

Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba

**Aimara Victoria De La Cruz Molina
Angelo Renato Terán Ratti**

**Escuela Agrícola Panamericano, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2013**

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Aimara Victoria De La Cruz Molina
Angelo Renato Terán Ratti

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2013

Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba

Presentado por:

Aimara Victoria De La Cruz Molina
Angelo Renato Terán Ratti

Aprobado:

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria Alimentaria

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba

Aimara Victoria De La Cruz Molina
Angelo Renato Terán Ratti

Resumen. La tendencia a consumir alimentos saludables y benéficos al cuerpo humano se encuentra en aumento lo cual promueve el estudio de alimentos funcionales adicionados con probióticos. Se evaluó la técnica de extrusión simulada en *Lactobacillus casei* para el jugo de guayaba de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La viabilidad y propiedades químicas de *L.casei* 431® Juice libre y encapsulado fueron evaluadas en los tiempos de 0, 4, 24, 72 y 192 horas. Las pruebas de viabilidad consistieron en almacenar jugo con bacteria libre y encapsulada (8 Log UFC mL⁻¹ y 8 Log UFC g⁻¹) con el fin de observar la variación de concentración de las células bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Se demostró que después de 8 días de almacenamiento del jugo a 4 °C, las cápsulas mantuvieron una concentración de bacteria de 7.06 Log UFC g⁻¹ y que almacenando un grupo por separado durante 15 días conservan una vida de anaquel en la que no se reduce su concentración. La acidez titulable del jugo con bacteria libre se comparó contra la encapsulada. Se encontró que la bacteria no produce cambios en la acidez. Finalmente se realizó un análisis sensorial para evaluar la aceptación del jugo con probióticos encapsulados. El estudio demostró que el uso de técnicas de encapsulación es una alternativa para aumentar la viabilidad a través del tiempo de *L. casei* en el jugo de guayaba, y no genera impacto tanto en la acidez, como en las características sensoriales (textura, color).

Palabras clave: Alimento funcional, alginato sódico, encapsulación de probióticos, *Lactobacillus casei*.

Abstract. The trend to consume healthier and benefic foods is growing, condition that promotes the investigation and researches about functional foods and probiotics. Encapsulation with sodium alginate by simulating the extrusion technique turns to be an alternative to add *Lactobacillus casei* as a Probiotic for the guava juice of Zamorano University. Viability and chemical properties of *L.casei* 431® Juice free and encapsulated were tested at 0, 4, 24, 72 and 192 hours. Viability test consisted in storing guava juice with free and encapsulated bacteria (8 Log UFC mL⁻¹ and 8 Log UFC g⁻¹) to observe any variation in the concentration of living cells. After 8 days of storage at 4°C the encapsulated cells maintained a concentration of 7.06 Log UFC g⁻¹, and in a separate batch stored to evaluate shelf life of the capsules, the concentration of bacteria remained constant for 15 days. Titrable acidity of the juice with the free bacteria was compared with the encapsulated. *L.casei* (free and encapsulated) did not produce any change in the acidity of the product. Finally, sensory test was carried out to evaluate the acceptance of the guava juice with the encapsulated cells. The study yield that encapsulation with sodium alginate is a real alternative to increase the viability over time of *L.casei* in guava juice, and does not have a perceptible impact in neither the acidity nor the sensorial properties of guava juice such as color, texture, flavor and others.

Key words: Functional food, encapsulated probiotic, sodium alginate, *Lactobacillus casei*

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	17
5. RECOMENDACIONES.....	18
6. LITERATURA CITADA.....	19
7. ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Eficiencia y rendimiento de encapsulado de <i>L. casei</i>	10
2. Viabilidad de <i>L. casei</i> evaluada como concentración de bacteria encapsulada (Log UFC g ⁻¹) y libre (Log UFC mL ⁻¹) en jugo de guayaba a través del tiempo. (n=3).....	12
3. Porcentaje de acidez titulable expresada como ácido cítrico a través del tiempo para jugo de guayaba control, jugo de guayaba con <i>L.casei</i> , encapsulado y jugo de guayaba con bacteria libre.....	14
4. Análisis sensorial del alimento funcional comparado con un control de jugo de guayaba regular. En el cuadro se muestran las medias y su desviación estándar. (n=60).....	15

Figuras	Página
1. Modelo de “caja de huevo” ilustrando formación de gel con un ión divalente de calcio.....	4
2. Viabilidad de <i>L.casei</i> encapsulado con alginato sódico y almacenado a temperatura de refrigeración (4°C).....	11
3. Comparación a través del tiempo de la concentración de <i>L.casei</i> libre y encapsulado mediante técnica de extrusión simulada, suspendido en jugo de guayaba y almacenado a temperaturas de 10-12° C (4 Horas) y 4°C (24, 72 y 192 horas).....	13

Anexos	Página
1. Metodología de estudio preliminar detallada.....	22
2. Boleta de evaluación sensorial utilizada en el estudio.....	24
3. Cuadro de salida del análisis estadístico realizado es SAS® para viabilidad y análisis sensorial.....	25

1. INTRODUCCIÓN

La evolución de los alimentos a lo largo de la historia ha estado influenciada por cambios políticos, culturales y sociales; sin embargo, en la actualidad el consumidor, busca estar más informado y preocupado por su salud y alimentación (Sanz *et al.* 2003). Alrededor del 80% de la población mundial presenta intolerancia progresiva a la lactosa. La intolerancia progresiva es aquella que a medida el individuo envejece empiezan a aparecer síntomas que van relacionados con la pérdida de enzima lactasa en el organismo (ADILAC 2007). Esta condición genera un rechazo hacia el consumo de los productos lácteos funcionales (fermentados) desconociendo que estos no contienen lactosa, pues ha sido fermentada en su proceso de elaboración. Los antecedentes mencionados han abierto una ventana de mercado para que las investigaciones en alimentos funcionales adicionados con probióticos comiencen a ofrecer alternativas orientadas a productos no necesariamente lácteos. Al ampliar la gama de productos probióticos se contribuye a que aumente el consumo de los mismos, un ejemplo de esto puede ser jugos inoculados con cultivos probióticos. El siguiente estudio propone una alternativa para consumo de jugos adicionados con probióticos, específicamente en el concentrado para jugo de guayaba, utilizado en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano (EAP).

Los probióticos son bacterias que al ser ingeridas en cantidades apropiadas ($6 \text{ Log UFC mL}^{-1}$) tienen la capacidad de producir reacciones benéficas en el consumidor (Obando *et al.* 2010). Los beneficios que podemos obtener a partir de la ingesta de probióticos son: reducción de intolerancia a la lactosa, inhibición de bacterias como el *Helicobacter pylori*, y por su naturaleza algunos llegan a ser precursores de vitamina B (Ubbink *et al.* 2003).

El microorganismo *Lactobacillus casei*, es una bacteria ácido láctica (BAL) que tiene propiedades probióticas. Este microorganismo es anaeróbico facultativo heterofermentativo, el cual produce ácido láctico a partir de azúcares. Para su crecimiento es necesario cumplir las especificaciones de temperatura ($15 - 45^{\circ}\text{C}$), y de preferencia ambientes anaeróbicos o reducidos en oxígeno, pues aunque son facultativas presentan problemas para ser reproducidas en laboratorio (Vedamuthu *et al.* 1992). *Lactobacillus casei* puede tener efectos benéficos en el huésped. Para el caso de este estudio y el microorganismo seleccionado, hay investigaciones que respaldan los efectos nutraceuticos del probiótico, entendiéndose como nutraceutico los efectos que benefician la salud del consumidor; entre estos: mejora el sistema inmunológico, y puede ayudar a mejorar la resistencia del cuerpo hacia infecciones comunes como gripes y resfriados (Rizzardini *et al.* 2011). Sin embargo, el uso de probióticos se extiende en su mayoría a productos lácteos, bebidas fermentadas, yogur, leche, quesos y helado (Heenan *et al.* 2004). En países europeos y en Japón el uso de probióticos es muy común y no limitado estrictamente a los productos lácteos sino a otro tipo de alimentos como bebidas, cereales y productos vegetales (Hernández *et al.* 2007).

Al desarrollar un alimento funcional es importante que las características sensoriales de este no se vean afectadas por la presencia del microorganismo, generando así desaprobación en el alimento. Por ejemplo, cultivos del género *Bifidobacterium ssp.* pueden producir ácido acético en el medio cuando se encuentran en las proporciones y condiciones adecuadas (La Torre *et al.* 2003, Frontela *et al.* 2006). De igual forma, *Lactobacillus acidophilus* puede producir acetaldehído y ácido láctico, cambiando el sabor y aroma de los alimentos. Otros cultivos probióticos altamente proteolíticos producen péptidos que modifican las características de sabor en el alimento (Tamamine *et al.* 2005).

Al trabajar con probióticos debe considerarse la relación del cultivo a utilizar con el alimento. Se considera la composición fisicoquímica del alimento, ya que este sirve al microorganismo como vehículo para llegar al tracto digestivo donde será absorbido (Kailasapathy y Chin 2000). Por otro lado, también es importante la selección del microorganismo, es por esta razón que la industria mediante mejoramiento genético y selección de cepas crea cultivos capaces de sobrevivir en diferentes condiciones (pH, grados Brix°) y que no modifiquen las características del alimento (Christian Hansen 2011).

Los jugos de frutas pueden ser buenos vectores para las bacterias ácido lácticas (BAL) como es el caso del jugo de guayaba. La guayaba (*Psidium guajava* L.) se considera un fruto ácido con un pH entre 3.6 y 4.2. Según estudios realizados se ha demostrado que posee un contenido de vitamina C de hasta 268 mg/100g, lo que favorece a su comercialización como fruto fresco (Rojas-Barquero y Narvaéz-Cuenca 2008). Sin embargo no todo el fruto posee las características necesarias para ser comercializado como fruto fresco, por lo que frutos que poseen daños físicos sin comprometer la calidad para el consumo, se destinan a comercializarse como alimentos procesados: jalea, mermelada, dulce, concentrado, puré y jugo (Kashyap *et al.* 2001).

En Zamorano la producción de concentrado de puré de guayaba es utilizada como materia prima para realizar el jugo de guayaba que se sirve en el comedor estudiantil de dicha institución. El procesamiento del concentrado de guayaba consta de lavado y desinfección, cortado de frutas, separación de la pulpa, despulpado (remoción de semillas), pesado, mezclado (azúcar, ácido cítrico), tratamiento térmico (70°C por 20 min) y enfriado (2°C por 10 min), esta descripción es del proceso para el procesamiento de concentrado de puré de guayaba con el que se elabora jugo (Turcios y Gordón 2012). Además de ser rico en vitamina C, el jugo de guayaba tiene un alto contenido de fibra, la cual puede ser utilizada por el probiótico como alimento prebiótico (Chaikham *et al.* 2012). Los prebióticos son suplementos de la dieta no digeribles, que los microorganismos pueden fermentar y aprovechar, estos suplementos incluyen lactulosa, lactitol, una variedad de oligosacáridos e inulina, los cuales son considerados también como fibra.

Estos prebióticos ayudan hasta cierto punto a promover la proliferación del *Lactobacillus* en el intestino delgado (Soriano 2010). El uso de prebióticos es importante para mejorar la viabilidad de los microorganismos, sin embargo hay factores mucho más determinantes que afectan directamente la viabilidad de los cultivos en el alimento *per se*.

Los cambios en las propiedades del alimento pueden ser evaluados como atributos sensoriales, o atributos físico-químicos puntuales (acidez, viscosidad, color, etc.). Durante el proyecto se busca generar información de ambas fuentes, tanto de la percepción sensorial del consumidor, como de las características físico-químicas. Entre las principales características que se ven afectadas dentro de los alimentos funcionales están las propiedades reológicas, relacionadas a la textura o “mouth feel” para el caso de bebidas, y el sabor, que para jugos de fruta funcional se puede determinar con la acidez. Sin embargo, estos cambios en las propiedades del alimento pueden no ser percibidos por el consumidor; razón por la que es necesario evaluar estos parámetros con resultados obtenidos de un panel sensorial (Frontela *et al.* 2006, Burgain *et al.* 2011).

Una alternativa para reducir el impacto de los factores físico químicos en el microorganismo es adicionar los probióticos mediante técnicas de encapsulación sin afectar las propiedades sensoriales del mismo (Obando *et al.* 2010). Los impactos en la textura pueden ser evitados si es que el tamaño de las cápsulas se encuentra por debajo de los 100 μm (Burgain *et al.* 2011). Para lograr estos tamaños de partícula hay que prestar atención al método con el cual se encapsula, pues diferentes métodos generan diferentes rangos de tamaño, y la selección de estos dependerá del alimento en sí y si se desea o no evitar diferencias en las propiedades físico-químicas (Burgain *et al.* 2011).

Las técnicas de encapsulación mediante el uso de gelatinas y polisacáridos (alginato de sodio) proveen protección a la acidez del Tracto Gastro Intestinal (TGI) aumentando la probabilidad en un 85% – 95% de llegar viables al intestino donde colonizan al huésped. Una de las matrices más utilizadas para esta técnica es el alginato de sodio, el cual ha demostrado que incrementa la sobrevivencia de *L. casei* (Mandal *et al.* 2005). El alginato es un polisacárido o polímero de carbohidrato que se produce de forma natural en las algas, en las formas de calcio, sodio y magnesio. Este co-polímero está compuesto por bloques de azúcares de uronato. Los ácidos urónicos son convertidos en sales, manuronato (M) y guluronato (G) mediante un proceso de neutralización después de cosechadas las algas. La estructura de bloque del alginato está compuesta por regiones homopoliméricas de G y de M, potencialmente separadas por secciones alternadas (MG) como se ilustra en la figura 1. La proporción, distribución y tamaño de estos bloques determina las propiedades físicas y químicas de la molécula de alginato. Los bloques del tipo G promueven formación de geles, mientras que los bloques MM o MG promueven flexibilidad (FMC Biopolymers 2003).

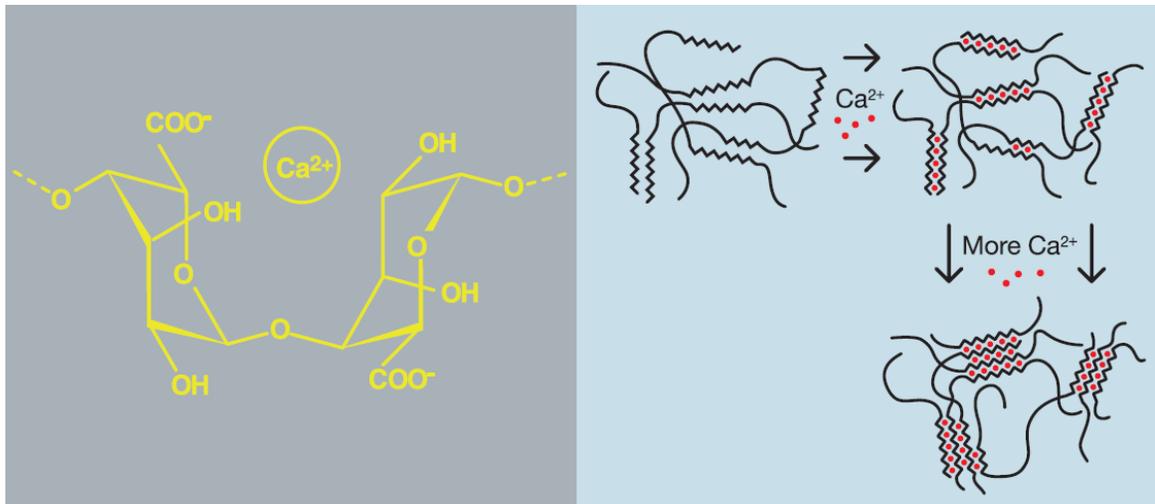


Figura 1. Modelo de “caja de huevo” ilustrando formación de gel con un ión divalente de calcio.

Fuente: (FMC Biopolymers 2003)

Las regiones de monómeros de guluronato (bloques G) pueden unirse a otra región similar de otra molécula de alginato mediante iones de calcio, o algún otro ión multivalente. El ion divalente de calcio Ca^{2+} se introduce en la estructura del bloque G como se describe en el modelo de “Egg Box” o modelo de “Caja de Huevos”. Esto junta al alginato formando zonas de enlace que resultan en gelificación de la solución (figura 1). Esta propiedad hace a los geles de alginato útiles para múltiples aplicaciones incluyendo inmovilización de células y micro encapsulación (FMC Biopolymers 2003).

Hay varias formas de encapsular probióticos. Estos métodos de encapsulación de acuerdo a la tecnología utilizada e insumos se pueden clasificar en: físicos, químicos y fisicoquímicos (Martín *et al.* 2009). Encontramos 3 métodos principales para encapsular:

Secado por aspersión (Spray-Drying) es una técnica basada en el principio de atomizar. Se prepara una suspensión del microorganismo junto con una solución (matriz encapsulante), la cual puede ser una goma o hidrocoloide, (Burgain *et al.* 2011). El proceso de secado por aspersión es muy utilizado en la industria láctea para producir leche en polvo, su uso en el área microbiológica sigue en investigación, pero es fácilmente escalable al nivel industrial. El segundo método se conoce como técnica de emulsión, basado en la relación de la fase continua y dispersa en la misma (Martín *et al.* 2009), utilizando un emulsificante y un agente solidificante (Cloruro de calcio por ejemplo). La técnica ha demostrado alta viabilidad en el producto final y fácil escalado a niveles industriales (Chen y Chen, 2008). No requiere de un equipo especializado para el proceso pero presenta un amplio rango tamaño de partícula (Kailasapathy 2009). Finalmente la técnica de extrusión es un proceso físico que consiste en hacer pasar la solución con los microorganismos vivos por un inyector a presiones altas y bajo condiciones controladas, proceso denominado “prilling” (Burgain *et al.* 2011).

La técnica de extrusión será la evaluada durante este estudio. Se considera el proceso más simple de encapsulación, y de mejores resultados, pues genera partículas esféricas y muy estables (Chen y Chen 2008). Requiere de un equipo especializado para poder realizar el proceso efectivamente, pero la técnica se puede simular utilizando una jeringa para remplazar el inyector a alta presión, en cuyo caso el tamaño de partícula dependerá del diámetro de la aguja utilizada (Chen y Chen 2008).

Evaluar las propiedades nutricionales del jugo de Guayaba inoculado con *Lactobacillus*, se ha convertido en una limitante del proyecto, debido al tiempo necesario para realizar este tipo de estudios. Por lo cual se asumirá su efecto en la nutrición y salud del consumidor basado en información técnica y estudios previamente realizados.

Los objetivos para realizar el presente proyecto son los siguientes:

- Determinar la eficiencia y factibilidad de encapsulado mediante la técnica de extrusión simulada con alginato sódico.
- Evaluar la vida de anaquel y estabilidad de las micro cápsulas de alginato basándose en viabilidad del microorganismo encapsulado.
- Determinar la viabilidad del *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en el jugo de guayaba de la EAP.
- Evaluar el efecto en las características químicas y sensoriales del jugo de fruta inoculado con micro cápsulas de *Lactobacillus casei*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y detalles del Estudio. Las capsulas fueron elaboradas y evaluadas en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ). Estas contenían el microorganismo *Lactobacillus casei* con nombre comercial de *L. casei* 431 Juice[®], donado para la tesis por Christian Hansen[®].

El jugo de guayaba fue elaborado a partir de concentrado de la Planta Hortofrutícola de Zamorano, y preparado en la Planta de Investigación de Alimentos (PIA). Los análisis sensoriales se realizaron en el Laboratorio de Análisis Sensorial de Zamorano.

Estudios Preliminares. Se realizaron pruebas preliminares para determinar la técnica apropiada para crecer el microorganismo y el manejo de la goma a utilizar para realizar el encapsulado tales como: Aislamiento y crecimiento de cepa; Encapsulación de *L. casei* con goma xanthan por técnica de extrusión; Condiciones de crecimiento de *L. casei* 431[®] Juice.

Se desarrolló un método de crecimiento para el *Lactobacillus casei* que permite alcanzar una concentración de 10 Log después de 4 horas a 37°C bajo condiciones aeróbicas. También se determinó que la técnica de encapsulado a utilizar más apropiada para trabajar en el laboratorio de microbiología de zamorano, fue la técnica de extrusión simulada, mediante una inyección con diámetro de que contenían la matriz de alginato sódico (goma seleccionada) inoculado con bacteria y se solidificó con cloruro de calcio. Las pruebas preliminares se explican a detalle en el Anexo 1.

Encapsulación. Las células probióticas (1 g *L. casei* 431 Juice[®]) fueron rehidratadas en 100 mL de caldo Man, Rogosa and Sharp (Criterion Lactobacilli broth MRS) por 5 minutos a temperatura ambiente e incubadas (Fisher Scientific) aeróbicamente a 37°C por 4 horas para alcanzar la fase estacionaria con una concentración de 10⁹ UFC mL⁻¹. Después de la incubación, la bacteria fue cosechada y doblemente lavada con agua peptonada estéril por el método de centrifugación (Thermo Scientific modelo Survall ST 16 R centrifuge) a 2500 x g por 30 minutos a 4° C. Los pellets fueron diluidos con 20 mL de agua peptonada estéril para obtener concentraciones de 10 Log UFC mL⁻¹.

Se suspendió 1 mL del cultivo lavado de *L. casei* 431[®] Juice a una concentración de 10¹⁰ UFC mL⁻¹, en 5 mL de agua peptonada estéril. La suspensión activa fue mezclada con 45 mL de una solución de alginato al 2% (p/v), de esta se tomaron 25 mL y fueron agregados a 200 mL de cloruro de calcio (0.1M), usando una primera jeringa con una aguja de diámetro 0.7 mm (22G), con la cual se llenaba una segunda jeringa con aguja de diámetro de 0.33 mm (29G).

Los probióticos encapsulados permanecieron en cloruro de calcio por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación continua para evitar coalescencia y reticulación de las partículas. Las cápsulas fueron filtradas por un colador de metal estéril, finalmente fueron lavadas con agua desionizada, y almacenadas en platos petri estériles a 4°C.

La eficiencia de encapsulado es una medida de la eficacia del atrapamiento y sobrevivencia de células viables durante el proceso de encapsulado, y fue calculado como la relación entre lo encapsulado y la concentración inicial de bacteria.

$$\text{Eficiencia de Encapsulado} = (N/N_0) * 100$$

N = Logaritmo de número células viables liberadas de las cápsulas

N₀ = Logaritmo de número de células añadidas a la mezcla de polímeros

Para liberar el *L.casei* 431[®] Juice encapsulado se tomó 1 g de cápsulas y se adicionó a una solución de citrato de sodio al 1% (p/v). La suspensión se homogeneizó por un minuto en el homogeneizador peristáltico (Stomacher IUL Instrument) seguido de nueve minutos de reposo y luego se procedió a realizar los recuentos.

Se determinó la vida anaquel de las cápsulas realizando conteos a los 0 y 15 días. Alícuotas de un mL de la solución producida al liberar las cápsulas en citrato de sodio fueron diluidas decimalmente y sembradas en medio agar MRS por la técnica de vertido en placa. Las muestras fueron incubadas por 48 horas a 37°C.

Incorporación y evaluación de cápsulas en matriz alimenticia. Se evaluó la viabilidad del *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en el jugo de guayaba de Zamorano. En esta sección se evaluaron dos tratamientos en el jugo con cinco medidas repetidas en el tiempo.

Tratamiento	Descripción del tratamiento
Control	Jugo de guayaba (relación 3:1 Agua:concentrado)
TRT 1	Jugo + cápsulas de <i>L.casei</i> (8 Log UFC g ⁻¹) ¹ (10g 100mL ¹) ²
TRT 2	Jugo + suspensión de <i>L.casei</i> libre (9 Log UFC mL ⁻¹) (10mL 100mL ⁻¹)

¹ Concentración del probiótico

² Cantidad de probiótico adicionado por volumen de jugo

Se prepararon 100 mL de jugo de guayaba elaborado a partir de concentrado proveniente de la planta de procesamiento hortofrutícola de la EAP, utilizando una relación de 3:1 (v:v agua: concentrado) según las recomendaciones del fabricante. Se adicionaron 10 g de células encapsuladas a una concentración de 8 Log UFC g⁻¹.

La bacteria libre fue adicionada suspendiendo un gramo del cultivo probiótico *L.casei* 431[®] Juice, que se encontraba a una concentración de 11 Log g⁻¹, en 100 mL de agua peptonada estéril para así llegar a una concentración de 9 Log mL⁻¹.

Posteriormente se adicionó esa suspensión al jugo de guayaba en relación 1:10, es decir 1 mL de suspensión de bacterias activas en 10 mL de jugo, con lo que se llegó a una concentración final de 8 Log mL⁻¹.

Para determinar la viabilidad del microorganismo se realizaron conteos microbiológicos a las 0, 4 horas, 1 día (24 horas), 3 días (72 horas) y 8 días (192 horas) para cada tratamiento. Para la enumeración de la células encapsuladas, las cápsulas se recolectaron del jugo con ayuda de un colador metálico estéril, posteriormente fueron adicionadas a una solución de Citrato de sodio (1% p/v) estéril para liberar las células como se describió anteriormente. Se tomó 1 mL de esta solución y se realizaron diluciones para sembrar en platos petri mediante técnica de vertido, los platos sembrados fueron incubados a 37 °C por 48 horas y posteriormente realizar el conteo. Para las muestras con bacteria libre se realizaron recuentos normales sin seguir ningún procedimiento especial para la dilución de la muestra.

Los platos sembrados de ambos tratamientos fueron preparados mediante técnica de vertido con medio agar MRS, poniendo una segunda capa de medio una vez solidificada la primera capa, para reducir las condiciones de oxígeno, pues el *Lactobacillus casei* es un anaerobio facultativo y este procedimiento facilita el crecimiento en los platos (Vedammuthu *et al.* 1992). Para el seguimiento del recuento de los microorganismos encapsulados se realizaron recuentos a las 0 horas, 4 horas, 1 día (24 horas), 3 días (72 horas) y finalmente a los 8 días (192 horas), ya que el jugo permanece máximo por un periodo de 3 días almacenado en el comedor estudiantil y 8 días es aproximadamente la vida útil estimada del jugo de guayaba. Para el recuento de cápsulas en el jugo de las 4 horas se simuló el ambiente que tendría en el comedor por lo que se mantuvo a 12°C. Para el recuento de los días 1, 3 y 8, el jugo con cápsulas fue almacenado a 4°C.

Métodos de evaluación de propiedades químicas. Acidez titulable se midió utilizando un método convencional de titulación. Alícuotas de 9 mL de muestra se mezclaron con 3 gotas de fenolftaleína y luego se titularon con hidróxido de sodio (NaOH). Este fue agregado gota por gota utilizando una bureta graduada, hasta que se llegó a un cambio de color (rosa pálido). El cambio de color es una medida que compara la cantidad de NaOH utilizada para neutralizar, con la cantidad de ácido en la muestra a través de una ecuación matemática. Este procedimiento se repitió para cada una de las muestras a diferentes días, de esta manera se evaluó si la bacteria libre y encapsulada estaban produciendo ácido láctico a través del tiempo. Adicionalmente se realizaron pruebas de acidez al jugo sin inocular (control), para asegurarse que la acidez del producto *per sé* no cambia a través del tiempo ni afecta los resultados.

Se midió el pH de las muestras usando el potenciómetro del laboratorio de microbiología de la EAP (Thermo Scientific® Orion 1119001 5-Star Plus). El electrodo de vidrio del potenciómetro fue lavado con agua destilada, secado y luego sumergido en las respectivas muestras de jugo inoculado.

Los datos de esta sección fueron evaluados como un DCA con medidas repetidas en el tiempo a las 0, 4, 24, 72 y 192 horas. Haciendo uso de un Procedimiento de Modelo Lineal General (Proc GLM) y un ANDEVA con separación de medias Tukey (P<0.05).

Análisis sensorial en producto final. En esta sección se evaluaron dos tratamientos el primero fue el jugo de guayaba con cápsulas de alginato que contenían *L. casei* en concentración de 8 Log UFC g⁻¹. Este fue evaluado contra un control, el cual era el jugo de guayaba normal. Los datos obtenidos se analizaron como un DCA. Se avaló la normalidad de los datos, observaciones fuera de tipo y se corrió un Proc GLM y un ANDEVA. La separación de medias utilizada fue Tukey (P<0.05).

Se realizó una prueba de aceptación, para comparar los atributos sensoriales del jugo encapsulado contra los de un control sin bacteria encapsulada, ni bacteria libre. Para esta parte del estudio se utilizaron 60 panelistas no capacitados. Los atributos evaluados en las boletas fueron: Color, Olor, Sabor, Textura, Acidez y Aceptación general. Las muestras de jugo se prepararon el día de la prueba en la Planta Agroindustrial de Investigación y Desarrollo. Las cápsulas con concentración de bacteria 9 Log UFC mL⁻¹ fueron adicionadas al jugo en una proporción de 20 g en un litro, estimando que un vaso de jugo del comedor estudiantil de la EAP tiene entre 200 y 300 mL y que la porción de consumo debe ser por lo menos superior a 1 gramo por porción. Esta relación es superior a un gramo por porción, pero evaluando el extremo podemos asegurar que cada panelista prueba el producto.

Todos los datos obtenidos mediante los métodos previamente mencionados durante el estudio fueron realizados en 3 repeticiones y cada repetición se realizó por duplicado. Estos datos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa SAS[®] 9.1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de medir la eficiencia del encapsulado, se realizaron los cálculos correspondientes indicados anteriormente en la metodología. Los resultados de estos cálculos indican que con una concentración promedio inicial de 10.5 Log UFC mL⁻¹ se obtuvo una concentración promedio final de 8.6 Log UFC mL⁻¹ al final de la encapsulación. La relación de la concentración final con la inicial (eficiencia) es del 82.48 % con una desviación estándar del 8.5% (Cuadro 1)

Cuadro 1. Eficiencia y rendimiento de encapsulado de *L. casei*

	Promedio	C.V.	Desviación Estándar
Concentración inicial(Log UFC mL ⁻¹) ^ψ	10.49	4%	0.39
Concentración final (Log UFC mL ⁻¹) ^η	8.63	7%	0.64
Eficiencia encapsulado (%) ^γ	82.48	10.3%	8.5
Mezcla Alginato + Bacteria (mL)	24.30	5%	1.15
Peso final cápsulas (g)	15.26	49%	7.49
Rendimiento encapsulación (%) ^η	62.36	46.5%	29

ψ Concentración *L.casei* en solución de alginato sódico

η Concentración de *L.casei* después de encapsulado en matriz de alginato sódico

γ Relación entre concentración inicial de bacteria y concentración final después de encapsulado

η Relación entre la cantidad inicial de alginato comparada con el peso final de cápsulas

Las tres repeticiones fueron centrifugadas y encapsuladas el mismo día para disminuir el error en reducción de logaritmos que se podía dar por almacenamiento. La diferencia en la eficiencia se puede atribuir a que los probióticos encapsulados con una matriz de gel de alginato resultan en cápsulas blandas, lo que da lugar a la aparición de poros. La aparición de estos, además de la solución endurecedora (cloruro de calcio), el tamaño de cápsulas y la técnica de encapsulación, se refleja en la alta variabilidad del rendimiento en la encapsulación (Mortazavian *et al.* 2007). Es importante mencionar que la presencia de poros no compromete la eficiencia de encapsulado, pues en estos micro espacios de aire, igual se puede alojar bacteria.

En el estudio se observó que al utilizar un volumen de cloruro de calcio de 200 mL en un erlenmeyer de 500 mL, las cápsulas tenían mayor turgencia, que las cápsulas elaboradas utilizando el mismo volumen de cloruro de calcio en un erlenmeyer de 2000mL. Además del volumen utilizado, el tiempo pudo haber sido una fuente de error, ya que según la metodología las cápsulas debían permanecer en el cloruro de calcio 30 minutos con agitación constante. En promedio para la elaboración de 10 g de cápsulas era de aproximadamente una hora, este, más tiempo de reposo, crean condiciones en el alginato que pueden generar variación en la cápsula.

Los cálculos de rendimiento en peso, tomando en cuenta la relación entre el promedio inicial de mezcla de alginato + *L.casei* (24.3 mL) con el promedio del peso final de cápsulas en gramos (15.26 g), resultaron en un rendimiento de encapsulación de 62.36% en promedio, con una desviación estándar de 29% (Cuadro 1). La alta desviación de los resultados se debe a la falta de equipo especializado para realizar este proceso, ya que el peso está ligado directamente a la cantidad de aire que se aloja en el embolo de la jeringa, el cual se manifiesta en cápsulas de menor peso (Mortazavian *et al.* 2007), más no crea ningún efecto significativo en la concentración de bacteria, ni afecta la vida de anaquel de las cápsulas *per sé* (figura 2).

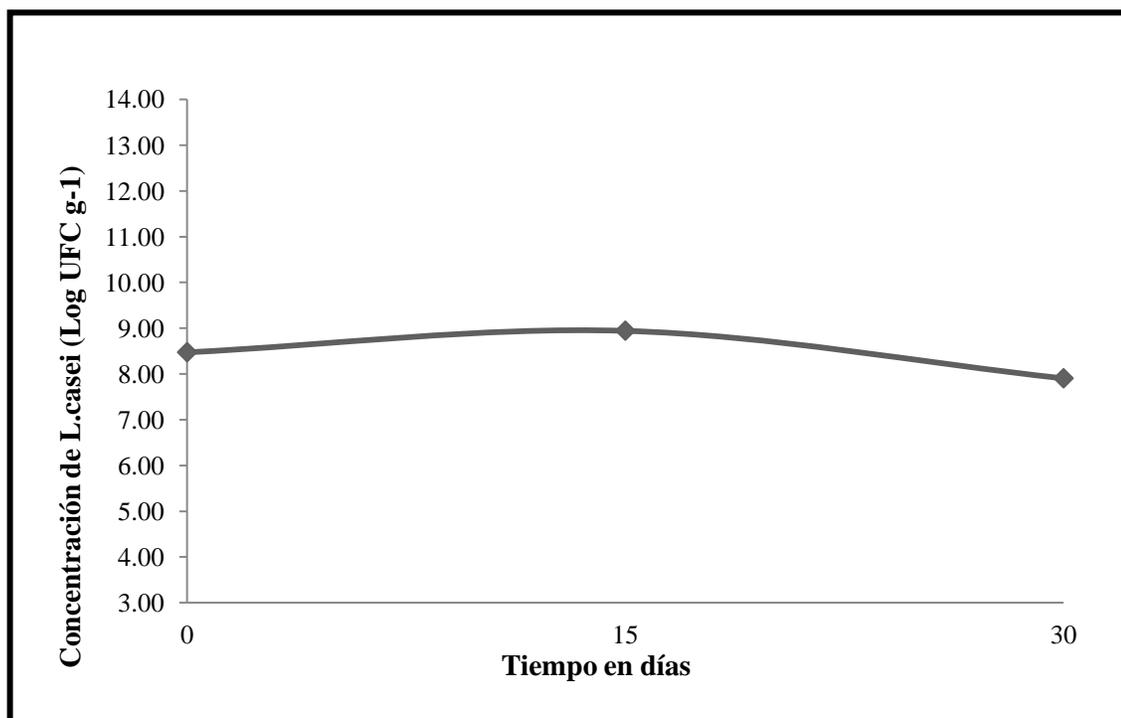


Figura 2. Viabilidad de *L.casei* encapsulado con alginato sódico y almacenado a temperatura de refrigeración (4°C)

A lo largo del estudio se realizaron pruebas de vida de anaquel, para estimar el tiempo que la bacteria encapsulada logra mantener su concentración durante almacenamiento. La prueba se realizó en un lote de cápsulas separado de las repeticiones utilizadas para evaluar el comportamiento en el jugo. La concentración de los probióticos encapsulados no presenta variaciones significativas a través del tiempo como era lo esperado. El encapsulamiento provee un ambiente anaeróbico, el cual se cree puede contribuir al crecimiento de la bacteria dentro de la matriz de alginato (Ding and Shah 2008). Se pronostica que las cápsulas almacenadas deberían tener un mejor desempeño, ya que estas no están en contacto con un medio que les pueda causar estrés

Los recuentos de *L. casei* libre y encapsulado en el jugo de guayaba fueron en promedio de 7.96 y 8.33 Log UFC mL⁻¹ respectivamente al tiempo 0 a 22°C. Posteriormente se refrigeraron entre 10-12°C por 4 horas, temperatura y tiempo a los cuales se encuentra servido el jugo en los dispensadores del comedor estudiantil de la EAP. La concentración de bacteria libre a las 4 horas se redujo a 6.38 Log UFC mL⁻¹, sin embargo el encapsulado mantiene su concentración inicial; lo cual indica que el microorganismo libre bajo las condiciones ácidas del jugo reduce significativamente su concentración a medida pasa el tiempo (figura 3). Por otro lado, el método de encapsulación protege lo suficiente a la bacteria de las condiciones ácidas ya que su concentración no se ve reducida significativamente durante las primeras 4 horas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Viabilidad de *L. casei* evaluada como concentración de bacteria encapsulada (Log UFC g⁻¹) y libre (Log UFC mL⁻¹) en jugo de guayaba a través del tiempo. (n=3).

Tratamiento	Tiempo (horas)				
	0	4	24	72	192
<i>Lactobacillus casei</i> Libre	7.96 ± 0.53 ^a _x	6.38 ± 0.55 ^a _y	6.03 ± 0.29 ^a _y	4.41 ± 0.18 ^a _w	2.95 ± 0.33 ^a _z
<i>Lactobacillus casei</i> encapsulado	8.33 ± 0.24 ^a _x	8.17 ± 0.37 ^b _x	7.83 ± 0.74 ^b _{xy}	8.04 ± 0.68 ^b _{xy}	7.06 ± 1.08 ^b _y
C.V. 8%					

Promedio de tres repeticiones con duplicado de muestra ± desviación estándar.

^{w x y z} Medias con la misma letra entre columnas no son significativamente diferentes (P>0.05).

^{ab} Medias seguidas con la misma letra entre filas no son significativamente diferentes (P>0.05).

La concentración de bacteria libre se redujo significativamente a lo largo del estudio, mostrando a las 192 horas una concentración final de 2.95 Log UFC mL⁻¹. Por otra parte la concentración de bacteria encapsulada se mantuvo hasta las 72 horas (8.04 Log UFC mL⁻¹), sin embargo se muestra una reducción significativa a las 192 horas (7.06 Log UFC mL⁻¹) La reducción, en el encapsulado no compromete la funcionalidad del alimento pues en promedio mantuvo una concentración de 7.89 Log UFC mL⁻¹, valor superior al de la bacteria libre (5.54 Log UFC mL⁻¹).

La concentración de bacteria encapsulada cumple con lo que exigen los institutos de tecnología de alimentos y gastroenterología para productos probióticos, en donde se indica que para que el producto probiótico tenga un efecto funcional en el huésped, es necesario que se encuentre en concentraciones entre 10^6 y 10^7 (Sanz *et al.* 2003). Cabe mencionar que la bacteria libre pierde su capacidad funcional a las 72 horas ($4.41 \text{ Log UFC mL}^{-1}$).

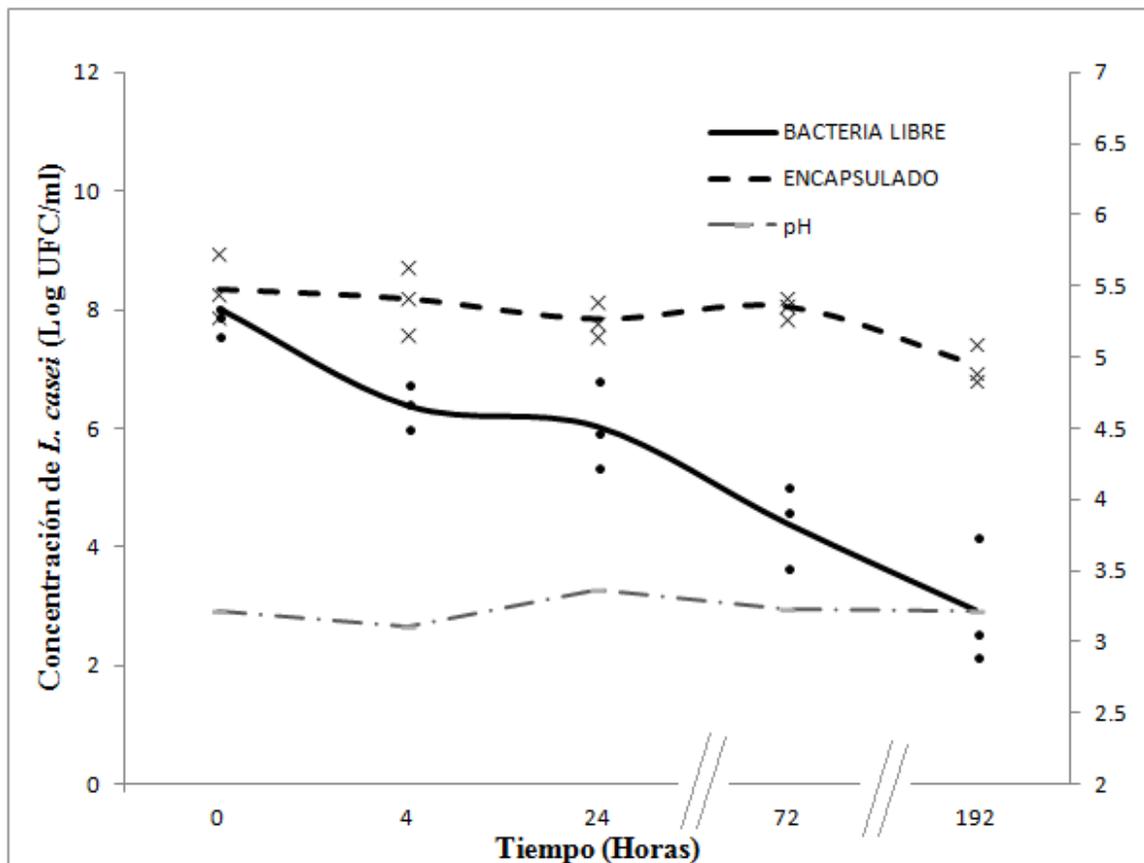


Figura 3. Comparación a través del tiempo de la concentración de *L.casei* libre y encapsulado mediante técnica de extrusión simulada, suspendido en jugo de guayaba y almacenado a temperaturas de 10-12° C (4 Horas) y 4°C (24, 72 y 192 horas).

La guayaba en general no tiene un pH muy ácido, sin embargo en la elaboración del producto se adiciona ácido cítrico para mantener una acidez que ayude a conservar el producto y evite el crecimiento de microorganismos (Turcios y Gordón 2012) resultando en un pH que se encuentra entre 3.1 y 3.2. Las bacterias ácido lácticas crecen óptimamente en valores de pH entre 4 – 5, deteniéndose su crecimiento en valores de 3.2 a 3.8 (Vedammuthu *et al.* 1992). Esto podría explicar porque se reduce la concentración de bacteria libre en el jugo de guayaba.

Es importante mencionar que aunque no se adiciona un preservante químico al concentrado de guayaba en el flujo de procesos, el puré con el que este concentrado se elabora contiene benzoato de sodio (Turcios y Gordón 2012), lo cual aunque en pequeñas proporciones puede contribuir a inhibir el crecimiento bacteriano y por ende reducir la viabilidad de la bacteria libre.

No hubo diferencias estadísticas ($P=0.359$) en la acidez, y se observó que de igual manera, la acidez inicial se mantiene a través del tiempo en todos los tratamientos. En el caso de la bacteria libre, sorpresivamente, el microorganismo no produjo ningún cambio en la acidez del producto (cuadro 3), como era lo esperado al tratarse de una bacteria ácido láctica. Esto pudo deberse a que la bacteria se encontraba demasiado estresada en el medio ácido, lo cual no le permitió producir ácido láctico, pues ante situaciones de estrés sólo se dedica a sobrevivir. Esto se puede observar si se analiza el comportamiento de la viabilidad de la bacteria libre a través del tiempo (figura 3).

Por otra parte el encapsulado tampoco mostró cambios a través del tiempo en la acidez titulable (cuadro 3), como era lo esperado. La explicación de esto es que aunque la bacteria produzca ácido láctico, este no debería salir de la cápsula, evitando que se acidifique el jugo de guayaba. El control a su vez refleja que la acidez del jugo se mantiene estable después de 8 días de almacenado a 4°C (cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de acidez titulable expresada como ácido cítrico a través del tiempo para jugo de guayaba control, jugo de guayaba con *L. casei*, encapsulado y jugo de guayaba con bacteria libre.

Tiempo (horas)	Acidez Titulable [‡] (%)		
	Encapsulado	Bacteria Libre	Control
0	17.56 ± 0.62	17.56 ± 0.62	17.88 ± 0.62
4	17.88 ± 0.62	17.88 ± 0.62	17.88 ± 0.62
24	17.88 ± 0.62	17.56 ± 0.62	17.88 ± 0.62
72	17.24 ± 0.62	17.88 ± 1.24	18.64 ± 0.62
192	17.24 ± 1.87	17.24 ± 0.62	17.24 ± 0.62
C.V. (%)	4.96	4.23	3.47

[‡]Los resultados no presentan diferencia estadística ($P = 0.359$)

Otros dos factores importantes a considerar en términos de producción de ácido láctico por parte de la bacteria son que la cepa de bacteria comercial utilizada (*L.casei* 431® Juice) desarrollada por la casa Christian Hansen® ha sido sometida a un proceso de mejoramiento genético mediante selección para funcionar como un probiótico. Este mejoramiento da como resultado bacterias que tienden a no alterar las características sensoriales del alimento (Rizzardini *et al.* 2011). El otro factor es que el ácido en mayor concentración que se encuentra en este producto es al ácido cítrico adicionado en el flujo de procesos (Turcios y Gordón 2012). El ácido cítrico es mucho más reactivo, poderoso y se encuentra en mayor proporción que los otros dos ácidos que podrían estar en el producto (ácido ascórbico de la guayaba y ácido láctico de las bacterias). Por lo cual la producción de ácido por parte de la bacteria viene a ser poco medible o casi imperceptible ante otro ácido más concentrado o fuerte.

Los datos observados en producción de Acidez y viabilidad de la bacteria hacen que el *Lactobacillus casei* sea un buen candidato para adicionar como probiótico al jugo del comedor estudiantil. El periodo de tiempo durante el cual se sirve el jugo es de máximo 3 horas (almuerzo de 10:30 am a 12:30 pm). Según el estudio de viabilidad, aún sería posible adicionar el microorganismo de forma libre pues se podría mantener en la concentración mínima (6 Log UFC mL⁻¹) para que el producto sea funcional. Sin embargo el consumo estaría limitado a ese periodo de tiempo, pues después de las cuatro horas, o de un día de almacenamiento la concentración se ve fuertemente reducida. En los volúmenes de jugo y temperaturas que se utilizan en el comedor la reducción bacteriana podría ser más notable, y según el comportamiento del microorganismo no resistiría suficiente tiempo como para que pueda ser aprovechado por el huésped, ya que las reducciones son de aproximadamente 2 logaritmos a las 4 horas.

En otro ámbito, los resultados de la prueba sensorial, demostraron que los panelistas no perciben diferencias entre los atributos del jugo de guayaba con la suspensión de cápsulas en comparación con el jugo control. A pesar de que muchos de los panelistas reportaron que percibieron diferencias en términos de textura como era esperados, este valor no es significativo estadísticamente (P>0.05) y era muchas veces (13% de los panelistas) asociado a “contenido de pulpa” según comentarios de algunos panelistas.

Cuadro 4. Análisis sensorial del alimento funcional comparado con un control de jugo de guayaba regular. En el cuadro se muestran las medias y su desviación estándar. (n=60).

Tratamiento	Escala Hedónica (1 -9) ^Ω					
	Color	Olor	Sabor	Textura	Acidez	Aceptación General
Control	6.18±1.66	6.45±1.48	7.05±1.44	6.47±1.50	6.54±1.63	7.1±1.3
Jugo con probiótico	6.5±1.67	6.69±1.42	7.09±1.42	6.43±1.70	6.47±1.59	7.16±1.08
C.V. (%)	16.05	13.72	11.04	16.18	13.84	10.34

Ω Los datos no presentan diferencias estadísticas (P>0.05).

Lo anterior se debe a que las propiedades sensoriales del jugo en términos de textura y granulometría son bastante marcadas, pues en el procesamiento de este no va incluido el clarificado ni filtrado, se realiza directamente del concentrado (pulpa) de guayaba, propiedad que se puede definir como pulposa (Turcios y Gordón 2012). Los panelistas tampoco percibieron diferencias en el color, aunque se presumía que textura debía ser el atributo principalmente detectado, pues a tamaños de partícula superiores a 100 μm los panelistas pueden percibir diferencias sensoriales (Burgain *et al.* 2011). Los tamaños de partícula de las cápsulas obtenidas oscilaron entre 1.4 y 2.3 mm. Este dato fue determinado mediante granulometría para el análisis sensorial, de aquí que la textura del jugo reportada por los panelistas se atribuye al gran contenido de sólidos propios del jugo de guayaba (pulpa, fibra y otros) que esconden la presencia de las cápsulas en el mismo.

4. CONCLUSIONES

- El encapsulado no presenta una reducción significativa en la concentración de bacteria, las cápsulas al ser agregadas en el jugo de guayaba mantendrán la concentración necesaria para seguir siendo un alimento funcional. Sin embargo el rendimiento de la técnica de extrusión simulada presenta una alta variabilidad, lo cual es un obstáculo al momento de escalar el método a niveles industriales.
- La vida de anaquel de las cápsulas determinada en el tiempo del estudio es de 30 días. Por lo que pueden ser almacenadas a temperatura de refrigeración en el comedor por este periodo de tiempo sin necesidad de estar elaborando cápsulas diarias o semanales.
- La técnica de encapsulación de extrusión simulada con alginato sódico protege al microorganismo del medio ácido del alimento y le permite mantenerse viable durante 8 días, tiempo apropiado de vida de anaquel para productos perecederos como jugos de frutas naturales.
- El *Lactobacillus casei* tiene potencial como para usarse como probiótico libre en el jugo de guayaba de la EAP debido al corto periodo de tiempo durante el cual se sirve. Es importante mencionar que agregar una suspensión de bacteria libre al jugo implica reformular el producto, para no modificar la relación que se usa agua: concentrado.
- El microorganismo comercial *L.casei* 431® Juice, como lo describe el fabricante, no modifica las características sensoriales del jugo de guayaba, hecho que se puede apreciar en el análisis de la acidez.
- Los panelistas no detectan diferencias entre los atributos sensoriales (Color, Textura, Sabor, Olor, Aceptación General) es evaluados para jugo de Guayaba con cápsulas de alginato sódico realizadas mediante extrusión simulada.

5. RECOMENDACIONES

- Estudiar el efecto nutricional de la aplicación de probióticos a la dieta estudiantil, correlacionando este consumo con la susceptibilidad a enfermedades.
- Realizar estudios posteriores sobre condiciones de crecimiento de *Lactobacillus casei* para lograr concentraciones más altas y de esta manera obtener una eficiencia y rendimiento mayor
- Realizar estudios sobre las otras técnicas de encapsulación existentes, e invertir en el equipo necesario para reducir los tamaños de partícula a medidas aceptadas según la literatura.
- Probar el producto en jugo de naranja con pulpa u otro tipo de alimentos (helados, gelatinas, postres) que permitan y faciliten la suministración a los estudiantes de la EAP.
- Se recomienda realizar un estudio detallado de la vida de anaquel de las cápsulas para conocer métodos apropiados de almacenamiento, además implementar un empaque especial para el almacenamiento de las cápsulas y de esta manera evaluar su efecto en la vida anaquel de las cápsulas.

6. LITERATURA CITADA

Asociación De Intolerantes a la Lactosa (ADILAC). 2007. Información sobre lacto intolerancia. (en línea) Consultado el: 10 de Agosto del 2013. Disponible en: <http://www.lactosa.org/saber.html>

Burgain J, Gaiani C., Linder M., Scher J. 2011. Encapsulation of Probiotic living cells: From laboratory scale to industrial. Vandoeuvre les Nancy, France : ELSEVIER, Journal of Food Engineering, (104). 467- 483 p.

Chaikham, P., Apichartsrangkoon, A., Worametrachanon, S., Supraditareporn, W., Chokiatirote, E., Van der Wiele, T. 2012. Activities of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA5 or *Lactobacillus casei* 01 in processed logan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract.(en línea) Journal of the Science of Food and Agriculture, published online. Disponible en: www.wileyonlinelibrary.com DOI 10.1002/jsfa. 6030.

Chen Ming-Ju and Chen Kun-Nan. 2008. Encapsulation of Probiotics in Alginate Systems,. Control Release Society NewsLetter. Vol.25. 7 – 9p.

Christian Hansen. Superior survival of *Lactobacillus casei* 431® Juice in multi-fruit juices. 2011. (en línea) Consultado: 12 de Agosto 2012. Disponible en: http://cdn.chr-hansen.com/uploads/tx_tcdownloadablessecure/One_Pager_L.casei_431_juice.pdf

Corcoran B. M., C. Stanton, G. F. Fitzgerald, R. P. Ross. 2005. Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. Journal Applied and Environmental Microbiology. Vol 71(4). 3060-3067 p.

Ding, W.K. and Shah, N.P. 2008. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. International Food Research Journal. Vol. 15(2). 219-232 p.

FMC Biopolymers. FMC patents: Alginates. 2003 (en línea). Consultado: 10 de Julio del 2013. Disponible en: www.fmcbiopolymer.com

Frontela, C., Lopez G., Ros G., Martinez C. 2006 Relación entre los parámetros sensoriales, fisicoquímicos. Murcia: Universidad de Murcia. Vol. 22. 67-78 p.

Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W., Fleet, G.H. 2004. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganism in a non fermented frozen vegetarian dessert. Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie, 37(4), 461 – 466.

Hernandez, A., Ávila, L., Montero, D., Barrantes, C. 2007. Desarrollo de helados con cultivos probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. Alimentech. Vol 5 N°1. 5-12 p.

Kailasapathy, K., & Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunology and cell Biology, 78(1), 80 – 88 P.

Kailasapathy, K., 2009. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources Vol (4), No. 033.

Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. 2001. Application of pectinases in the commercial sector: A review. Punjab, India. Bioresources technology Vol. 77. 215-227 p.

La Torre, L, Tamime, A and Muir, D. Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotics and yoghurt starter cultures. s.l.: International Journal of Dairy Technology, 2003, 163-170 p.

Mair N. S., M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

Mandal, S., Puniya, A.K., Singh, K. 2005. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. International Dairy Journal (16). 1190-1195 p.

Martín Villena MJ, Morales Hernández ME, Gallardo Lara V y Ruiz Martínez MA. 2009. Técnicas de micro encapsulación: una propuesta para micro encapsular probióticos. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.

Mortasavial, A., Hadi, S.R., Ehsani, R.M., Sohrabvandi 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian Journal of Biotechnology. Vol. 5(1). 1-18 p.

Obando, Mónica., Carmen, Brito., y Schöbitz, Renate. 2010. Viabilidad De Los Microorganismos Probióticos. Medellín : VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol 17 (2). 141-148 p.

Rizzardini, G., Eskesen D., Calder P.C., Capetti A., Jespersen L. 2011. Evaluation of the immune benefits of two Probiotic strains. 2011. British Journal of Nutrition. In: Christian Hansen®, Study highlights: Immune Health.

Rojas-Barquero, D., Narvaéz-Cuenca C.E. 2009. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de Guayaba. Química Nova. Vol.32 (9). 2336-2340 P.

Sanz Y., M.C. Collado y J. Dalmau. 2003. Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. Acta Pediátrica Española, Vol.6 (9). 476-482 P.

Soma, P and Lo, Y. 2009. Xanthan chitosan polyionic hydrogels for microencapsulation of probiotics. XVII International Conference on Bioencapsulation, Groningen, Netherlands. 24 - 26 September. University of Mary Land, College Park – USA.

Sohail, A., Turner, M., Coombes, A., Bostrom, T., 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. International Journal of Food Microbiology (145) 162–168 p.

Soriano C. 2006. Capítulo 25: Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. *In*: Tópicos selectos en medicina interna – Gastroenterología. Colegio Médico Del Perú, Revista de Gastroenterología vol. (26) 59 – 71 P.

Tamime, A., Saarela M., Korslund Sondergard A. 2005. Production and maintenance of viability of probiotic Microorganisms *in* Dairy products. [book auth.] Dr. Adnan Tamime. Probiotic Dairy Products. s.l. Blackwell Publishing Ltd., pp. 40-72

Turcios Zelaya, C.D. y E.X. Gordón Caballero, 2012. Desarrollo y evaluación de un puré de guayaba Taiwanesa (*Psidium guajava* L.) para bebidas. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 28 p.

Tzec Yam J.A., Villaseñor Perea C.A., Kriuchkova E., Soto Escobar M., Peña Peralta M.A. 2010 Una revisión sobre la importancia del fruto de Guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha. Revista Ciencias técnicas agropecuarias. vol.19, n.4 [citado 2013-05-13], 74-82 p. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542010000400012&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2071-0054.

Ubbink J.B., Schaer-Zammaretti P., Cavadini C. 2003. European Patent Application. European Patent Office. Bulletin 2003/38

Vedamuthu E.R., M. Raccach, Bonita A. Glatz, E.W. Seitz y M.S. Reddy. 1992. Acid-Producing Microorganisms. *In*: C. Vanderzant and D. Splittstoesser (Ed) Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods. Third Edition. Washington, United States, American Public Health Association P. 229 - 232

7. ANEXOS

Anexo 1. Metodología de estudio preliminar detallada.

Prueba: Aislamiento y crecimiento de cepa

L. casei fue aislado de una muestra de yogur (Dos Pinos), se mezclaron 10 g de yogur con 90 mL de agua peptonada, de esta solución se realizaron las diluciones 10^{-1} hasta 10^{-8} . Las últimas cuatro diluciones fueron sembradas en agar Man, Rogosa and Sharp (Criterion Lactobacilli broth MRS) y se dejaron en la incubadora (Fisher Scientific) por 48 horas a 37°C. Los cultivos madres fueron preparados mezclando una UFC extraída del plato petri y depositada en 10 mL de caldo MRS e incubado a 37°C por 24 horas en condiciones aeróbicas, para crecimiento de células. Después del periodo de incubación, la bacteria fue cosechada y doblemente lavada con agua peptonada por el método de centrifugación (Thermo Scientific modelo Survall ST 16 R centrifuge) a $2500 \times g$ por 30 minutos a 4°C. Los pellets fueron suspendidos con 20 mL de agua peptonada (0.1%) estéril.

Prueba: Encapsulación de *L. casei* con goma xanthan por técnica de extrusión

En el estudio se probó la efectividad y manejo de la goma xanthan endurecida con una solución de CaCl_2 (cloruro de calcio) a concentración de 0.1 M, de acuerdo a como se especifica en el estudio de Soma y Lo (2009). Un volumen de 4 mL de la suspensión activa de las células probióticas se adicionó a una solución de (1.2% p/v) de goma xanthan, para llegar a una concentración final de 1% de la misma. De la mezcla con células vivas de por lo menos $6 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ se tomaron 20 mL, estos fueron agregados a 100 mL de cloruro de calcio (solución al 0.1 M) usando una jeringa operada manualmente como gotero, con una aguja de diámetro 0.7 mm.

Los probióticos encapsulados permanecieron en cloruro de calcio por 40 minutos a temperatura ambiente con agitación continua para evitar coalescencia y reticulación de las partículas. Las cápsulas fueron filtradas en gasa, filtro de café y manta, finalmente fueron lavadas con agua des ionizada estéril. Para fortalecer las cápsulas elaboradas se suspendieron en 50 mL de agua des ionizada y posteriormente se adicionaron 10 mL de solución con goma xanthan al 0.1%. Se dejaron reposar con agitación continua por 30 minutos, posteriormente fueron filtradas en un filtro de café, para finalmente ser lavadas con agua des ionizada.

Prueba: Condiciones de crecimiento de *L.casei* 431[®] Juice

En esta prueba se utilizó el probiótico comercial *L.casei* 431[®] Juice (donado por Chr Hansen[®]) al cual se aplicaron tres métodos de crecimiento. El primero fue: inocular 1 g de cultivo en 100 mL de caldo MRS, e incubado durante 48 hrs a 37°C Este método se desarrolló en dos momentos, en la hora cero se aplicó 1 g de cultivo en 100 mL de caldo MRS y se incubó durante 24 horas, al final de las 24 se realizó una resiembra para lo cual se tomaron 10 mL del inóculo inicial, es decir del incubado, y se le añadieron 100 mL de caldo MRS, se incubó por 24 horas más para completar las 48 horas, para posteriormente realizar los recuentos de ambos inóculos.

El segundo método consistió en inocular 0.1 g de cultivo láctico en 10 mL de agua peptonada y fueron vertidos en un erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de agar MRS, más perlas de vidrio estériles para poder agitarlo. Su incubación se realizó utilizando un recipiente cerrado herméticamente para consumir el oxígeno e impedir penetración de oxígeno hacia la bacteria durante un periodo de 48 horas.

Se realizó un tercer método en el cual se inocularon dos frascos, cada uno con 100 mL de caldo MRS y 1 g de cultivo láctico, las muestras se incubaron a 37°C durante cuatro y ocho horas respectivamente. Se realizaron conteos a ambos inóculos de esta manera se determinó que el mejor método de crecimiento fue este último con cuatro horas de incubación.

Hoja de Evaluación Sensorial: Jugo Funcional de Guayaba

Nombre: _____

Instrucciones

- Evalúe la Color y Olor antes de probar cada muestra, marque con una X el cuadrado indicando su grado de aceptación para cada uno de los atributos. Déjenos comentarios, Serán de gran utilidad en el estudio.
- Limpie su paladar con agua y galleta antes de probar cada muestra y **AGITE ANTES DE BEBERLA.**

Muestra: _____

	Me desagrada extremadamente	Me desagrada mucho	Me desagrada moderadamente	Me desagrada poco	Ni me agrada ni me desagrada	Me agrada poco	Me agrada moderadamente	Me agrada mucho	Me agrada extremadamente
Atributos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Olor									
Color									
Textura									
Sabor									
Acidez									
Aceptación general									

Observaciones y comentarios sobre los atributos:

Muestra: _____

	Me desagrada extremadamente	Me desagrada mucho	Me desagrada moderadamente	Me desagrada poco	Ni me agrada ni me desagrada	Me agrada poco	Me agrada moderadamente	Me agrada mucho	Me agrada extremadamente
Atributos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Olor									
Color									
Textura									
Sabor									
Acidez									
Aceptación general									

Observaciones y comentarios sobre los atributos:

¿El atributo en el que más percibió diferencias fué? _____

¿Qué muestra le gusto más? _____

Anexo 2. Boleta de evaluación sensorial utilizada en el estudio.

Anexo 3. Cuadro de salida del análisis estadístico realizado es SAS® para viabilidad y análisis sensorial

Viabilidad: Concentración de bacteria a través del tiempo

```

data viabilidad;
input trt $ tiempo concentracion rep;
datalines;
Libre      0      7.9    1
Libre      4      6.74   1
Libre     24      5.94   1
Libre     72      5.00   1
Libre    184      4.17   1
Encapsulado 0      8.94   1
Encapsulado 4      8.71   1
Encapsulado 24      7.78   1
Encapsulado 72      7.85   1
Encapsulado 184     6.81   1
Libre      0      7.9    2
Libre      4      6.41   2
Libre     24      6.81   2
Libre     72      4.59   2
Libre    184      2.53   2
Encapsulado 0      7.89   2
Encapsulado 4      8.20   2
Encapsulado 24      8.15   2
Encapsulado 72      8.20   2
Encapsulado 184     6.94   2
Libre      0      8.03   3
Libre      4      6.00   3
Libre     24      5.34   3
Libre     72      3.66   3
Libre    184      2.15   3
Encapsulado 0      8.27   3
Encapsulado 4      7.60   3
Encapsulado 24      7.57   3
Encapsulado 72      8.08   3
Encapsulado 184     7.43   3
;
proc glm;
class trt rep tiempo;
model concentracion = trt rep tiempo trt*rep trt*tiempo tiempo*rep;
test h=trt e=trt*rep;
means trt/tukey;
lsmeans trt*tiempo/stderr pdiff;
run;

```

The GLM Procedure

Dependent Variable: **concentración**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	21	92.51592333	4.40552016	15.22	0.0003
Error	8	2.31637333	0.28954667		
Corrected Total	29	94.83229667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	concentracion Mean
0.975574	8.007769	0.538095	6.719667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	41.41875000	41.41875000	143.05	<.0001
rep	2	1.65708667	0.82854333	2.86	0.1155
tiempo	4	33.57138000	8.39284500	28.99	<.0001
trt*rep	2	0.64406000	0.32203000	1.11	0.3748
trt*tiempo	4	13.58356667	3.39589167	11.73	0.0020
rep*tiempo	8	1.64108000	0.20513500	0.71	0.6813

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	41.41875000	41.41875000	143.05	<.0001
rep	2	1.65708667	0.82854333	2.86	0.1155
tiempo	4	33.57138000	8.39284500	28.99	<.0001
trt*rep	2	0.64406000	0.32203000	1.11	0.3748
trt*tiempo	4	13.58356667	3.39589167	11.73	0.0020
rep*tiempo	8	1.64108000	0.20513500	0.71	0.6813

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for trt*rep as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	41.41875000	41.41875000	128.62	0.0077

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for concentracion

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error Mean Square	0.289547
Critical Value of Studentized Range	3.26115
Minimum Significant Difference	0.4531

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	trt
A	7.8947	15	Encapsul
B	5.5447	15	Libre

Least Squares Means

trt	tiempo	concentracion LSMEAN	Standard Error	LSMEAN Pr > t	Number
Encapsul	0	8.36666667	0.31066953	<.0001	1
Encapsul	4	8.17000000	0.31066953	<.0001	2
Encapsul	24	7.83333333	0.31066953	<.0001	3
Encapsul	72	8.04333333	0.31066953	<.0001	4
Encapsul	184	7.06000000	0.31066953	<.0001	5
Libre	0	7.94333333	0.31066953	<.0001	6
Libre	4	6.38333333	0.31066953	<.0001	7
Libre	24	6.03000000	0.31066953	<.0001	8
Libre	72	4.41666667	0.31066953	<.0001	9
Libre	184	2.95000000	0.31066953	<.0001	10

Least Squares Means for effect trt*tiempo
Pr > |t| for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j)

Dependent Variable: concentracion

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.6663	0.2594	0.4828	0.0178	0.3635	0.0020	0.0007	<.0001	<.0001
2	0.6663		0.4655	0.7804	0.0355	0.6199	0.0036	0.0012	<.0001	<.0001
3	0.2594	0.4655		0.6455	0.1164	0.8086	0.0109	0.0034	<.0001	<.0001
4	0.4828	0.7804	0.6455		0.0556	0.8257	0.0054	0.0018	<.0001	<.0001
5	0.0178	0.0355	0.1164	0.0556		0.0792	0.1621	0.0471	0.0003	<.0001
6	0.3635	0.6199	0.8086	0.8257	0.0792		0.0075	0.0024	<.0001	<.0001
7	0.0020	0.0036	0.0109	0.0054	0.1621	0.0075		0.4445	0.0021	<.0001
8	0.0007	0.0012	0.0034	0.0018	0.0471	0.0024	0.4445		0.0063	0.0001
9	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	<.0001	0.0021	0.0063		0.0103
10	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	0.0103	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned

ANÁLISIS SENSORIAL

The SAS System 22:00 Wednesday, October 7, 2013 984

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
trt	2	326 610
panelista	60	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55
 56 57 58 59 60

Number of Observations Read 120
 Number of Observations Used 120

The GLM Procedure

Dependent Variable: **olor**

Source	Sum of				
	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	60	206.3333333	3.4388889	4.47	<.0001
Error	59	45.3666667	0.7689266		
Corrected Total	119	251.7000000			

R-Square Coeff Var Root MSE olor Mean
 0.819759 13.38755 0.876885 6.550000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	1.6333333	1.6333333	2.12	0.1503
panelista	59	204.7000000	3.4694915	4.51	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	1.6333333	1.6333333	2.12	0.1503
panelista	59	204.7000000	3.4694915	4.51	<.0001

The SAS System 22:00 Wednesday, October 7, 2013 986

The GLM Procedure

Dependent Variable: **color**

Source	Sum of				
	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	60	260.3666667	4.3394444	4.55	<.0001
Error	59	56.3000000	0.9542373		
Corrected Total	119	316.6666667			

R-Square Coeff Var Root MSE color Mean
 0.822211 15.42396 0.976851 6.333333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	2.7000000	2.7000000	2.83	0.0978
panelista	59	257.6666667	4.3672316	4.58	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	2.7000000	2.7000000	2.83	0.0978
panelista	59	257.6666667	4.3672316	4.58	<.0001

The SAS System 22:00 Wednesday, October 7, 2013 987

The GLM Procedure

Dependent Variable: **textura**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	60	238.6000000	3.9766667	3.73	<.0001
Error	59	62.8666667	1.0655367		
Corrected Total	119	301.4666667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	textura Mean
0.791464	16.04531	1.032248	6.433333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	0.1333333	0.1333333	0.13	0.7248
panelista	59	238.4666667	4.0418079	3.79	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	0.1333333	0.1333333	0.13	0.7248
panelista	59	238.4666667	4.0418079	3.79	<.0001

The GLM Procedure

Dependent Variable: **sabor**

Source	Sum of				
	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	60	229.4666667	3.8244444	5.94	<.0001
Error	59	38.0000000	0.6440678		
Corrected Total	119	267.4666667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	sabor Mean
0.857926	11.57507	0.802538	6.933333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	0.0000000	0.0000000	0.00	1.0000
panelista	59	229.4666667	3.8892655	6.04	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	0.0000000	0.0000000	0.00	1.0000
panelista	59	229.4666667	3.8892655	6.04	<.0001

Dependent Variable: **acidez**

Source	Sum of				
	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	60	261.1666667	4.3527778	5.53	<.0001
Error	59	46.4250000	0.7868644		
Corrected Total	119	307.5916667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	acidez Mean
0.849069	13.52560	0.887054	6.558333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	0.0750000	0.0750000	0.10	0.7586
panelista	59	261.0916667	4.4252825	5.62	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	0.0750000	0.0750000	0.10	0.7586
panelista	59	261.0916667	4.4252825	5.62	<.0001

Dependent Variable: **aceptacion**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	60	116.1666667	1.9361111	3.88	<.0001
Error	59	29.4250000	0.4987288		
Corrected Total	119	145.5916667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	aceptacion Mean
0.797894	9.934922	0.706207	7.108333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	0.0750000	0.0750000	0.15	0.6996
panelista	59	116.0916667	1.9676554	3.95	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	1	0.0750000	0.0750000	0.15	0.6996
panelista	59	116.0916667	1.9676554	3.95	<.0001

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **olor**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	59
Error Mean Square	0.768927
Critical Value of Studentized Range	2.82992
Minimum Significant Difference	0.3204

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	trt
A	6.6667	60	610
A			
A	6.4333	60	326

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **color**

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	59
Error Mean Square	0.954237
Critical Value of Studentized Range	2.82992

Minimum Significant Difference 0.3569

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	trt
A	6.4833	60	610
A			
A	6.1833	60	326

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **textura**

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	59
Error Mean Square	1.065537
Critical Value of Studentized Range	2.82992
Minimum Significant Difference	0.3771

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	trt
A	6.4667	60	610
A			
A	6.4000	60	326

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **sabor**

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	59
Error Mean Square	0.644068
Critical Value of Studentized Range	2.82992
Minimum Significant Difference	0.2932

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	trt
A	6.9333	60	326
A			
A	6.9333	60	610

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **acidez**

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	59
Error Mean Square	0.786864
Critical Value of Studentized Range	2.82992
Minimum Significant Difference	0.3241

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	trt
A	6.5833	60	326
A			
A	6.5333	60	610

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **acceptacion**

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	59
Error Mean Square	0.498729
Critical Value of Studentized Range	2.82992
Minimum Significant Difference	0.258

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	trt
A	7.1333	60	610
A			
A	7.0833	60	326