



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**“OBTENCIÓN DE UN SIMBIÓTICO ENCAPSULADO A BASE DE DIFERENTES  
NIVELES DE INULINA Y *Lactobacillus casei*”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

**Previa a la obtención del título de:**

**INGENIERA EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**AUTORA:**

**SANDRA PAOLA SILVA PUZMA**

**Riobamba – Ecuador**

**2018**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Sandra Paola Silva Puzma, con C.I. 060275885-6, declaro que el presente trabajo de titulación, es de mi autoría, y que los resultados del mismo son auténticos y originales, los textos constantes en el documento que proviene de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

---

Sandra Paola Silva Puzma.  
C.I: 060275885-6

Riobamba, 12 de Abril del 2018.

Este trabajo de titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal:

---

Dr. Sandra López Sampedro

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

Dr. Iván Flores Mancheno PhD.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

---

Ing. Iván Salgado Tello

**ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Riobamba, 12 Abril del 2018.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mi DIOS por bendecirme tanto día a día. Y ha concretado este sueño tan anhelado de ser Ingeniera en Industrias Pecuarias, porque DIOS es mi pastor y nada me faltara.

Mis más sinceros agradecimientos a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial a la Facultad de Ciencias Pecuarias y por su intermedio a la Escuela de Ingeniería en Industrias Pecuarias por permitir ser parte de esta prestigiosa institución.

Sandra Silva.

## DEDICATORIA

A mi DIOS tan bueno que siempre me ha cuidado y protegido en las múltiples facetas y circunstancias de la vida, y que me ha bendecido durante la formación de la carrera para obtener de mi profesión.

A mi Madre María Leonor Puzma Gómez que me apoyado incondicionalmente en TODO SENTIDO que no me ha dejado rendirme y me ha impulsado a continuar con mis sueños, metas y proyectos.

Agradezco a HIJO Cristhofer Gabriel Ponce Silva quien llevo a darme una chispa a mi vida, y a conocer lo maravilloso que es ser madre y estudiante a la vez y todo lo que implicaba en ello como responsabilidad, fortaleza, formación etc.

Y por supuesto a mis hermanos Rommel Mariño, Byron Mariño, Cecilia Mariño, Diego Silva, y Carolina Silva; mis cuñadas/os ; mis 13 sobrinos/as; familiares ; que me dieron su apoyo cuando más lo necesitaba en todos los aspectos, en quienes pude confiar para que cuiden de mi GORDITO algunas horas mientras me formaba como profesional.

Y por supuesto aquellos que hicieron que mi vida sea más difícil, a los que NO creyeron en mí, y que disfrazados de buenas personas de pronto en el momento menos esperado mostraron envidia, hipocresía, maldad, MIL GRACIAS porque en vez de deprimirme o quedar devastada me enseñaron a ser fuerte.

Sandra Silva.

## RESUMEN

En los Laboratorios de Biotecnología y de Investigación de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH ,así como el laboratorio de prototipos, producción y agroemprendimientos de la UTPL –LOJA, se evaluó la combinación de 6 tipos diferentes de simbióticos encapsulados, mediante la utilización de puesto que se expone a los microorganismos a temperaturas altas(100°C inicial),los polvos obtenidos reflejaron un pH dentro de los rangos de neutralidad *Lactobacillus casei* (50,100 y 150)mg combinados con Inulina (40mg y 80)mg para cada uno de los tratamientos, se aplicó un diseño completamente al azar en arreglo bifactorial, con 10 repeticiones por tratamiento y un tamaño de unidad experimental de 200ml , determinándose estadísticamente la mejor combinación con 150mg de *Lactobacillus casei* con 80mg de Inulina obteniendo una cantidad de BAL 2.99E+06 UFC/g la cual se encuentra dentro de la norma, se reportó una disminución de estas frente al conteo inicial debido al proceso propio de atomización debido a que la Inulina actúa como solución tampón frente a lo elevados °Brix de la biomasa como efecto de la alta concentración de maltodextrina(1:3),la densidad de los microencapsulados se encuentran en una media de 0.66 g/ml que es relativamente bajo ,ocasionado por el material encapsulante que es obtenido por hidrolisis de almidón y por ello tiene un peso molecular bajo, además se observó que las variables de estudio no tuvieron una influencia frente a la adición cantidades inulina si no por otros factores antes mencionados, se recomienda la aplicación del microencapsulado en distintas matrices alimentarias para obtener un alimento funciona a su vez realizar micrografía eléctrica de barrido (E-SEM) de los polvos para un análisis profundo.

## ABSTRACT

In the biotechnology and research laboratories from School of Sciences at ESPOCH as well as the laboratory of prototypes, production and agribusiness from UTPL-LOJA the combination of 6 different types of encapsulated symbiotic was evaluated by using *Lactobacillus casei* (50, 100 and 150 mg) combined with Inulin (40 mg and 80 mg) for each of the treatments. A completely randomized design was applied in a bi-factorial arrangement with 10 repetitions per treatment and an experimental unit size of 200 ml. Statistically determining the best combination with 150 mg of *Lactobacillus casei* with 80 mg of Inulin obtaining a quantity of BAL  $2.99E + 06$  CFU/g which is within the norm. A decrease of these were reported in front of the initial count due to the process own atomization since it is exposed to microorganisms at high temperatures (initial 100 °C). The powders obtained reflect a pH within the ranges of neutrality due to the Inulin acts as a buffer solution against the high °Brix of the biomass as an effect of the high concentration of maltodextrin (1: 3). The density of the microencapsulated are in a mean of 0.66 g/ml that is relatively low caused by the encapsulating material which is obtained by hydrolysis of starch and therefore has a low molecular weight. In addition, it was observed that the study variables did not have an influence on the addition of Inulin amounts, if not for other factors mentioned above. The application of microencapsulation in different food matrices is recommended to obtain a food; it works in turn to perform electric scanning micrography (E-SEM) of the powders to a deep analysis.

## CONTENIDO

<b>Nº</b>	<b>Pág.</b>
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
<b>I. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u></b>	<b>4</b>
A.    PREBIOTICO	4
B.    PROBIÓTICO	6
C.    SIMBIÓTICOS	7
D.    MICRO ENCAPSULACIÓN	8
<b>III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>12</b>
A.    LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	12
B.    UNIDADES EXPERIMENTALES	12
C.    MATERIALES, EQUIPOS, E INSTALACIONES	13
1. <u>Materiales de laboratorio</u>	13
2. <u>Equipos</u>	14
3. <u>Materias primas e insumos</u>	14
4. <u>Instalaciones</u>	15
D.    TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	15
E.    MEDICIONES EXPERIMENTALES	16
F.    ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	16
G.    PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	17
H.    METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN	18
1. <u>Preparación de los biorreactores</u>	18
2. <u>Activación de microorganismos</u>	18
3. <u>Siembra y recuento de la biomasa</u>	19
4. <u>Determinación de la cantidad de Bacterias Ácido Lácticas- BAL (UFC/g) de la biomasa</u>	19
5. <u>Encapsulación</u>	19
6. <u>Siembra y recuento de los encapsulados</u>	20
7. <u>Determinación de la cantidad de Bacterias Ácido Lácticas- BAL (UFC/g) de los</u>	20

	<u>encapsulados</u>	
8.	<u>Determinación de la viabilidad de Lactobacillus casei (log UFC/g) de los encapsulados</u>	21
9.	<u>Determinación de la Densidad</u>	21
10.	<u>Determinación del pH</u>	21
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>21</b>
A	EVALUACIÓN FÍSICO QUÍMICO DEL ANÁLISIS DE LA OBTENCION DE UN SIMBIOTICO ENCAPSULADO A BASE DE DIFERENTES NIVELES DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y Lactobacillus casei 50 mg, 100 mg y 150 mg	23
1.	<u>pH</u>	23
2.	<u>Densidad</u>	28
B	EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS EN LA OBTENCION DE UN SIMBIOTICO ENCAPSULADO A BASE DE DIFERENTES NIVELES DE INULINA 40 mg y 80 mg, Y Lactobacillus casei 50 mg, 100 mg y 150 mg	29
1.	<u>Lactobacillus Casei (BAL)</u>	29
2.	<u>Viabilidad</u>	30
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>33</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURA CITAD</b>	<b>34</b>
	ANEXOS	

**LISTA DE CUADROS**

<b>Nº</b>		<b>Pág.</b>
Cuadro 1	CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL CANTÓN RIOBAMBA	12
Cuadro 2	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO	16
Cuadro 3	ESQUEMA DEL ADEVA	17
Cuadro 4	EFECTO DE LA INTERRACCION ENTRE DIFERENTES NIVELES DE INULINA Y L. CASEI EN LA OBTENCION DE SIMBIOTICOS ENCAPSULADOS	25
Cuadro 5	RECUENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL) DE CADA UNO DE LAS COMBINACIONES DE LOS SIMBIÓTICOS ENCAPSULADOS	30

**LISTA DE GRAFICOS**

<b>Nº</b>		<b>Pág.</b>
Grafico 1	pH de los diferentes encapsulados combinados con diferentes niveles de inulina y <i>Lactobacillus casei</i> .	26
Grafico 2	Regresión cuadrática de la variable pH del simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles de inulina 40 mg y 80 mg , y <i>Lactobacillus casei</i> 50 mg, 100 mg y 150 mg	27
Grafico 3	Densidad en g/ml de los diferentes encapsulados combinados con diferentes niveles de inulina y <i>Lactobacillus casei</i> .	28
Grafico 4	El recuento microbiano de la cantidad de bacterias acido lácticas presentes en el simbiótico en los diferentes encapsulados combinados con diferentes niveles de inulina y <i>Lactobacillus casei</i>	29
Grafico 5	Viabilidad en los encapsulados combinados con diferentes niveles de inulina y <i>Lactobacillus casei</i>	31

## LISTA DE ANEXOS

### Nº

- Anexo 1 EFECTO DE LA INTERRACCION ENTRE DIFERENTES NIVELES DE INULINA Y L. CASEI EN LA OBTENCION DE SIMBIOTICOS ENCAPSULADO
- Anexo 2 Análisis estadístico de Lactobacillus Casei UFC/mg en la elaboración de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg
- Anexo 3 Análisis estadístico del pH en la elaboración de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg
- Anexo 4 Análisis estadístico del densidad en la elaboración de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg
- Anexo 5 Análisis estadístico del células viabilidad en la elaboración de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg
- Anexo 6 Ficha técnica del probióticos Lactobacillus casei
- Anexo 7. Norma NTE INEN 1334-3:2011 Recuento microbiano de probióticos, requisitos de probióticos y prebióticos que deben cumplir
- Anexo 8. Norma INEN 526 1980-12 determinación de pH
- Anexo 9. Ficha técnica del prebiótico inulina
- Anexo 10. Equipo Büchi Spray Dryer B-290
- Anexo 11. Fotos del trabajo de campo

## I. INTRODUCCIÓN

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de los alimentos que benefician al huésped estimulando selectivamente el crecimiento de la actividad de las especies de bacterias que están establecidas en el colon, mejorando así la salud del huésped. Agrega por otro lado que, los probióticos es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. ( FAO/OMS, 2006).

Según Tripathi y Giri (Citado en Araùjo et al., 2015), Cada día la industria alimentaria muestra un interés creciente en la implementación de los microorganismos probióticos para la elaboración de Alimentos Funcionales (AF). Ya que eficacia medicinal o terapéutica de estos alimentos depende del número de Unidades Formadoras de colonias por ml o gramo (UFC/ml o g) de microorganismos probióticos viables y activos en el producto al momento de consumirlo.

Luján (2007), Manifiesta que dentro del grupo de los probióticos de mayor importancia encontramos los *Lactobacillus casei* y esta es una bacteria, productora de ácido láctico, se emplea en la industria láctea (por lo general) en la elaboración de alimentos probióticos , se ha comprobado que esta especie particular de lactobacilo es muy resistente a rangos muy amplios de pH y temperatura.

Beltran et al., (citado en Agirre, 2016), Reporta que un simbiótico es a la mezcla de uno o más organismos probióticos con uno o varios compuestos prebióticos. El objetivo es favorecer la actividad de ambos componentes para potenciar sus propiedades saludables gracias al efecto sinérgico que existe entre ellos. Esto implica que sólo puede ser simbiótico el producto que demuestra ejercer un efecto beneficioso superior a la suma de los generados por sus integrantes por separado.

De acuerdo a lo que establece NTE INEN (2011), el recuento de un probiótico debe de ser mayor o igual a  $1 \times 10^6$  UFC/g en el producto terminado hasta el final de la vida útil.

Por otro lado Araujo et al.,(2015), Mensiona que desventajas del empleo de probióticos en el procesamiento de alimentos es la baja viabilidad de estos, la cual se puede ver afectada por condiciones ambientales como el la humedad y la temperatura. Una alternativa para mitigar estos efectos es mediante el desarrollo de condiciones protectoras que garanticen dicha viabilidad y actividad de estos microorganismos durante su uso y aplicación en alimentos, asegurando que sean liberados en el intestino donde se precisa su acción.

Foo et al., (1993), indican que el género *Lactobacillus* está comprendida por bacterias en forma bacilar de  $0,5 - 1,2 \times 1,0 - 10,0 \mu\text{m}$ , comúnmente se asocian en cadenas cortas, son anaerobias facultativas ó microaerófilas, catalasa y citocromo negativos.

Guevara y Bretòn (2008), Indican que en la actualidad la encapsulación es un método frecuentemente utilizado para conservar o mejorar las propiedades en el manejo y producción de algunos ingredientes alimenticios como vitaminas ,acidulantes ,sabores , aromas , enzimas ,células microbianas entre otras .

Lara (2011), encontró que la inulina constituye una interesante alternativa para la elaboración de cubiertas de fármacos que deben liberar su principio activo en el colon.

Roberfroid (Citado por Chanantita et al.,2014), Agrega que debido a sus propiedades nutricionales y fisiológicas, la inulina se ha utilizado cada vez más como un ingrediente versátil en alimentos funcionales procesados como los reemplazos de grasas y azúcares o suplementos de fibra.

Existen en la actualidad no existen estudios profundizados sobre la encapsulación de simbióticos por lo que justificada la realización de la presente investigación, por lo cual los objetivos planteados los siguientes:

- Obtener un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles de *Inulina* y *Lactobacillus casei*.
- Evaluar la cantidad de bacterias ácido lácticas presentes en el simbiótico.
- Analizar las características físico-químico del simbiótico como es el pH y la densidad.
- Determinar la mejor concentración del simbiótico encapsulado compuesto por *Lactobacillus casei* (50 mg, 100 mg, y 150 mg) e Inulina (40 mg y 80 mg).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### A. PREBIÓTICO

Fontecha (2003) y Barrio (2016), coinciden en el criterio de que los prebióticos son ingredientes alimentarios y que modifican, estimulan de forma selectiva la flora intestinal mejorando así la salud del huésped, estos no son absorbidos ni digeridos durante el paso del estómago o incluso del intestino delgado pues llegan al colon prácticamente intacto.

Según la FAO/OMS(2006), benefician en algunos casos los prebióticos a los probióticos, especialmente en lo que concierne a las Bífidobacterias: es lo que se entiende por simbiosis. La simbiosis se define como la 'mezcla de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al huésped mejorando la supervivencia y la implantación de suplementos dietéticos a base de microbios vivos en el aparato digestivo del huésped.

De acuerdo a NTE INEN(2011), una sustancia prebiótico debe cumplir las siguientes propiedades: Ser una sustancia preferida por una o más especies de bacterias benéficas en el intestino grueso o colon, resistente a los ácidos gástricos (a la acidez gástrica), fermentables por la microflora intestinal, resistente a la hidrólisis enzimática endógena, tener la capacidad de producir cambios en el lumen del intestino grueso o en el organismo del huésped que muestra beneficios para la salud y estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de aquellas bacterias que están asociadas con la salud y el bienestar.

De acuerdo al criterio de Lara(2011), La inulina es un polisacárido no digerible por las enzimas del tracto gastrointestinal humano pero sí fermentable por las bacterias colónicas.

Madrigal y Sangronis(2007), definen a la inulina como un carbohidrato de almacenamiento presente en muchas plantas, vegetales, frutas y cereales y por

tanto forma parte de nuestra dieta diaria, La inulina y sus derivados (oligofruktosa, fructooligosacáridos) son generalmente llamados fructanos, que están constituidos básicamente por cadenas lineales de fructosa.

Lara (2011), en su investigación encontró que la inulina favorece a la salud al reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, enfermedades del tracto gastrointestinal, cáncer de colon, osteoporosis y diabetes, y aumentar la actividad inmunológica del organismo.

Mercola (2016) ,manifiesta que la inulina sirve para ayudar con la pérdida de peso y a la vez asegura que la inulina ofrece una serie de posibles beneficios adicionales, como disminuir los triglicéridos y el colesterol en la sangre, mejora la absorción del calcio y el magnesio, lo que ocasiona una mayor densidad ósea y la mineralización ósea en los niños, reducir los crecimientos precancerosos en el intestino grueso, lo que causa una menor inflamación y un menor número de cambios en células precancerosas en los estudios con animales, así como favorecer un entorno menos adecuado para el desarrollo de cáncer de intestino grueso en humanos.

Según Pèrez y Pelaes(2017), la inulina es considerada como grupo de carbohidratos resistentes a la digestión por las enzimas del intestino delgado y fermentado en forma parcial o total en el colon, con efectos favorables en la salud.

Mientras que Mensiona Chanantita et al.,(2014), menciona que la inulina en los alimentos cumplen las dos funciones principales de fibra dietética soluble y prebiótica. Con un beneficio adicional que es fuente potencial de fibra dietética en muchos productos alimenticios manufacturados es que no puede ser digerido por las enzimas del intestino delgado humano.

Gibson et al., (Citado por Chanantita et al., 2014), afirman que el nivel más efectivo de inulina en la ingesta humana para reducir las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol y colesterol LDL fue de 8-10 g por día. Se encontró que

la inulina a 15-20 g por día era efectiva para aliviar estreñimiento. La fermentación de microorganismos de la inulina ha producido ácidos grasos de cadena corta y lactato, mientras que las Bifidobacterias aumentaron del 20 % al 71 % y los bacteroides disminuyeron del 65 % al 26 %.

Chanantita et al.,(2014), menciona que la inulina tienen numerosas características beneficiosas como ingredientes funcionales que ofrecen una combinación única de propiedades nutricionales interesantes e importantes beneficios tecnológicos, además puede mejorar el sabor, la textura y la humedad en muchos alimentos, por otra parte la inulina tiene características gelificantes que pueden usarse para hacer quesos bajos en grasa, salsas, sopas y untables de mesa, así mismo otra de sus propiedades de fusión permiten un procesamiento fácil de postres congelados, pues las características de unión permiten que la inulina se use en barras de cereal, además el reemplazo de grasas e hidratos de carbono con inulina ofrece la ventaja de no tener que comprometer el sabor o la textura, a la vez que proporciona mayores beneficios nutricionales. Por lo tanto, la inulina representa un ingrediente clave que ofrece nuevas oportunidades a una industria alimentaria que constantemente busca productos del futuro bien equilibrados, pero de mejor sabor.

## **B. PROBIÓTICO**

La FAO/OMS( 2006), indica que un probiótico actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales.

La norma NTE INEN(2011), establece las principales características de los probióticos que son los siguientes: estar vivo, no ser patógeno y su medio natural es el tracto digestivo humano, capaz de sobrevivir en el tracto intestinal, es decir, ser resistente a los jugos gástricos y los ácidos biliares, tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, capacidad de colonizar el intestino y también capacidad de sobrevivir a lo largo de la vida útil del producto al cual se adiciona.

De acuerdo a Spreer( 1991), define a los Lactobacilos, como microaerófilos o anaerobios, pero después de cultivos continuos, algunas cepas pueden desarrollarse en presencia de aire, sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no puede cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero.

Panesso et al .,(2015), manifiesta que el *Lactobacillus casei* en donde los *L. casei* crecen a una Temperatura optima de 37 °C con una Fermentación de azúcar sobre la Ribosa-sacarosa. D-tiranososa.

Por otra parte Panesar et al.,(Citado en Panesso et al ., 2015), afirman que el cesimiento de *Lactobacillus casei* depende de varios factores del medio de fermentación que incluye la fuente de carbono y nitrógeno, el tipo de fermentación, el pH, la temperatura, la formación de subproductos, entre otros.

### **C. SIMBIÓTICOS**

Para Cagigas y Blanco (2002), estos productos disminuyen el pH en el colon creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse. Los prebióticos constituyen el sustrato fundamental (el “alimento”) de las bacterias probióticas. Dicen que la combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico, la cual beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal. Por ejemplo de sinergismo en el que lo constituye la relación de la cantidad de fibra dietética en la dieta con la microflora intestinal.

Ya que Zafrilla y Manzotti (citado por Agirre, 2016), mencionan que el simbiótico estimulan el sistema inmunitario y actúan tanto sobre las células implicadas en la inmunidad natural como en la específica y también sobre los macrófagos. Además, favorecen la producción de anticuerpos, específicamente de IgA en la luz intestinal, que a su vez inhiben la adhesión de las bacterias patógenas.

## D. MICRO ENCAPSULACIÓN

Los carbohidratos son utilizados ampliamente en la encapsulación mediante el secado por atomización como soportes encapsulantes. Son excelentes candidatos en aplicaciones de encapsulación debido a que posee muchos atributos tales como: presentar baja viscosidad a altas concentraciones, forma parte integral de muchos sistemas alimenticios, tener un bajo costo, estar disponibles en un amplio intervalo de tamaños, además de tener buena solubilidad. Charalampopoulos et al., (Citado por Guevara y Bretòn, 2008)

Madene et al., (Citado por Guevara y Bretòn, 2008), Las maltodextrinas son un subgrupo importante de los carbohidratos, estas se forman por la hidrólisis parcial del almidón de maíz por medio de enzimas o ácidos.

Además son inodoras, incoloras, permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original García et al., (Citado por Parra, 2011)

Se utiliza la maltodextrina, principalmente como material pared en técnicas de secado por aspersión por su efecto protector frente a altas temperaturas y como agente estimulante del crecimiento de probióticos. shokri et al.,(Citado en Araùjo et al., 2015)

También se ha propuesto la co-encapsulación de probióticos con prebióticos como la inulina, un carbohidrato no digerible que estimula selectivamente las cepas probióticas ayudándolas a sobrevivir e implantarse en el colon Avila-Reyes et al., (Citado en Araùjo et al., 2015)

Montes, M.(2013), Mediante su investigación nos relata que las tecnologías de microencapsulación de microorganismos probióticos han dado paso al desarrollo de nuevos alimentos funcionales al mejorar su estabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y en la supervivencia durante su paso a través del tracto gastrointestinal, la encapsulación de componentes activos de tipo

químico y biológico mediante tecnologías de secado por aspersión y liofilización han abierto las posibilidades del uso de estos compuestos en productos alimenticios, y a su vez las cepas más utilizadas de *Lactobacillus casei* se emplean para estimular el sistema inmune para que de un efecto beneficioso.

A su vez agrega la bacterióloga Luz María Montes, que en la microencapsulación de probióticos con agentes prebióticos que son azúcares de cadena corta, fibra soluble, se obtienen polvos estables mayores a las 7 semanas, hablando específicamente de la viabilidad. Montes (2013)

Vila Jato (Citado por Caez y Jaraba, 2012), dicen que la microencapsulación es el proceso por el cual partículas individuales o gotas de un material activo (core) se rodean por una cubierta (shell) para producir capsulas en el rango de micras a milímetros, conocidas como microcápsulas. Cuando las partículas poseen un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , el producto resultante del proceso de encapsulación recibe la denominación de "nanocápsulas"

Para Vilstrup (Citado por Caez y Jaraba, 2012), dice que la microcápsula más simple posee una estructura que está compuesta por dos elementos, el material activo y una delgada pared que envuelve al primero. Si consideramos un mismo volumen de material, el área superficial que se consigue con nanocápsulas esféricas en comparación con microcápsulas esféricas es mucho mayor.

Para Rathore *et al.*, (Citado por Araujo *et al.*, 2015), aseguran que la producción de microcapsulas estables que aseguren la viabilidad microbiana depende en gran medida de la selección del material para la encapsulación.

Sanguansri y Augustin (Citado en Araujo *et al.*, 2015), han descrito distintas técnicas y materiales encapsulantes para diferentes compuestos activos tales como ácidos, bases, buffers, lípidos, enzimas, aminoácidos, péptidos, vitaminas y minerales, antioxidantes, polifenoles, fibras solubles y microorganismos probióticos entre otros.

Doherty. (Citado por Araùjo et al., 2015), dicen que en el caso de los probióticos para que un material encapsulante sea exitoso, debe propiciar la viabilidad celular durante y después de los procesos de microencapsulación y ser compatible con el sistema alimentario al que se va a incluir.

Según Serna y Vallejo (Citado en Araùjo et al.,2015), se debe tener en cuenta factores químicos y físicos de los mismos con el fin de poder controlar la liberación del probiótico de la matriz alimenticia a un pH, temperatura o concentración de sales específicos.

Según Parra ( Citado por Araùjo et al.,2015), existen varios tipos de materiales de revestimiento para la microencapsulación de probióticos que incluyen principalmente polisacáridos, oligosacáridos, lípidos y proteínas, dentro de los polisacáridos más utilizados se encuentran agar, carragenina, goma arábica, dextranos, almidón, celulosa y alginato de sodio.

Para Shokri (Citado por Araùjo et al.,2015), en la microencapsulación se necesitan unos agentes protectores de microorganismos probióticos como son los oligosacáridos tipo jarabe de maíz, sucrosa y maltodextrina, donde esta última se utiliza principalmente como material pared en técnicas de secado por aspersion por su efecto protector frente a altas temperaturas y como agente estimulante del crecimiento de probióticos.

Para Avila et al., (Citado por Araùjo et al.,2015), dicen que la co-encapsulación de probióticos con prebióticos como la inulina, estimula selectivamente las cepas probióticas ayudándolas a sobrevivir e implantarse en el colon (Otros prebióticos como los galactooligosacáridos y fructo-oligosacaridos junto con la inulina protegen a los probióticos durante la micro encapsulación e incrementan su resistencia frente a condiciones gástricas simuladas.

Mariluz (2011), afirma que este proceso de encapsulación se denomina atomización, en donde disolvente se evapora instantáneamente, permitiendo que

el material activo presente en la emulsión, quede atrapado dentro de una película de material encapsulante.

Serna y Vallejo (Citado en Araùjo et al., 2015), afirman que es importante considerar factores que afectan la viabilidad celular como: las características de cada cepa, su tolerancia a los niveles de estrés, el tipo de material encapsulante utilizado, la presión de atomización, flujo de alimentación y las condiciones de almacenamiento que incluyen la actividad de agua y la temperatura.

Rodríguez; Ávila (Citado por Araùjo et al.,2015), sugieren el uso de agentes termoprotectores como la inulina que aumenta la supervivencia de los microorganismos después del secado y durante el almacenamiento debido a que minimizan el estrés mecánico, oxidativo y osmótico al que pueden ser sometidos.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### A. LOCALIZACION Y DURACION DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se realizará en el Ecuador, provincia de Chimborazo, en el cantón Riobamba, km 1.5 de la Panamericana Sur, donde está ubicada la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH y en los laboratorios de :Investigación de la Facultad De Ciencias de la ESPOCH y laboratorio de prototipos, producción y agroemprendimientos de la UTPL –LOJA .Las condiciones meteorológicas del cantón Riobamba se describen en el (cuadro 1).

Cuadro 1. CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL CANTÓN RIOBAMBA.

INDICADORE	2016
Temperatura (°C).	13,45
Precipitación (mm/año).	42,8
Humedad relativa (%).	61,4
Viento / velocidad (m/s).	2,50
Heliofania (horas/ luz).	1317,6

Fuente: Estación Meteorológica Facultad de Recursos Naturales ESPOCH,(2017)

#### B. UNIDADES EXPERIMENTALES

Para la presente investigación se utilizará 12 litros de simbiótico (volumen de cultivo) partiendo de la preparación de muestras de 200ml (TUE), pues al ser un arreglo bifactorial tenemos tres niveles de probióticos (*Lactobacillus casei* 50 mg ,100 mg y 150 mg) que es el factor A, y ,2 niveles de prebiótico (Inulina de 40 mg y 80 mg) que es el factor B con 10 repeticiones que serán motivos de estudio.

## C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

### 1. Materiales De Laboratorio.

- Cajas Petri.
- Vasos de precipitación.
- Matraces.
- Pipetas 10 ml
- Tubos de ensayo
- Tapones para tubos de ensayo.
- Frascos termo resistentes.
- Papel absorbente.
- Papel aluminio.
- Alcohol antiséptico.
- Alcohol industrial.
- Espátula
- Cinta parafilm
- Codificadores
- Marcador codificador
- Cooler
- Fundas ziploc
- Gradilla
- Matraces
- Puntas para micro pipetas 1000 $\mu$ l ,100 $\mu$ l
- Asa drigalsky de vidrio en forma de L
- Papel de empaque
- Tijera
- Probeta
- Crisoles

## 2. Equipos

- Micropipeta 1000µl
- Micropipeta 100µl
- Agitador Shaker incubadora ES-20
- Agitador orbital Shaker
- Desecador
- pH-metro
- cuenta colonias
- Agitador magnético.
- Agitador para tubos
- Balanza normal.
- Balanza analítica.
- Mecheros
- Cámara de flujo laminar.
- Refrigerador.
- Estufa
- Autoclave.
- Reverbero
- Mini Spray Dryer B-290 marca BÜCHI

## 3. Materia prima e insumos

- Agar MRS.
- Cultivo comercial liofilizado de *Lactobacillus casei*.
- Inulina
- Suero
- Urea.
- Fosfato de amonio.
- Agua destilada

#### 4. Instalaciones

Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH

Laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH

Laboratorio de prototipos, producción y agroemprendimientos de la UTPL –LOJA

#### **D. TRATAMIENTOS Y DISEÑOS EXPERIMENTALES**

En esta investigación se probó distintas mezclas de Inulina y *Lactobacillus casei* encapsulándolos por el método de Spray Drying. Haciendo dos soluciones de Inulina de 40 mg y 80 mg, con 3 concentraciones de microorganismos 50 mg, 100 mg y 150 mg. Se trabajó con un Diseño Completamente al Azar con un arreglo Bifactorial el mismo consta de 6 tratamientos, 10 repeticiones, Vàsques V. (2014). En donde La fórmula del diseño es:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + A*B_{ij} + e_{ijk}$$

$\mu$  = efecto de la media

$A_i$  =efecto del factor A en el i-ésimo nivel

$B_j$  = efecto del factor A en el i-ésimo nivel

$A*B_{ij}$  = efecto de la interacción de los factores

$e_{ijk}$  = error experimental

En el cuadro 2, se describe el esquema del experimento que se utilizó en la presente investigación:

**Cuadro 2. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO**

Factor A	Factor B	Código	Repetición	TUE(ml)	TUE/ Trat.
<i>Lactobacillus c.</i> 50mg	Inulina 40mg	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	10	200	2000
<i>Lactobacillus c.</i> 100mg	Inulina 80mg	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	10	200	2000
<i>Lactobacillus c.</i> 150mg	Inulina 40mg	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	10	200	2000
<i>Lactobacillus c.</i> 50mg	Inulina 80mg	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	10	200	2000
<i>Lactobacillus c.</i> 100mg	Inulina 40mg	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	10	200	2000
<i>Lactobacillus c.</i> 150mg	Inulina 80mg	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	10	200	2000
<b>TOTAL</b>				<b>60</b>	
<b>12000ml</b>					

**E. MEDICIONES EXPERIMENTALES**

Análisis físico – químico

- pH
- Densidad g/ml

Análisis microbiológico

- Evaluar la cantidad de Bacterias Acido Lácticas (BAL). UFC/ml.
- Determinar la viabilidad (Log UFC/g).

**F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBA DE SIGNIFICANCIA**

En la presente investigación las mediciones experimentales fueron modeladas bajo un Diseño Completamente al Azar con un arreglo combinatorio sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

- Análisis de Varianza (ADEVA), para aceptar la hipótesis.
- Separación de medias ( $P < 0,05$ ) a través de la prueba de DUCAN, utilizando en programa infostat versión 1 (2016).

Se describe el esquema del análisis de varianza que se aplicó en la investigación: en el (cuadro 3)

**Cuadro 3.ESQUEMA DEL ADEVA**

Fuentes de Variación	Grados De Libertad	
	TOTAL	ab (r-1)
FACTOR A	a-1	2
LINEAL	1	1
CUADRADO	1	1
FACTOR B	b-1	1
INT. AB	(a-1)(b-1)	2
ERROR	ab (r-1)	54

## G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- Preparación de los biorreactores
- Activación de microorganismos
- Siembra y recuento de la biomasa
- Determinación de la cantidad de Bacterias Ácido Lácticas- BAL (UFC/g)de la biomasa
- Encapsulación
- Siembra y recuento de los encapsulados
- Determinación de la cantidad de Bacterias Ácido Lácticas- BAL (UFC/g)de los encapsulados
- Determinación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* (log UFC/g) de los encapsulados
- Determinación de la Densidad
- Determinación del pH

## H. METODOLOGIA DE EVALUACIÓN

### 1. Preparación de los biorreactores

Se preparó los birreactores a partir de la formulación de Yáñez, G. (2016) considerando la recomendación realizada en su investigación.

- Pesar los componentes de la formulación (192ml de suero (96%),3.2 gr. Urea(1.6%) y 4.8 gr. Fosfato de amonio(2.4%))
- Disolver
- Colocar en frascos termo resistentes de 250 ml de capacidad, con sellado hermético.
- Esterilizar

### 2. Activación de microorganismos

Se realizó la activación de la los *Lactobacillus casei* a partir de la formulación de Yáñez, G. (2016) considerando una gradiente de 50 con respecto al inculo (50, 100 y 150).

- Inoculación de la cepa liofilizada en el biorreactor (la cantidad correspondiente para cada tratamiento),
- Sellar con cinta parafilm los frascos (bioseguridad)
- Distribuirlos biorreactores en el agitador Shaker orbital a una temperatura de 37°C, durante 48 horas y con 50 rpm.
- Realizar pruebas de realizar pruebas de solidos totales (SST) de cada uno de los tratamientos.
- Colocar los biorreactores en un cooler con hielo ligeramente esparcido, para la conservación y bioseguridad de la biomasa que serán microencapsulados después de 16 horas

### 3. Siembra y recuento de la biomasa

Utilizando para la siembra Normas ISO, UNE... (2006)

- Plaquear utilizando agar MRS (70 g de medio en 1000 ml de agua purificada), esterilizar dentro de frascos termoresistentes y finalmente verter 15 ml en cajas Petri y codificar
- Realizar diluciones  $10^{-3}$  y por triplicado de los microencapsulados, de cada uno de los tratamientos.
- Tomar 0,1 ml (100 $\mu$ l) de cada dilución y sembrar en las cajas Petri con el método de siembra por superficie, usando la Asa drigalsky vidrio, e incubar a 36°C por 48 horas.
- Realizar el recuento utilizando una cuenta colonias.
- Para colonias demasiado numerosas o incontables se realiza un conteo dividiendo la caja en 2 o 4 partes dependiendo el caso, se cuenta una parte, y éste se multiplica por las partes divididas.

### 4. Determinación de la cantidad de Bacterias Ácido Lácticas- BAL (UFC/g) de la biomasa

Calcular el valor de UFC/ml de las bacterias en estudio empleando la Ec. 1. Yáñez, G. (2016):

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias por placa} \times \text{el factor inverso de la dilución}}{\text{ml de la muestra sembrad}} \quad [\text{Ec. 1}]$$

### 5. Encapsulación

Se basó de acuerdo a un estudio científico frente a las temperaturas óptimas para micro encapsular probióticos con agentes prebióticos Montes. (2013).

- Realizar la relación 1:3 respecto al peso seco de la biomasa y al material encapsulante (maltodextrina).
- Agregar el prebiótico (Inulina) correspondiente a cada tratamiento y homogenizar.

- la mezcla es alimentada al secador y se atomiza por medio de una boquilla o disco.
- Atomizar la biomasa en el equipo Mini Spray Drying a una temperatura de entrada de  $100\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$  y una temperatura de salida de  $50\pm 5$ , con una alimentación de 10. La biomasa cae en forma de pequeñas gotitas en un medio de secado (aire caliente); dando como resultado un material que queda incluido dentro de otro. el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s)
- Se recoge el material microencapsulado del recolector del equipo, se envasa, pesa y codifica.

## **6. Siembra y recuento de los encapsulados**

Utilizando para la siembra Normas ISO, UNE... (2006)

- Plaquear utilizando agar MRS (70 g de medio en 1000 ml de agua purificada), esterilizar dentro de frascos termoresistentes y finalmente verter 15 ml en cajas Petri y codificar
- Realizar diluciones  $10^{-3}$  y por triplicado de los microencapsulados, de cada uno de los tratamientos.
- Tomar 0,1 ml (100 $\mu$ l) de cada dilución y sembrar en las cajas Petri con el método de siembra por superficie usando la Asa drigalsky vidrio, e incubar a  $36^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.
- Realizar el recuento utilizando una cuenta colonias.
- Para colonias demasiado numerosas o incontables se realiza un conteo dividiendo la caja en 2 o 4 partes dependiendo el caso, se cuenta una parte, y éste se multiplica por las partes divididas.

## **7. Determinación de la cantidad de Bacterias Ácido Lácticas- BAL (UFC/g)de los encapsulados**

Calcular el valor de UFC/ml de las bacterias en estudio empleando la Ec. 2 Yáñez, G. (2016):

$$\frac{\text{UFC}}{\text{gr.}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias por placa} \times \text{el factor inverso de la diluci3n}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

[Ec. 2]

### **8. Determinaci3n de la viabilidad de *Lactobacillus casei* (log UFC/g) de los encapsulados**

Calcular el valor de la viabilidad expresando las UFC/ml en logaritmo natural UFC/ml de UFC/ml de las bacterias en estudio empleando la Ec. 3 Y3nez, G. (2016):

Viabilidad = Log natural X (N° UFC/ ml) [Ec. 3]

### **9. Determinaci3n de la Densidad**

- Se utiliz3 una probeta de 10 ml la cual se pes3 en gramos.
- Se incorpor3 el simbi3tico a la probeta cuidadosamente utilizando una geringa para que no queden part3culas en las paredes, hasta alcanzar un volumen de 2ml.
- se tom3 el peso de la probeta con el simbi3tico.
- se aplic3 la formula m/v para obtener la densidad.

### **10. Determinaci3n del pH**

Para determinar esta variable nos basamos en la norma INEN 526 1980-12 ,2012. (Anexo 8)

- Se homogeniza la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que lo contiene.
- La determinaci3n debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra preparada
- Comprobar el correcto funcionamiento del potenci3metro.
- Pesar, 1 g de muestra y colocar en el vaso de precipitaci3n, a3adir 100 cm<sup>3</sup> de agua destilada, recientemente hervida y enfriada, y agitar suavemente hasta que las part3culas queden uniformemente suspendidas.

- Continuar la agitación durante 30 minutos a 25°C, y dejar en reposo.
- Determinar el pH por lectura directa, introduciendo los electrodos del potenciómetro en el vaso de precipitación con la muestra, cuidando que éstos no toquen las paredes del recipiente ni las partículas sólidas.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### A. EVALUACIÓN FÍSICO QUÍMICO DEL ANÁLISIS DE LA OBTENCIÓN DE UN SIMBIÓTICO ENCAPSULADO A BASE DE DIFERENTES NIVELES DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg

###### 1. pH

Se realizó el análisis de la variable pH de todos los tratamientos, obteniendo el resultado mayor con 100 mg de *Lactobacillus casei* y 80mg de Inulina (7.33), mientras que el menor valor fue de 6.52 en el encapsulado que contiene 150 mg de *Lactobacillus casei* y 80mg de Inulina, valores que difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) del resto de tratamientos.

Según Ortiz et, al (2008), menciona en su estudio sobre la Evaluación de la capacidad probiótica “in vitro” de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae* que las bacterias ácido lácticas crecen en pH, donde los medios son ligeramente ácidos (4,5 a 6,4). Por otro lado López et al (2009) nos da a conocer que la maltodextrina tiene un efecto significativo en los °Brix y la viscosidad del medio en donde se aplica por lo que es necesario encontrar un equilibrio entre el máximo de °Brix y una mínima viscosidad, pues una viscosidad baja permite una mejor fluidez de la mezcla en el sistema de atomización (disco o difusor), y una alta concentración de sólidos totales incrementa el rendimiento del producto final, es por ello que Ochoa et al (Citado por López et al.,2009), nos dice que la maltodextrina es uno de las materias primas base en los procesos de secado por aspersión para productos con un bajo contenido de sólidos totales.

El pH de los biorreactores cuando culminaron su proceso de activaron oscilan entre 6 y 6.2, pero, al agregar la maltodextrina en una proporción 1:3 (biomasa y material encapsulante) debido a que la cantidad de SST de la biomasa es bajo (0,8-1,0 %), sube sustancialmente los °Brix por lo que al utilizar la INULINA (prebiótico), este actúa como una solución tampón de acuerdo a su ficha técnica , en el que indica que si se aplica en una solución que tiene 30 y 50 °Brix este

tendrá un pH de 5 y 7 respectivamente. Es por ello que el pH de nuestros encapsulados llega a rangos de neutralidad.

Se describe el efecto de la interacción entre diferentes niveles de inulina y *Lactobacillus casei*: en el (cuadro 4)

CUADRO 4. EFECTO DE LA INTERRACCION ENTRE DIFERENTES NIVELES DE INULINA Y L. CASEI EN LA OBTENCION DE SIMBIOTICOS ENCAPSULADOS

Variables	50 mg. <i>Lactobacillus casei</i>		100 mg. <i>Lactobacillus casei</i>		150 mg. <i>Lactobacillus casei</i>		Error estándar	Probabilidad
	40 mg. Inulina	80mg. Inulina	40 mg. Inulina	80 mg. Inulina	40mg. . Inulina	80mg. Inulina		
pH	6.98 b	6.85 a	6.78 bc	7.33 bc	6.71 bc	6.52 c	0.11	0.00
DENSIDAD, g/ml	0.66 a	0.64 a	0.64 a	0.69 a	0.67 a	0.7 a	0.02	0.17
BAL, UFC/mg	2.15E+06 a	6.56E+05 b	2.00E+06 ab	1.51E+06 ab	9.49E+05 b	2.99E+06 a	0.41	0.00
VIABILIDAD, log UFC/ml	11.79 a	10.48 b	11.48 ab	11.55 ab	10.46 b	12.31 a	0.41	0.00

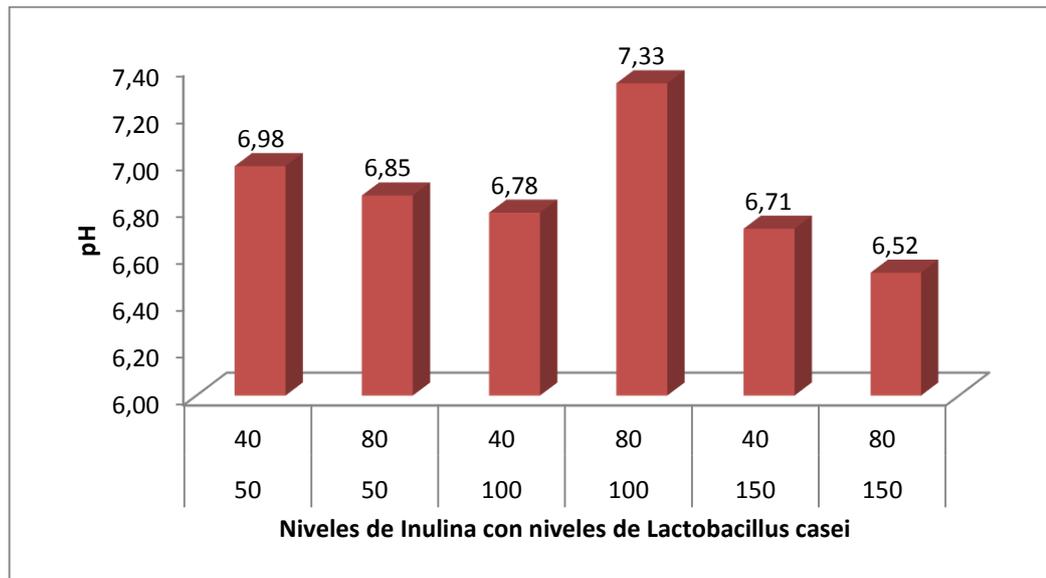
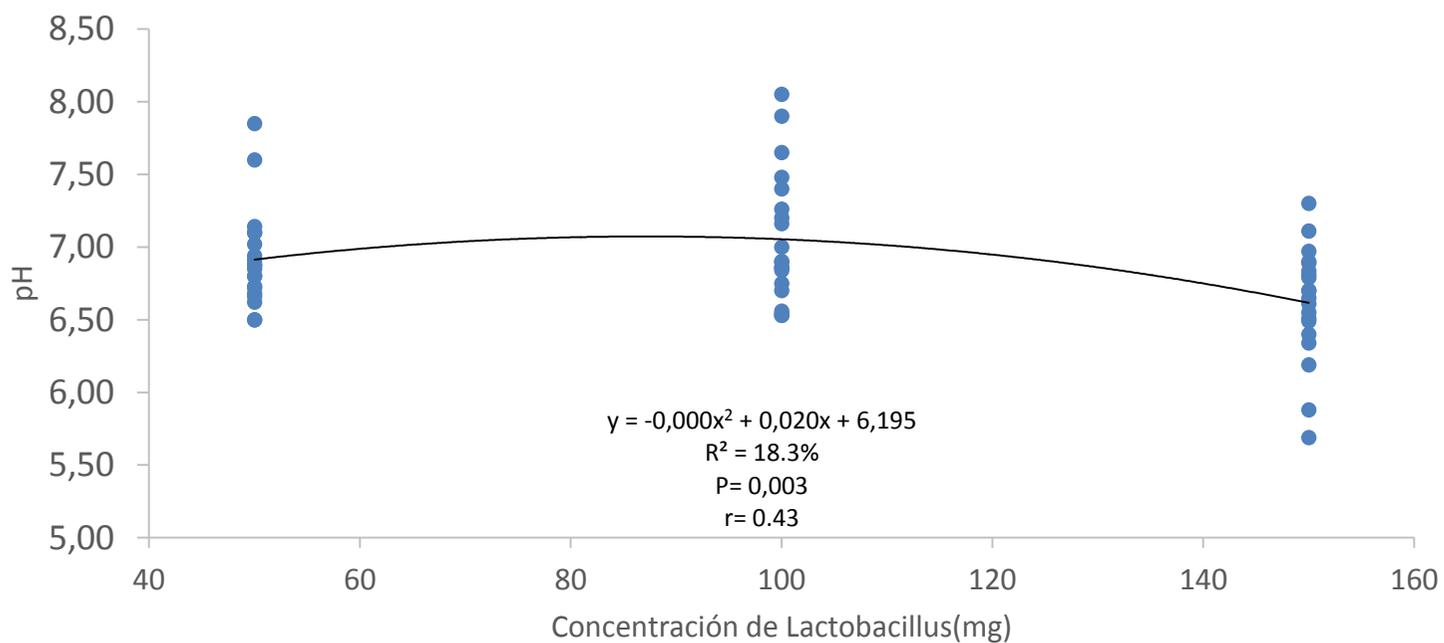


Grafico 1. pH de los diferentes encapsulados combinados con diferentes niveles de inulina y *Lactobacillus casei*

A demás al hacer el análisis de varianza encontramos que mediante el coeficiente de determinación la función que más se ajusta es la cuadrática por lo que se realizó regresión encontrándose diferencias altamente significativa ( $<0.01$ ), donde se infiere que partiendo de un intercepto de  $-0,000x^2$  la tensión se eleva  $0,020x$  y finaliza en el intercepto final de  $6,195$ , con un coeficiente de determinación de  $R^2 = 18.3\%$ ; mientras tanto que el  $81.17\%$  restantes dependió de otros factores no determinados en la presente investigación. La ecuación aplicada para la determinación de la regresión de la prueba de la resistencia a la tensión fue:

$$\text{Resistencia a la tensión} = -0,000x^2 + 0,020x + 6,195 (\%CM)$$

Grafico 2 .Regresión cuadrática de la variable pH del simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles de Inulina 40 mg y 80 mg , Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg



## 2. Densidad

En lo que refiere a la densidad no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los tratamientos siendo 0.70 g/ml la mayor densidad presente en 150 mg de *Lactobacillus casei* con 80 mg de Inulina en tanto que , con 50 mg de *Lactobacillus casei* con 80 mg de Inulina se presenta una densidad menor 0,64 g/ml, resultados que se encuentran en concordancia con otras investigaciones realizadas por Sánchez (2016), que determina la densidad de la microcapsulas de cacao con 2 materiales encapsulantes ( maltodextrina y HI-CAP100) que obtuvieron 0,605 y 0,622 respectivamente .estos resultados permiten deducir que la densidad del encapsulado dependerán de muchos factores uno de ellos del peso molecular del material encapsulante , puesto que mayor peso del mismo mayor será la densidad, atribuyéndose un peso mayor a HI-CAP100(almidón modificado) frente a las maltodextrinas (obtenidas por hidrolisis de almidones )

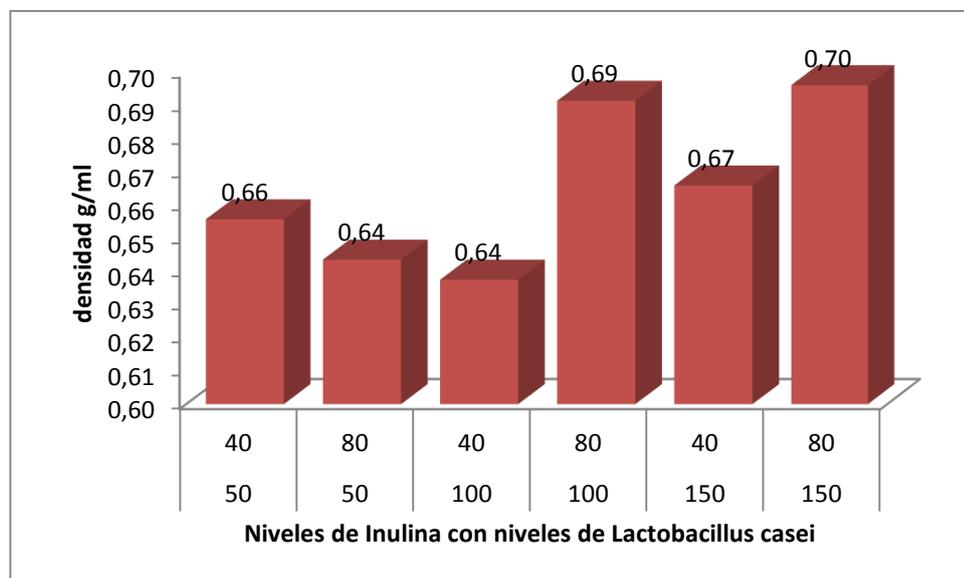


Grafico 3 .La densidad en g/ml de los diferentes encapsulados combinados con diferentes niveles de inulina y *Lactobacillus casei*

La densidad de los microencapsulados tiene una media de 0,66 g/ml. que es relativamente baja, debido a que el peso molecular del material encapsulante (Maltodextrina) que se utilizo es relativamente bajo puesto que es obtenida partir

de la hidrólisis de almidón, pero no obstante es mayor a la investigación de capsulas de cacao debido a la cantidad de concentración aplicada para la atomización (1:3) respecto al peso seco de la biomasa y al material encapsulante (maltodextrina).

## B. EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS EN LA OBTENCIÓN DE UN SIMBIÓTICO ENCAPSULADO A BASE DE DIFERENTES NIVELES DE INULINA 40 mg y 80 mg, Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg

### 1. *Lactobacillus Casei* (BAL)

La utilización de 50 mg de *Lactobacillus casei* con 40mg de Inulina además de 150 mg de *Lactobacillus casei* con 80mg de Inulina permitieron registrar 14,09 y 14,62 UFC/g de *Lactobacillus casei* respectivamente, valores que difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) del resto de tratamientos, principalmente de los tratamientos 50 mg de *Lactobacillus casei* con 80mg de Inulina y 150 mg de *Lactobacillus casei* con 40mg de Inulina con las cuales registraron 12,78 y 12,76 UFC/g de *Lactobacillus casei*.

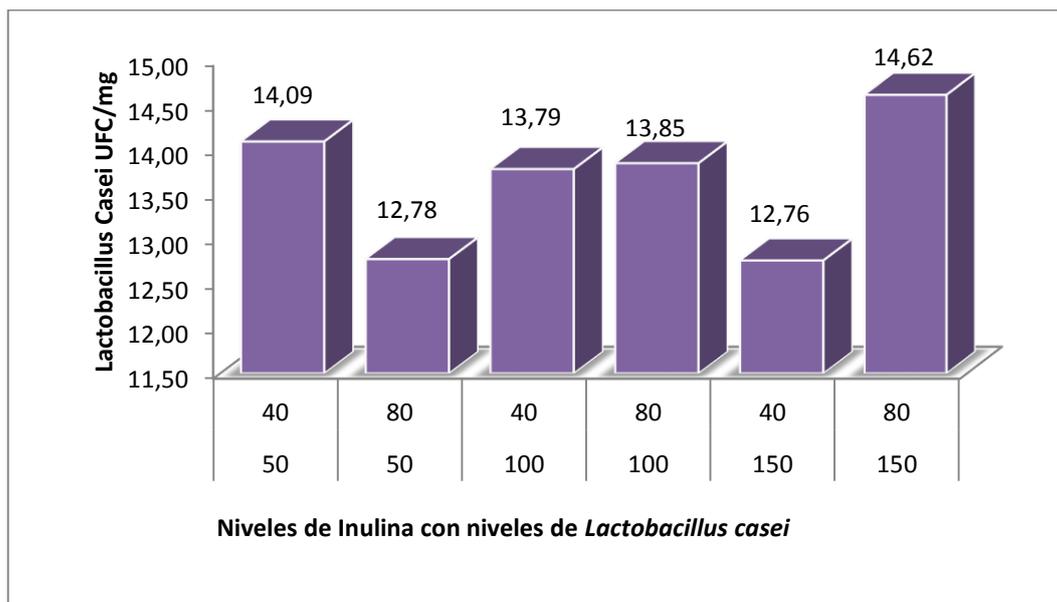


Gráfico 4. El recuento microbiano de la cantidad de bacterias ácido lácticas presentes en el simbiótico en los diferentes encapsulados combinados con diferentes niveles de inulina y *Lactobacillus casei*

De acuerdo a la Norma NTE INEN 1334-3:2011 en numeral 5.1.5 Propiedades de salud comprobadas que se pueden declarar en los alimentos. Literal b) nos dice que: El alimento debe contener un número mayor o igual de bacterias viables de origen probiótico a  $1 \times 10^6$  UFC/g en el producto terminado hasta el final de la vida útil. Encontrándose en el cuadro 1 el recuento bacterias ácido lácticas (BAL) de cada uno de las combinaciones de los simbióticos encapsulados, hallándose  $2.15E+06$ ,  $2.00E+06$ ,  $1.51E+06$  y  $2.99E+06$  en las combinaciones 50 mg *Lactobacillus casei* con 40 mg Inulina, 100 *Lactobacillus casei* con 40 mg Inulina, 100 mg *Lactobacillus casei* con 80 mg Inulina y 150 mg *Lactobacillus casei* con 80 Inulina, respectivamente. Considerándoles a estas netamente probióticos porque cumplen la norma.

CUADRO 5. RECUENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL) DE CADA UNO DE LAS COMBINACIONES DE LOS SIMBIÓTICOS ENCAPSULADOS.

<i>Lactobacillus casei</i> , mg	Inulina, mg	BAL, UFC/g
50	40	$2.15E+06$
50	80	$6.56E+05$
100	40	$2.00E+06$
100	80	$1.51E+06$
150	40	$9.49E+05$
150	80	$2.99E+06$

## 2. Viabilidad

La viabilidad del *Lactobacillus casei* en la obtención en la microencapsulación se partió de un recuento inicial de  $10^7$  UFC/ml o 16.11 log UFC/ml, y después del proceso de atomización obtuvimos como resultados 11.79 log UFC/ml, 10.48 log UFC/ml 11.48 log UFC/ml 11.55 log UFC/ml 10.46 log UFC/ml y 12.31 log UFC/ml en las encapsulados con las siguientes combinaciones: 50 mg *Lactobacillus casei* con 40 mg Inulina, 50 mg *Lactobacillus casei* con 80 mg Inulina, 100 mg *Lactobacillus casei* con 40 mg Inulina, 100 mg *Lactobacillus casei* con 80 mg

Inulina, 150 mg *Lactobacillus casei* con 40 mg Inulina y 150 mg *Lactobacillus casei* con 80 mg Inulina, respectivamente.

Según Montes (2013), en el proceso de atomización de su investigación titulada: EFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN CON AGENTES PREBIÓTICOS SOBRE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469).trabajo bajo temperaturas controladas de entrada  $100\pm 3$  °C y una temperatura de salida de  $48\pm 3$  °C, tienen los encapsulados con una viabilidad del 65.71 %.

La viabilidad de la presente investigación es de 70.42%, debido a que, al agregar una concentración alta de maltodextrina (1:3) esta actúa como termo protector para los microorganismos, teniendo en cuenta que en el proceso de secado por atomización los microorganismos sufren un alza de temperatura drásticamente de 100 °C , la cual se encuentra fuera del rango optimo en el desarrollo de las bacterias *Lactobacillus casei*.

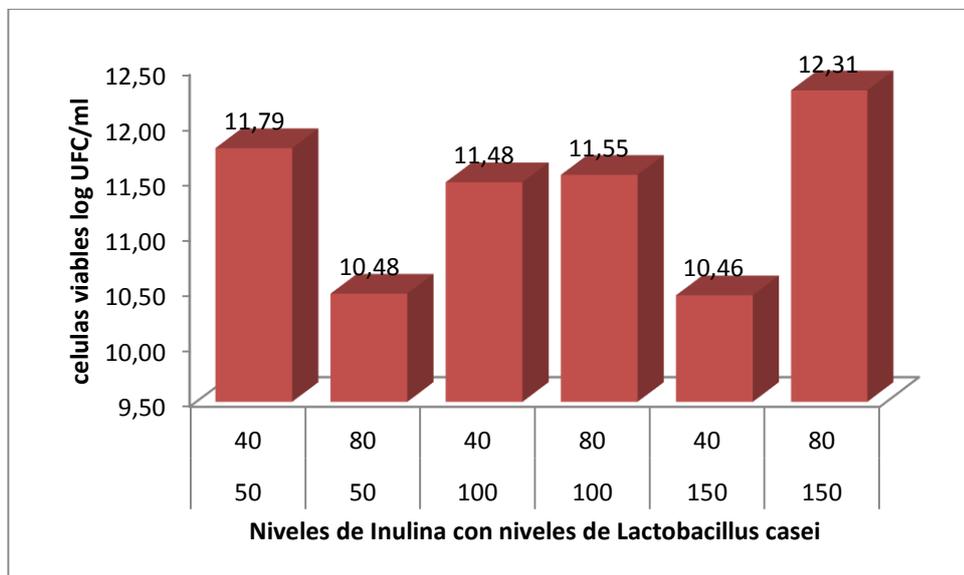


Grafico 5. Viabilidad en los encapsulados combinados con diferentes niveles de inulina y *Lactobacillus casei*

## V. CONCLUSIONES

- Mediante el método spray Drying se pudo obtener 6 tipos diferentes de simbióticos encapsulados, mediante la utilización de *Lactobacillus casei* (50,100 y 150) mg combinados con Inulina (40mg y 80) mg, para cada uno de los tratamientos.
- Se pudo evaluar la cantidad de BAL presentes en los 6 tipos diferentes de simbiótico encapsulado dando como resultado (2.15E+06, 6.56E+05, 2.00E+06, 1.51E+06, 9.49E+05 y 2.99E+06) UFC/g, en las combinaciones 50 mg *Lactobacillus casei* con 40 y 80 mg Inulina, 100 mg *Lactobacillus casei* con 40 y con 80 mg Inulina, 150 mg *Lactobacillus casei* con 40 y con 80 mg Inulina respectivamente.
- Se pudo concluir que los 6 diferentes encapsulados obtuvieron un pH que se encuentra dentro del rango de neutralidad siendo el menor valor 6.52 y el mayor 7.33 ,mientras que la variable densidad se encuentra en una media de 0,66 g/ml. entre los tratamientos.
- Se determinó la mejor concentración del simbiótico encapsulado dentro de la combinación de 150 mg *Lactobacillus casei* con 80mg de Inulina obteniendo 2.99E+06 UFC/g.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Realizar el estudio respectivo para determinar el tiempo exacto de sinergismo en el estudio (0, 24 y 48) horas entre el *Lactobacillus casei* y la Inulina en cada uno de micro encapsulados.
- Proceder con análisis de la vida útil, las técnicas de empaque y las condiciones de almacenamiento del producto.
- Para la continuidad de esta investigación se recomienda realizar pruebas físico-químicas una de ellas importante es la micrografía eléctrica de barrido (E-SEM) de los polvos encapsulados obtenidos, actividad de agua de los polvos y la humedad, rendimiento de producción, eficacia de la encapsulación y contenido en material activo y estudio de liberación del material activo.
- Aplicación del microencapsulado en distintas matrices alimentarias para obtener un alimento funcional.

## **LITERATURA CITADA**

- Agirre, M. 2016. PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS. *El farmacéutico.es*. Obtenido de Curso de atención farmacéutica en preparados alimenticios en la farmacia comunitaria:<http://elfarmacéutico.es/index.php/cursos/item/7600-probioticos-prebioticos-y-simbioticos#.Wm8En2nOXMx>
- Araújo et al.,. (2015). TÉCNICAS PARA LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS Y EL IMPACTO EN SU FUNCIONALIDAD: UNA REVISIÓN. *Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol 23. No 36 . Revista Alimentos Hoy. Colombia. pp 112-114-126.
- Barrio Merino A. (2016),PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS. DEFINICIÓN, FUNCIONES Y APLICACIÓN CLÍNICA EN PEDIATRÍA. *Fundación Hospital Alcorcón, Unidad de Pediatría*. Madrid .Disponible en : <http://pap.es/files/1116-531-pdf/556.pdf>
- Caez y Jaraba. (2012). MICROENCAPSULACIÓN DEL JUGO DE MANGO (Mangifera Indica L.) PARA LA OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO CON LA UTILIZACIÓN DE MALTODEXTRINA COMO MATERIAL PARED .*Universidad de Cartagena*. Cartagena de Indias. Disponible en: <http://190.242.62.234:8080/jspui/bitstream/11227/1398/1/INFORME%20OFICIAL%20pdf.pdf>
- Cagigas y Anesto. (2002). PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS, UNA RELACIÓN BENEFICIOSA. *Revista Cubana Aliment Nutr* 2002;16(1):63-8 .disponible en : [http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16\\_1\\_02/ali10102.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.pdf)
- Chanantita et al.,.2014. OBTENIDO DE CONTENIDO DE INULINA DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS FORTIFICADOS EN TAILANDIA, disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614017142>
- Estación Meteorológica Facultad De Recursos Naturales ESPOCH,(2017) Disponible en : <https://www.espoch.edu.ec/index.php/estaci%C3%B3n-meteorol%C3%B3gica.html>
- FAO/OMS, 2006. PROBIÓTICOS EN LOS ALIMENTOS PROPIEDADES SALUDABLES Y NUTRICIONALES Y DIRECTRICES PARA LA EVALUACIÓN. Roma. pp 2-17. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>
- Foo et al. (1993). *United Kingdom*. pp. 89 – 91. Obtenido de <https://www.caister.com/backlist/horizonscientificpress/lab.html>
- Fontecha J . (2003). LOS PREBIOTICOS EN LOS ALIMNTOS : ORIGEN Y EFECTOS SOBRE EL ORGANISMO HUMANO .INSTITUTO DEL FRIO CONCEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)REVISTA NUTRICION Y SALUD . NUEVOS ALIMENTOS PARA NUEVAS NECESIDADES . Madrid . disponible en :[http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/nuevos\\_alimentos.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/nuevos_alimentos.pdf)
- Guevara y Bretón. (2008). MATERIALES UTILIZADOS EN LA ENCAPSLACION ,*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos*. Obtenido de Universidad de las Américas - Mexico:

<http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-1/TSIA-2%281%29-Guevara-Breton-et-al-2008b.pdf>

- Lara Laura. 2011. INULINA: Polisacárido con interesantes beneficios a la salud humana y con aplicación en la industria farmacéutica, *INFARMATE*. Ciencias de la Nutrición en la Universidad de las Américas Puebla, Disponible en: <http://www.zukara.com.mx/inulina%202011.pdf>
- López et al (2009). ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE LA MEZCLA DE PULPA DE BANANO (*Musa paradisiaca* L.) PARA SOMETER A SECADO POR ASPERSIÓN. REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA. Vol.16 N° 3. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a02.pdf>
- Luján, M. (2007), BACTERIOFAGOS DE *LACTOBACILLUS CASEI/PARACASEI*. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA FAGORRESISTENCIA, Universidad Nacional del Litoral, Disponible en: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/128/tesis1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Madrigal & Sangronis. (2007), LA INULINA Y DERIVADOS COMO INGREDIENTES CLAVES EN ALIMENTOS FUNCIONALES. *Archivos latino Americanos de Nutricion*. Vol. 57 N° 4. Universidad de Bolivar. Caracas. Disponible en : <http://www.piaschile.cl/wp-content/uploads/2015/04/La-inulina-y-derivados-como-ingredientes-claves-en-alimentos-funcionales.pdf>
- Mariluz Alonso. (2011). MICROENCAPSULACIÓN DE BIOCIDAS. *Universidad Euskal Herriko . VASCO*. Disponible en: [https://addi.ehu.es/bitstream/10810/6944/7/1-%20Cap.I%20\(Tesis-Alonso\).pdf](https://addi.ehu.es/bitstream/10810/6944/7/1-%20Cap.I%20(Tesis-Alonso).pdf)
- Mercola. (2016). *Beneficios de la Inulina en la Salud*. Obtenido de Mercola tome control de su salud E.E.U.U. Disponible en : <https://articulos.mercola.com/sitios/articulos/archivo/2016/03/19/beneficios-de-la-inulina.aspx>
- Montes M. (2013). EFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN CON AGENTES PREBIÓTICOS SOBRE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469) .*Universidad de nacional de Colombia*. Disponible en : <http://www.bdigital.unal.edu.co/9473/1/01107466.2013.pdf>
- Montes Ramires Luz Maria ,2013, ENCAPSULACIÓN DE MICROORGANISMOS, Bogotá, disponible en : <https://www.youtube.com/watch?v=EoojUqeXnhY>
- Normas ISO UNE, (2006) Sara Cano Ruera. Consultora Analiza Calidad, Disponible en: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi148anmic.pdf>
- NTE INEN 1334-3:2011. 2011. ROTULADO DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS PARA CONSUMO HUMANO. PARTE 3. REQUISITOS PARA LAS DECLARACIONES NUTRICIONALES Y DECLARACIONES SALUDABLES. Disponible en: [http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/07/ec.nte\\_.1334.3.2011.pdf](http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/07/ec.nte_.1334.3.2011.pdf)

- NTE INEN 526 1980-12, 2012, HARINAS DE ORIGEN VEGETAL.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IÓN HIDRÓGENO o pH. DETERMINACION DE pH, disponible en: <https://es.scribd.com/document/228282024/NTE-INEN-526-2012ph-de-Harina>
- Ortiz, A.; Reuto, J.; Fajardo, E.; Sarmiento, S.; Aguirre, A.; Arbeláez, G.; Gómez, D.; Quevedo, H.B. (2008). Evaluación de la capacidad probiótica “in vitro” de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Colombia
- Panesso et al ., . ( 2015). PRODUCCIÓN DE ACIDO LACTICO A PARTIR DEL SUERO DE LECHE. *Universidad Nacional de Colombia Sede Medellin*. Disponible en :<https://www.researchgate.net/publication/278414362>
- Parra Huertas Ricardo Adolfo , 2011, Microencapsulación de Alimentos , Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Medellín-Colombia ,Disponible en : <file:///C:/Users/User/Downloads/25055-88057-2-PB.pdf>
- Pèrez y Pelaes. (2017). *Fibra dietaria: nuevas definiciones, propiedades funcionales y beneficios para la salud*. volumen 67 No 2. disponible en : <https://www.alanrevista.org/ediciones/2017/2/art-10/>
- Sánchez Reinoso Zain (2016),EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS Y SENSORIALES DE MICROENCAPSULADOS DE CACAO OBTENIDOS POR SPRAY DRYING, Universidad Nacional de Colombia ,Facultad de Ciencias Agrarias Bogotá, Colombia
- Spreer . (1991). *LACTOLOGIA INDUSTRIAL* . Obtenido de EDITADA ACRIBA p. 432: <https://www.casadellibro.com/libro-lactologia-industrial-2-ed/9788420007151/194132>
- Vàsques V. (2014), DISEÑOS EXPERIMENTALES Con SAS, Edit CONSITEC FONDECYT, CAJAMARCA – PERÙ. Pg. 353.
- Yáñez Tisalema Geovanny David, (2016) ,“USO DE DISTINTOS SUSTRATOS PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA” ,ESPOCH, Riobamba. DISPONIBLE EN : <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/5788>

# Anexos

Anexo.1. EFECTO DE LA INTERRACCION ENTRE DIFERENTES NIVELES DE INULINA Y L. CASEI EN LA OBTENCION DE SIMBIOTICOS ENCAPSULADOS

Resumen

Variables	50		100		150		E.E.	Prob.
	40	80	40	80	40	80		
Lactobacillus Casei UFC/mg	14.09 a	12.78 b	13.79 ab	13.85 ab	12.76 b	14.62 a	0.41	0.00
Ph	6.98 b	6.85 a	6.78 bc	7.33 bc	6.71 bc	6.52 c	0.11	0.00
densidad g/ml Celulas viables log	0.66 a	0.64 a	0.64 a	0.69 a	0.67 a	0.70 a	0.02	0.17
UFC/ml	11.79 a	10.48 b	11.48 ab	11.55 ab	10.46 b	12.31 a	0.41	0.00

Prob. > 0.05 no hay diferencias significativas

Prob. < 0.05 existen diferencias significativas.

Prob. < 0.01 existen diferencias altamente significativas

Anexo 2. Análisis estadístico de Lactobacillus Casei UFC/mg en la elaboración de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y Lactobacillus casei 50 mg, 100 mg y 150 mg

### A. ANÁLISIS DE VARIANZA

ADEVA					
F. Var	gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	59	120.15			
Factor A mg	2	1.52	0.76	0.44	0.65
Lineal	1	0.64	0.64	0.37	0.54
Cuadrática	1	0.87	0.87	0.51	0.48
Factor B mg	1	0.61	0.61	0.35	0.55
Int. AB	2	25.24	12.62	7.35	0.00
Error	54	92.78	1.72		
CV %			9.60		
Media			13.65		

### B. SEPARACIÓN DE MEDIAS DE ACUERDO A LA PRUEBA DE DUNCAN AL 5%.

#### Interacciones (A \* B)

Int. AB		Media	Grupo
50	40	14.09	a
50	80	12.78	b
100	40	13.79	ab
100	80	13.85	ab
150	40	12.76	b
150	80	14.62	a

Anexo 3. Análisis estadístico del pH en la elaboración de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg

### C. ANÁLISIS DE VARIANZA

ADEVA					
F. Var	Gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	59	10.88			
Factor A mg	2	2.00	1.00	7.60	0.00
Lineal	1	0.89	0.89	6.74	0.01
Cuadrática	1	1.11	1.11	8.46	0.01
Factor B mg	1	0.09	0.09	0.72	0.40
Int. AB	2	1.68	0.84	6.37	0.00
Error	54	7.10	0.13		
CV %			5.29		
Media			6.86		

### D. SEPARACIÓN DE MEDIAS DE ACUERDO A LA PRUEBA DE DUNCAN AL 5%.

#### Interacciones (A \* B)

Int. AB		Media	Grupo
50	40	6.98	b
50	80	6.85	a
100	40	6.78	bc
100	80	7.33	bc
150	40	6.71	Bc
150	80	6.52	c

Anexo 4. Análisis estadístico del densidad en la elaboración de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y *Lactobacillus casei* 50 mg, 100 mg y 150 mg

## ANÁLISIS DE VARIANZA

ADEVA					
F. Var	gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	59	0.20			
Factor A mg	2	0.01	0.00	1.58	0.21
Lineal	1	0.01	0.01	3.17	0.08
Cuadrática	1	0.00	0.00	0.00	0.96
Factor B mg	1	0.01	0.01	2.78	0.10
Int. AB	2	0.01	0.01	1.80	0.17
Error	54	0.17	0.00		
CV %			8.40		
Media			0.67		

## E. SEPARACIÓN DE MEDIAS DE ACUERDO A LA PRUEBA DE DUNCAN AL 5%.

### Interacciones (A \* B)

Int. AB		Media	Grupo
50	40	0.66	a
50	80	0.64	a
100	40	0.64	a
100	80	0.69	a
150	40	0.67	a
150	80	0.70	a

Anexo 5. Análisis estadístico del viabilidad en la elaboración de un simbiótico encapsulado a base de diferentes niveles DE INULINA 40 mg y 80 mg , Y Lactobacillus casei 50 mg, 100 mg y 150 mg

## ANÁLISIS DE VARIANZA

ADEVA					
F. Var	gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	59	120.15			
Factor A mg	2	1.52	0.76	0.44	0.65
Lineal	1	0.64	0.64	0.37	0.54
Cuadrática	1	0.87	0.87	0.51	0.48
Factor B mg	1	0.61	0.61	0.35	0.55
Int. AB	2	25.24	12.62	7.35	0.00
Error	54	92.78	1.72		
CV %			11.55		
Media			11.35		

## F. SEPARACIÓN DE MEDIAS DE ACUERDO A LA PRUEBA DE DUNCAN AL 5%.

### Interacciones (A \* B)

Int. AB		Media	Grupo
50	40	11.79	a
50	80	10.48	b
100	40	11.48	ab
100	80	11.55	ab
150	40	10.46	b
150	80	12.31	a

## Anexo 6. Ficha técnica del probióticos *Lactobacillus casei*

**CHR HANSEN**

### FD-DVS L.casei-01 nu-trish®

Información de Producto

Versión: 1 PI-EU-ES 04-09-2008

<b>Descripción</b>	Cultivo ácido láctico mesófilo. El cultivo es una cepa simple definida con una larga historia de uso seguro.		
<b>Taxonomía</b>	Lactobacillus paracasei		
<b>Envase</b>	<b>No Material:</b> 100088	<b>Tamaño</b> 5X25 G	<b>Tipo</b> Sobre (s) en caja
<b>Propiedades Físicas</b>	<b>Color:</b>	Blanco a ligeramente rojizo o marrón	
	<b>Aspecto Físico:</b>	Granulado	
<b>Aplicación</b>	<b>Uso</b> El cultivo es utilizado en la producción de productos lácteos fermentados. El cultivo es aplicado fundamentalmente en combinación con cultivos ácido lácticos como Streptococcus thermophilus o cultivos de yogur, pero puede también ser utilizado solo. Una evaluación de riesgos y control de puntos críticos ha sido desarrollada para productos lácteos fermentados. Para otras aplicaciones una evaluación de riesgos debería ser completada antes de que el producto sea liberado para la venta ya que los riesgos para la seguridad alimentaria son distintos de los productos fermentados. <b>Dosis recomendada</b> Se recomienda que L.casei-01 sea inoculado de acuerdo con el recuento deseado de células probióticas en el producto final. Esto está influido por la caducidad, el pH y la temperatura de almacenamiento del producto final. Para los productos fermentados la interacción con otras cepas además del tiempo de fermentación y la temperatura pueden también afectar al recuento final de células probióticas.		

## FD-DVS L.casei-01 nu-trish®

Información de Producto

Versión: 1 PI-EU-ES 04-09-2008

**CHR HANSEN**

### Directivas para su uso

Sacar el cultivo del congelador justo antes de su utilización. No descongelar.  
Limpiar la parte superior del sobre con cloro. Abrir el sobre y añadir los granulos liofilizados directamente al producto pasteurizado mientras se agita suavemente.  
Agitar la mezcla durante 10-15 minutos para distribuir el cultivo homogéneamente. La temperatura recomendada de incubación depende de la aplicación en la que se va a utilizar el cultivo. Para más información sobre aplicaciones específicas, por favor, consulte nuestros catálogos técnicos y recetas recomendadas.

**Gama** L.casei-01 está disponible en forma congelada y liofilizada.

**Almacenaje y manipulación**  $+10\text{ }^{\circ}\text{C} / +0\text{ }^{\circ}\text{F}$ .

**Vida útil** Como mínimo 24 meses desde la fecha de fabricación cuando se almacena siguiendo las recomendaciones.  
A  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $0\text{ }^{\circ}\text{F}$ ) la caducidad es de como mínimo 6 semanas.

### Información técnica

#### Métodos analíticos

Los métodos de referencia y analíticos están disponibles bajo petición.

**Legislación** Chr. Hansen cumple con los requerimientos generales de seguridad alimentaria establecidos por el Reglamento 178/2002/EC. Las bacterias ácido lácticas son reconocidas de forma general como seguras y pueden ser utilizadas en alimentos, sin embargo, para aplicaciones específicas recomendamos que consulte la legislación nacional.

El producto está destinado a ser utilizado en alimentos.

**Seguridad alimentaria** No existe garantía de seguridad alimentaria implícita para aplicaciones de este producto distintas de las indicadas en la sección de utilización. Si desea utilizar este producto en otra aplicación por favor, contacte con su representante de Chr. Hansen para solicitar ayuda.

**Ingredientes** Disponible bajo requerimiento.

**Etiquetado** Etiquetado recomendado "cultivo ácido láctico" o "cultivo iniciador", sin embargo, la legislación puede variar. Por favor, consulte la legislación local.

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

Página: 2 (3)

La información aquí contenida es según nuestro conocimiento verdadero y correcto, y presentada de buena fe. Puede sufrir modificaciones sin previo aviso. Ninguna garantía contra infracciones o patentes está implícita o explícita. Esta información es ofrecida solamente para su consideración y verificación. Copyright Chr. Hansen A/S. Todos los derechos reservados.

## FD-DVS L.casei-01 nu-trish®

Información de Producto

Versión: 1 FI-EU-ES 04-09-2008

**CHR HANSEN**

### Marcas comerciales

Las marcas que aparecen en este documento pueden no estar registradas en su país, aun si poseen el signo ®. Las marcas son propiedad de Chr Hansen o usadas bajo licencia.

### Certificados alimentarios

Kosher:                      Kosher Lácteos exclu. Pasoua

### Servicio técnico

Personal de los Laboratorios de Aplicación y Desarrollo de Productos de Chr Hansen están a su disposición si necesita más información.

Anexo 7.Norma NTE INEN 1334-3:2011 Recuento microbiano de probióticos, requisitos de probióticos y prebióticos que deben cumplir



## INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

---

---

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA**

**NTE INEN 1334-3:2011**

---

### **ROTULADO DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS PARA CONSUMO HUMANO. PARTE 3. REQUISITOS PARA DECLARACIONES NUTRICIONALES Y DECLARACIONES SALUDABLES.**

**Primera Edición**

FOOD PRODUCTS LABELLING FOR HUMAN CONSUMPTION. PART 3. REQUERIMENTS FOR NUTRITIONAL CLAIMS AND HEALTH CLAIMS .

First Edition

---

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, productos alimenticios, rotulado, requisitos.  
AL 01.08-401  
COU: 621.798  
CIU: 311  
ICB: 67.040

- e) Cantidad máxima segura a ser consumida, cuando se considere necesario
- f) Cómo cabe el alimento o ingrediente alimentario en el contexto de una dieta total.
- g) Una declaración sobre la importancia de observar una dieta saludable.

5.1.3 *Declaraciones prohibidas.* No pueden hacerse las siguientes declaraciones de propiedades:

- a) Declaraciones de propiedades que afirmen que un determinado alimento constituye una fuente adecuada de todos los nutrientes esenciales, salvo en el caso de productos bien definidos para los cuales existe una norma nacional o del Codex que sanciona tales declaraciones de propiedades admisibles, o cuando las autoridades competentes hayan admitido que el producto constituye una fuente adecuada de todos los nutrientes esenciales.
- b) Declaraciones de propiedades que hagan suponer que una alimentación equilibrada a base de alimentos ordinarios no puede suministrar cantidades suficientes de todos los elementos nutritivos.
- c) Declaraciones de propiedades que no puedan comprobarse.
- d) Declaraciones sobre la utilidad de un alimento para prevenir, aliviar, tratar o curar una enfermedad, trastorno o estado fisiológico, a menos que:
  - d.1) cumplan con las disposiciones de las normas o directrices nacionales o del Codex para alimentos de Regímenes Especiales y se ajusten a los principios establecidos en estas directrices; o bien.
- e) Declaraciones de propiedades que pueden suscitar dudas sobre la inocuidad de alimentos análogos, o puedan suscitar o provocar miedo en el consumidor.

5.1.4 *Declaraciones de propiedades potencialmente engañosas.* A continuación se presentan ejemplos de declaraciones de propiedades que pueden ser engañosas y no se permite su uso:

5.1.4.1 Declaraciones de propiedades que carecen de sentido, incluidos los comparativos y superlativos incompletos.

5.1.4.2 Declaraciones de propiedades referentes a buenas prácticas de higiene, tales como "genuino", "saludable", "sano".

5.1.5 *Propiedades de salud comprobadas que se pueden declarar en los alimentos.*

5.1.5.1 *Declaraciones que relacionan el consumo de probióticos con una mejor función digestiva:*

- a) El microorganismo o bacteria debe cumplir lo siguiente:
  - a.1) Estar vivo, no ser patógeno y su medio natural es el tracto digestivo humano.
  - a.2) Ser capaz de sobrevivir en el tracto intestinal, es decir, ser resistente a los jugos gástricos y los ácidos biliares.
  - a.3) Tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.
  - a.4) Tener la capacidad de colonizar el intestino.
  - a.5) Tener la capacidad de sobrevivir a lo largo de la vida útil del producto al cual se adiciona.
- b) El alimento debe contener un número mayor o igual de bacterias viables de origen probiótico a  $1 \times 10^6$  UFC/g en el producto terminado hasta el final de la vida útil.
- c) La declaración debe indicar que el consumo adecuado y regular de microorganismos probióticos no es el único factor para mejorar las funciones digestivas y que existen otros factores adicionales a considerar como el ejercicio físico y el tipo de dieta.

(Continúa)

d) Modelo de declaración. "Una adecuada alimentación y un consumo regular de alimentos con microorganismos probióticos, puede ayudar a normalizar las funciones digestivas y regenerar la flora intestinal".

5.1.5.2 *Declaraciones de propiedades de salud que relacionan el consumo de prebióticos con una mejor función intestinal:*

a) La sustancia considerada como prebiótico debe cumplir lo siguiente:

- a.1) La cantidad de alimento que debe consumirse, para obtener el efecto benéfico debe ser razonable en el contexto de la dieta diaria.
- a.2) Ser una sustancia preferida por una o más especies de bacterias benéficas en el intestino grueso o colon.
- a.3) Ser resistente a los ácidos gástricos (a la acidez gástrica).
- a.4) Ser fermentables por la microflora intestinal.
- a.5) Ser resistente a la hidrólisis enzimática endógena.
- a.6) Tener la capacidad de producir cambios en el lumen del intestino grueso o en el organismo del huésped que muestra beneficios para la salud.
- a.7) Estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de aquellas bacterias que están asociadas con la salud y el bienestar.

b) La declaración debe indicar que el consumo adecuado y regular con prebióticos no es el único factor para mejorar las funciones digestivas y que existen otros factores adicionales a considerar tales como el ejercicio físico y el tipo de alimentación.

c) Modelo de declaración. "Una dieta adecuada y el consumo regular de mínimo X g al día de prebióticos Y, promueve una flora intestinal saludable/buena/balanceada"; "Beneficia la flora intestinal"; "Ayuda en el mejoramiento intestinal /función digestiva"

5.1.5.3 *Declaraciones de propiedades de salud relacionadas con reducción de riesgos de enfermedad.* Las siguientes son las declaraciones de propiedades de salud permitidas relacionadas con la reducción de riesgos de enfermedad y los requisitos que se deben cumplir en cada caso.

a) *Calcio y reducción de riesgos de osteoporosis.* Las declaraciones de propiedades de salud asociando calcio con un bajo riesgo de osteoporosis pueden ser hechas en el rótulo o etiqueta del producto, si se cumplen los siguientes requisitos:

- a.1) El alimento debe cubrir o exceder los requisitos exigidos para el término o descriptor "alto" en calcio, estar presente en una forma asimilable y el contenido de fósforo no puede ser superior al de calcio.
- a.2) La declaración debe indicar que el consumo adecuado de calcio no es el único factor para evitar la osteoporosis y que existen otros factores adicionales a considerar como el ejercicio regular, una dieta balanceada, el género, la raza y la edad de la persona.
- a.3) Alimentos que contengan más de 400 mg de calcio por porción declarada en la etiqueta, deben especificar en la declaración que consumos superiores a 2 000 mg de calcio al día no brindan beneficios adicionales a la salud ósea.
- a.4) Declaración modelo. "Ejercicio regular y una dieta balanceada con suficiente calcio ayuda a los adolescentes, adultos jóvenes y mujeres a mantener una buena salud ósea y puede reducir el riesgo de osteoporosis en la vida adulta. Este alimento es alto en calcio"

b) *El sodio y reducción de riesgos de hipertensión.* Las declaraciones de propiedades de salud asociando las dietas bajas en sodio con un menor riesgo de hipertensión pueden ser hechas en el rótulo o etiqueta del producto, si se cumplen los siguientes requisitos:

(Continúa)

## Anexo 8. Norma INEN 526 1980-12 DETERMINACION DE pH



CDU: 664.2:543.062

AL 02.02-310

Norma Técnica Ecuatoriana	HARINAS DE ORIGEN VEGETAL. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ION HIDROGENO	INEN 526 1980-12
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJ ETO</b></p> <p>1.1 Esta norma establece el método para determinar la concentración de ion (pH) en las harinas de origen vegetal.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. ALCANCE</b></p> <p>2.1 Este método es aplicable a harinas de trigo y pan.</p> <p style="text-align: center;"><b>3. RESUMEN</b></p> <p>3.1 Determinar la concentración de ion hidrógeno (pH) utilizando el potenciómetro.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. INSTRUMENTAL</b></p> <p>4.1 <i>Potenciómetro, con electrodos de vidrio.</i></p> <p>4.2 <i>Vaso de precipitación de 250 cm<sup>3</sup>.</i></p> <p>4.3 <i>Piceta.</i></p> <p style="text-align: center;"><b>5. REACTIVOS</b></p> <p>5.1 <i>Solución estándar, de valores de pH conocidos entre 4,5 y 7,0.</i></p> <p style="text-align: center;"><b>6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</b></p> <p>6.1 Las muestras para el ensayo deben estar acondicionadas en recipientes herméticos, limpios, secos (vidrio, plástico u otro material inoxidable), completamente llenos para evitar que se formen espacios de aire.</p> <p>6.2 La cantidad de muestra de la harina de origen vegetal extraída dentro de un lote determinado debe ser representativa y no debe exponerse al aire mucho tiempo.</p> <p>6.3 Se homogeniza la muestra invirtiendo varias veces el recipiente que lo contiene.</p> <p style="text-align: center;"><b>7. PROCEDIMIENTO</b></p> <p>7.1 La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3998 – Baquerizo Moreno Es-28 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

7.2 Comprobar el correcto funcionamiento del potenciómetro.

7.3 Pesar, con aproximación al 0,1 mg, 10 g de muestra preparada y colocar en el vaso de precipitación, añadir 100 cm<sup>3</sup> de agua destilada, recientemente hervida y enfriada, y agitar suavemente hasta que las partículas queden uniformemente suspendidas.

7.4 Continuar la agitación durante 30 minutos a 25°C, de modo que las partículas de almidón se mantengan en suspensión, y dejar en reposo para que el líquido se decante.

7.5 Determinar el pH por lectura directa, introduciendo los electrodos del potenciómetro en el vaso de precipitación con la muestra, cuidando que éstos no toquen las paredes del recipiente ni las partículas sólidas.

#### 8. ERRORES DE MÉTODO

8.1 La diferencia entre los resultados de una determinación efectuada por duplicado no debe exceder de 0,1 unidades de pH; en caso contrario, debe repetirse la determinación.

#### 9. INFORME DE RESULTADOS

9.1 Como resultado final, debe reportarse la media aritmética de los dos resultados obtenidos de la determinación.

9.2 En el informe de resultados, deben indicarse el método usado y el resultado obtenido. Debe mencionarse, además, cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.

9.3 Deben incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.

## Anexo 9. Ficha técnica del prebiótico Inulina

# Hoja de especificaciones

## Beneo™ GR

DOC.CHA4-03\*06/06

---

### Descripción

<b>Beneo™ GR</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>Es un ingrediente alimenticio compuesto de inulina de achicoria. Beneo™GR es un polvo granulado.</li></ul>
<b>Inulina</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>Es una mezcla de oligo- y polysacáridos compuestos de unidades de fructosa unidas entre sí mediante enlaces β (2-1). Prácticamente cada molécula se termina con una unidad de glucosa. El recuento de unidades de fructosa o glucosa (= grado de polimerización o DP) de la gama de inulinas de achicoria se halla principalmente entre 2 y 60.</li></ul>

---

### Especificaciones de composición

Todos los valores se expresan sobre materia seca.  
Métodos analíticos : Ver nuestros folletos técnicos.

Inulina	> 90 %
Glucosa + fructosa	≤ 4 %
Sacarosa	≤ 8 %
Materia seca(d.m.)	97 ± 1.5 %
Contenido en carbohidratos	> 99.5 %
Promedio grado polim. de la Inulina	≥ 10
Cenizas (sulfatos)	< 0.2 %
Conductividad (28 Brix)	< 250 µS
Metales pesados	Pb, As cada uno < 0.1 mg/kg Cd, Hg cada uno < 0.01mg/kg
pH (30-50*Brix)	5.0 - 7.0

---

### Especificaciones microbiológicas

Todos los valores se expresan sobre materia seca.  
Métodos analíticos : Ver nuestros folletos técnicos.

Aeróbios mesófilos totales	max. 1000/g
Levaduras	max. 20/g
Mohos	max. 20/g
Esporas aeróbicas termófilas	max. 1000/g
Anaeróbicos H <sub>2</sub> S productores de esporas termófilas	max. 25/g
Enterobacteriaceae	ausente en 1 g
Bacillus cereus	max. 100/g
Staphylococcus aureus	ausente en 1 g
Escherichia coli	ausente en 1 g
Clostridium perfringens	ausente en 1 g
Clostridium botulinum	ausente en 1 g
Salmonella	ausente en 100 g
Listeria	ausente en 25 g



page 1

Doc.CHA4-03-06-06.doc



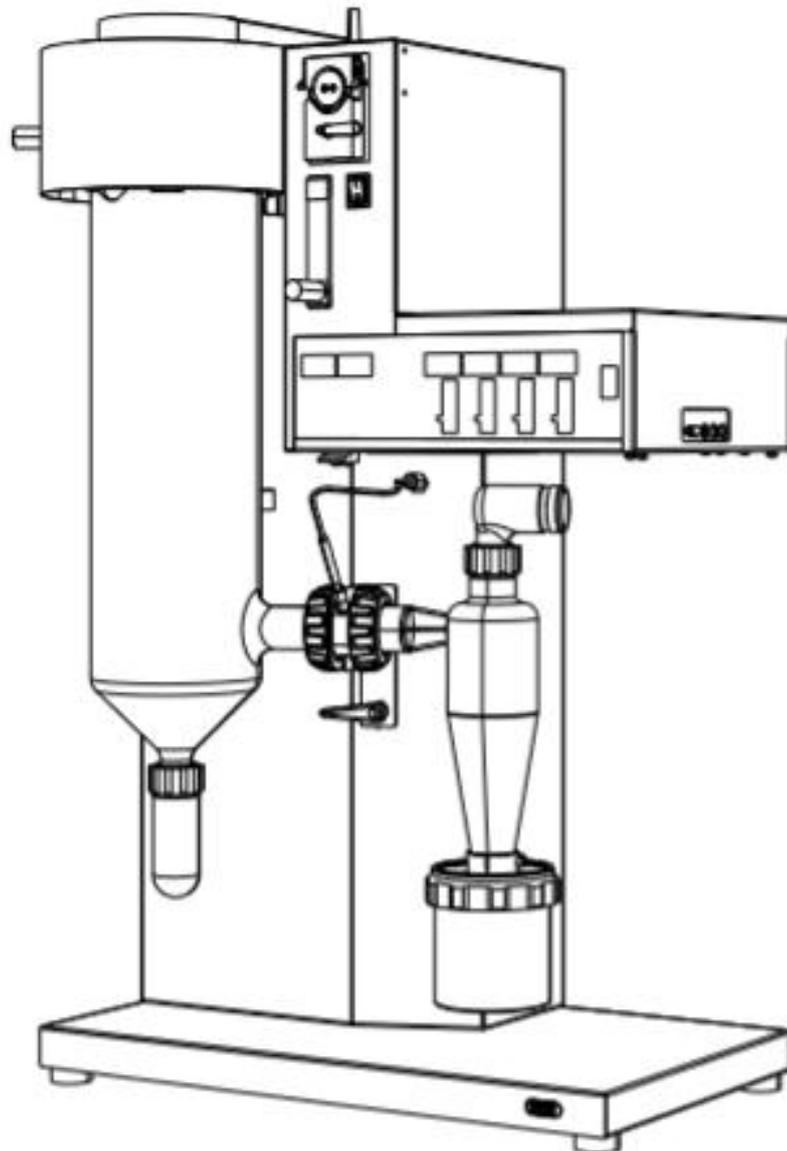
ORAFI Active Food Ingredients • Aardvorenstraat 1, B - 3300 Tienen België • Tel +32 (0)16 801 301 Fax +32 (0)16 801 308  
af@orafit.com • www.orafit.com

## Anexo 10. Equipo Büchi Spray Dryer B-290



### Mini Spray Dryer B-290 Technical data sheet

The Mini Spray Dryer B-290 is the world leading laboratory scale Spray Dryer since many years. It is designed to visualize your Spray Drying process for wide range of applications in various fields such as pharma, materials, chemistry, food, feed, beverages, etc. It allows working with acids, organic solvents or mixtures of aqueous- and organic solvents safely in combination with the Inert Loop B-295 and the Dehumidifier B-296.



**Step 1 - Heating:**

Heat the inlet air to the desired temperature (max. 220 °C)

**Step 2 - Droplet formation:**

Two-fluid nozzle for the B-290 and.

**Step 3 - Drying chamber:**

Conductive heat exchange between drying gas and sample droplets.

**Step 4 - Particle collection:**

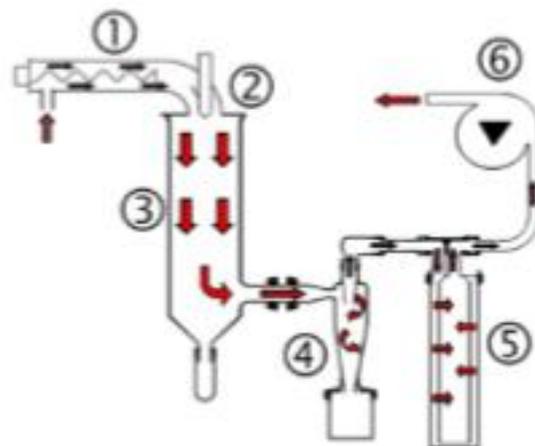
Cyclone technology

**Step 5 - Outlet filter:**

Collection of finest particles to protect the user and the environment.

**Step 6 - Drying gas:**

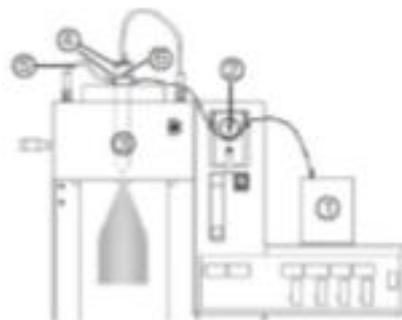
Delivered by aspirator



**Functional principle of the sample feed dispersion**

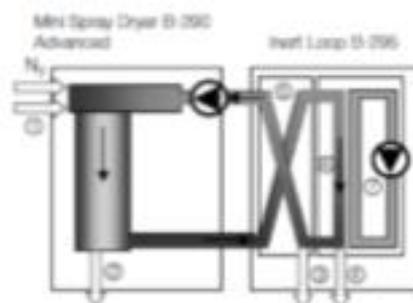
The Mini Spray Dryer has an integrated two-fluid nozzle: Compressed gas (normally air or N<sub>2</sub>) is used to disperse the liquid body into fine droplets which are subsequently dried in the cylinder.

1. Feed solution
2. Peristaltic pump
3. Two fluid nozzle
4. Connection for cooling water
5. Connection for compressed spray gas
6. Automatic nozzle cleaning system



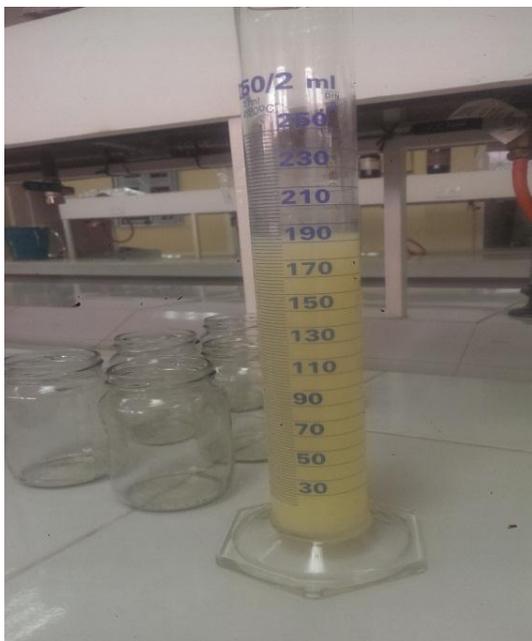
**Functional principle of the closed mode with the Inert Loop B-295**

1. Feed
2. Product
3. Exhaust gas
4. Solvent
5. Preheat exchanger
6. Condensation
7. Cooling unit



## ANEXO 11. FOTOS DEL TRABAJO DE CAMPO

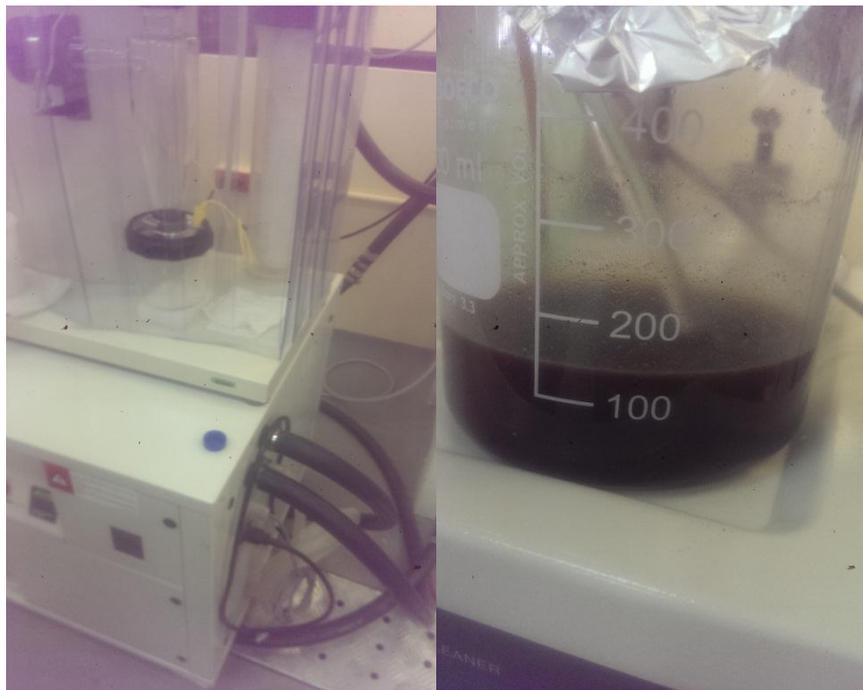
### Preparación de los birreactores



## INCUBACIÓN



## ATOMIZACIÓN



## PLAQUEO



## DILUCIONES



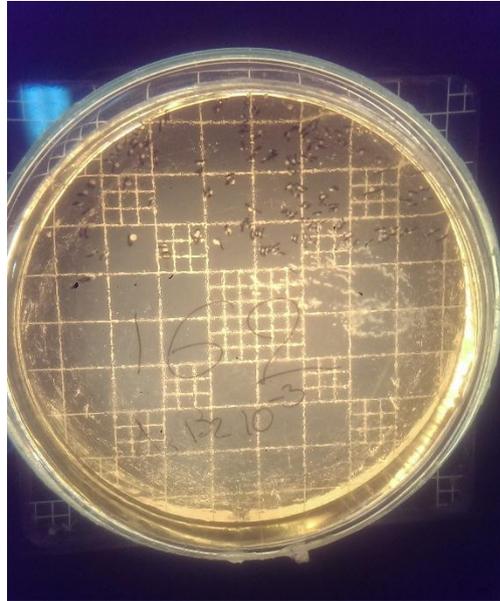
## SIEMBRA



## INCUBACION



## Conteo de colonias



## Prueba de densidad



## Prueba de pH

