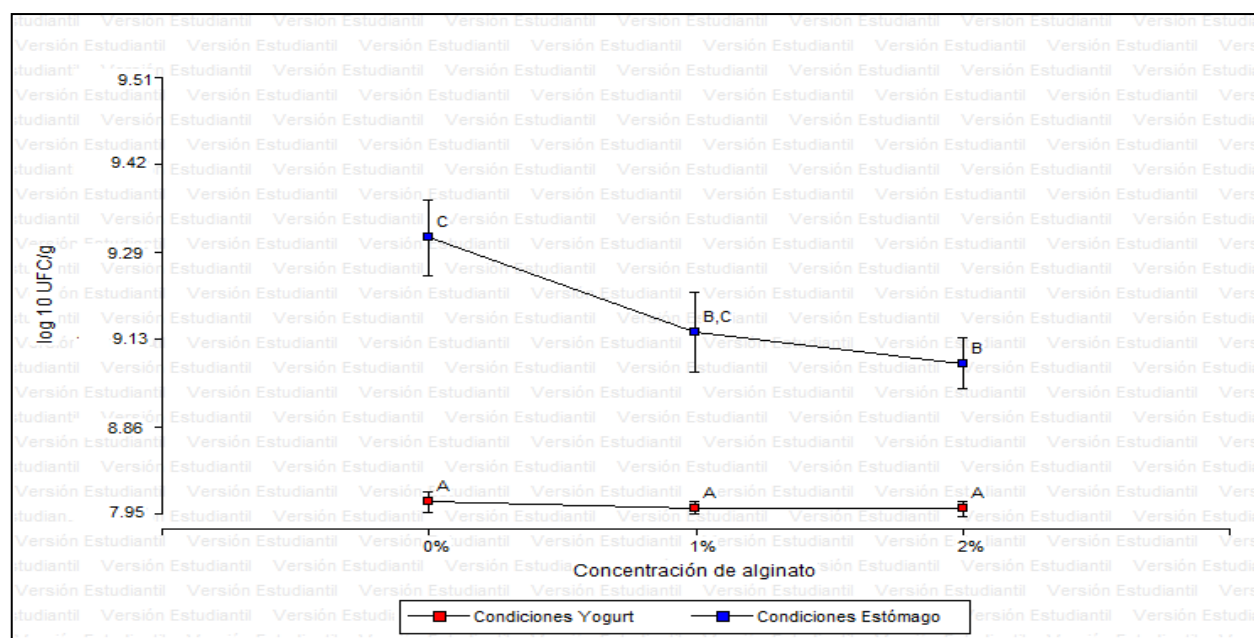


Imagen 17: Superficies de los yogurt preparados: (a) 0% alginato, (b) 1% alginato, (c) 2% alginato.

4.4 Condiciones del yogurt y condiciones simuladas del estómago

4.4.1 Concentración de *Lactobacillus casei* bajo las condiciones del yogurt y condiciones simuladas del estómago humano

En el caso de los resultados de la concentración del microorganismo, se realizó el análisis estadístico de las diferentes interacciones (Apéndice 8.4) y sólo se pudo determinar que hubo interacción significativa entre los factores de concentración de alginato de calcio de las cápsulas y las condiciones de muestreo. Cabe mencionar que para poder aislar y enumerar a *Lactobacillus casei* de las muestras de yogurt se utilizó un medio de cultivo selectivo (MRS) acidificado a un pH de 5.7 y una temperatura de incubación de 15°C. En la Gráfica 2, se puede observar como la concentración del microorganismo es más alta cuando este se expone a las condiciones simuladas del estómago humano. La concentración del microorganismo se mantiene en 9 log UFC/g en las condiciones del estómago, mientras que en las condiciones del yogurt se mantiene en 8 log UFC/g.



Gráfica 2: Interacción entre la concentración de alginato de calcio de las cápsulas (0, 1 y 2%) con las condiciones de muestreo (yogurt y estómago humano).

En contraste con otras investigaciones, tanto en la condición del yogurt como en la del estómago se puede ver que el microorganismo no encapsulado (0% de alginato) tiene un mayor conteo de UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias / gramo). Por ejemplo; utilizando una técnica de encapsulación distinta a la de esta investigación, Mandal y colaboradores (2006), encontraron que si se utiliza el proceso de emulsión (alginato de sodio/ aceite de soya/ Tween 80/ cloruro de calcio) *Lactobacillus casei* NCDC-298 encapsulado resulta ser más viable que el que no fue encapsulado. Además determinaron que un incremento en la concentración de alginato también puede tener un efecto positivo en la supervivencia del microorganismo bajo las condiciones poco favorables del TGI. Petreska y colaboradores (2012) utilizaron la técnica de secado por atomización para encapsular a *Lactobacillus casei* utilizando alginato de sodio, chitosano y cloruro de calcio. Utilizando esta técnica se observó que este tipo de encapsulación le ofrece una protección significativa a las células del probiótico bajo condiciones simuladas del estómago en comparación a las células no encapsuladas del microorganismo. Cabe señalar que en ninguna de estas investigaciones se evaluó la supervivencia del microorganismo bajo las condiciones del yogurt; sólo se utilizó un inóculo del microorganismo y se expuso a las condiciones del estómago.

La exposición de las muestras a las condiciones simuladas del estómago (pH 1.8/NaCl/Pepsina/2horas) pudo haber sido uno de los factores principales por los cuales se observó un mayor número de UFC/g en comparación con el conteo de microorganismos en las condiciones del yogurt solamente. Al ser expuestas a este tipo de condición (movimiento constante (200rpm) bajo la presencia de sal y enzimas) pudo

haber ocasionado que: (1) la integridad de las cápsulas se viera afectada y facilitará que los microorganismos fueran liberados más eficazmente y (2) que los microorganismos no encapsulados fueran mejor contabilizados. Según LeRoux y colaboradores (1999) y Wan y colaboradores (2008) cuando el alginato de calcio se encuentra en presencia de iones de sodio (Na^+) estos iones tienden a competir con los iones de calcio (Ca^{2+}) por el sitio de unión del ácido gulurónico (Imagen 18), lo que hace que la estructura rígida de la cápsula se vea afectada y la liberación de los microorganismos sea la más adecuada. Para que los resultados de ambas condiciones sean comparables se podría haber debilitado las microcápsulas de las condiciones del yogurt para así también tener un mejor conteo de microorganismos como ocurrió en las condiciones del estómago.

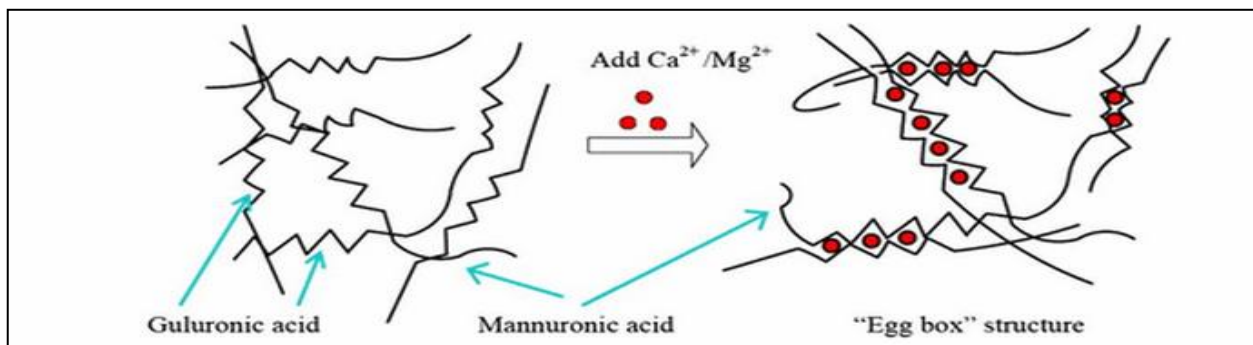


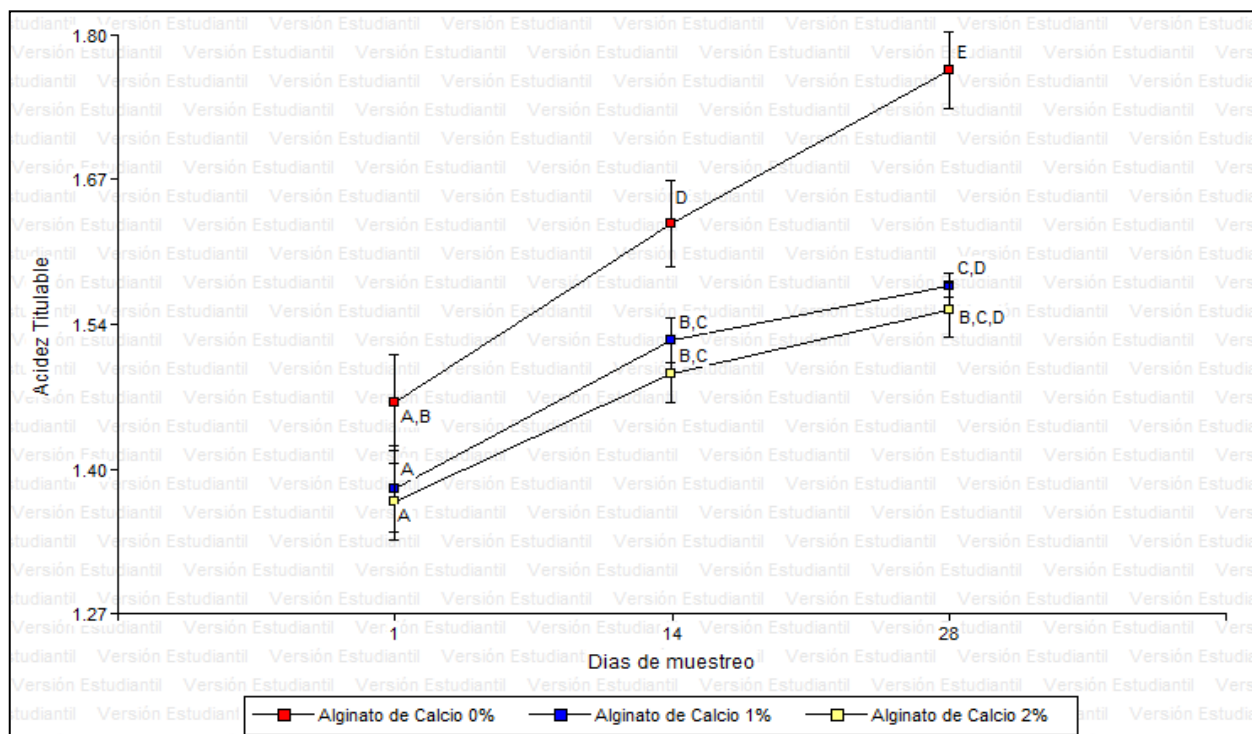
Imagen 18: Proceso de gelificación del alginato cuando se le adiciona iones de Ca^{2+} o de Mg^{2+} (adaptado de Wan et al., 2008).

En general los resultados se pueden comparar con la investigación llevada a cabo por Kourkoutas y colaboradores (2005) la cual concluyó que las células de *L. casei* pueden sobrevivir a largos períodos de almacenamiento y se pueden adaptar a los ambientes con pH bajos, factores que usualmente resultan inhibitorios para otros microorganismos. Cabe mencionar que las concentraciones de microorganismos en ambas condiciones y en las diferentes concentraciones de alginatos cumplen con el

nivel adecuado de UFC/g ($\geq 10^6$) en productos con probióticos (Ashraf & Shah, 2011 y Sidira et al., 2013).

4.4.2 Acidez titulable del yogurt

Al monitorear la acidez titulable durante los diferentes días de muestreo se pudo observar que en las tres muestras de yogurt (0,1 y 2% de alginato) la acidez va en aumento a través de los días de almacenamiento (Gráfica 3). Esto demuestra que los microorganismos se encuentran activos y llevando a cabo el proceso de fermentación en el cual utilizan el azúcar de la leche (lactosa) y la convierten en ácido láctico (Lourens & Viljoen, 2001) a través del tiempo de almacenaje del producto. El mismo comportamiento se observó en la investigación llevada a cabo por Adhikari y colaboradores (2000), en donde se utilizaron bifidobacterias encapsuladas y no encapsuladas en yogurt. En este estudio se pudo observar que a medida que pasaban los días de almacenamiento la acidez titulable del yogurt iba en aumento. En ese mismo estudio se puede observar como ese tipo de microorganismo cuando no se encuentra encapsulado tiene un aumento en la acidez titulable del producto más alto que los productos que contienen microorganismos encapsulados. Ese mismo comportamiento se observa con *Lactobacillus casei* no encapsulado en este experimento, por lo que se puede inferir que el microorganismo se mantiene más activo metabólicamente sin tener que ser encapsulado.

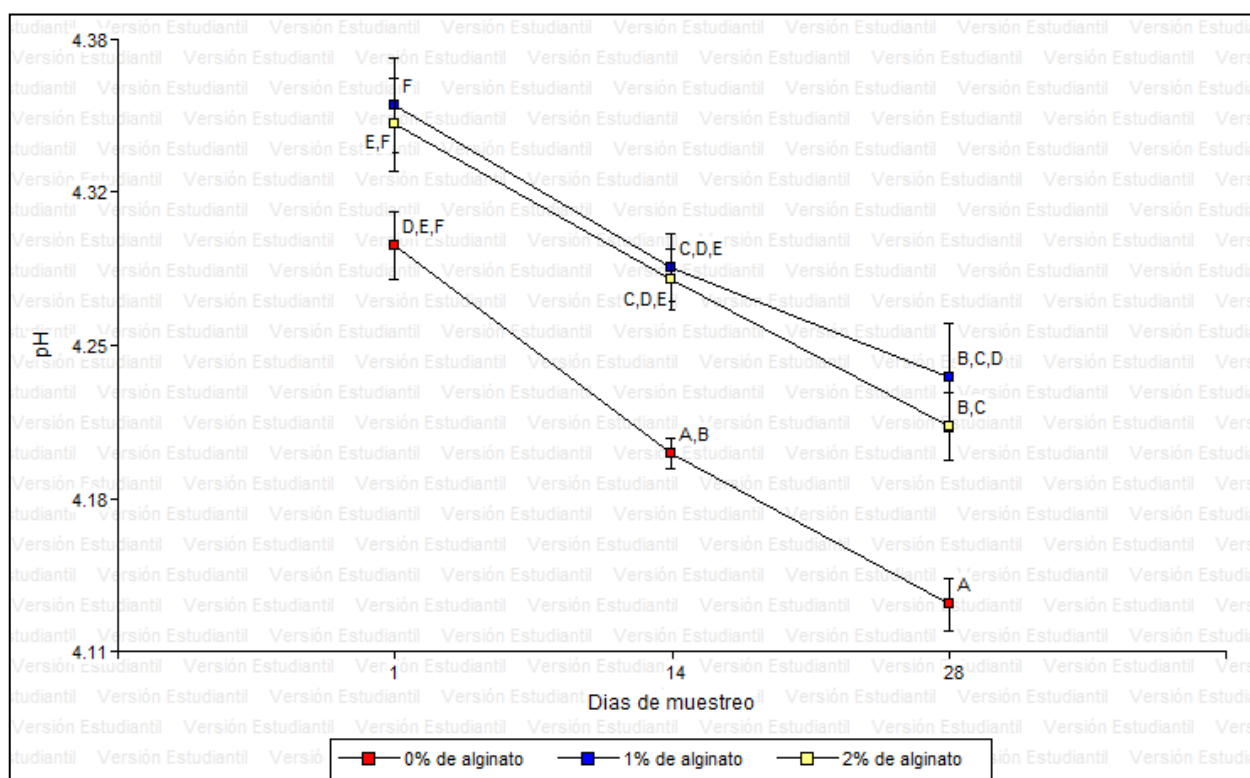


Gráfica 3: Interacción entre los días de almacenamiento del yogurt y la concentración de alginato de calcio en la acidez titulable del yogurt.

4.4.3 Medidas de pH del yogurt

El pH es una de las características químicas más importantes en la preparación de productos fermentados como lo es el yogurt. En el caso de la producción del yogurt el pH juega un papel importante en la formación de la estructura semi-rígida del yogurt. Cuando este alcanza el pH de 4.6 se llega al punto isoelectrico de la caseína. En este punto ocurre una disminución en la repulsión electrostática de las moléculas de dicha proteína y se produce el coágulo del yogurt (Lee & Lucey, 2010). Es común observar que el pH del producto tiende a disminuir durante el tiempo de almacenamiento. Aún a temperatura de refrigeración los microorganismos se mantendrán metabólicamente activos y producirán como producto de la fermentación de la lactosa, ácido láctico el cual disminuye el pH del yogurt.

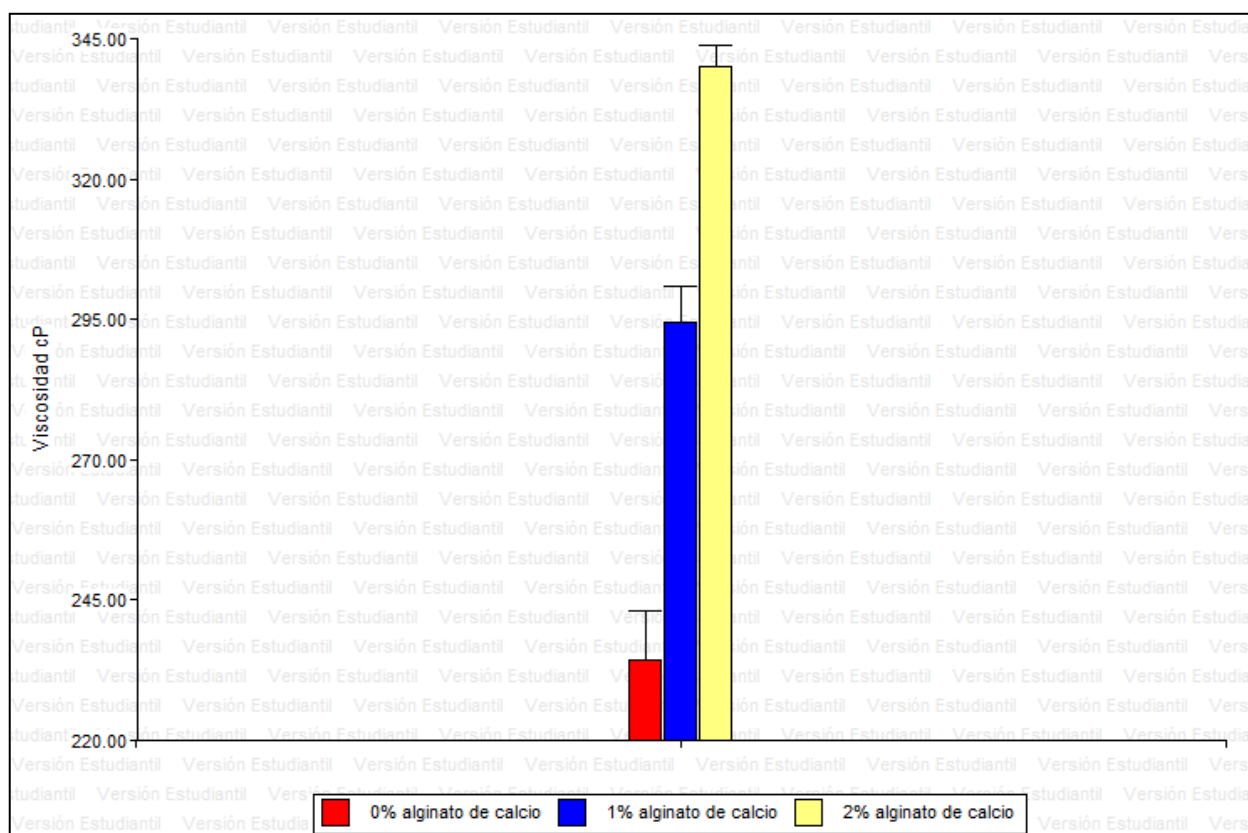
En un estudio de supervivencia de microorganismos encapsulados (*Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium lactis*) en yogurt se pudo determinar que el pH del producto tiende a disminuir a través de los días de almacenamiento (en este caso 13 días) (Parra-Huertas & Medina-Vargas, 2012). Al comparar los resultados de ese estudio con los de esta investigación se puede determinar que hay similitud entre ambos. Si se observa la Gráfica 4 se puede observar como el pH de los tres tipos de yogurt van disminuyendo según pasan los días de muestreo. Además en dicha investigación se encontró que el yogurt que contenía microorganismos no encapsulados obtuvo valores de pH más bajo en comparación con las que estaban encapsulados, al igual que ocurrió con las células de *Lactobacillus casei* en esta investigación.



Gráfica 4: Interacción entre los días de muestreo y la concentración de alginato de calcio utilizado en la encapsulación del microorganismo.

4.5 Viscosidad aparente del yogurt

La adición de cápsulas al yogurt puede un tener efecto en la viscosidad del producto una vez esté preparado. En el caso del yogurt preparado para este estudio se pudo apreciar como a medida que aumenta la concentración de alginato la viscosidad del producto iba aumentando (Gráfica 5). Esto guarda relación con el estudio llevado a cabo por Pinto y colaboradores (2012), en donde concluyeron que al encapsular a *Bifidobacterium* BB-12 y añadir las micro-cápsulas a un yogurt congelado la viscosidad aparente aumenta.



Gráfica 5: Viscosidad aparente del yogurt con diferentes concentraciones de alginato de calcio

4.6 Análisis sensorial: yogurt de vainilla con granola

La apariencia de un producto es lo que más llama la atención a los clientes a la hora de comprar. Si se toma este punto de vista y se utiliza como criterio para evaluar la apariencia final del producto preparado en esta investigación tendríamos un problema. Como se observó en la Imagen 17 la presencia de las cápsulas en la superficie del yogurt debido a su baja densidad, podría ser una problemática al momento de mercadear el producto a los consumidores. Es por esto que se llevó a cabo un análisis sensorial utilizando un yogurt al cual se le adicionó granola y vainilla. La función de la granola fue enmascarar la presencia de las cápsulas al momento de consumirlo y la vainilla fue para darle un sabor más agradable. El análisis sensorial del producto se llevó a cabo en el Centro de Innovación y Tecnología Agro-Industrial (CITAI). En el panel participaron 54 personas adultas, entre los cuales se encontraban estudiantes, profesores y empleados de la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez.

4.6.1 Primer sensorial: yogurt con células sin encapsular (0% de alginato) vs. yogurt con células encapsuladas (1% de alginato)

En esta prueba triángulo se les suministró a los panelistas tres muestras de las cuales dos eran con microorganismos sin encapsular y una contenía microorganismos encapsulados al 1% de alginato de calcio. Como resultado 22 de las 54 personas que participaron acertaron y determinaron cuál de las tres muestras que se le suministraron era diferente (Tabla 4). Si se observa la Tabla 6 (*Números críticos de respuestas correctas en una prueba triángulo*) el autor nos indica en base al número de participantes (en el nuestro 54) que si 25 personas o más aciertan en la prueba se

puede inferir que si hay diferencia entre los productos. En el caso de nuestro análisis el número de aciertos fue de 22 por lo que se determina que no existe diferencia entre ambos productos.

Número Total de Respuestas	54
Número Total de Aciertos	22
Nivel de Significancia	0.05
Número de aciertos según la tabla # para indicar si hay diferencia entre las muestras	≥ 25

Tabla 4: Datos para el primer análisis sensorial: 0% vs 1% de alginato

4.6.2 Segundo Sensorial: Yogurt con células sin encapsular (0% de alginato) vs. Yogurt con células encapsuladas (2% de alginato)

En esta prueba triángulo también se les suministro a los panelistas tres muestras de las cuales dos eran con microorganismos sin encapsular y una contenía microorganismos encapsulados al 2% de alginato de calcio. En esta prueba 27 personas de las 54 que participaron lograron acertar y determinar cuál de las muestras era diferente de las otras (Tabla 5). Si tomamos estos resultados y los analizamos con la Tabla 6 podemos inferir que si existe diferencia entre los yogurt que no contiene microorganismos encapsulados vs los que contiene cápsulas de *L. casei* al 2% de alginato. Esto se debe a que según el autor si de 54 personas, 25 o más aciertan se puede decir que si hay diferencias.

Número Total de Respuestas	54
Número Total de Aciertos	27
Nivel de Significancia	0.05
Número de aciertos según la tabla # para indicar si hay diferencia entre las muestras	≥ 25

Tabla 5: Datos para el segundo análisis sensorial: 0% vs 2% de alginato

TABLE T8

Critical Number of Correct Responses in a Triangle Test
(Entries are $x_{\alpha,n}$)

Entries are the minimum number of correct responses required for significance at the stated α -level (i.e., column) for the corresponding number of respondents, n (i.e., row). Reject the assumption of “no difference” if the number of correct responses is greater than or equal to the tabled value.

n	α							n	α						
	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001		0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001
3	2	2	3	3	3	—	—	31	12	13	14	15	16	18	20
4	3	3	3	4	4	—	—	32	12	13	14	15	16	18	20
5	3	3	4	4	4	5	—	33	13	13	14	15	17	18	21
6	3	4	4	5	5	6	—	34	13	14	15	16	17	19	21
7	4	4	4	5	5	6	7	35	13	14	15	16	17	19	22
8	4	4	5	5	6	7	8	36	14	14	15	17	18	20	22
9	4	5	5	6	6	7	8	42	16	17	18	19	20	22	25
10	5	5	6	6	7	8	9	48	18	19	20	21	22	25	27
11	5	5	6	7	7	8	10	54	20	21	22	23	25	27	30
12	5	6	6	7	8	9	10	60	22	23	24	26	27	30	33
13	6	6	7	8	8	9	11	66	24	25	26	28	29	32	35
14	6	7	7	8	9	10	11	72	26	27	28	30	32	34	38
15	6	7	8	8	9	10	12	78	28	29	30	32	34	37	40
								84	30	31	33	35	36	39	43
								90	32	33	35	37	38	42	45

Tabla 6: Números críticos de respuestas correctas en una prueba triángulo (adaptado de Meilgaard, Civille and Carr, 1999)

5 CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se puede concluir que si se incubaba a *Lactobacillus casei* ATCC 393 en caldo MRS a una temperatura de 35°C por aproximadamente 18 horas se obtendría la concentración necesaria del microorganismo probiótico para ser añadido posteriormente a un producto alimenticio. Este microorganismo al ser anaeróbico aerotolerante es una buena opción para ser utilizado en los alimentos, ya que durante la preparación del producto la concentración del mismo no se vería afectada por la presencia del oxígeno.

Utilizando un medio de cultivo selectivo (MRS) para el género *Lactobacillus* y una temperatura de 15°C, se buscó aislar a *Lactobacillus casei* y enumerarlo tanto en las condiciones del yogurt como en las condiciones simuladas del estómago humano. Se pudo observar un mayor conteo de microorganismos en las condiciones del estómago vs las del yogurt, esto se debe a que se realizaron dos procedimientos de enumeración de microorganismos distintos, favoreciendo así la liberación de más microorganismos en las condiciones del estómago. En ambas condiciones se pudo observar un mayor conteo de microorganismos en las muestras de yogurt que contenía a *Lactobacillus casei* sin encapsular.

Las muestras de yogurt que contenían al probiótico sin encapsular presentaron un porcentaje de acidez más alto y un pH más bajo en comparación con las que tenían a los microorganismos encapsulados. La encapsulación evita que los microorganismos estén en contacto con los sustratos de la leche y por ende la producción de ácido se ve disminuida.

En este estudio se encapsuló en alginato de calcio a el microorganismo *Lactobacillus casei*, la cápsulas formadas en promedio tenían un tamaño aproximado de 0.67mm (670µm), el cual cae bajo los parámetros del tamaño de una microcápsula. Las mismas no tenían una forma definida, en la mayoría de los casos se observaron cápsulas con formas irregulares. La presencia de las mismas en el yogurt tiende a afectar la viscosidad del mismo, a medida que se aumenta la concentración del alginato la viscosidad aparente aumenta. Estas tienden a ser menos densas que el yogurt, por lo tanto se van a la superficie del producto, la presencia de las cápsulas en la superficie puede afectar negativamente la aceptabilidad del producto al momento de mercadearlo. Se puede añadir color a las microcápsulas y mercadearlas al sector de los niños como un producto que contiene las concentraciones necesarias de probióticos para llevar un efecto beneficioso a los niños.

El utilizar la granola y el sabor de vainilla pudo ocultar la presencia de las cápsulas de 1% de alginato en el yogurt, según los datos obtenidos en el primer sensorial. En el segundo sensorial se pudo determinar que las personas si podían percibir la presencia de las cápsulas en el yogurt que contenía el probiótico encapsulado en alginato de calcio al 2% aun si se utiliza granola.

6 RECOMENDACIONES

- En investigaciones futuras se debe utilizar en el proceso de encapsulación un sistema de bombeo automático para evitar que el tamaño y la forma de las cápsulas sean tan variables.
- Se podría sugerir el uso de otras matrices como chitosano, carboximetil celulosa o carragenina para encapsular a *Lactobacillus casei*.
- Realizar investigaciones con otros tipos de microorganismos probióticos para evaluar si es cierto que el proceso de encapsulación favorece la supervivencia del mismo bajo las condiciones del yogurt y las del estómago.
- A la hora de enumerar se puede utilizar técnicas moleculares para detectar y diferenciar al microorganismo probiótico de los cultivos fermentadores que se encuentran en el producto.

7 REFERENCIAS

- Adhikari, A., Mustapha, A., Grun, U., & Fernando, L. (2000). Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*(83), 1946-1951.
- Alakali, J., Ameh, B., & Igyor, M. (2011). Effect of whey protein enrichment on selected engineering and sensory properties of pasteurised yoghurt. *African Journal of Food Science*, 5(7), 392-399.
- Amdekar, S., Singh, V., Singh, R., Dwivedi, L., Sharma, P., Kumar Goyal, D., & Kumar Kumar, A. (2010). *Anti-inflammatory, anti-microbial and immunomodulatory properties of Lactobacillus casei against enteropathogenic Escherichia coli*. Retrieved from Webmedcentral: www.webmedcentral.com/article_view/873
Accesado: 14 de marzo de 2014
- AOAC. 1998. *Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemistry*. Washington D.C. USA
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* susp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt- A review. *International Journal of Food Microbiology*(149), 194-208.
- Bigetti, K., Magnani, M., San Martin, J., Guadalupe, C., & Garcia, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebotic vegetal fibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*(11), 415-421.
- Burton, G. R., & Engelkirk, P. G. (2004). *Microbiology for the Health Sciences* (7th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Chandan, R. (2011). *Dairy ingredients for food processing*. Wiley-Blackwell.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27-35.
- Chen, K., Chen, M., Liu, R., & Chiu, H. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotics microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70(5), M260-M266.
- De Man, J., Rogosa, M., Sharpe, E. (1960). A medium for cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), 130-135
- Denin-Djurdjevic, J., Macej, O., & Jovanovic, S. (2002). The influence of dry matter, applied heat treatment and storage period on the viscosity of stirred yogurt. *Journal of Agricultural Sciences*, 47(2), 189-2004.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Journal of Food Science*, 74(2), M53-M61.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (2001). *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (2nd ed.). Washington, DC: ASM Press.
- Erdoğrul, Ö., & Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turkish Journal of Biology*, 30(1), 39-44.
- FAO/WHO. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba, Argentina.

- FAO/WHO. (2011). *Codex Alimentarius: Leche y Productos Lacteos* (2 ed.). Roma.
- Fatih, Y. (2009). *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*. CRC Press.
- FDA. (2013). *US Food and Drug Administration*. Retrieved May 13, 2014, from Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Calcium alginate: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm260877.htm> Accesado: 13 de mayo de 2014
- Fennema, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2008). *Fennema's food chemistry* (4th ed.). CRC Press.
- Fernandes, C. F., Shahani, K. M., & Amer, M. A. (1987). Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli fermented dairy products. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 343-356.
- Ferreira Grosso, C. R., & Fávaro-Trindade, C. S. (2004). Stability of Free and Immobilized Lactobacillus Acidophilus and Bifidobacterium Lactis in Acidified Milk and of Immobilized B. Lactis in Yoghurt. *Brazilian Journal of Microbiology*(35), 151-156.
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. *Pharmaceutics*, 4, 149-163.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., & Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of Lactobacillus plantarum spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 103-105.
- Gerdes, S. (2005). *Synbiotic synergy of pro and prebiotics*. Food product design: health/nutrition.
- Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 175-188.
- Gilliland, S. E. (1998). Fermented Milks and Probiotics. In E. H. Marth, & J. L. Steele, *Applied Dairy Microbiology* (pp. 195-212). Madison: Marcel Dekker, Inc.
- Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición hospitalaria*, 22 (2), 14-19
- Harley, J., & Prescott, L. (1999). *Laboratory exercises in microbiology* (4th ed.). WCB/McGraw-Hill.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577-585.
- Janson, B. C., & Taylor, J. (2005). *Memmler's Structure and function of the human body* (8th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- JHeimbach LLC. (2012, March 27). *Generally Recognized as Safe (GRAS); Determination for the use of Lactobacillus casei Strain Shirota as a food ingredient*. Retrieved March 5, 2014, from FDA: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/GRN000429.pdf Accesado: 5 de marzo de 2014
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, 3, 39-48.

- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., & Kanellaki, M. (2005). *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, 40, 411-416.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. E. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yogurt from UHT and conventionally treated milk during storage. *Food science and technology*, 39, 177-183.
- Kumar, A., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in food science and technology*, 18, 240-251.
- Lee, J., Cha, D., & Park, H. (2004). Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of agriculture and food chemistry*, 52, 7300-7305.
- Lee, W., & Lucey, J. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 23(9), 1127-1136.
- LeRoux, M. A., Guilak, F., & Setton, L. A. (1999). Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 46-53.
- Lian, W.-C., Hsiao, H.-C., & Chou, C.-C. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 293– 301.
- Lourens Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Review- Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*(11), 1-17.
- Mandal, S., Puniya, A., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16, 1190-1195.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock Microbiología de los microorganismos* (10ma ed.). Prentice Hall.
- Martín, M., Morales, M., Gallardo, V., & Ruiz, M. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, 50(1), 43-50.
- Meilgaard, M., Civille, G., & Carr, B. (1999). *Sensory Evaluation Techniques* (3rd ed.). CRC Press LLC.
- Montville, T. J., Matthews, K. R., & Kniel, K. E. (2012). *Food Microbiology: An Introduction*. Washington, DC: ASM Press.
- Montville, T., & Matthews, K. (2005). *Food microbiology: an introduction*. ASM Press.
- Nazarro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A., & Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 319-323.
- NIDDK. (2012). *Lo que usted debe saber sobre la intolerancia a la lactosa*. Retrieved Julio 17, 2014, from National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases:
http://digestive.niddk.nih.gov/spanish/pubs/lactoseintolerance_ez/WINTKA_Lactose_Intolerance-SP_508.pdf

- Oberg, C., Moyes, L., Domek, M., Brothersen, C., & McMahon, D. (2010). Survival of probiotic adjunct cultures in cheese and challenges in their enumeration using selective media. *Journal of dairy science*, 94, 2220-2230.
- Ortakci, F., Broadbent, J. R., McManus, W. R., & McMahon, D. J. (2012). Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *Journal of Dairy Science*, 95, 6274-6281.
- O'Sullivan, M. G., Thornton, G., O'Sullivan, G. C., & Collins, J. K. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality. *Trends in food science and technology*, 3, 309-314.
- Parra-Huertas, R., & Medina-Vargas, O. (2012). Sobrevivencia y encapsulacion de bacterias y su efecto en las propiedades sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas del yogurt. *Vitae*, 19(1), S90-S92.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 100, 1171-1185.
- Pereira, A. L., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*(44), 1276-1283.
- Petreska Ivanovska, T., Petruševska-Tozi, L., Dabevska Kostoska, M., Geškovski, N., Grozdanov, A., Stain, C., Stafilov, T., & Mladenovska, K. (2012). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in chitosan-Ca-alginate microparticles using spray-drying method. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 31(1), 115-123.
- Pinto, S. S., Fritzen-Freire, C. B., Muñoz, I. B., Barreto, P. L., Prudencio, E. S., & Amboni, R. D. (2012). Effects of the addition of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 on the properties of frozen yogurt. *Journal of Food Engineering*, 111, 563-569.
- Rafter, J. (2003). Probiotics and colon cancer. *Best practices in research of clinical gastroenterology*, 17(5), 849-859.
- Reddy, G. V., Shahani, K. M., & Banerjee, M. R. (1973). Inhibitory effect of yogurt on Ehrlich Ascites tumor-cell proliferation. *Journal of the national cancer institute*, 50(3), 815-817.
- Salminen, S., Deighton, M., & Gorbach, S. (1993). Lactic acid bacteria in health and disease. In S. Salminen, & A. von Wright, *Lactic acid bacteria* (pp. 199-225). Marcel Dekker, Inc.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteu, P., Brassard, D., de Vos, W., Fonde, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S., & Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics: a review. *International Journal of food microbiology*, 44, 93-106.
- Salsac, A., Zhang, L., & Gherbezza, J. (2009). Measurement of mechanical properties of alginate beads using ultrasound. *19 eme Congres Francais de Mecanique*, 1-6.
- Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Microentrapment of *Lactobacillus* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557-561.
- Sidira, M., Saxami, G., Dimitrellou, D., Santarmaki, V., Galanis, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Monitoring survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in probiotic yogurts using an efficient molecular tool. *Journal of Dairy Science*, 96, 3369-3377.

- Tamine, A. Y., Saarela, M., Korslund, A., Mistry, V. V., & Shah, N. P. (2005). Production and Maintenance of Viability of Probiotic Microorganisms in Dairy Products. In A. Y. Tamime, *Probiotic Dairy Products* (pp. 39-72). Ayr, UK: Blackwell Publishing.
- Van Tassell, M., & Miller, M. (2011). Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613-636.
- Vidhyalakshmi, R., Bhagyaraj, R., & Subhasree, R. (2009). Encapsulation "The future of probiotics"- a review. *Advances in biological research*, 3, 96-103.
- Walstra, P., Wouters, J., & Geurts, T. (2005). *Fermented milks* (2nd ed.). CRC Press.
- Wan, L. Q., Jiang, J., Arnold, D. E., Guo, X. E., Lu, H. H., & Mow, V. C. (2008). Calcium concentration effects on the mechanical and biochemical properties of chondrocyte-alginate constructs. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 1(1), 93-102.
- Weather, D. (1955). The characteristics of Lactobacillus plantarum, L. helveticus and L. casei. *Journal of general microbiology*, 12, 133-139.
- Yeung, P., Sanders, M., Kitts, C., Cano, R., & Tong, P. (2002). Species-specific identification of commercial probiotics strains. *Journal of Dairy Science*, 85, 1039-1051.

8 APÉNDICE

8.1 Datos para la curva de crecimiento de *Lactobacillus casei*, 35°C en caldo MRS

Tiempo (horas)	Absorbancia (nm)	CFU/mL
0	0.028	5.9×10^6
6	0.255	1.3×10^8
12	1.324	7.8×10^8
18	2.138	1.9×10^9
24	2.213	2.0×10^9
30	2.262	1.3×10^9

8.2 Hoja de contestaciones de los panelistas: análisis sensorial de yogurt de vainilla con granola

Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez Colegio de Ciencias Agrícolas Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos		
Fecha:	Prueba Triángulo	Num. Panelista:
1 Yogurt de Vainilla con Granola		
Instrucciones: Se le están entregando tres muestras de yogurt. Las muestras están codificadas con números de tres dígitos. Dos de ellas son iguales y una es diferente. Por favor, mezcle el yogurt y la granola antes de comenzar a degustar las muestras. Estas se comienzan a degustar de izquierda a derecha. Se le provee un vaso de agua para que limpie su paladar entre cada muestra. Los números se colocan en la parte donde se piden los códigos de las muestras en ese mismo orden. Luego de degustar cada muestra favor de marcar con una x la muestra que es diferente.		
Códigos de las Muestras	Muestra Diferente	Comentarios
_____	☐	
_____	☐	
_____	☐	
Se le provee un espacio para que usted escriba cualquier comentario sobre las razones por las cuales usted seleccionó la muestra de yogurt diferente.		

8.3 Carta de exención del Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación: análisis sensorial de yogurt de vainilla con granola

	Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación CPSHI/IRB 00002053 Universidad de Puerto Rico – Recinto Universitario de Mayagüez Decanato de Asuntos Académicos Call Box 9000 Mayagüez, PR 00681-9000	
27 de marzo de 2014		
Sr. Jason Dragoni Rosado Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos Recinto Universitario de Mayagüez Call Box 9000 Mayagüez, PR 00681-9000		
Estimado Sr. Dragnoni Rosado:		
Como presidente del Comité para la Protección de los Seres Humanos en la Investigación (CPSHI), he estudiado la versión enmendada con su documentación acompañante para el proyecto titulado <i>Micro-encapsulación de Lactobacillus casei y el efecto sobre su supervivencia durante el procesamiento del yogurt y bajo condiciones simuladas del estómago humano</i>.		
Este estudio, por limitarse la participación de los seres humanos a un panel sensorial en el que se toman medidas para evitar que personas alérgicas participen y además los ingredientes están dentro de los parámetros considerados seguros por la FDA, está exento bajo la cláusula 45 CFR 46.101(b)(6) de todos los requisitos de la parte 45 CFR 46.		
Agradecemos su compromiso con los más altos estándares de protección de los seres humanos en la investigación y le deseamos éxito en su proyecto. Queda de usted,		
Atentamente,		
		
Rosa F. Martínez Cruzado, Ph.D. Presidente CPSHI/IRB UPR - RUM		

8.4 Análisis estadístico de los resultados de la investigación

Análisis de la varianza

Microorganismos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Microorganismos	54	0.82	0.72	57.02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.6961987462963E19	19	1.94536776120858E18	8.24	<0.0001
Bloques	2.96484337037037E18	2	1.48242168518518E18	6.28	0.0048
Concentración	2.26058414814815E18	2	1.13029207407408E18	4.79	0.0147
Condiciones	2.68802555740741E19	1	2.68802555740741E19	113.92	<0.0001
Días	604619370370371000.00	2	302309685185185000.00	1.28	0.2908
Concentración*Condiciones	1.79956192592592E18	2	899780962962962000.00	3.81	0.0320
Concentración*Días	939550740740740000.00	4	234887685185185000.00	1.00	0.4234
Condiciones*Días	631008259259260000.00	2	315504129629630000.00	1.34	0.2760
Condiciones*Días*Concentra..	881564074074074000.00	4	220391018518519000.00	0.93	0.4559
Error	8.02233262962964E18	34	235950959694989000.00		
Total	4.49843200925926E19	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=396764597.25018

Error: 235950959694989280.0000 gl: 34

Bloques	Medias	n	E.E.	
1	664166666.67	18	114491862.81	A
2	709222222.22	18	114491862.81	A
3	1182222222.22	18	114491862.81	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=396764597.25018

Error: 235950959694989280.0000 gl: 34

Concentración	Medias	n	E.E.	
2	652500000.00	18	114491862.81	A
1	769944444.44	18	114491862.81	A B
0	1133166666.67	18	114491862.81	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=268670478.42207

Error: 235950959694989280.0000 gl: 34

Condiciones	Medias	n	E.E.	
1	146333333.33	27	93482214.53	A
2	1557407407.41	27	93482214.53	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=396764597.25018

Error: 235950959694989280.0000 gl: 34

Días	Medias	n	E.E.	
2	739555555.56	18	114491862.81	A
1	822388888.89	18	114491862.81	A
3	993666666.67	18	114491862.81	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=691128325.23355

Error: 235950959694989280.0000 gl: 34

Concentración	Condiciones	Medias	n	E.E.	
2	1	127222222.22	9	161915945.17	A
1	1	134333333.33	9	161915945.17	A
0	1	177444444.44	9	161915945.17	A
2	2	117777777.78	9	161915945.17	B
1	2	140555555.56	9	161915945.17	B
0	2	208888888.89	9	161915945.17	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=927977652.72928

Error: 235950959694989280.0000 gl: 34

Concentración	Días	Medias	n	E.E.	
1	2	427500000.00	6	198305723.44	A
2	1	535333333.33	6	198305723.44	A
2	3	699333333.33	6	198305723.44	A
2	2	722833333.33	6	198305723.44	A
1	1	930666666.67	6	198305723.44	A
1	3	951666666.67	6	198305723.44	A
0	1	1001166666.67	6	198305723.44	A
0	2	1068333333.33	6	198305723.44	A
0	3	1330000000.00	6	198305723.44	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=691128325.23355

Error: 235950959694989280.0000 gl: 34

Condiciones	Días	Medias	n	E.E.	
1	1	118111111.11	9	161915945.17	A
1	3	155111111.11	9	161915945.17	A
1	2	165777777.78	9	161915945.17	A
2	2	131333333.33	9	161915945.17	B
2	1	152666666.67	9	161915945.17	B
2	3	183222222.22	9	161915945.17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1493651052.03128

Error: 235950959694989280.0000 gl: 34

Condiciones	Días	Concentración	Medias	n	E.E.	
1	1	2	100666666.67	3	280446643.59	A
1	1	1	118000000.00	3	280446643.59	A
1	3	2	135333333.33	3	280446643.59	A
1	1	0	135666666.67	3	280446643.59	A
1	3	1	136666666.67	3	280446643.59	A
1	2	2	145666666.67	3	280446643.59	A
1	2	1	148333333.33	3	280446643.59	A
1	3	0	193333333.33	3	280446643.59	A
1	2	0	203333333.33	3	280446643.59	A
2	2	1	706666666.67	3	280446643.59	A B
2	1	2	970000000.00	3	280446643.59	A B
2	3	2	126333333.33	3	280446643.59	A B C
2	2	2	1300000000.00	3	280446643.59	A B C
2	1	1	174333333.33	3	280446643.59	B C
2	3	1	176666666.67	3	280446643.59	B C
2	1	0	186666666.67	3	280446643.59	B C
2	2	0	193333333.33	3	280446643.59	B C
2	3	0	246666666.67	3	280446643.59	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

INTERACCIÓN TRIPLE:

Ho: $\alpha\beta\delta_{ijk} = 0$

Ha: $\alpha\beta\delta_{ijk} \neq 0$

Valor p 0.4559 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción triple no es significativa

INTERACCIONES DOBLES:

Concentración/Condiciones

Ho: $\alpha\beta_{ij} = 0$

Ha: $\alpha\beta_{ij} \neq 0$

Valor p 0.0320 < 0.05, Se rechaza la Ho, la interacción entre las concentraciones y las condiciones es significativa

Concentración/DíasHo: $\alpha\delta_{ik} = 0$ Ha: $\alpha\delta_{ik} \neq 0$

Valor p 0.4234 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción entre las concentraciones y los días no es significativa

Condiciones/DíasHo: $\beta\delta_{jk} = 0$ Ha: $\beta\delta_{jk} \neq 0$

Valor p 0.2760 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción entre las condiciones y los días no es significativa

EFFECTOS PRINCIPALES:**Concentración**Ho: $\alpha = 0$ Ha: $\alpha \neq 0$

Valor p 0.0147 < 0.05, Se rechaza la Ho, hay diferencias significativas entre las concentraciones de alginato y la concentración de *Lactobacillus casei*

CondicionesHo: $\beta = 0$ Ha: $\beta \neq 0$

Valor p 0.0001 < 0.05, Se rechaza la Ho, hay diferencias significativas entre las condiciones de tratamientos y la concentración de *Lactobacillus casei*

DíasHo: $\delta = 0$ Ha: $\delta \neq 0$

Valor p 0.2908 > 0.05, Se acepta la Ho, no hay diferencias significativas entre los días de tratamiento y la concentración de *Lactobacillus casei*

pH

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
pH	54	0.85	0.77	0.87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0.27	19	0.01	10.30	<0.0001
Bloques		2.7E-03	2	1.3E-03	0.98	0.3851
Concentración		0.07	2	0.03	25.23	<0.0001
Condiciones		5.4E-04	1	5.4E-04	0.39	0.5364
Días		0.17	2	0.09	62.09	<0.0001
Concentración*Condiciones		6.0E-04	2	3.0E-04	0.22	0.8036
Concentración*Días		2.6E-03	4	6.4E-04	0.47	0.7594
Condiciones*Días		0.02	2	0.01	7.43	0.0021
Condiciones*Días*Concentra..		2.1E-03	4	5.2E-04	0.38	0.8199
Error		0.05	34	1.4E-03		
Total		0.32	53			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.03025

Error: 0.0014 gl: 34

Bloques	Medias	n	E.E.	
2	4.25	18	0.01	A
1	4.26	18	0.01	A
3	4.27	18	0.01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.03025

Error: 0.0014 gl: 34

Concentración	Medias	n	E.E.	
0	4.21	18	0.01	A
2	4.28	18	0.01	B
1	4.29	18	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.02049

Error: 0.0014 gl: 34

Condiciones	Medias	n	E.E.	
2	4.26	27	0.01	A
1	4.26	27	0.01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.03025

Error: 0.0014 gl: 34

Días	Medias	n	E.E.	
3	4.19	18	0.01	A
2	4.25	18	0.01	B
1	4.33	18	0.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.05270

Error: 0.0014 gl: 34

Concentración	Condiciones	Medias	n	E.E.	
0	1	4.21	9	0.01	A
0	2	4.21	9	0.01	A
2	2	4.28	9	0.01	B
2	1	4.28	9	0.01	B
1	2	4.28	9	0.01	B
1	1	4.30	9	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.07076

Error: 0.0014 gl: 34

Concentración	Días	Medias	n	E.E.	
0	3	4.14	6	0.02	A
0	2	4.20	6	0.02	A B
2	3	4.21	6	0.02	B C
1	3	4.24	6	0.02	B C D
2	2	4.28	6	0.02	C D E
1	2	4.28	6	0.02	C D E
0	1	4.29	6	0.02	D E F
2	1	4.35	6	0.02	E F
1	1	4.36	6	0.02	E F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.05270

Error: 0.0014 gl: 34

Condiciones	Días	Medias	n	E.E.	
1	3	4.18	9	0.01	A
2	3	4.21	9	0.01	A B
1	2	4.25	9	0.01	B C
2	2	4.26	9	0.01	C D
2	1	4.30	9	0.01	D
1	1	4.36	9	0.01	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.11389

Error: 0.0014 gl: 34

Condiciones	Días	Concentración	Medias	n	E.E.				
1	3	0	4.13	3	0.02	A			
2	3	0	4.14	3	0.02	A	B		
1	2	0	4.19	3	0.02	A	B	C	
1	3	2	4.19	3	0.02	A	B	C	
2	2	0	4.21	3	0.02	A	B	C	D
1	3	1	4.22	3	0.02	A	B	C	D
2	3	2	4.23	3	0.02	A	B	C	D
2	3	1	4.25	3	0.02		B	C	D
1	2	2	4.27	3	0.02			C	D
2	1	0	4.28	3	0.02			C	D
1	2	1	4.28	3	0.02			C	D
F									
2	2	1	4.29	3	0.02			C	D
F									
2	2	2	4.29	3	0.02			C	D
F									
2	1	2	4.31	3	0.02				D
F									
1	1	0	4.31	3	0.02				D
F									
2	1	1	4.32	3	0.02				D
F									
1	1	2	4.38	3	0.02				E
F									
1	1	1	4.39	3	0.02				
F									

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

INTERACCIÓN TRIPLE:

Ho: $\alpha\beta\delta_{ijk} = 0$

Ha: $\alpha\beta\delta_{ijk} \neq 0$

Valor p 0.8199 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción triple no es significativa

INTERACCIONES DOBLES:

Concentración/Condiciones

Ho: $\alpha\beta_{ij} = 0$

Ha: $\alpha\beta_{ij} \neq 0$

Valor p 0.8036 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción entre la concentraciones y las condiciones no es significativa

Concentración/Días

Ho: $\alpha\delta_{ik} = 0$

Ha: $\alpha\delta_{ik} \neq 0$

Valor p 0.7594 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción entre las concentraciones y los días no es significativa

Condiciones/Días

Ho: $\beta\delta_{jk} = 0$

Ha: $\beta\delta_{jk} \neq 0$

Valor p 0.0021 < 0.05, Se rechaza la Ho, la interacción entre las condiciones y los días es significativa

EFFECTOS PRINCIPALES:

Concentración

Ho: $\alpha = 0$

Ha: $\alpha \neq 0$

Valor p 0.0001 < 0.05, Se rechaza la Ho, hay diferencias significativas entre las concentraciones de alginato de calcio y el pH del yogurt

Condiciones

Ho: $\beta = 0$

Ha: $\beta \neq 0$

Valor p 0.5364 > 0.05, Se acepta la Ho, no hay diferencia significativa entre las condiciones de tratamiento y el pH del yogurt

Días

Ho: $\delta = 0$

Ha: $\delta \neq 0$

Valor p 0.0001 < 0.05, Se rechaza la Ho, hay diferencias significativas entre los días de tratamiento y el pH del yogurt

Acidez Titulable

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Acidez Titulable	54	0.92	0.87	3.23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.91	19	0.05	19.58	<0.0001
Bloques	0.18	2	0.09	36.03	<0.0001
Concentración	0.23	2	0.12	47.40	<0.0001
Condiciones	4.1E-03	1	4.1E-03	1.67	0.2046
Días	0.45	2	0.22	91.86	<0.0001
Concentración*Condiciones	7.8E-04	2	3.9E-04	0.16	0.8530
Concentración*Días	0.03	4	0.01	3.32	0.0212
Condiciones*Días	0.01	2	5.0E-03	2.04	0.1461
Condiciones*Días*Concentra..	0.01	4	1.3E-03	0.54	0.7071
Error	0.08	34	2.4E-03		
Total	0.99	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04039

Error: 0.0024 gl: 34

Bloques	Medias	n	E.E.	
2	1.49	18	0.01	A
1	1.49	18	0.01	A
3	1.61	18	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04039

Error: 0.0024 gl: 34

Concentración	Medias	n	E.E.	
2	1.47	18	0.01	A
1	1.49	18	0.01	A
0	1.62	18	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.02735

Error: 0.0024 gl: 34

Condiciones	Medias	n	E.E.	
1	1.52	27	0.01	A
2	1.54	27	0.01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04039

Error: 0.0024 gl: 34

Días	Medias	n	E.E.	
1	1.41	18	0.01	A
2	1.55	18	0.01	B
3	1.63	18	0.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.07036

Error: 0.0024 gl: 34

Concentración	Condiciones	Medias	n	E.E.	
2	1	1.47	9	0.02	A
2	2	1.48	9	0.02	A
1	1	1.48	9	0.02	A
1	2	1.50	9	0.02	A
0	1	1.61	9	0.02	B
0	2	1.63	9	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.09447

Error: 0.0024 gl: 34

Concentración	Días	Medias	n	E.E.				
2	1	1.38	6	0.02	A			
1	1	1.39	6	0.02	A			
0	1	1.47	6	0.02	A	B		
2	2	1.49	6	0.02		B	C	
1	2	1.52	6	0.02		B	C	
2	3	1.55	6	0.02		B	C	D
1	3	1.57	6	0.02			C	D
0	2	1.63	6	0.02				D
0	3	1.77	6	0.02				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.07036

Error: 0.0024 gl: 34

Condiciones	Días	Medias	n	E.E.	
1	1	1.38	9	0.02	A
2	1	1.44	9	0.02	A
2	2	1.54	9	0.02	B
1	2	1.55	9	0.02	B
1	3	1.63	9	0.02	C
2	3	1.63	9	0.02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.15206

Error: 0.0024 gl: 34

Condiciones	Días	Concentración	Medias	n	E.E.					
1	1	2	1.34	3	0.03	A				
1	1	1	1.35	3	0.03	A				
2	1	2	1.41	3	0.03	A	B			
2	1	1	1.42	3	0.03	A	B	C		
1	1	0	1.45	3	0.03	A	B	C	D	
2	1	0	1.48	3	0.03	A	B	C	D	E
2	2	2	1.49	3	0.03	A	B	C	D	E
1	2	2	1.49	3	0.03	A	B	C	D	E
2	2	1	1.52	3	0.03		B	C	D	E
1	2	1	1.52	3	0.03		B	C	D	E
2	3	2	1.53	3	0.03		B	C	D	E
1	3	1	1.57	3	0.03			C	D	E
1	3	2	1.57	3	0.03			C	D	E
2	3	1	1.57	3	0.03				D	E
2	2	0	1.62	3	0.03					E
1	F	2	0	1.63	3	0.03				E
1	F	3	0	1.75	3	0.03				
2	F	G	0	1.79	3	0.03				
	G									

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

INTERACCIÓN TRIPLE:

Ho: $\alpha\beta\delta_{ijk} = 0$

Ha: $\alpha\beta\delta_{ijk} \neq 0$

Valor p 0.7071 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción triple no es significativa

INTERACCIONES DOBLES:

Concentración/Condiciones

Ho: $\alpha\beta_{ij} = 0$

Ha: $\alpha\beta_{ij} \neq 0$

Valor p 0.8530 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción entre la concentraciones y las condiciones no es significativa

Concentración/Días

Ho: $\alpha\delta_{ik} = 0$

Ha: $\alpha\delta_{ik} \neq 0$

Valor p 0.0212 < 0.05, Se rechaza la Ho, la interacción entre las concentraciones y los días es significativa

Condiciones/Días

Ho: $\beta\delta_{jk} = 0$

Ha: $\beta\delta_{jk} \neq 0$

Valor p 0.1461 > 0.05, Se acepta la Ho, la interacción entre las condiciones y los días no es significativa

EFFECTOS PRINCIPALES:**Concentración**

Ho: $\alpha = 0$

Ha: $\alpha \neq 0$

Valor p 0.0001 < 0.05, Se rechaza la Ho, hay diferencias significativas entre las concentraciones de alginato calcio y la acidez titulable del yogurt

Condiciones

Ho: $\beta = 0$

Ha: $\beta \neq 0$

Valor p 0.2046 > 0.05, Se acepta la Ho, no hay diferencias significativas entre las condiciones de tratamiento y la acidez titulable del yogurt

Días

Ho: $\delta = 0$

Ha: $\delta \neq 0$

Valor p 0.0001 < 0.05, Se rechaza la Ho, hay diferencias significativas entre los días de tratamiento y la acidez titulable del yogurt