

**Evaluación de alginato de sodio en la  
encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en  
yogur sin sabor**

**Andrés Sebastián Défaz Gavilanes  
Juan Fernando Moreira Cálix**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogur sin sabor**

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

**Andrés Sebastián Défaz Gavilanes  
Juan Fernando Moreira Cálix**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2017

## **Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogur sin sabor**

**Andrés Sebastián Défaz Gavilanes  
Juan Fernando Moreira Cáliz**

**Resumen.** La baja supervivencia de probióticos en productos lácteos genera mayor interés en técnicas como la encapsulación para poder asegurar que la concentración viable se mantenga durante toda la vida útil del producto. Se evaluó la encapsulación de *L. plantarum* como método para mejorar su supervivencia en el yogur sin sabor. El experimento consistió de dos fases, la primera fue la caracterización de las cápsulas y resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas y en la segunda fase se calculó la viabilidad del microorganismo al igual que la viscosidad y acidez del yogur a los 0, 15 y 30 días. La viabilidad consistió en realizar conteos microbiológicos a lo largo de la vida útil del yogur y comparar cómo se reducía la concentración del probiótico libre y encapsulado. La acidez y viscosidad del yogur con bacteria libre se comparó contra la del encapsulado. Al final del experimento se realizó un análisis sensorial para evaluar si las cápsulas eran detectables. Después de 30 días de almacenamiento a 4 °C las cápsulas con *L. plantarum* mantuvieron una concentración dentro de la dosis viable de 6.03 Log UFC/g, mejorando significativamente la supervivencia en comparación al yogur con probiótico libre ( $P < 0.05$ ). La elevada población bacteriana libre incremento significativamente la acidez y viscosidad a través el tiempo ( $P < 0.05$ ). El análisis sensorial demostró que el consumidor sí logró detectar las cápsulas, afectando de manera negativa las características sensoriales del yogur.

**Palabras clave:** Gelificación iónica, probiótico, supervivencia, viabilidad.

**Abstract.** The low survival of probiotics in dairy products generates major interest in techniques such as encapsulation, in order to make sure that the viable dosis is maintained throughout the shelf-life of the product. This study evaluated how the encapsulation of *L. plantarum* affected its survival inside flavorless yogurt. The experiment was made up of two phases, the first consisted of characterizing the capsules and evaluating their resistance to simulated gastrointestinal conditions and in the second phase, viability of the microorganism as well as the viscosity and acidity of the yogurt were evaluated at 0, 15, and 30 days. The viability tests consisted in carrying out microbiological counts throughout the yogurt's shelf-life and comparing how the concentration of the free and encapsulated probiotic was reduced. The acidity and viscosity of the yogurt with free bacteria was compared to that of the encapsulated bacteria. At the end of the experiment a sensory analysis was carried out in order to evaluate if the capsules were detectable. After 30 days of storage at 4 °C the capsules maintained a concentration within the limits of the viable dosis of 6.03 Log CFU/g, improving significantly the survival in comparison to the yogurt with free probiotic ( $P < 0.05$ ). The elevated free microbial population increased significantly the acidity and viscosity throughout time ( $P < 0.05$ ). The sensory analysis demonstrated that the consumer is able to detect the capsules, affecting in a negative manner the sensory characteristics of the yogurt.

**Key words:** Ionic gelation, probiotic, survival, viability.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>18</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>19</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>20</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>23</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diseño experimental Fase I. ....	5
2. Diseño experimental Fase II. ....	7
3. Efecto de cápsulas de alginato en simulación del tracto gastrointestinal. ....	11
4. Supervivencia de <i>L. plantarum</i> y cultivo de yogur, en yogur sin sabor (Log UFC/g). ....	12
5. Conteo de Bacterias Ácido Lácticas (Log UFC/g). ....	12
6. Análisis de viscosidad en yogur sin sabor(Pa.s). ....	13
7. Análisis de % ATECAL en yogur sin sabor. ....	14
8. Características físicas de las cápsulas en alginato de sodio. ....	17

Figuras	Página
1. Flujo de proceso para la elaboración de yogur sin sabor. ....	6
2. Eficiencia de encapsulación de <i>L. plantarum</i> . ....	10
3. Prueba de preferencia (P<0.05). ....	16

Anexos	Página
1. Boleta de evaluación sensorial para análisis de preferencia. ....	23
2. Resultados del análisis (Chi-cuadrado) de la muestra con mayor preferencia. ....	24
3. Resultados del análisis (Chi-cuadrado) de la muestra con menor preferencia. ....	25
4. Cuadros de salida de análisis estadístico SAS®. ....	26
5. Análisis de costos. ....	27
6. Correlaciones. ....	28

## 1. INTRODUCCIÓN

La fermentación ácido láctica ha sido utilizada dentro de la industria láctea durante mucho tiempo para proveerle características sensoriales a los productos, como incremento de acidez y de viscosidad. Los principales responsables de llevar a cabo dicha fermentación son las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales consumen lactosa y producen ácido láctico, el cual es secretado al medio reduciendo el pH del producto (Zhang y Cai 2014). Esta acidificación facilita la digestión de los productos debido a la reducción de lactosa, reducción de triglicéridos a péptidos más cortos y reducción de cadenas de amino ácidos. Todo producto lácteo, por su naturaleza contiene BAL pero para acelerar el proceso se agregan microorganismos específicos, dependientes de las características que se buscan producir (Zhang y Cai 2014). Generalmente la concentración de estos microorganismos se reduce luego de la acidificación, debido a la disminución de lactosa. Los microorganismos que logran sobrevivir y llegar al tracto gastrointestinal del consumidor generan diversos beneficios a la salud del mismo, estos microorganismos son conocidos como probióticos.

Los probióticos son beneficiosos a la salud porque mejoran la flora intestinal, estableciendo un balance en la microbiota intestinal parecido al que existe en infantes recién nacidos. Al nacer, el intestino está colonizado principalmente por bifidobacterias, por esta razón las bacterias ácido lácticas son una buena alternativa para tratar de reestablecer el balance de la microbiota intestinal (Charalampopoulos y Rastall 2009). Las BAL que llegan al intestino consumen mucha de la lactosa residual que se encuentre dentro del tracto gastrointestinal, ayudando a las personas intolerantes a lactosa a poder digerir más fácilmente productos lácteos. Dentro del colón se pueden encontrar enzimas pre carcinogénicas, dichas enzimas son removidas más rápidamente gracias a la acción de probióticos, consecuentemente reduciendo la incidencia de cáncer de colón. Cuando existe una mayor concentración de probióticos que otros microorganismos, se reduce la incidencia de patógenos intestinales al generar competencia y producción de compuestos antimicrobianos. Los beneficios son tan importantes que esto ha generado un gran auge en la industria láctea por incrementar la producción de productos con altas concentraciones de probióticos (Caicedo 2010).

Para poder generar estos beneficios al consumidor las BAL deben no solamente llegar hasta el intestino sino también hacerlo en una concentración viable. Esta concentración viable es de  $10^6$ - $10^7$  UFC/g de producto (Martínez *et al.* 2015). La mayoría de los productos con probióticos no tienen la concentración viable al ser consumidos, esto debido a que los cambios de pH y temperatura desde su elaboración hasta el consumo aceleran la mortalidad de los microorganismos. Estos cambios pH y temperatura son ocasionados principalmente por las frecuentes pérdidas de la cadena del frío. La significativa reducción de la población de probióticos genera una grave falla en el propósito de su dosificación

dentro del producto, ya que el consumidor consume el producto principalmente por los beneficios que le generará, y sin la dosis adecuada estos beneficios no ocurren (Stahl *et al.* 2008).

Uno de los posibles métodos de mejorar la supervivencia de los probióticos en los productos es la micro encapsulación. Esta técnica consiste en encerrar sólidos, líquidos o gases dentro de micro cápsulas para luego liberar este contenido a cierta velocidad y en determinadas condiciones. Dichas cápsulas hacen más resistentes a los probióticos a cambios de pH y temperatura debido a que mantienen un microambiente dentro de la cápsula ideal para que sobrevivan (Anal y Singh 2007). Al realizar una encapsulación de probióticos se busca que gracias a este incremento en supervivencia la concentración de probióticos se mantenga con vida dentro del producto y se liberen las cápsulas junto con los probióticos dentro del organismo a una cantidad igual o mayor a la concentración viable. Las cápsulas dentro del organismo deben de poder resistir también los jugos gástricos del estómago y liberar su contenido en el intestino, ya que es en esta área donde los probióticos se podrán reproducir (Yanniotis *et al.* 2013).

Para una micro encapsulación eficiente los materiales encapsulantes deben ser sustancias capaces de formar estructuras alrededor de los compuestos bioactivos (núcleo), llamadas paredes, las cuales protejan al núcleo contra el deterioro y posteriormente ocurra una liberación bajo condiciones deseadas (Yanniotis *et al.* 2013). De igual manera, uno de los polímeros más empleados en esta técnica es el alginato, el cual forma una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica para la protección de componentes activos, células o microorganismo sensibles al calor, pH, oxígeno, luz entre otros factores que los alimentos son expuestos durante el procesamiento y almacenamiento (González *et al.* 2012). Por lo cual, la presente investigación estará enfocada en mejorar la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* en yogur utilizando un medio encapsulante a base alginato de sodio gelificado mediante un secado por aspersión, para posteriormente evaluar la estabilidad de las cápsulas. Los objetivos de este estudio fueron:

- Determinar el tamaño de las cápsulas de alginato de sodio con *Lactobacillus plantarum* y su resistencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.
- Comparar la viabilidad del *Lactobacillus plantarum* libre y encapsulado con alginato de sodio en el yogur sin sabor.
- Evaluar las características físico-químicas y sensoriales del yogur inoculado con cápsulas de alginato de sodio conteniendo *Lactobacillus plantarum*.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### **Ubicación.**

El presente estudio se realizó en la Planta de Lácteos, Laboratorio de Análisis de Alimentos y el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano ubicada en el km 30, carretera a Danlí., departamento de Francisco Morazán, Tegucigalpa, Honduras.

### **Materia prima.**

Se utilizó leche entera estandarizada al 2.5% de grasa, cultivo termófilo FD-DVS Yoflex® Mild 1.0: *Lactobacillus delbruekii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, leche descremada en polvo de Concadal®, estabilizador para yogurt 7915-A de Cosco®, azúcar, sorbato de potasio y cultivo liofilizado de *Lactobacillus plantarum* BG 112.

### **Equipo.**

Marmita MKDT/20 T Cleveland Range Ltd, termómetro digital, balanza de precisión YP8100, Yamato®, vortex, incubadora, baño maría, potenciómetro, Reómetro Brookfield, Thermo Scientific modelo Sourvall ST 16R centrifuge.

### **Fase I. Caracterización de cápsulas y evaluación de su resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas.**

**Estudios preliminares.** Con el fin de establecer la técnica más apropiada de encapsulación del *L. plantarum* se determinaron las condiciones de crecimiento del mismo en leche estéril, con el fin de llegar a una concentración de 8 Log UFC/mL. Esto se logró mediante una centrifugación y posterior rehidratación del pellet.

**Inoculación de leche.** Se utilizaron muestras de 100 mL de leche semi-descremada Zamorano en frascos de vidrio para esterilizar a 121 °C por 15 minutos a 15 PSI/slow, asegurando una matriz libre de BAL propias de los productos lácteos. Una vez que se temperó la leche estéril, se inoculó con 0.05% del cultivo liofilizado de *L. plantarum* BG 112. La mezcla fue homogenizada y distribuida en cuatro tubos de centrifuga, esto para su posterior uso. La incubación fue a 37 °C por 20 horas para llegar a 8 Log UFC/mL. Una vez que se cumplió el tiempo establecido se observó una coagulación de la leche como resultado del crecimiento bacteriano. Esta leche se agitó para que se encontrara de manera líquida de nuevo.

**Concentración de células (probióticos).** Para la concentración del *L. plantarum* se usó la centrifuga (Thermo Scientific modelo Sourvall ST 16R centrifuge) a 2500 RPM / 4 °C / 1 h ora (De La Cruz y Terán 2013). Se distribuyó 25 mL de leche inoculada en cada tubo para un total de cuatro tubos con leche inoculada y cuatro tubos adicionales con agua destilada para equilibrar el peso. Debido a la concentración se formó un pellet con 8 Log UFC/mL como fase estacionaria, el sobrenadante formado en la parte superior fue removido y desechado con una micropipeta. Los pellets fueron rehidratados con 100 mL de agua peptona estéril al 0.1%.

**Formación de las cápsulas de alginato de sodio con *Lactobacillus plantarum* mediante gelificación iónica.** Se suspendió 10 mL de la leche inoculada centrifugada sobre una solución acuosa de 100 mL de alginato de sodio al 2% (p/v). Con el uso de una jeringa con una aguja de diámetro 0.7 mm (22G) se adicionó la mezcla mediante goteo a 100 mL de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a 100 mM con una velocidad de goteo promedio de 2.89887 cápsulas/segundo. Esta solución permaneció en agitación constante durante 30 minutos para generar una forma esférica debido a la gelificación instantánea que ocurre por la interacción entre el alginato de sodio y el cloruro de calcio.

**Liberación de cápsulas de alginato de sodio con *Lactobacillus plantarum*.** Para destruir la red formada por el alginato se sumergió 2 g de cápsulas en una solución de 100 mL de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) a 55 mM, la cual se encontraba en constante agitación durante 30 minutos (Medina y Parra 2012).

**Eficiencia de encapsulación de probiótico.** Para determinar la eficiencia de encapsulación de *L. plantarum* en las suspensiones, el material encapsulado tuvo recuentos expresados en Log UFC/g para cada condición experimental. Estos recuentos fueron llevados a cabo por medio de siembras en agar MRS.

Se evaluaron mediante la ecuación 1 donde describe eficiencia de encapsulación de los probióticos:

$$\text{Eficiencia} = (N/N_0) * 100 \quad [1]$$

N = Logaritmo de número de células viables encapsuladas

$N_0$  = Logaritmo de número de células viables inoculadas

(Montes 2013).

**Simulación del tracto gastrointestinal.** Se utilizó un modelo convencional para determinar la resistencia y liberación de las cápsulas en el tracto gastrointestinal. La simulación del sistema digestivo conlleva tres fases; gástrica, entérica y entérica final. Para la primera fase se utiliza NaCl (0.35 g / 100 mL) y pepsina (0.165 g / 100 mL) (Cuadro 1). Se ajustó el pH en un rango de 1 a 3 con HCl al 0.1 M. La segunda fase o fase entérica usa NaCl (0.65 g / 100 mL), KCl (0.08 g / 100 mL),  $\text{CaCl}_2$  (0.02 g / 100 mL) y  $\text{NaHCO}_3$  (0.14 g / 100 mL). El pH necesario es de 6 a 8. Para la tercera fase o entérica final se utilizan las mismas soluciones, pero con un pH de 6.7 a 7.5. Se introducen 2 g de cápsulas para la solución gástrica (fase 1) y se incuba por un tiempo de 120 min a una temperatura de  $37 \pm 1$  °C (Jiménez y Juárez 2013). Posteriormente se cosechan las cápsulas con un tamiz y se

lavan con agua destilada para tomar nuevamente el peso y ver su efecto. Se suspenden en la nueva solución (fase 2). Se repite el proceso con la fase 3 hasta cumplir un total de 6 horas (120 min/solución). Al inicio y al final de cada fase se determinó el peso de las cápsulas y los resultados fueron expresados en porcentaje de peso restante (González y Hernández 2006).

**Diseño experimental.** Para determinar si hubo diferencias significativas en la pérdida de peso en porcentaje se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres repeticiones y tres tratamientos, siendo cada fase un tratamiento. Se utilizó una separación de medias Tukey con una probabilidad de significancia del 5%, con el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.1) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental fase I.

<b>Tratamiento</b>	<b>Horas</b>	<b>Descripción</b>
Fase 1	0 – 2	Fase Gástrica
Fase 2	2 – 4	Fase Entérica
Fase 3	4 - 6	Fase Entérica Final

**Fase II. Comparación de la viabilidad, análisis físico, químicos y sensoriales de yogur sin sabor con *L. plantarum* libre y encapsulado.**

**Preparación de la mezcla para yogurt natural.** Para la elaboración del yogur sin sabor se estandarizó leche entera al 2.5% de grasa con la cual se hizo un precalentamiento aproximadamente a los 42 °C para la pre-mezcla en la cual se pesaron los ingredientes. Seguido a esto se procedió a pasteurizar la mezcla a una temperatura de 85°C por un tiempo de 30 minutos y homogenizar a 140.61 kg/cm<sup>2</sup>. El pre enfriamiento nos dio las condiciones adecuadas para los cultivos lácticos e inocular junto con el probiótico a una temperatura de 45 °C. Luego, se llevó al cuarto frío para reducir su temperatura a 4 °C y al romper el coágulo formado en la leche. Se adicionó el sorbato de potasio el cual ayuda a prolongar la vida de anaquel. Finalmente, para su almacenamiento se colocó en un cuarto frío a 4 °C (Figura 1).

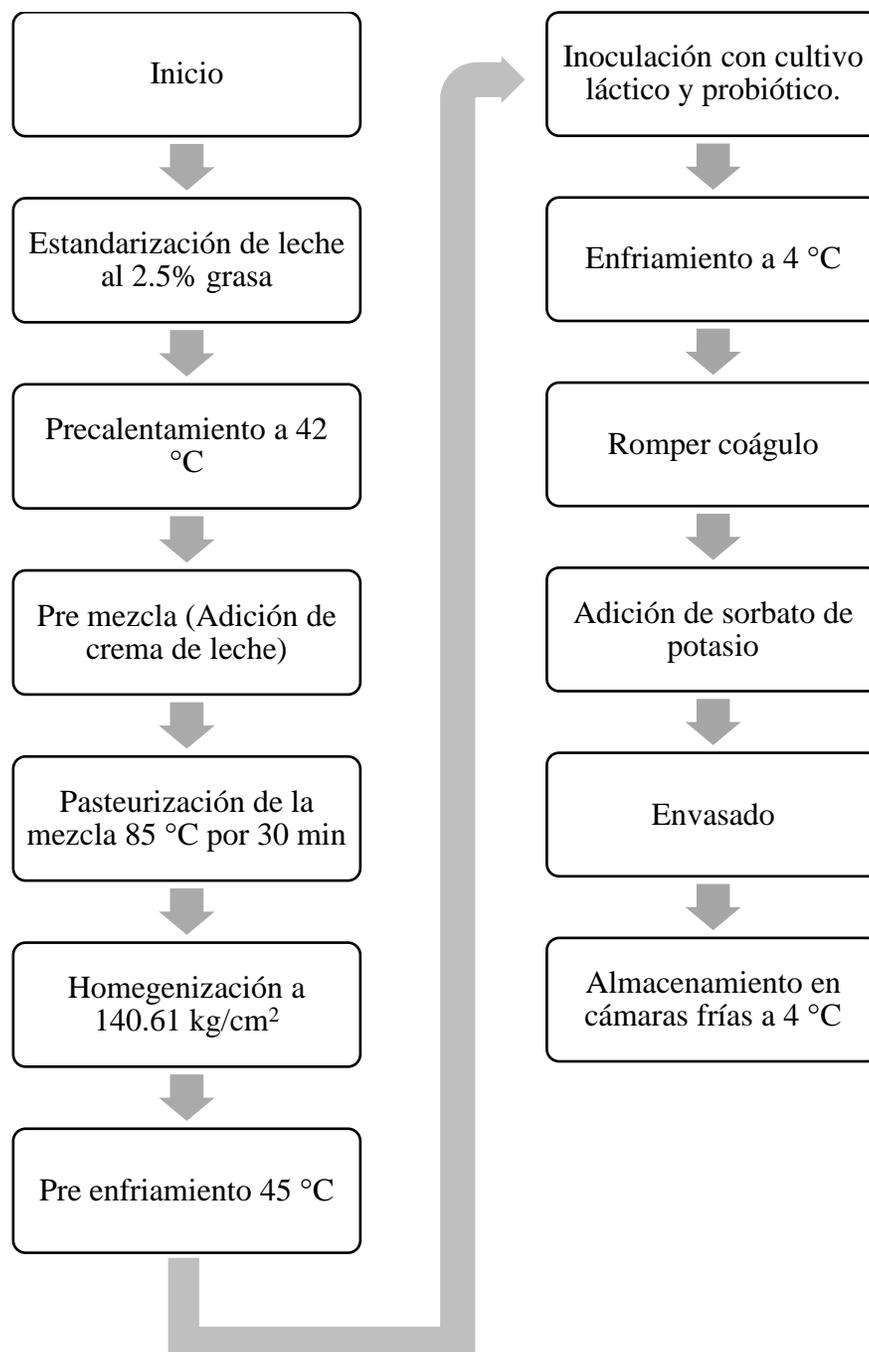


Figura 1. Flujo de proceso para la elaboración de yogur sin sabor.

**Incorporación y recuento de *Lactobacillus plantarum* BG 112 encapsulado y libre en yogur sin sabor Zamorano.** La metodología empleada para el recuento basado en la vida de anaquel del yogur de 30 días. Para determinar la viabilidad del *L. plantarum*, se hicieron conteos microbiológicos con el fin de garantizar que la dosis requerida por el consumidor se encontrara dentro del rango estimado. Se ha observado que en la mayoría de estudios investigados la concentración de probióticos utilizada está entre  $10^8$ - $10^9$  UFC/mL

encontrándose por arriba de las recomendaciones y sugerencias de la federación internacional de lácteos, que señala que por lo menos  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL en el producto hasta la fecha mínima de vencimiento (Martínez *et al.* 2015).

Se evaluaron las cápsulas conformadas por *L. plantarum* y su forma libre en yogur sin sabor Zamorano (Cuadro 2). El experimento fue evaluado con tres medidas repetidas en el tiempo a los días 0, 15 y 30. Se preparó muestras de 100 g de yogur en base a la formulación que maneja la planta de lácteos de Zamorano. Para el tratamiento 1 se adiciono 10 g de cápsulas a una concentración de 6 Log UFC/g. El tratamiento 2 se obtuvo a partir de 1 g de *L. plantarum* puro el cual se encontraba a 12 Log UFC/g por lo que se agrega en 100 mL de agua peptonada estéril y de la nueva mezcla se tomó 0.1 mL de bacteria a 100 g de yogur llegando a una concentración final de 6 Log UFC/g.

Para el conteo de las células se tomó 2 g de cápsulas las cuales se obtuvieron del tratamiento 1 (Cuadro 2). Se usó un colador donde se colocaron las cápsulas y luego se lavaron con agua destilada estéril. Estas mismas se adicionaron a 100 mL de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) a 55 mM en donde se liberaban las bacterias. Se tomó 1 mL de la solución de probiótico liberado en citrato de sodio, este se diluyó secuencialmente y fue sembrado en agar MRS utilizando la técnica de vertido en placa con una doble capa. Los platos fueron incubados por 72 horas a  $37 \pm 1$  °C. Para determinar si existía alguna fuga de *L. plantarum* encapsulado al yogur, se evaluó también el yogur en el cual estaban sumergidas las cápsulas. La muestra con bacteria libre y el control fueron diluidos y sembrados en agar MRS, estas muestras se incubaron a  $37 \pm 1$  °C. Posteriormente se efectuaron recuentos microbiológicos para cada muestra.

Cuadro 2. Diseño experimental fase II.

Tratamiento	Descripción
Control	Yogur sin sabor + cultivo de yogur
TRAT 1	Yogur sin sabor + cápsulas de <i>L. plantarum</i> + cultivo de yogur
TRAT 2	Yogur sin sabor + <i>L. plantarum</i> libre +

**Métodos para los análisis físico-químicos.** Se evaluó que tanto influye la adición de cápsulas y probiótico libre en el yogur con análisis físico-químico de cada tratamiento con medidas repetidas en el tiempo.

**Análisis de viscosidad.** Se usó el método ISO 1652:2011 con una muestra de 250 mL en un vaso de precipitado de vidrio de 250 mL, se utilizó el Reómetro de Brookfield DV-III Ultra V6.1 LV con acople LV3 estableciendo cinco puntos para la toma de datos a las velocidades de 20, 40, 60, 80 y 100 RPM. Se midió a una temperatura constante de  $20 \pm 2$  °C (ISO 2011).

**Análisis de Acidez Titulable Expresado como Ácido Láctico (ATECAL).** Para este proceso se usó el método AOAC 942.15, se pesó 9 g de la matriz (yogur) en un vaso de precipitado plástico de color blanco agregando seis gotas de fenolftaleína para titular con

hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N. Se utilizó una bureta graduada colocando gota tras gota paulatinamente sobre la mezcla hasta observar que cambiara de color de blanco a rosado. Se repitió el mismo proceso para cada una de las muestras incluyendo el control con el fin de verificar la producción de ácido láctico en el yogur de cada tratamiento (AOAC 2005).

**Análisis microbiológico.** Se determinó presencia de coliformes totales y fecales para calidad e inocuidad respectivamente.

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ), para una muestra que contenía probiótico libre en yogur sin sabor Zamorano por el método de Número Más Probable. Se utilizó nueve tubos con 9 mL de Caldo Lauril (CL) con campanas de fermentación y tres tubos con 9 mL de agua peptonada para llevar la muestra de una dilución de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ . Para la preparación de la muestra se utiliza una dilución 1:9 (muestra: diluyente). A partir de cada dilución se transfiere 1 mL a cada tubo con CL. Se incuban a  $35 \pm 1$  °C por 24 horas para prueba presuntiva. Todos los tubos negativos son re incubados por 24 horas más para obtener la prueba confirmatoria.

**Análisis sensorial.** Para determinar la preferencia del producto se comparó yogur con probióticos encapsulado, libre y yogur sin sabor Zamorano, donde se evaluó el de mayor preferencia por los panelistas y el de menor preferencia. Se utilizó una población total de 100 personas las cuales se dividieron en tres grupos (33, 33, 34) uno para cada repetición. Las presentaciones de las muestras tuvieron códigos tomados al azar sobre una bandeja plástica en copas de 56.70 g. Con el fin de reducir variabilidad se ordenaron los códigos con las diferentes combinaciones posibles (ABC, BCA, CAB) de manera que cada tratamiento tenga la misma posibilidad de ser el primero (Ramírez *et al.* 2015).

**Diseño experimental.** Para el análisis de las propiedades físico-químicas del yogur, y viabilidad de los microorganismos bioactivos se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con un arreglo factorial de 3 x 3. Se realizaron también tres medidas repetidas en el tiempo a los 0, 15 y 30 días con separación de medias Tukey con una probabilidad de significancia del 5%. Se procedió con tres repeticiones por tratamiento para un total de 27 unidades experimentales. Adicionalmente, se usó una muestra testigo o control. Para evaluar la preferencia del producto se efectuó una Prueba de Chi cuadrado con el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.1).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Fase I. Caracterización de cápsulas y evaluación de su resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas.**

**Pruebas preliminares.** Con la finalidad de establecer un protocolo de encapsulación eficiente se realizaron diversas pruebas preliminares. Inicialmente las bacterias se rehidrataban y se agregaban directamente a la solución de alginato, sin embargo, debido a la viscosidad de la solución los probióticos no lograban distribuirse de manera uniforme. Esto provocaba que al momento de realizar las cápsulas no todas tenían microorganismos por dentro. Para poder solucionar este problema se utilizó leche como medio de incubación para los microorganismos. Luego de completar el proceso de incubación se agregaban 10 mL de leche inoculada a 100 mL de alginato, ambas soluciones siendo exitosamente homogenizadas. El problema ahora recaía en que las cápsulas obtenidas por si solas no contenían la concentración viable de  $10^6$ - $10^7$  UFC/g (6 – 7 Log UFC/g). Al muestrear la leche inoculada se descubrió que contenía una concentración de 6 log y al diluirse en el alginato se redujo hasta 4 log, es decir una pérdida de 2 log. Para poder incrementar la concentración en la leche se incluyó un proceso de centrifugación con una velocidad de 2,500 rpm (De La Cruz y Terán 2013). El proceso se concentró exitosamente elevando la concentración de las bacterias probióticas hasta 8 Log UFC/g, y al ser encapsuladas, el *L. plantarum* se redujo hasta 6 Log UFC/g dentro de las cápsulas. Al ser completadas estas pruebas preliminares fue posible comenzar el experimento.

**Eficiencia de encapsulación.** Para poder medir que tan eficiente fue la encapsulación en capturar a la suspensión de *L. plantarum* se utilizó la ecuación 1 mencionada previamente en la metodología. Considerando que la carga inicial de microorganismos en la leche fue de 8 Log UFC/g y que al finalizar la formación de cápsulas dentro de las cápsulas había una concentración promedio de  $6.11 \pm 0.06$  Log UFC/g la eficiencia de encapsulación fue de un  $76\% \pm 0.69$ . Esto significa que se logró encapsular de manera exitosa el 76% de las células viables dentro de la leche inoculada, lo cual es similar al estudio realizado por De La Cruz y Terán (2013) en donde lograron una eficiencia del 82% (Figura 2). Para poder referenciar como se reducía el microorganismo en comparación con la concentración inoculada al día 0, se midió la eficiencia de encapsulación a los días 15 y 30. Luego de concluir el experimento se determinó que la eficiencia fue significativamente menor entre los días 0 y 15 ( $P < 0.05$ ).

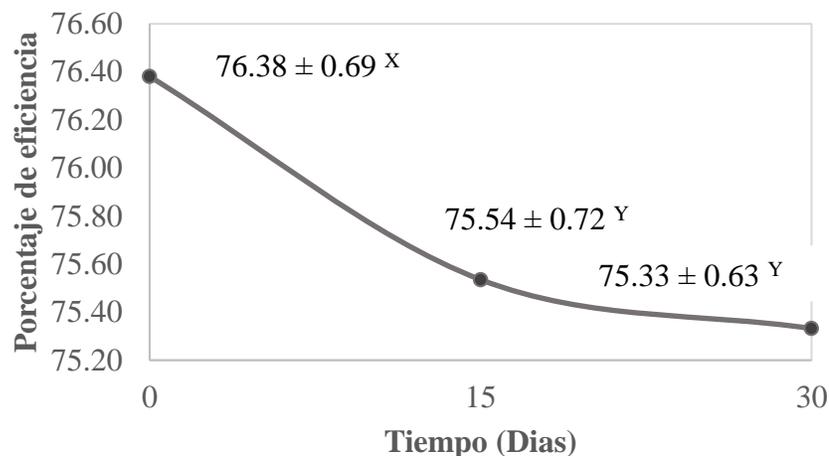


Figura 2. Eficiencia de encapsulación de *L. plantarum*.  
<sup>x-y</sup> Medias con diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

**Simulación del tracto gastrointestinal.** Con el propósito de determinar la viabilidad y la resistencia que proveen las cápsulas se desarrolló el modelo convencional para simular el tracto gastrointestinal. Se observó una reducción significativa en el peso de las cápsulas al final de la Fase 1 (P<0.05) (Cuadro 3). Estudios previos corroboran que cepas como, *Lactobacillus GG* (origen humano) presentan reducciones de 2 log en apenas 15 minutos a pH = 2 (Arcand *et al.* 2005). Esta es la causa por la cual existe pérdida de peso en las primeras 2 horas. Según González y Hernández (2006), los cuales se basaron en estudios previos que demostraron la resistencia del encapsulado con alginato a la digestión gástrica la cual posee en su mayoría HCl y pepsina. Sin embargo, existen cepas que se han logrado detectar en el colon lo cual nos brinda la cantidad adecuada para considerarse como benéfico para la salud, por tal razón a partir de la hora 2 a la 6 las cuales representan la fase entérica y entérica final respectivamente, se mantiene el peso sin mostrar diferencias estadísticas. Métodos de gelificación han logrado incrementar la supervivencia de organismos probióticos utilizando alginato como medio encapsulante. Jiménez y Juárez (2013), corroboran con estudios similares obteniendo la mejor supervivencia en cápsulas con alginato y quitosano. La supervivencia del encapsulado presenta una relación directamente proporcional al diámetro, es decir que a menor diámetro, menor será la supervivencia (Allan *et al.* 2002).

Cuadro 3. Efecto de cápsulas de alginato en simulación del tracto gastrointestinal.

Tiempo (h)	Pérdida de peso (%) Media $\pm$ DE
Control	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
Fase 1	63.67 $\pm$ 5.19 <sup>b</sup>
Fase 2	63.33 $\pm$ 4.71 <sup>b</sup>
Fase 3	58.67 $\pm$ 4.50 <sup>b</sup>
C.V (%)	4.16

C.V: Coeficiente de variación; DE: Desviación estándar.

<sup>a-b</sup> Medias con diferente letra en la misma columna denota diferencias significativas entre fases (P<0.05).

Control: Antes de simulación de tracto gastrointestinal.

Fase 1: 0 – 2 horas. Recuentos estimados después de dos horas.

Fase 2: 2 – 4 horas. Recuentos estimados después de cuatro horas.

Fase 3: 4 – 6 horas. Recuentos estimados después de seis horas.

## Fase II. Comparación de la viabilidad, análisis físico, químicos y sensoriales de yogur sin sabor con *L. plantarum* libre y encapsulado.

**Viabilidad de *L. plantarum* libre y encapsulado.** En promedio los recuentos de *L. plantarum* libre y encapsulado fueron de 6.15 y 6.13 Log UFC/g, respectivamente, durante el día 0 del análisis. Posteriormente las muestras se almacenaron a temperaturas de 4 °C, donde permanecían hasta su siguiente análisis. Durante el muestreo del día 15 se presentó una reducción significativa en el *L. plantarum* libre desde su concentración inicial de 6 Log UFC/g hasta 5.57 Log UFC/g (P<0.05) (Cuadro 4). El *L. plantarum* encapsulado no presentó una disminución significativa en su concentración inicial. Para el último día de muestreo el *L. plantarum* libre y encapsulado presentaron conteos finales de 5.09 y 6.03 Log UFC/g, respectivamente (Cuadro 4). Al mantenerse dentro de la concentración viable de 6 – 7 Log UFC/g a lo largo de la vida útil del yogur, si se considera el *L. plantarum* como un microorganismo probiótico (Martínez *et al.* 2015). A pesar de que ambas disminuciones presentan comportamientos distintos para *L. plantarum* encapsulado no existe diferencia significativa en comparación al conteo del día 15 y para *L. plantarum* libre si existe una diferencia significativa (P<0.05). La supervivencia entre *L. plantarum* encapsulado fue significativamente superior a la del *L. plantarum* libre, evidenciando que la encapsulación sí logro mejorar la supervivencia del microorganismo (P<0.05) (Allan *et al.* 2002). La reducción en la concentración de *L. plantarum* libre se atribuye principalmente a que estos microorganismos son susceptibles al rompimiento de la cadena de frío, mientras que el *L. plantarum* encapsulado es más resistente a estos cambios de temperatura debido a que dentro de las cápsulas se genera un micro ambiente que brinda protección a cambios externos (Anal y Singh 2007; Stahl *et al.* 2008).

Es importante resaltar que para analizar de manera eficiente las muestras que contenían *L. plantarum* encapsulado también se muestreaba el yogur en el que se contenían las cápsulas por si solas. Estos conteos se iban comparando junto con los del control para saber si existía fuga de microorganismos desde las cápsulas. Al realizar este muestreo se descubrió que el control y el yogur conteniendo cápsulas de *L. plantarum* no presentaron diferencias

significativas entre tratamientos en los tres días analizados (Cuadro 5). Las cápsulas por si solas crean un microambiente que permiten que las bacterias sobrevivan pero no para que logren reproducirse significativamente (Anal y Singh 2007).

Cuadro 4. Supervivencia de *L. plantarum* y cultivo de yogur, en yogur sin sabor (Log UFC/g).

Tratamiento	Tiempo		
	Día 0 Media ± DE	Día 15 Media ± DE	Día 30 Media ± DE
TRAT 1	6.11 ± 0.06 <sup>aX</sup>	6.04 ± 0.06 <sup>aX</sup>	6.03 ± 0.05 <sup>aX</sup>
TRAT 2	6.13 ± 0.03 <sup>aX</sup>	5.57 ± 0.03 <sup>bY</sup>	5.09 ± 0.07 <sup>bZ</sup>
C.V (%)	1.41	3.24	6.89

C.V: Coeficiente de variación; DE: Desviación estándar.

<sup>a-b</sup> Medias con diferente letra en la misma columna denota diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

<sup>x-z</sup> Medias con diferente letra en la misma fila denota diferencias significativas entre tiempos (P<0.05).

TRAT 1: *L. plantarum* encapsulado.

TRAT 2: Yogur sin sabor + *L. plantarum* libre + cultivo de yogur.

Cuadro 5. Conteo de Bacterias Ácido Lácticas (Log UFC/g).

Tratamiento	Tiempo		
	Día 0 § Media ± DE	Día 15 § Media ± DE	Día 30 § Media ± DE
Yogur sin sabor con <i>Lactobacillus plantarum</i> encapsulado	4.07 ± 0.13 <sup>X</sup>	4.08 ± 0.10 <sup>X</sup>	3.84 ± 0.11 <sup>X</sup>
Yogur sin sabor	4.12 ± 0.08 <sup>X</sup>	3.87 ± 0.22 <sup>X</sup>	3.35 ± 0.44 <sup>Y</sup>
C.V (%)	2.68	5.82	8.52

C.V: Coeficiente de variación; DE: Desviación estándar.

§ No se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos (P>0.05).

<sup>x-y</sup> Medias con diferente letra en la misma fila denota diferencias significativas entre tiempos (P<0.05).

**Análisis de viscosidad.** La adición de nuevos ingredientes en productos lácteos como yogur que presentan variaciones en sus características físicas y químicas modifican su composición final. Sin embargo, los componentes bioactivos son utilizados para brindar beneficios a la salud razón por la cual es necesario determinar la acción que presentan con base a su viscosidad y acidez (Ramírez *et al.* 2015). Esta variable se midió para cada muestra después de su elaboración con tres repeticiones a los días 0, 15 y 30. Los resultados

del análisis físico se muestran en el Cuadro 6. Con base en los datos, se presentan cambios con una diferencia significativa a lo largo del tiempo incrementando sus valores a partir del día 0 al 30 para cada tratamiento ( $P < 0.05$ ). Este aumento en viscosidad indica un comportamiento no-Newtoniano debido al esfuerzo de corte. La viscosidad, que ocasionan fricción interna, puede haber sido provocada por las microcápsulas agregadas, este comportamiento también se observó en estudios previos (Ramírez *et al.* 2015; González *et al.* 2014) confirmando lo mismo con cambios que presenta la micro encapsulación en el crecimiento de organismos bioactivos incluyendo las posibles interacciones entre grasa y proteína.

El tratamiento con probiótico libre solo presenta diferencia hasta el día 15, Chacon *et al.* (2007), explica que durante los primeros días de almacenamiento en refrigeración (4 °C) ocurre una mejoría en consistencia y viscosidad demostrado con un leve aumento en los valores producto de la tixotropía típica en fluidos no-newtonianos y pseudoplásticos. Los tratamientos con *L. plantarum* libre y encapsulado no son diferentes significativamente ( $P > 0.05$ ) con un comportamiento reofluidificante de acuerdo a experimentos previos (González *et al.* 2014). La muestra control presenta un comportamiento peculiar ya que existe diferencia significativa entre el día 0, 15 y 30 ( $P < 0.05$ ), esto se debe a la proteína que aumenta la velocidad de corte atribuido a la ruptura que existe entre los enlaces de las proteínas de la leche y colisiones moleculares como resultado de la reintegración (Ramírez *et al.* 2015).

Existen diferentes interacciones que influyen directamente en el nivel de viscosidad Zambrano (2008), presenta dos valores de 1.5 y 0.3% para grasa y estabilizador respectivamente. El uso superior a los porcentajes asignado confirma mayor viscosidad en base al tiempo de vida útil del yogur.

Cuadro 6. Análisis de viscosidad en yogur sin sabor (Pa.s).

Tratamiento	Tiempo		
	Día 0 § Media ± DE	Día 15 § Media ± DE	Día 30 § Media ± DE
TRAT 1	0.59 ± 0.21 <sup>X</sup>	0.63 ± 0.34 <sup>X</sup>	0.72 ± 0.06 <sup>Y</sup>
TRAT 2	0.35 ± 0.05 <sup>X</sup>	0.53 ± 0.10 <sup>Y</sup>	0.61 ± 0.05 <sup>Y</sup>
Control	0.43 ± 0.06 <sup>X</sup>	0.62 ± 0.19 <sup>Y</sup>	0.79 ± 0.09 <sup>Z</sup>
<b>C.V (%)</b>	25.89	24.37	13.52

C.V: Coeficiente de variación; DE: Desviación estándar.

§ No se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ).

<sup>X-Z</sup> Medias con diferente letra en la misma fila denota diferencias significativas entre tiempos ( $P < 0.05$ ).

TRAT 1: Yogur sin sabor + *L. plantarum* encapsulado + cultivo de yogur.

TRAT 2: Yogur sin sabor + *L. plantarum* libre + cultivo de yogur.

Control: Yogur sin sabor + cultivo de yogur.

Velocidades: 20, 40, 60 80 y 100 RPM.

Temperatura: 20 ± 2 °C.

**Análisis de acidez.** La acidez del tratamiento con *L. plantarum* libre y del control comenzaron con el mismo valor (0.90 %), el *L. plantarum* encapsulado en cambio comenzó con un valor de 0.81 % ATECAL (Cuadro 7). Esto se debe a que el tratamiento no solamente contenía yogur, sino también cápsulas de alginato, se interpretó que esto fue lo que provocó una lectura diferente entre las muestras. No se presentaron diferencias significativas entre las lecturas del día 0 al día 15 en ninguno de los tratamientos. En el día 30 del análisis todas las muestras presentaron un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) a comparación de sus lecturas anteriores. El incremento de acidez en los tratamientos se puede atribuir a la presencia de bacterias ácido lácticas en el yogur. El tratamiento con *L. plantarum* libre y el control presentaron la mayor acidez de todas las muestras, esto generado por las mismas bacterias ácido lácticas que se encontraban de manera libre en el yogur, estas bacterias como parte de su metabolismo generan ácido láctico, acidificando el yogur (Caicedo 2010). Las muestras con *L. plantarum* encapsulado se esperaba inicialmente que no presentarían incrementos significativos durante el experimento, pero como se mencionó anteriormente sí se presentó dicho incremento significativo de acidez, específicamente entre el día 0 y 30. Este resultado inesperado se atribuye a las mismas bacterias ácido lácticas en el yogur.

Cuadro 7. Análisis de % ATECAL en yogur sin sabor.

Tratamiento	Tiempo		
	Día 0 Media ± DE	Día 15 Media ± DE	Día 30 Media ± DE
TRAT 1	0.81 ± 0.01 <sup>b X</sup>	0.82 ± 0.01 <sup>b X</sup>	0.87 ± 0.01 <sup>b Y</sup>
TRAT 2	0.90 ± 0.01 <sup>a X</sup>	0.90 ± 0.01 <sup>a X</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>a Y</sup>
Control	0.90 ± 0.01 <sup>a X</sup>	0.91 ± 0.01 <sup>a X</sup>	0.95 ± 0.02 <sup>a Y</sup>
<b>C.V (%)</b>	1.04	1.11	1.32

C.V: Coeficiente de variación; DE: Desviación estándar.

<sup>a-b</sup> Medias con diferente letra en la misma columna denota diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

<sup>X-Y</sup> Medias con diferente letra en la misma fila denota diferencias significativas entre tiempos ( $P < 0.05$ ).

TRAT 1: Yogur sin sabor + *L. plantarum* encapsulado + cultivo de yogur.

TRAT 2: Yogur sin sabor + *L. plantarum* libre + cultivo de yogur.

Control: Yogur sin sabor + cultivo de yogur.

**Análisis microbiológicos.** Según el Reglamento Técnico Centro Americano (RTCA) el valor máximo para coliformes fecales no debe ser superior a  $< 3$  NMP /g (RTCA 2009). La muestra tuvo un conteo adecuado y nos indica que es un producto inocuo el cual puede ser consumido y presentado en la evaluación sensorial. Estos resultados nos indican las condiciones bajo las cuales se procesó el yogur y su posterior almacenamiento, cumpliendo con el requerimiento.

**Análisis sensorial.** En el análisis sensorial se determinó el tratamiento con mayor preferencia en base al ordenamiento que proporcionaron los panelistas en el test. El objetivo de la evaluación fue poner a cada uno de los panelistas a ordenar de mayor a menor según el nivel de preferencia para cada muestra codificada, el test indica claramente las instrucciones que deben seguir para evitar variabilidad en los resultados. Las muestras se presentan simultáneamente, una sola vez, se solicitó tomar un pedazo de galleta de soda sin sal y agua antes de dar su criterio (Ramírez *et al.* 2015).

Según los resultados obtenidos sí existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) para uno de los tratamientos, en este caso fue el yogur sin sabor de Zamorano sin la adición de probióticos. El valor  $p$  con un nivel de alfa del 0.05 no será significativamente diferente si es superior (Johnson y Waller 2013). El grado de preferencia entre las tres muestras se presenta en la (Figura 3). La muestra con mayor porcentaje (50%) tuvo una notable diferencia en comparación a las dos muestras restantes.

Debemos tomar en cuenta la amplia variabilidad que se presenta debido a diferentes factores, una de las propiedades consideradas como filtros para preferencia y aceptación están ligadas a la apariencia debido a que pueden suponer anomalías en los atributos de viscosidad como: mecánicos, geométricos y de composición. La razón por la cual la muestra con encapsulado fue la menos aceptada se debe al método utilizado. El método de goteo en conjunto con gelificación iónica provee una marcada sensación de granulosidad en comparación con otros métodos (Reglero 2011). El límite de detección de las cápsulas se verá influenciada dependiendo de la matriz a la cual se agregue, es decir que para cada alimento existe un óptimo de microcápsulas que se pueden añadir sin que sean detectadas, en nuestro experimento el promedio del diámetro de las cápsulas es de  $2.19 \pm 0.21$  mm (Cuadro 8). Sin embargo, se ha comprobado que existe una correlación entre el diámetro y el tipo de alimento, para productos lácteos como yogur y leche, microcápsulas con un rango de 2 a 3 mm de diámetro tienen un efecto negativo en las características sensoriales, según estudios el tamaño ideal para lácteos es menor a 100  $\mu\text{m}$  (Sánchez 2012).

La detección de las cápsulas es una falla muy grande dentro del propósito de realizar una encapsulación, esto se debe a que la cápsula debe de ser ingerida sin comprometerse su estructura. Al detectarse por el consumidor este puede tratar de masticar las cápsulas, liberando los probióticos dentro de la boca. Esta temprana liberación expone a los microorganismos a los cambios abruptos de pH y diferentes enzimas que actúan durante la digestión, reduciendo la concentración, de manera que no se asegurara que la concentración viable de probióticos llegue hasta el intestino y provea un beneficio a la salud del consumidor.

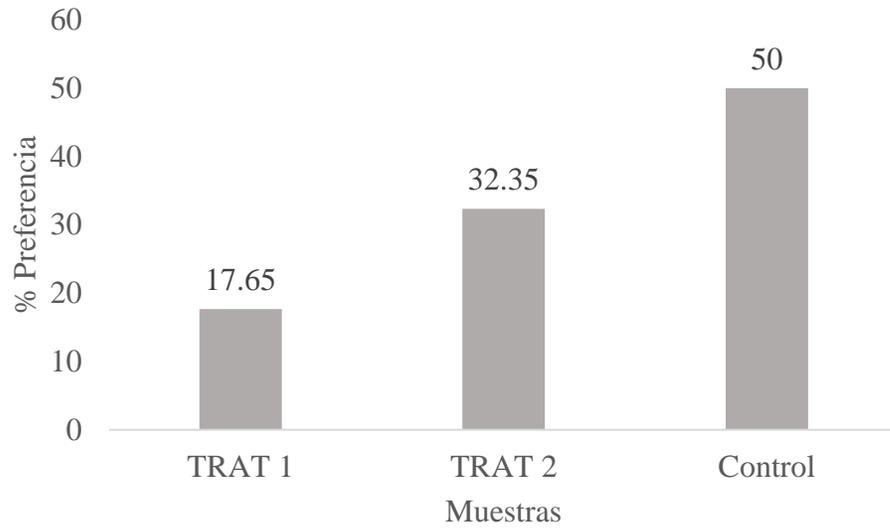


Figura 3. Prueba de preferencia ( $P < 0.05$ ).  
TRAT 1: Yogur sin sabor + cápsulas de *L. plantarum*.  
TRAT 2: Yogur sin sabor + *L. plantarum* libre.  
Control: Yogur sin sabor.

Cuadro 8. Características físicas de las cápsulas de alginato de sodio.

<b>Cápsulas</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Cápsulas</b>	<b>Diámetro (mm)</b>
1	2.02	26	2.26
2	2.29	27	2.29
3	2.27	28	2.06
4	2.09	29	2.27
5	2.05	30	2.27
6	2.31	31	2.19
7	2.17	32	2.09
8	1.94	33	2.23
9	2.09	34	2.38
10	2.26	35	2.52
11	2.13	36	2.18
12	2.24	37	2.12
13	2.40	38	2.30
14	2.28	39	2.42
15	2.09	40	2.44
16	2.54	41	1.92
17	1.29	42	2.19
18	2.15	43	2.27
19	2.31	44	2.33
20	2.04	45	2.14
21	2.05	46	2.18
22	2.33	47	2.17
23	2.07	48	2.46
24	1.87	49	2.27
25	2.41	50	1.91
<b>Promedio</b>		<b>2.19 ± 0.20</b>	

#### 4. CONCLUSIONES

- Las cápsulas de alginato de sodio con *L. plantarum* brindaron protección a las condiciones de un tracto gastrointestinal simulado.
- La encapsulación mejoró de manera significativa la supervivencia del probiótico *L. plantarum*, manteniendo la concentración de dicho microorganismo dentro de la concentración viable (6.03 Log UFC/g) durante toda la vida útil del yogur sin sabor de Zamorano.
- Los panelistas lograron detectar las cápsulas, promoviendo la liberación temprana del probiótico al masticarlas, disminuyendo su probabilidad de supervivencia durante el paso en el tracto gastrointestinal.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Reducir el tamaño de las cápsulas para estar por debajo del rango detectable de 100 $\mu$ m de diámetro.
- Estudiar como el consumo regular de este producto mejora la flora intestinal de las personas.
- Utilizar otros productos lácteos como helado y queso, para evaluar si se logra detectar las cápsulas.

## 6. LITERATURA CITADA

Allan P, Hansen L, Jin Y, Paulson A. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. En: Food Microbiology 19, pág. 35–45. [Consultado 2017 abr 7]. Disponible en línea en <http://www.idealibrary.com>.

Anal A, Singh H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. En: Trends in Food Science & Technology 18 (5): 240–251. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.01.004.

AOAC (Official methods of analysis). 2005. Acidity (Titratable) of fruit products [Internet]. 17. [Consultado 2017 ago 16]. Disponible en línea en: <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=15499>.

Arcand Y, Farnworth E, Mainville I. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. En: International journal of food microbiology 99 (3):287–296. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020.

Caicedo, Y. 2010. Estudio de la viabilidad de la incorporación de bacterias probióticas micro encapsuladas en helados [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia-Colombia. 68 p.

Chacon A, Pineda M, Rojas W. 2007. Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. En: Agronomía mesoamericana 18 (2):221–237.

Charalampopoulos D, Rastall R. 2009. Prebiotics and probiotics science and technology. Vol 1. Nueva York (Estados Unidos): Springer (Springer reference). 1247 p. ISBN: 978-0-387-79057-2.

De La Cruz A, Terán A. 2013. Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano-Honduras. 33 p.

González C, Lupo B, Maestro A. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. En: Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 3 (1):130–151. [Consultado 2017 mar 20]. Disponible en línea en: <http://www.rvcta.org>.

González J, Hernández H. 2006. Efecto de la simulación gástrica y sales biliares en cápsulas de alginato y k-carragenina para encapsular bacterias lácticas [Tesis]. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-México. 9 p.

González R, Pérez J; Urbina N. 2014. Efecto de la microencapsulación sobre las propiedades reológicas y fisicoquímicas del yogurt blando. En: Inf. tecnol. 25 (6):45–56. DOI: 10.4067/S0718-07642014000600007.

ISO (International Standard). 2011. Rubber latex – determination of apparent viscosity by the Brookfield test method [Internet]. 4. TISI library; [Consultado ago 16]. Disponible en línea en: <http://www.tla-latex.org/activity/pic/20160727121655.pdf>

Jiménez M, Juárez A. 2013. Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados. En: Temas Selectos de Ingeniería de alimentos 7 (2):15–24.

Johnson M, Waller J. 2013. Chi-square and t-tests using SAS: Performance and Interpretation. Publicación. Georgia: Georgia Regents University; [Consultado 2017 sep 20]. Disponible en línea en: [http://www.lexjansen.com/wuss/2015/122\\_Final\\_Paper\\_PDF.pdf](http://www.lexjansen.com/wuss/2015/122_Final_Paper_PDF.pdf)

Martínez H, Montañez J, Rodiles J, Zamora R. 2015. Viabilidad de *Saccharomyces boulardii* en queso fresco bajo condiciones de acidez *in vitro*. En: Nova Scientia 7 (3):68–80.

Medina O, Parra R. 2012. Sobrevivencia y encapsulación de bacterias y su efecto en las propiedades sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas del yogurt. En: Vitae 19 (1), pág. 89–92. [Consultado 2017 jul 10]. Disponible en línea en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914022>.

Montes L. 2013. Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos. (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* 9469) [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia-Colombia. 106 p.

Ramírez, Macedo R, Vélez J. 2015. Propiedades fisicoquímicas y de flujo de un yogur asentado enriquecido con microcápsulas que contienen ácidos grasos omega 3. En: Inf. tecnol. 26 (5):87–96. DOI: 10.4067/S0718-07642015000500012.

Reglero G. 2011. Curso de análisis sensorial de alimentos. [Internet]. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España; [Consultado ago 16]. Disponible en línea en: <https://www.google.hn/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjgppn45p3XAhVJiYKHczaBPIQFgglMAA&url=http%3A%2F%2Fdigital.csic.es%2Fbitstream%2F10261%2F63961%2F1%2F358508.pdf&usg=AOvVaw0bxUA7W019ADE1gotQ8aZR>

Rehm B. 2009. Alginates; Biology and applications. Vol 13. Münster (Germany): Springer. 266 p. ISBN 978-3-540-92678-8.

RTCA (Reglamento tecnico centro americano). 2009. Alimentos criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos, del 67.04.50:08. Fuente: Reglamento Técnico Centroamericano.

Sánchez M. 2012. Efecto de la incorporación de microorganismos probióticos encapsulados en queso tipo manchego [Tesis]. Universidad autónoma de Querétaro-México. 90 p.

Stahl U, Donalies U, Nevoigt E, Archer D. 2008. Food biotechnology. Berlin (Alemania): Springer. 269 p. ISBN 978-3-540-70535-2.

Yanniotis S, Taoukis P, Stoforos N, Karathanos V. 2013. Advances in food process engineering research and applications. Vol 1. Nueva York (Estados Unidos): Springer. 677 p. ISBN 978-1-4614-7905-5.

Zambrano G. 2008. Evaluación de la calidad de yogur tipo II elaborado con leche concentrada por microfiltración tangencial utilizando diferentes tipos de grasa y estabilizante [Tesis]. Universidad Técnica del Norte-Ecuador. 179 p.

Zhang H, Cai Y. 2014. Lactic acid bacteria. Vol 1. Tsukuba (Japan): Springer. 535 p. ISBN 978-94-017-8840-3.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Boleta de evaluación sensorial para análisis de preferencia.

Fecha: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

**IMPORTANTE:** Por favor lea las instrucciones antes de iniciar.

Frente a usted se presentan tres muestras de yogur sin sabor, por favor ordene cada una de ellas de acuerdo a su preferencia, siendo 1 = más preferido y 3 = menos preferido.

**NOTA:** no olvide tomar agua y comer un pedazo de galleta antes de cada muestra.

348

628

715

Muestras

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Comentarios:

---

---

Gracias por su colaboración.

**Anexo 2.** Resultados del análisis (Chi-cuadrado) de la muestra con mayor preferencia.

The SAS System

The FREQ Procedure

<b>TRT</b>	<b>Frequency</b>	<b>Percent</b>	<b>Cumulative Frequency</b>	<b>Cumulative Percent</b>
<b>1</b>	18	17.65	18	17.65
<b>2</b>	33	32.35	51	50.00
<b>3</b>	51	50.00	102	100.00

<b>Chi-Square Test for Equal Proportions</b>	
<b>Chi-Square</b>	16.0588
<b>DF</b>	2
<b>Pr &gt; ChiSq</b>	0.0003

**Anexo 3.** Resultados del análisis (Chi-cuadrado) de la muestra con menor preferencia.

The SAS System

The FREQ Procedure

<b>TRT</b>	<b>Frequency</b>	<b>Percent</b>	<b>Cumulative Frequency</b>	<b>Cumulative Percent</b>
<b>1</b>	61	59.80	61	59.80
<b>2</b>	24	23.53	85	83.33
<b>3</b>	17	16.67	102	100.00

<b>Chi-Square Test for Equal Proportions</b>	
<b>Chi-Square</b>	32.8824
<b>DF</b>	2
<b>Pr &gt; ChiSq</b>	<.0001

**Anexo 4.** Cuadros de salida de análisis estadístico SAS®.

<b>Parametros</b>	<b>Análisis</b>	<b>F value</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>Efecto de cápsulas de alginato en simulación de tracto gastrointestinal.</b>	TIEMPO	134.25	<.0001
	REP	9.00	0.0156
<b>Eficiencia del encapsulado.</b>	DIAS	74.23	0.0007
	REP	163.89	0.0001
<b>Supervivencia (LSD).</b>	TRT	697.42	<.0001
	BLK	3.99	0.0469
	DIAS	48.00	<.0001
	TRT*BLK	5.55	0.0091
	TRT*DIAS	10.25	0.0008
<b>Supervivencia (LSMEANS).</b>	TRT	655.47	<.0001
	BLK	3.75	0.0709
	DIAS	45.11	<.0001
	TRT*BLK	5.22	0.0230
	TRT*DIAS	9.64	0.0038
<b>Bacterias ácido lácticas en yogur.</b>	TRT	7.13	0.0284
	BLK	5.79	0.0278
	DIAS	13.51	0.0027
	TRT*BLK	4.28	0.0546
	TRT*DIAS	3.63	0.0756
<b>Viscosidad.</b>	TRT	2.68	0.1089
	BLK	5.95	0.0160
	DIAS	6.66	0.0113
	TRT*BLK	1.85	0.1844
	TRT*DIAS	0.53	0.7132
<b>Viscosidad (LSMEANS).</b>	TRT	25.49	0.0003
	BLK	56.51	<.0001
	DIAS	63.29	<.0001
	TRT*BLK	17.57	0.0005
	TRT*DIAS	5.08	0.0247

<b>ATECAL.</b>	TRT	214.32	<.0001
	BLK	6.89	0.0102
	DIAS	84.79	<.0001
	TRT*BLK	0.56	0.6991
	TRT*DIAS	2.89	0.0689
<b>ATECAL (LSMEANS).</b>	TRT	241.11	<.0001
	BLK	7.75	0.0044
	DIAS	95.39	<.0001
	TRT*DIAS	3.25	0.0394

**Anexo 5.** Análisis de costos.

*L. plantarum* Encapsulado

Descripción	U/M	Costo/Unidad	Cant.	Valor (L)
Mezcla para yogur	lb	6.78	1	6.78
Alginato	kg	235	0.002	0.47
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112	kg	8225	0.00005	0.41125
Leche semi-descremada	ml	0.005317	100	0.5317
Cloruro de calcio	kg	42.53	0.002	0.08506
Envase plástico de 150 g	Envase	1.58	1	1.58
Tapa para envase plástico de 150 g	Tapa	0.84	1	0.84
			<b>Total</b>	<b>10.698</b>

*L. plantarum* libre

Descripción	U/M	Costo/Unidad	Cant.	Valor (L)
Mezcla para yogur	lb	6.78	1	6.78
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112	kg	8225	0.00001	0.08225
Envase plástico de 150 g	Envase	1.58	1	1.58
Tapa para envase plástico de 150 g	Tapa	0.84	1	0.84
			<b>Total</b>	<b>9.2823</b>

*L. plantarum* libre

Descripción	U/M	Costo/Unidad	Cant.	Valor (L)
Mezcla para yogur	lb	6.78	1	6.78
<i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112	kg	8225	0.00001	0.08225
Envase plástico de 150 g	Envase	1.58	1	1.58
Tapa para envase plástico de 150 g	Tapa	0.84	1	0.84
			<b>Total</b>	<b>9.2823</b>

**Anexo 6.** Correlaciones

TRT1

**Pearson Correlation Coefficients, N = 9**

**Prob > |r| under H0: Rho=0**

	<b>DIAS</b>	<b>CONTEO</b>	<b>VISCOSIDAD</b>	<b>ATECAL</b>
<b>DIAS</b>	1.00000	-0.92612 0.0003	0.23054 0.5507	0.84859 0.0038
<b>CONTEO</b>	-0.92612 0.0003	1.00000	-0.19324 0.6184	-0.63706 0.0650
<b>VISCOSIDAD</b>	0.23054 0.5507	-0.19324 0.6184	1.00000	0.13502 0.7291
<b>ATECAL</b>	0.84859 0.0038	-0.63706 0.0650	0.13502 0.7291	1.00000

TRT2

**Pearson Correlation Coefficients, N = 9**  
**Prob > |r| under H0: Rho=0**

	<b>DIAS</b>	<b>CONTEO</b>	<b>VISCOSIDAD</b>	<b>ATECAL</b>
<b>DIAS</b>	1.00000	-0.95080 <.0001	0.81033 0.0081	0.84247 0.0044
<b>CONTEO</b>	-0.95080 <.0001	1.00000	-0.84892 0.0038	-0.65961 0.0532
<b>VISCOSIDAD</b>	0.81033 0.0081	-0.84892 0.0038	1.00000	0.52336 0.1482
<b>ATECAL</b>	0.84247 0.0044	-0.65961 0.0532	0.52336 0.1482	1.00000

TRT3

**Pearson Correlation Coefficients, N = 9**  
**Prob > |r| under H0: Rho=0**

	<b>DIAS</b>	<b>CONTEO</b>	<b>VISCOSIDAD</b>	<b>ATECAL</b>
<b>DIAS</b>	1.00000	-0.92095 0.0004	0.75262 0.0193	0.78591 0.0120
<b>CONTEO</b>	-0.92095 0.0004	1.00000	-0.78286 0.0126	-0.83270 0.0053
<b>VISCOSIDAD</b>	0.75262 0.0193	-0.78286 0.0126	1.00000	0.71667 0.0298
<b>ATECAL</b>	0.78591 0.0120	-0.83270 0.0053	0.71667 0.0298	1.00000