



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**Elaboración de un Recubrimiento Comestible Simbiótico y su
Aplicación en Confites**

**Trabajo previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**Autor:
CASTRO CRIOLLO PAOLA ESTEFANÍA**

**Directora:
MARÍA FERNANDA ROSALES**

**Co- Director:
JONNATAN AVILÉS GONZÁLEZ**

CUENCA – ECUADOR

2018

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis es dedicado a mi familia quienes son parte importante en mi vida, han sido mi fuente de motivación e inspiración.

A mi mamá Rhina quien supo darme todo su amor y apoyo incondicional para lograr mis metas, siempre guiándome por las cosas buenas, que con sus palabras de aliento estuvo para iluminarme y motivarme a seguir adelante.

A mi abuelo Miguel, aunque ya no esté con nosotros, siempre lo llevo presente. A mi abuelita Ana que sigue con nosotros dándonos sus consejos y ayudando a toda la familia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, expresar mi más profundo agradecimiento a Dios por la fuerza y sabiduría para llegar a cumplir todas mis metas y permitirme tener a mi familia cerca todo el tiempo.

A la Ingeniera María Fernanda Rosales y al Doctor Jonnatan Avilés González, por haber compartido todos sus conocimientos conmigo y por la confianza para realizar el presente trabajo.

A los laboratoristas Ing. Jhoana Tacuri e Ing. Diego Montero, por su apoyo y aporte durante la realización de esta tesis.

A la Universidad del Azuay por permitirme prepararme profesionalmente.

A Rodrigo Brito por haberme apoyado durante la realización de esta investigación.

A mi familia, compañeros de aula y amigos por brindarme su apoyo sincero y escuchado en cada momento.

Elaboración de un Recubrimiento Comestible Simbiótico y su Aplicación en Confites

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un recubrimiento comestible simbiótico por la incorporación de la inulina con el *Lactobacillus casei* y aplicado a un caramelo blando. Se llevó a cabo un diseño experimental 2³ para evaluar el efecto de las variables gretetina, inulina y probiótico. Se midió el pH del recubrimiento y la humedad en el producto. Como características microbiológicas se evaluaron la presencia de patógenos en distintos tiempos de almacenamiento. Se obtuvo un 40% de aceptación en las pruebas de afectividad sensorial. La viabilidad del *L. casei* a los 18 días fue mayor a 6 log UFC/g, presentándose como una alternativa para el consumo de probióticos en estos alimentos.

Palabras clave: probióticos, recubrimientos comestibles, caramelo blando, *Lactobacillus casei*, inulina



Ing. María Fernanda Rosales Medina

Coordinadora de Escuela

Ingeniería en Alimentos



Ing. María Fernanda Rosales Medina

Directora del Trabajo de Titulación



Srta. Paola Estefanía Castro Criollo

Autora

Preparation of a Symbiotic Edible Coating and its Application in Confectionery

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effect of a symbiotic edible coating by the incorporation of inulin with *Lactobacillus casei* applied to a soft candy. An experimental design 2³ was carried out to evaluate the effect of the variables: grenetin, inulin and probiotic. The pH of the coating and the moisture in the product were also measured. The presence of pathogens in different storage times was evaluated as a microbiological characteristic. 40% of acceptance was obtained in sensory affective tests. The viability of *L. casei* at 18 days was greater than 6 log CFU/g, which is why it was presented as an alternative for the consumption of probiotics in these foods.

Keywords: probiotics, edible coatings, soft candy, *Lactobacillus casei*, inulin.



Ing. María Fernanda Rosales Medina

Food Engineering

Faculty Coordinator



Ing. María Fernanda Rosales Medina

Thesis Director



Paola Esterania Castro Criollo

Author

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
RESUMEN.....	iv
PALABRAS CLAVE.....	iv
ABSTRACT.....	v
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
1.1 Diseño experimental factorial completo 2 ³	5
1.2 Activación de la cepa de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	6
1.2.1. Tinción de Gram.....	6
1.3 Desarrollo del recubrimiento comestible adicionado con <i>Lactobacillus casei</i>	6
1.4 Medición de pH.....	7
1.5 Supervivencia del <i>Lactobacillus casei</i>	7
1.6 Aplicación del recubrimiento comestible adicionado con <i>Lactobacillus casei</i> a un confite.....	8
1.7 Determinación de humedad.....	8
1.8 Supervivencia del <i>Lactobacillus casei</i> con el producto.....	8
1.9 Análisis microbiológicos.....	8
1.10 Aceptación del producto por parte del consumidor.....	9
CAPÍTULO 2: RESULTADOS.....	10
2.1 Verificación de la bacteria mediante la tinción de Gram.....	10
2.2 Viabilidad del <i>Lactobacillus casei</i> en el recubrimiento aplicado al producto.....	10
2.3 Evaluación de pH.....	12

2.4	Resultados del análisis del diseño experimental factorial completo 2^3	12
2.5	Viabilidad del <i>Lactobacillus casei</i> en el producto.....	17
2.6	Evaluación de la humedad.....	18
2.7	Análisis microbiológicos.....	19
2.8	Aceptación del producto por parte del consumidor.....	19
CAPITULO 3: DISCUSIONES.....		21
CONCLUSIONES.....		23
RECOMENDACIONES.....		24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		25
ANEXOS.....		29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones de los recubrimientos comestibles obtenidos del diseño factorial 2^3	5
Tabla 2. Componentes de la matriz del recubrimiento comestible.....	6
Tabla 3. Descripción de resultados obtenidos del diseño experimental para viabilidad.....	11
Tabla 4. Valores de pH de las muestras de recubrimientos obtenidos a diferentes tiempos.....	12
Tabla 5. Resumen del modelo para pH a los 10 días.....	13
Tabla 6. Datos del análisis de varianza para pH a los 10 días.....	13
Tabla 7. Resumen del modelo para viabilidad a los 10 días.....	15
Tabla 8. Datos del análisis de varianza para viabilidad a los 10 días.....	15
Tabla 9. Análisis estadístico de la prueba de afectividad.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestra del <i>Lactobacillus casei</i> mediante la tinción de Gram.....	10
Figura 2. Plot de normalidad aplicada la prueba de Anderson-Darling para pH a los 10 días	14
Figura 3. Diagrama de Pareto para pH a los 10 días.....	14
Figura 4. Plot de normalidad aplicada la prueba de Anderson-Darling para viabilidad a los 10 días.	16
Figura 5. Diagrama de Pareto para viabilidad a los 10 días.....	17
Figura 6. Función de utilidad a través de deseabilidad	17
Figura 7. Datos de viabilidad en el producto a distintos tiempos de almacenamiento.....	18
Figura 8. Datos de humedad del producto con recubrimiento en diferentes lapsos de tiempo.....	19
Figura 9. Porcentaje de aceptación por parte del consumidor.....	20

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de regresión en unidades codificadas para pH a los 10 días.....	12
Ecuación 2. Ecuación de regresión en unidades codificadas para viabilidad a los 10 días.....	15

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Activación del <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	31
Anexo 2. Norma INEN 1529-5. Control microbiológico de los alimentos.....	31
Anexo 3. Norma INEN 2395. Probióticos.....	32
Anexo 4. Norma INEN 2217. Humedad.....	32
Anexo 5. Norma INEN 2217. Requisitos microbiológicos.....	32
Anexo 6. Ficha de aceptación por parte del consumidor.....	33

Castro Criollo Paola Estefanía

Trabajo de Graduación

Ing. María Fernanda Rosales Medina. M. Sc.

Dr. Jonnatan Fernando Avilés Gonzales

Noviembre, 2018

Elaboración de un Recubrimiento Comestible Simbiótico y su Aplicación en Confites

INTRODUCCIÓN

Un producto alimentario puede estar expuesto a diversos peligros, causando una posible pérdida de su inocuidad por múltiples agentes (físicos, químicos o microbiológicos). Estos pueden provocar un daño en la salud del consumidor, razones por las que los productores buscan nuevas alternativas para asegurar la calidad microbiológica de los alimentos (Fuente and Barboza).

El auge de los alimentos enriquecidos con microorganismos probióticos se debe a una gran variedad de beneficios que le proporcionan al consumidor, entre ellos: facilitar la digestibilidad de la lactosa, protección contra enfermedades gastrointestinales, del tracto urogenital y respiratorio, equilibrio del sistema inmunológico, prevención de enfermedades dermatológicas y proteger contra el cáncer de colon. Con la finalidad de mantener todos los efectos favorables en el consumidor, es necesario complementarlos con ingredientes prebióticos (Salazar and Montoya).

PELÍCULA Y RECUBRIMIENTO COMESTIBLE

Un recubrimiento comestible es definido como una matriz continua y delgada, aplicada en el exterior de un producto de manera que el alimento final sea apto para el consumo preservando su calidad. Su función principal es proteger al producto de factores fisicoquímicos y microbiológicos que puedan afectar la calidad del producto, además se debe tomar en cuenta que deben ser inocuos, aceptables sensorialmente y proporcionar un valor agregado al producto (Velázquez and Guerrero).

Una película comestible es preformada elaborada por moldeo y delgada (cuyo espesor es mayor al recubrimiento comestible). Durante su conservación, actúa como barrera al intercambio de gases y vapor de agua. Dichas soluciones pueden formarse por separado o por una mezcla de un polisacárido o un compuesto de naturaleza proteica o lipídica (Fernández et al.).

PROCESOS DE FORMACIÓN DE PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS

Existen diversas técnicas para la conformación de películas y recubrimientos comestibles, sin embargo, difiere mucho del producto que se va a recubrir. Hay distintos métodos de aplicación siendo los más importantes los de aspersión e inmersión. La inmersión proporciona excelentes resultados ya que en el caso del caramelo blando se requieren una capa uniforme en una superficie irregular (Morales). La técnica de inmersión consiste en sumergir el alimento a conservar en determinado tiempo, en una solución filogénica, y a continuación secar el producto (Solis).

ALIMENTOS FUNCIONALES

Como afirma Fuentes, Acevedo, & Gelvez, (2015), los alimentos funcionales contienen componentes biológicamente activos que en una o varias funciones del organismo, ofrecen efectos beneficiosos y nutricionales. De esta forma reducen el riesgo de sufrir enfermedades y mejoran la salud gastrointestinal.

PROBIÓTICOS

Se le designan, a las bacterias con efectos beneficiosos para los seres humanos y animales (FAO and OMS). Participan activamente, en la regulación cualitativa del equilibrio de la microbiota intestinal (Castañeda). Además, se utilizan para prevenir infecciones entéricas y gastrointestinales (Blanco and Cagigas).

Probiótico hace referencia a un producto que tiene cepas de microorganismos viables en suficiente cantidad para alterar la microflora en algún compartimento del huésped y que produce efectos beneficiosos (Oliveira and González).

LACTOBACILLUS

Son organismos Gram positivos, inmóviles, no esporulados y microaerófilos. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 40 °C, su pH óptimo esta entre 5,5 y 6,2 e incluso se pueden desarrollar a pH menor de 5,0. Además mejora el crecimiento en anaerobiosis o disminuidas presiones de oxígeno y entre 5 y 10% de dióxido de carbono. Su tolerancia al ácido varía desde 0,3% hasta 1,9% de acidez titulable (Cartes).

LACTOBACILLUS CASEI

Lactobacillus casei es un microorganismo que tiene aplicación como probiótico, cultivo iniciador ácido-productor para fermentaciones de leche y como cultivo para la intensificación y aceleración de desarrollo de sabores en ciertas variedades de quesos madurados con bacterias (Velásquez et al.). Se encuentran de forma natural en vegetales fermentados, leche, carne, así como en el intestino, la boca del ser humano y el ambiente. “El nombre de *L. casei* se usó por primera vez en 1919 y se relaciona con queso: casei y caseína (proteína de la leche). Proviene de la palabra caseus que significa queso” (Calpa and Chaspuengal).

MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA DEL LACTOBACILLUS CASEI

Lactobacillus casei son diferentes de otras especies de *Lactobacillus* en varios aspectos. Se identifican por ser Gram positivos, bacilos, mesofílicos y heterofermentadores facultativos, por lo general inmóviles y no formadores de esporas. Son más pequeños que *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. helveticus* (Rodríguez, 2000).

PREBIÓTICOS

Como indica la FAO & OMS, (2006), los prebióticos se definen como ‘ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una de las especies de bacterias que están ya establecidas en el colon, o de un número limitado de ellas, y por consiguiente mejoran de hecho la salud del huésped’.

Los prebióticos tienen esencialmente la misma finalidad que los probióticos, es decir, mejorar la salud del huésped mediante la modulación de la flora intestinal, aunque utilizando un mecanismo diferente (FAO and OMS). Ejemplos de prebióticos son la inulina y los fructooligosacáridos son sustancias no digeridas que beneficia el crecimiento de las bacterias beneficiosas del intestino (Castro and Rovetto).

INULINA

Es parte de la dieta diaria, es un carbohidrato de reserva y está presente en plantas, vegetales, frutas y cereales (Madrigal and Sangronis). En la naturaleza existen varios tipos de inulina, su origen puede ser vegetal o microbiano y hay diferencias en el grado de polimerización, peso molecular, la fuente, el tiempo de cosecha, condiciones de procesamiento. Hay estructuras lineales, ramificadas o cíclicas (Muñoz et al.).

La inulina ofrece beneficios para la salud humana cuando se incorpora en la dieta alimentaria. Contribuye a diluir los carcinógenos fecales y los promotores tumorales simplemente por la presencia de un mayor volumen fecal y por su capacidad para inducir la secreción colónica. Es reconstituyente de la microflora intestinal y corrige el estreñimiento, mejorando el balance intestinal y contribuyendo de esta manera a reducir el contacto de agentes carcinógenos con el epitelio colónico y por ende a prevenir el desarrollo de cáncer de colon (Bedoya et al.).

SIMBIÓTICOS

Los simbióticos son un conjunto equilibrado de probióticos con prebióticos, con la finalidad de aumentar la cantidad y resistencia de los probióticos en el intestino grueso (Aranceta et al.).

El principal objetivo de esta investigación fue la elaboración y caracterización de un recubrimiento comestible a base de suero de leche, gredina y glicerol, incorporando inulina y *Lactobacillus casei* como simbióticos para añadir a confites. Se realizó un diseño experimental, factorial completo 2^3 , con puntos centrales, dando como resultado 18 experimentos. Se analizaron las características fisicoquímicas de pH y humedad. En las pruebas microbiológicas se evaluó la presencia de: *Escherichia coli*, hongos y levaduras, siguiendo la norma NTE INEN 2217 (2012) para productos de confitería. Además, se verificó la viabilidad del *Lactobacillus casei* durante un tiempo determinado. Finalmente, se evaluó la aceptabilidad del producto por el consumidor. Los resultados pueden ser beneficiosos a la población especialmente por su potencial de ingerir probióticos de otros alimentos.

CAPÍTULO 1

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL COMPLETO 2³

Se utilizó el programa Minitab 18.1 para planificar un diseño factorial 2³ en donde las variables de análisis son: grenetina (g), inulina (g) y probiótico (g). Se obtuvo como resultado 18 tratamientos diferentes. Que constituye de: dos réplicas (la segunda réplica empieza desde el número 9) y dos puntos centrales (número 17 y 18). En la tabla 1 se encuentra el diseño experimental que se aplicó.

Tabla 1. Formulaciones de los recubrimientos comestibles obtenidos del diseño factorial 2³

OrdenCorrida	PtCentral	Grenetina	Inulina	Probiótico
1	1	2	1	0.5
2	1	5	1	0.5
3	1	2	4	0.5
4	1	5	4	0.5
5	1	2	1	1
6	1	5	1	1
7	1	2	4	1
8	1	5	4	1
9	1	2	1	0.5
10	1	5	1	0.5
11	1	2	4	0.5
12	1	5	4	0.5
13	1	2	1	1
14	1	5	1	1
15	1	2	4	1
16	1	5	4	1
17	0	3.5	2.5	0.75
18	0	3.5	2.5	0.75

1.2. ACTIVACIÓN DE LA CEPA DE *Lactobacillus casei* ATCC 393

Se activó una cepa de *Lactobacillus casei* ATCC 393 comercial liofilizada de la empresa MICROBIOLOGICS adquirido por la Universidad del Azuay.

Manteniendo la regla de CULTIMED, (2010) se cultivó en Agar MRS a pH 5,5; que son medios específicos para ser empleados en el cultivo de *Lactobacillus*. Se tomaron los tubos con las bacterias liofilizadas y se sembraron en cajas Petri con el agar MRS, Posteriormente se incubaron a 37 ± 1 °C durante 72 horas, en un ambiente microaerófilo (5% de CO₂) , en una jarra para anaerobiosis (Montero).

Para una mejor producción de *L. Casei* ATCC 393, siguiendo el protocolo para el análisis, se esterilizó 100 mL de leche en polvo reconstituida al 9% de sólidos totales y se adicionó tiamina al 0,001%. En cada frasco de leche esterilizada de 100 mL, se adicionaron las bacterias sembradas en agar MRS y se colocó en una incubadora a 37 ± 1 °C por 72 horas. Este procedimiento se realizó por duplicado. El *L. casei* sembrado en agar MRS se recogió con asa y se colocó en crioviales (CRYOBANK MIXED, USA) para su posterior uso (Anexo 1).

1.2.1. TINCIÓN DE GRAM

Para está prueba se utilizaron kits de tinción de Gram (Proquímica, Ecuador), siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez & Arenas, (2018). La observación se efectuó con un microscopio óptico (Olympus CX22LED, Japón) y se realizaron registros fotográficos.

1.3. DESARROLLO DEL RECUBRIMIENTO COMESTIBLE ADICIONADO CON *Lactobacillus casei*

La tabla 2 muestra las proporciones generales de los componentes empleados para la matriz del recubrimiento comestible.

Tabla 2. Componentes de la matriz del recubrimiento comestible.

Componente	Porcentaje
Suero de leche*	6%
Glicerol*	5%
Grenetina	0-4%
Inulina	2-5%
Probiótico	0.5-1%

*El suero de leche y el glicerol se mantuvieron en dichas proporciones en todas las fórmulas

Los recubrimientos comestibles se prepararon en un ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar (C4 CLASEII TIPOAB3, Colombia). Se utilizaron 100 mL de agua destilada estéril,

que fue calentada a una temperatura de 70°C, empleando una hornilla de agitación magnética (Cimarek SP131325, USA). Cada componente se pesó en una balanza analítica (OHAUS Adventurer Pro AV313, USA) y se adicionó uno por uno en agitación constante hasta lograr su completa disolución (aproximadamente 3 – 5 min por cada componente), manteniendo la temperatura constante. Primero se agregó la grenetina (Levapan, Ecuador) después la inulina (CIAL, Ecuador), posteriormente la proteína de suero de leche (CIAL, Ecuador) y finalmente la glicerina (CIAL, Ecuador). Se redujo la temperatura a 40°C y se mantuvo en agitación por 5 minutos (García Argueta).

El *Lactobacillus casei* ATCC 393 obtenido de la activación fue sembrado a partir de las crioperlas de los crioviales en 1000 mL de caldo MRS, incubado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas, en un ambiente anaerobio. Luego fue sometido a centrifugación por 30 min a 3500 rpm a 4°C en una centrífuga temperada (EPPENDORF 5702R, Alemania). El sólido obtenido fue lavado con agua peptonada y nuevamente centrifugado por 15 min a 3500 rpm a 4°C . El producto fue pesado y agregado al recubrimiento comestible a una temperatura de 30°C y se mantuvo en agitación por 10 min hasta lograr su total incorporación (García Argueta).

Como paso final se colocaron 6 mL del recubrimiento comestible en cajas Petri y se dejaron reposar por 30 min en la campana de extracción, y posteriormente se colocaron las placas en una incubadora (Mettmert B40, Alemania) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Las películas fueron retiradas de la incubadora, colocadas en bolsas herméticas de plástico, rotuladas y almacenadas en refrigeración (Indurama RI-580, Ecuador) hasta su análisis (García Argueta).

1.4. MEDICIÓN DE pH

El equipo utilizado para la medición del pH fue un potenciómetro (Mettler Toledo S220, Suiza) previamente calibrado con dos puntos (buffer pH 4 y 7). Se utilizó una muestra de 90 mL del recubrimiento comestible a 25°C y se registraron las lecturas del pH por duplicado.

1.5. SUPERVIVENCIA DEL *Lactobacillus casei*

Para determinar la supervivencia del *Lactobacillus casei* ATCC 393, las muestras del literal 1.3 se llevaron a la campana de flujo laminar, se pesó 10g de muestra y preparó diluciones 1/10 (10g de muestra y 90 mL de agua peptonada previamente estéril) 1/100 (1 mL de dilución 1/10 y 9 mL de agua peptonada), hasta la dilución 10^{-9} mL para la siembra a los 0 días, dilución 10^{-8} mL para los 2 días y 10^{-5} mL para los 10 días. Se inoculó por duplicado 1 mL de las 2 últimas diluciones en cajas Petri adicionando agar MRS. Se introdujeron en la incubadora, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 72h se observó el crecimiento y se hizo un conteo visual de las unidades formadoras de colonias (UFC).

1.6. APLICACIÓN DEL RECUBRIMIENTO COMESTIBLE ADICIONADO CON *Lactobacillus casei* A UN CONFITE

Para la aplicación del recubrimiento comestible al producto, se empleó la mejor fórmula del análisis estadístico, con las mejores respuestas a las pruebas de pH y supervivencia del *Lactobacillus casei* ATCC 393 correspondiente al desarrollo del recubrimiento comestible. Bajo condiciones asépticas, se aplicó el recubrimiento por inmersión en volúmenes aproximados de 2 y 3 mL, a las muestras de caramelo blando (D'Leche). Las muestras se mantuvieron en atmósfera controlada en incubadora (ESCO IFA 110-8, Singapur) a 20°C a distintos períodos.

1.7. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se pesaron alrededor de 3 – 4g de las muestras (caramelo blando con recubrimiento y sin recubrimiento) y se analizaron en una termobalanza (Sartorius MA35H-115US, Alemania). La humedad de las muestras se evaluó de 3 a 4 días. Las determinaciones se realizaron por duplicado y el promedio de los resultados obtenidos se expresó como porcentaje.

1.8. SUPERVIVENCIA DEL *Lactobacillus casei* EN EL PRODUCTO

Se usaron 10g de caramelo blando con recubrimiento comestible almacenado durante 18 días, así como muestras control (sin recubrimiento), las cuales se colocaron en diluciones 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , y 1×10^{-5} . Se inoculó por duplicado 1 mL, de las 2 últimas diluciones en cajas Petri adicionando agar MRS. Se introdujeron en la incubadora (Gemmy INA 010, USA) ajustada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72h. Pasado este tiempo, se realizó un conteo visual de UFC.

1.9. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Las muestras utilizadas para realizar las pruebas estaban almacenadas en una cámara climatizada (Binder, USA) durante 25 días, a 35°C y 65% de humedad. Se realizaron los análisis de cada 3 a 4 días.

Para el recuento de *E. coli* y coliformes totales se utilizaron placas compact dry EC (HyServe). Cuyo medio contiene dos sustratos enzimáticos cromógenos: Magenta-GAL y X-Gluc. De esta manera los coliformes desarrollan una coloración roja, mientras que el *E. coli* es azul, lo que facilita la enumeración de las colonias de acuerdo al tipo de bacterias. Las muestras de 10 g, se depositaron en recipientes esterilizados. Se llevaron a la campana de flujo laminar, preparando, diluciones 1/10. Se inoculó por triplicado 1mL, de la dilución en las placas compact dry EC (HyServe). Se introdujeron en la estufa, ajustada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72h, para luego observar el crecimiento y realizar un conteo visual de las UFC.

Para el recuento de hongos y levaduras se utilizaron placas compact dry YM (HyServe). El medio contiene el sustrato cromógeno X-Phos que provoca una coloración azul en prácticamente todas las levaduras, lo que facilita la enumeración de las colonias. Las muestras de 10 g, se depositaron en recipientes esterilizados. Se llevaron a la campana de flujo laminar, preparando diluciones 1/10 y 1/100. Se inoculó por cuadruplicado 1 mL de la dilución en las placas. Se introdujeron en la estufa ajustada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y después de 5 días se observó el crecimiento, haciendo un conteo visual de las UFC en las placas a sus respectivos tiempos.

1.10. ACEPTACIÓN DEL PRODUCTO POR PARTE DEL CONSUMIDOR

La prueba fue conducida en el laboratorio de Biotecnología de alimentos de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay. Se realizó una prueba de afectividad para analizar el nivel de aceptación. Se utilizaron 25 panelistas tipo consumidor (jueces no entrenados) y los datos se expresaron en porcentaje. Se empleó una calificación de 9 puntos: 1- Me disgusta muchísimo, 2- Me disgusta mucho, 3- Me disgusta bastante, 4- Me disgusta ligeramente, 5- Ni me gusta ni me disgusta, 6-Me gusta ligeramente, 7- Me gusta bastante, 8- Me gusta mucho y 9- Me gusta muchísimo. Con esta misma escala de calificación se analizaron los atributos: color, olor, sabor y textura.

CAPITULO 2

RESULTADOS

2.1. VERIFICACIÓN DE LA BACTERIA MEDIANTE LA TINCIÓN DE GRAM.

Se demostró que las cepas de *Lactobacillus casei* ATCC 393 presentaban morfología bacilar no esporulados y Gram positivos (Figura 1). Esto consiste con lo descrito para esta especie bacteriana (Rodríguez).

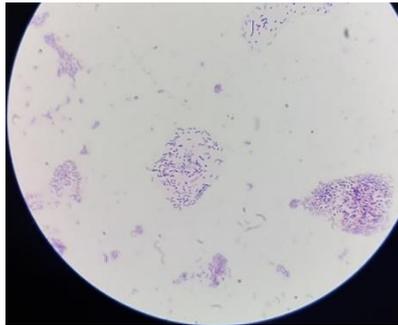


Figura 1. Muestra del *Lactobacillus casei* mediante la tinción de Gram.

2.2. VIABILIDAD DEL *Lactobacillus casei* EN EL RECUBRIMIENTO NO APLICADO AL PRODUCTO.

Las pruebas de viabilidad se realizaron de acuerdo a la fórmula de NTE INEN 1529-5 (Anexo 2), de manera que se cultivaron dos diluciones distintas por duplicado y los resultados se expresaron como microorganismos por gramo. Los resultados se presentan en la tabla 3 en los distintos períodos de evaluación. Todos los resultados fueron expresados en logaritmo.

Las muestras fueron almacenadas a 5°C y presentan variaciones en sus resultados. Se observó que las fórmulas que contenían un mayor porcentaje de inulina podrían haber contribuido a la supervivencia del probiótico. Todos los valores iniciales tienen un aumento en la viabilidad mayores a 10 log UFC/g, conforme avanza el tiempo se puede ver una disminución en la cantidad de probiótico de forma significativa, llegando a valores menores a 6 unidades logarítmicas a los diez días.

Tabla 3. Descripción de resultados obtenidos del diseño experimental para viabilidad.

NÚMERO DE MUESTRA	0 días		2 días		10 días	
	Fórmula expresada en exponencial	Logaritmo	Fórmula expresada en exponencial	Logaritmo	Fórmula expresada en exponencial	Logaritmo
1	5,00E+12	12,7009	1,40E+09	9,1400	5,90E+04	4,7715
2	1,50E+12	12,1664	5,40E+09	9,7300	1,30E+06	6,1109
3	1,00E+12	12,0076	1,50E+09	9,1700	1,00E+05	5,0193
4	2,40E+11	11,3835	5,70E+09	9,7500	1,50E+06	6,1761
5	4,60E+12	12,6657	6,30E+08	8,8000	3,20E+04	4,5027
6	2,10E+12	12,3312	9,70E+08	8,9900	1,60E+06	6,2163
7	9,60E+11	11,9817	2,00E+08	8,2900	1,50E+06	6,1761
8	1,20E+11	11,0692	6,40E+07	7,8000	1,80E+04	4,2596
9	1,10E+12	12,0459	7,50E+08	8,8700	8,60E+04	4,9363
10	1,00E+12	12,0195	1,60E+08	8,2000	9,80E+05	5,9920
11	1,30E+11	11,1139	3,70E+08	8,5700	1,10E+05	5,0378
12	1,10E+12	12,0585	2,30E+08	8,3700	1,40E+05	5,1347
13	6,50E+11	11,8126	1,30E+09	9,1100	7,70E+04	4,8880
14	1,40E+10	10,1489	8,90E+08	8,9500	1,80E+06	6,2640
15	6,60E+10	10,8219	1,90E+09	9,2800	2,00E+06	6,3040
16	9,80E+10	10,9920	4,50E+07	7,6600	1,80E+04	4,2596
17	2,00E+11	11,3098	1,90E+08	8,2700	1,00E+06	6,0193
18	5,50E+11	11,7404	1,60E+09	9,2200	7,80E+05	5,8906

2.3. EVALUACIÓN DEL pH.

Se puede observar en la tabla 4 que las muestras no tienen diferencias significativas en su pH inicial, pero conforme avanzan los días el pH disminuye de forma no significativa. Se señalan las muestras 2 y su réplica 10, que tuvieron el mejor comportamiento de pH para este estudio.

Tabla 4. Valores de pH de las muestras de recubrimiento obtenidos a diferentes tiempos

Número de muestra	pH inicial (0 días)	pH intermedio (2 días)	pH final (10 días)
1	5,96	5,83	5,50
2	6,15	5,90	5,56
3	6,03	5,48	5,05
4	6,06	5,60	5,28
5	5,96	5,75	5,47
6	6,17	5,87	5,62
7	6,14	5,82	5,10
8	6,00	5,64	5,03
9	6,05	5,80	5,58
10	6,11	5,85	5,53
11	6,05	5,50	5,14
12	6,09	5,58	5,24
13	6,13	5,82	5,51
14	6,04	5,90	5,83
15	5,93	5,64	5,09
16	6,13	5,55	5,13
17	6,19	5,80	5,22
18	6,10	5,62	5,06

2.4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL COMPLETO 2³

Se realizaron las gráficas de los estudios estadísticos en el programa Minitab 18.1, de pH y viabilidad a los diez días.

Se presentó la ecuación de regresión en unidades codificadas para pH a los 10 días (Ec.1) en donde están los elementos que tienen más relevancia para este estudio.

$$pH \text{ a los 10 días} = 5,3537 + 0,0488 \text{ Grenetina} - 0,2213 \text{ Inulina} - 0,0387 \text{ Inulina} * \text{ Probiótico} \\ - 0,0513 \text{ Grenetina} * \text{ Inulina} * \text{ Probiótico}$$

(Ec.1)

Esta ecuación 1 muestra un coeficiente de determinación $R^2=94,86\%$, como se ve a continuación, (tabla 5).

Tabla 5. Resumen del modelo para pH a los 10 días

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
0,0661280	94,86%	92,72%	0,135140	86,76%

En la tabla 6 se muestran las variables que son significativas para el pH a los 10 días de estudio ya que los $p < 0,05$.

Tabla 6. Datos del análisis de varianza para pH a los 10 días.

Fuente	Contribución	Valor F	Valor p
Modelo	94,86%	44,30	0,000
Lineal	80,44%	93,90	0,000
Grenetina	3,72%	8,70	0,012
Inulina	76,71%	179,11	0,000
Interacciones de 2 términos	2,35%	5,49	0,037
Inulina*Probiótico	2,35%	5,49	0,037
Interacciones de 3 términos	4,12%	9,61	0,009
Grenetina*Inulina*Probiótico	4,12%	9,61	0,009
Curvatura	7,96%	18,57	0,001
Error	5,14%		
Falta de ajuste	0,32%	0,20	0,894
Error puro	4,82%		
Total	100,00%		

En la figura 2 se observa un valor p de 0,967 comprobando la normalidad de los residuos, que caen cerca de la línea recta.

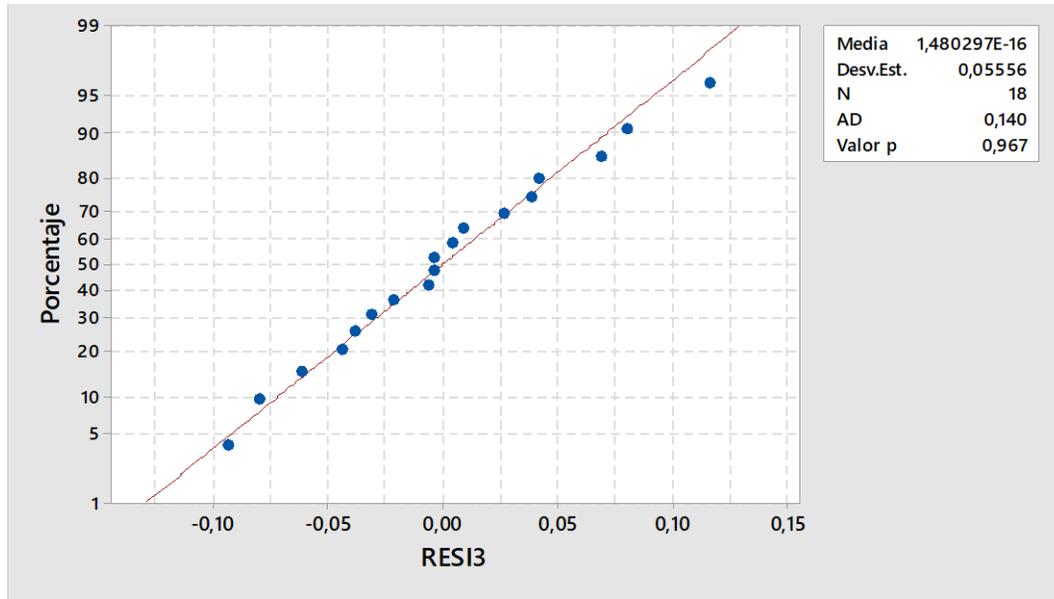


Figura 2. Plot de normalidad aplicada la prueba de Anderson-Darling para pH a los 10 días

El pH a los 10 días se vio significativamente afectado por la adición de inulina, siguiéndole en menor proporción, pero similar importancia la grenetina, interacciones de inulina-probiótico y grenetina-inulina-probiótico (Figura 3). En la figura no se incluyeron al probiótico y las interacciones de grenetina-probiótico y grenetina-inulina, por lo que no son variables significativas.

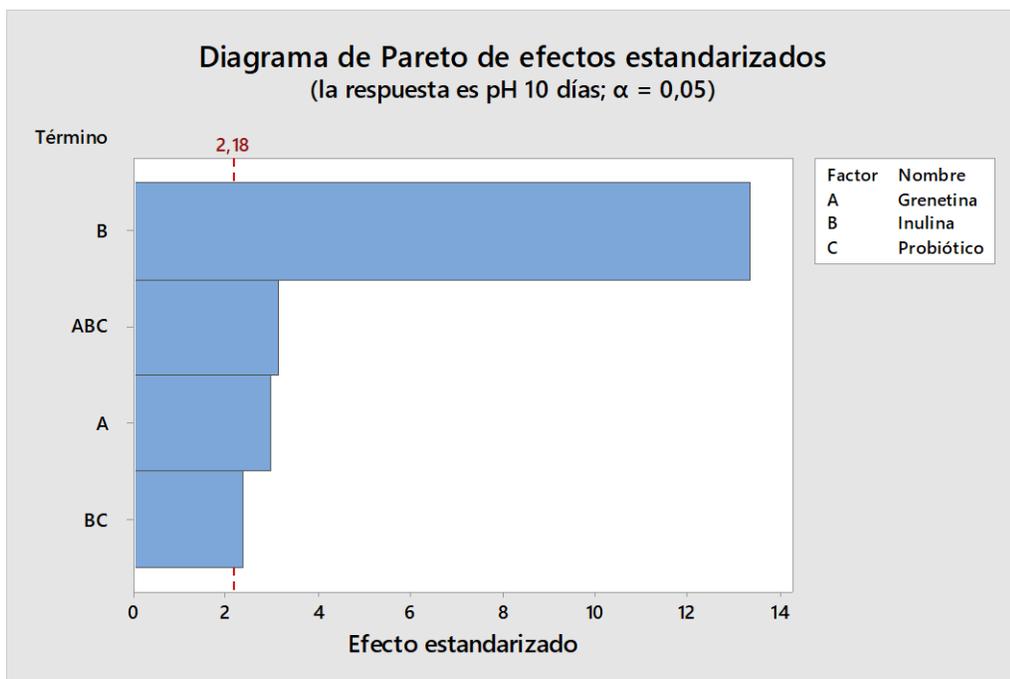


Figura 3. Diagrama de Pareto para pH a los 10 días

Se mostró los factores que tienen más valor para este análisis en la ecuación de regresión en unidades codificadas para viabilidad a los 10 días (Ec.2).

Viabilidad a los 10 días

$$= 797778 + 290750 \text{ Grenetina} + 94375 \text{ Probiótico} - 387500 \text{ Grenetina} \\ * \text{Inulina} - 312375 \text{ Grenetina} * \text{Probiótico} - 456875 \text{ Grenetina} * \text{Inulina} \\ * \text{Probiótico} \quad (\text{Ec. 2})$$

Se observó en la ecuación (2) un ajuste muy bueno, ya que posee un coeficiente de determinación $R^2=96,65\%$ como se ve en la tabla 7.

Tabla 7. Resumen del modelo para viabilidad a los 10 días

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
159350	96,65%	95,26%	7,06010E+11	92,24%

Las variables significativas para la viabilidad a los 10 días se presentan valores $p < 0,05$, según se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Datos del análisis de varianza para viabilidad a los 10 días

Fuente	Contribución	Valor F	Valor p
Modelo	96,65%	69,30	0,000
Lineal	16,42%	29,44	0,000
Grenetina	14,86%	53,27	0,000
Probiótico	1,57%	5,61	0,035
Interacciones de 2 términos	43,54%	78,05	0,000
Grenetina*Inulina	26,39%	94,62	0,000
Grenetina*Probiótico	17,15%	61,49	0,000
Interacciones de 3 términos	36,69%	131,53	0,000
Grenetina*Inulina*Probiótico	36,69%	131,53	0,000
Error	3,35%		
Curvatura	0,21%	0,74	0,409
Falta de ajuste	0,65%	1,17	0,355
Error puro	2,49%		
Total	100,00%		

Hay normalidad de los residuos, ya que los puntos caen cerca de la línea recta (Figura 4), obteniendo un valor p de 0,603.

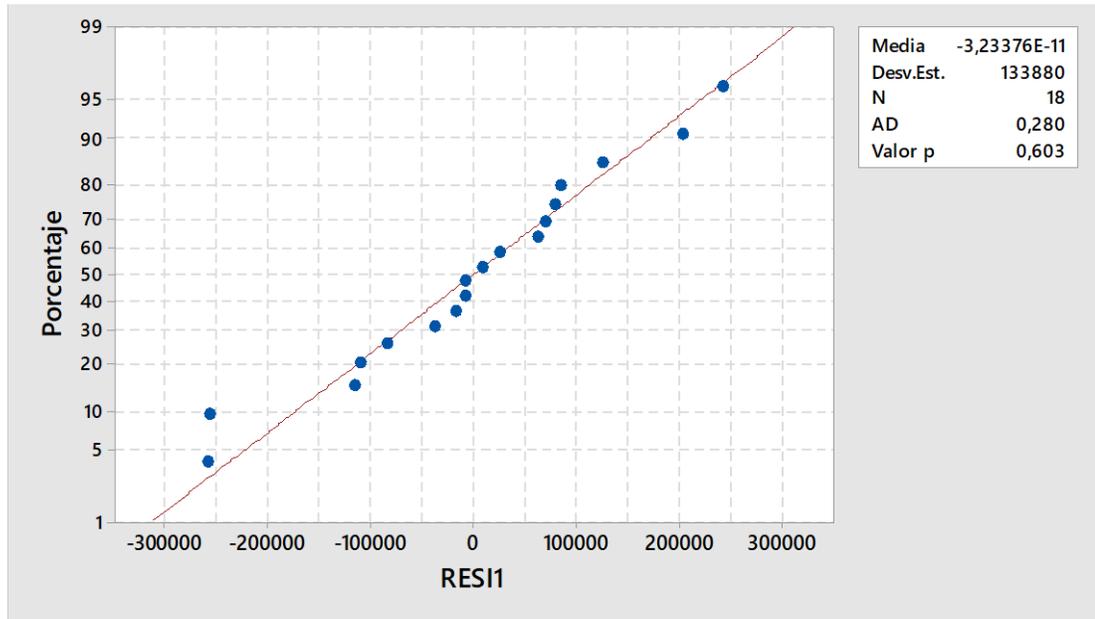


Figura 4. Plot de normalidad aplicada la prueba de Anderson-Darling para viabilidad a los 10 días

Según la figura 5 en 10 días la viabilidad se vio afectada mayormente por la interacción de la grenetina-inulina-probiótico, seguida de las interacciones de grenetina-inulina y grenetina-probiótico y por último los factores de: grenetina, probiótico. No se colocaron las variables de inulina y la interacción de inulina-probiótico, porque no son significativas.

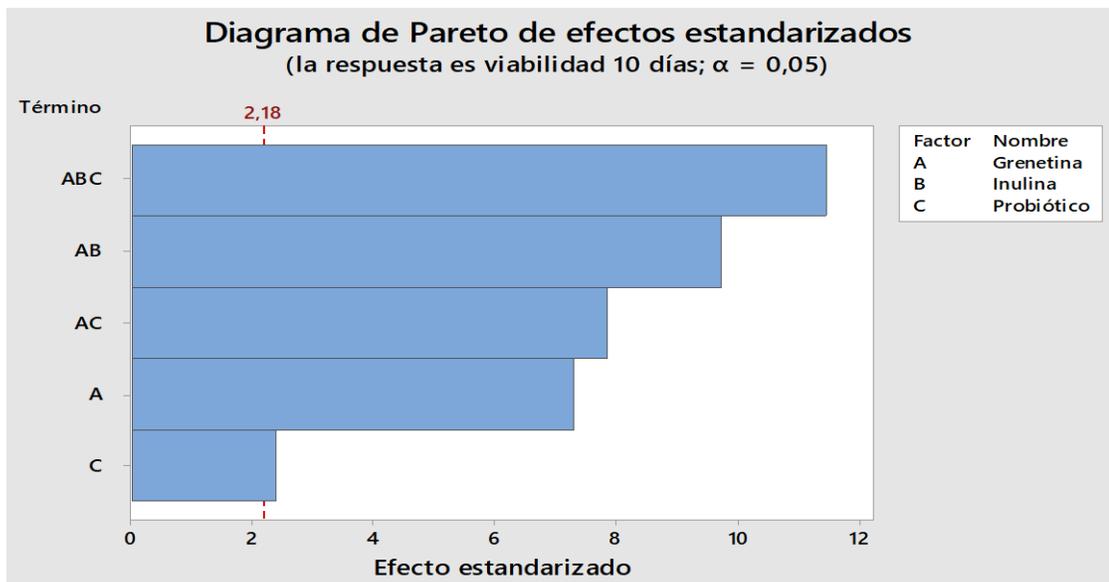


Figura 5. Diagrama de Pareto para viabilidad a los 10 días

En la figura 6 se muestran las funciones de deseabilidad. En color rojo se encuentra la mejor mezcla que cumplió con maximizar la viabilidad y como objetivo el pH a 5,5. La deseabilidad general de la mejor mezcla indicó un 0,6758.

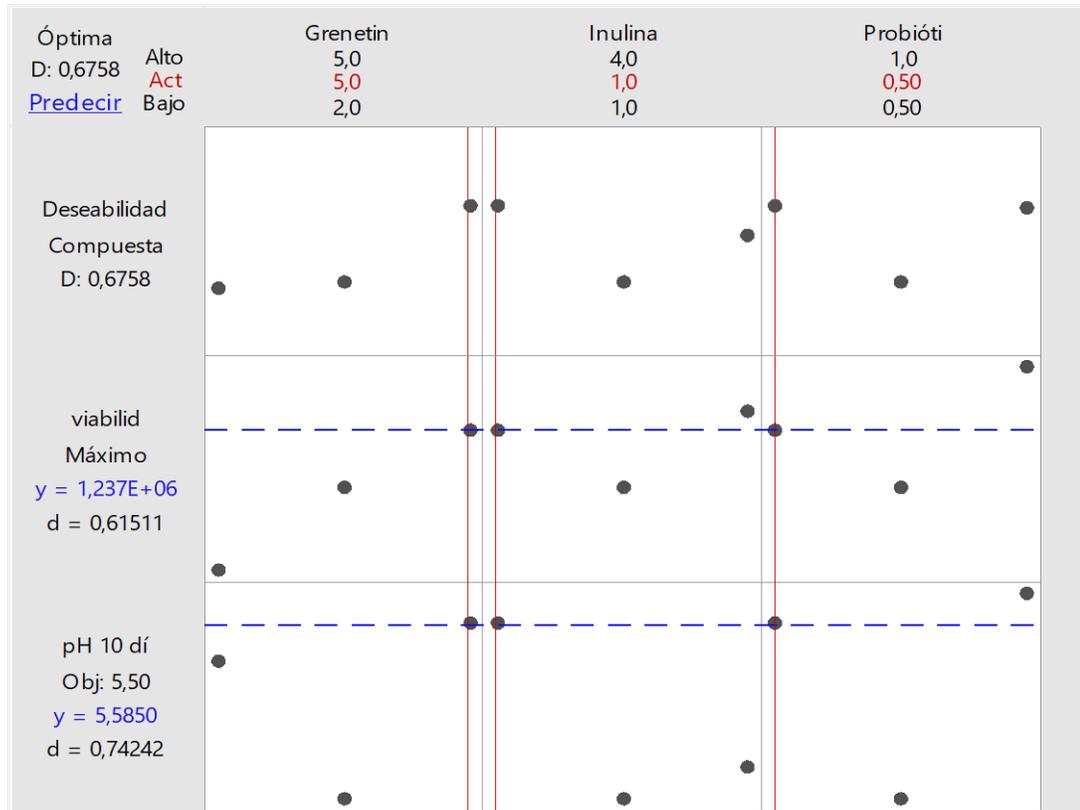


Figura 6. Función de utilidad a través de deseabilidad

2.5. VIABILIDAD DEL *Lactobacillus casei* EN EL PRODUCTO.

Se tomó como referencia la norma NTE INEN 2217 (Anexo 3) que especifica la cantidad de 1×10^6 UFC/g como la cantidad necesaria para que se considere como probiótico. Las pruebas de viabilidad se realizaron por duplicado a dos distintas diluciones y los resultados fueron expresados en logaritmo.

Las muestras almacenadas a 20°C presentaron leves variaciones en sus resultados. Durante 18 días se mantiene la cantidad de bacterias que debe tener un alimento probiótico, es decir, por encima de 6 log UFC/g (Figura 7).

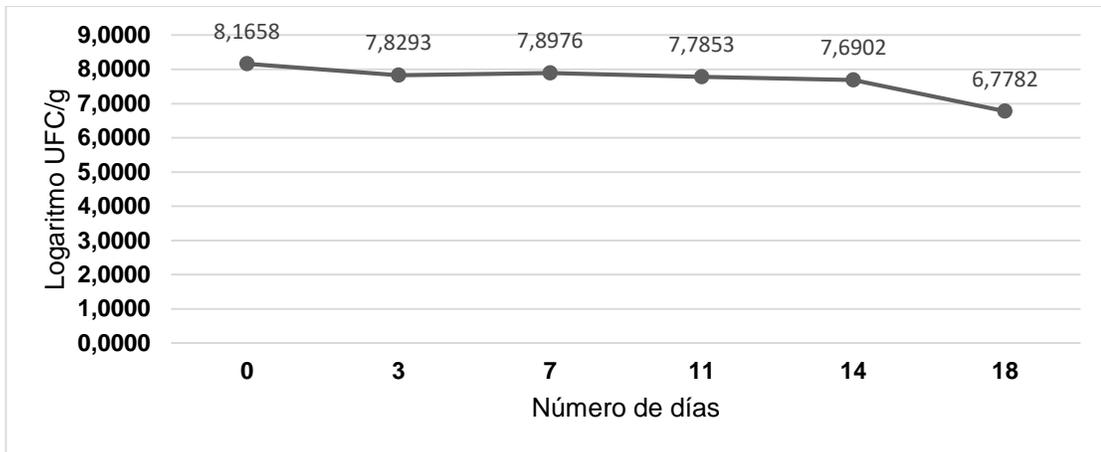


Figura 7. Datos de viabilidad en el producto a distintos tiempos de almacenamiento.

2.6. EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD DE HUMEDAD.

Se tomó en cuenta para el estudio de humedad la norma NTE INEN 2217 para productos de confitería (Anexo 4). La cantidad aplicada de recubrimiento comestible no tuvo un efecto significativo en los resultados de las pruebas de humedad del producto (Figura 8).

El producto sin recubrimiento dio un porcentaje muy bajo de 0,545%, sin embargo, el producto con recubrimiento después de 600 horas se estabilizó en 7,650%. Este resultado es muy alto en comparación con el producto original, pero se encuentra dentro de la norma que se exige un 10% máximo de humedad.

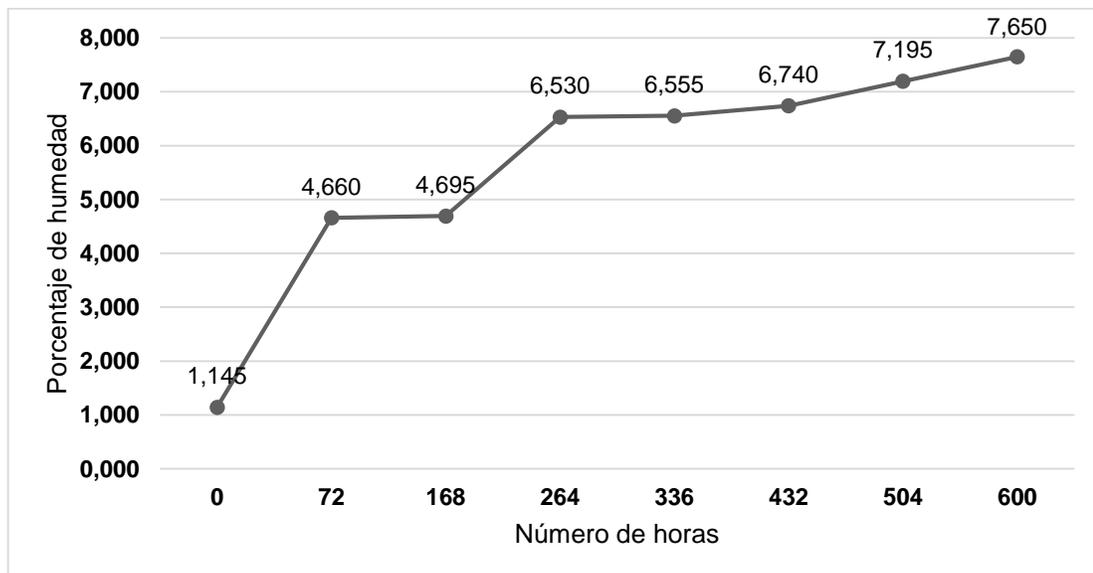


Figura 8. Datos de humedad del producto con recubrimiento en diferentes lapsos de tiempo

2.7. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.

Los resultados de *E. coli*, son menor a 1 UFC/g; hongos y levaduras fue menor a 1 UP/g, acatan los criterios microbiológicos especificados en la NTE INEN 2217, pues son valores menores a m (m = nivel de aceptación) en cada uno de ellos (Anexo 5).

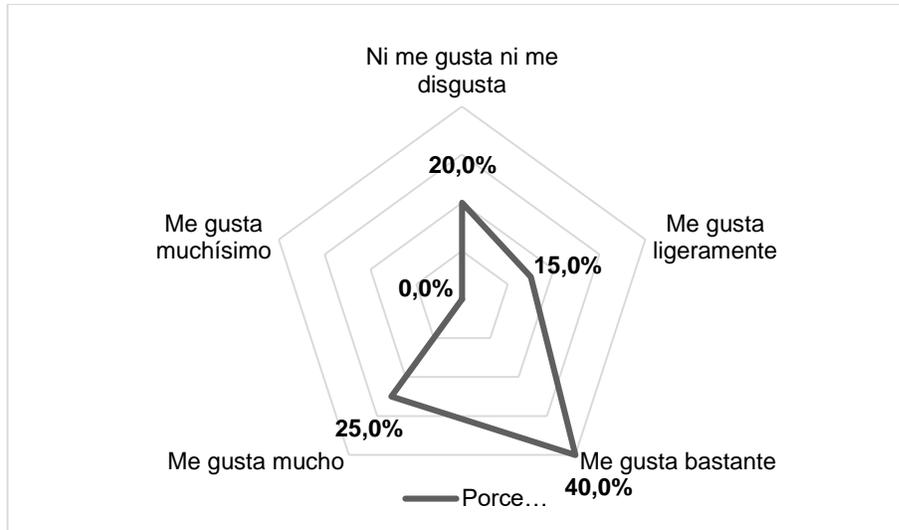
2.8. ACEPTACION DEL PRODUCTO POR PARTE DEL CONSUMIDOR.

Cada evaluador recibió un formulario similar al presentado en el anexo 6 y una muestra de caramelo blando con recubrimiento. Como se muestra en la figura 9, el 40% de los jueces indicaron mediante la escala hedónica que “me gusta bastante” el caramelo blando con recubrimiento y el 25% de personas señaló como “me gusta mucho”. Lo que indica que el producto si es aceptado por el consumidor. Las diferencias no fueron significativas según el panel de evaluación sensorial. A los resultados obtenidos se les aplicó las pruebas de varianza, desviación estándar, media y mediana (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis estadístico de la prueba de afectividad.

NOMBRE	RESULTADO
Media	20,0%
Mediana	20,0%
Varianza	0,02125
Desviación estándar	0,145774%

La media de los resultados dio un 20% ya que es el más representativo, la mediana fue de un 20%, es la mitad de los datos ordenados en orden creciente; con una varianza del 0,02125 y una desviación estándar de 0,145774%, estos dos últimos valores significan que la dispersión de los datos es cercana a la media.



*los valores inferiores de la escala no se colocaron ya que sus resultados dieron 0% y no son relevantes para la figura. Los que constan de: Me disgusta muchísimo, Me disgusta mucho, Me disgusta bastante, Me disgusta ligeramente.

Figura 9. Porcentaje de la aceptación por parte del consumidor

CAPITULO 3

DISCUSIONES

La cepa láctica mostró un crecimiento adecuado en los diversos tiempos evaluados. Uno de los factores de mayor importancia es la viabilidad de las cepas probióticas a diferentes valores de pH (Gúzman and Jurado). El recubrimiento comestible presentó un pH promedio de 5,33 a los diez días. Este valor se encuentra dentro del rango de pH óptimo de 4,0 a 6,5 para el crecimiento de probióticos (Hossein et al.), sin embargo, el pH hallado por Vergara, (2007) es de 3,03 y el pH según Lozano, (2011) es de 6,5 para todo el género de *Lactobacillus*. No obstante, se encuentra dentro del rango óptimo para favorecer el crecimiento del microorganismo.

Como señalan Figiel & Tajner, (2006) la textura de los productos alimenticios se ha convertido en una característica importante para influir en la aceptación de los consumidores de un alimento. Según Malagón, (2007) la cantidad máxima de humedad que permite un caramelo blando es del 20%, pero en la norma GSO, (2002) y el Instituto Ecuatoriano de Normalización, (2012), la humedad del caramelo blando no debe superar el 10% de humedad. El resultado de esta investigación fue del 7% durante 25 días, el cual indica que está dentro de los requisitos que se pide, pero este valor está por encima del que sugiere Candico, (2012) cuyo máximo es del 2,5% de humedad para este tipo de producto.

El Instituto Ecuatoriano de Normalización, (2011) y el Codex Alimentarius, (2010) especifican que la cantidad mínima para que se pueda considerar un probiótico es de 10^6 UFC/g. Con este nivel de crecimiento la bacteria láctica tendrá la capacidad de competir con bacterias patógenas, con beneficios en el huésped, reduciendo la translocación y la inflamación intestinal (Gúzman and Jurado). La cantidad promedio del recubrimiento sin producto a los diez días de este estudio es de $7,35 \times 10^5$ UFC/g, el cual se encuentra fuera de las especificaciones de la norma. Sin embargo, el producto con recubrimiento a los 18 días dio un resultado de 6×10^6 UFC/g, este valor sí se encuentra dentro de la norma.

Las principales sustancias antimicrobianas producidas durante los procesos metabólicos de los lactobacilos, así como de otras bacterias ácido lácticas, son los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno, las enzimas y bacteriocinas (Rondón et al.). En la literatura, la mayoría de las cepas antifúngicas activas en productos lácteos fermentados se relacionan con el grupo *L. casei* (Delavenne et al.). Los estudios de Mejía, Chacón, Guerrero, Otoniel, & López, (2007) mostraron que se produjo una inhibición del crecimiento microbiano del *E. coli*, luego de 3 horas de incubación de los microorganismos. En la investigación de González, Apella, Romero, Nader de Macías, & Guillermo, (1993) se determinó que el uso de alimentos con varias cepas probióticas es más eficiente que en productos con una sola especie, logrando ventajas tecnológicas y

organolépticas. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros investigadores tales como Työppönen, Petäjä, & Mattila, (2003) y Vallejo, Etchechoury, Horiszny, & Marguet, (2009) quienes proponen el uso de cepas de bacterias ácido lácticas productoras de sustancias antimicrobianas para prevenir la contaminación de diferentes matrices alimentarias con distintas especies de bacterias patógenas.

La cantidad de *E. coli*, es menor a 1 UFC/g; hongos y levaduras fue menor a 1 UP/g, que se vio afectado en parte por la cantidad de humedad presente, pero aun así las cepas de *L. casei* inhibieron en gran parte a estos microorganismos ya que no hubo crecimiento de microorganismos durante el tiempo analizado. Estos resultados indican que es necesario seguir profundizando esta investigación para llegar a conclusiones más aproximadas, sin embargo, una diferencia puede estar en los metabolitos generados por el *L. casei* que aportan al efecto antagónico.

La medida de la aceptabilidad sensorial es un paso lógico y necesario antes de lanzar un producto al mercado (Hough and Fiszman), ya que ninguna persona invertiría en un producto que sensorialmente no sea aceptado. El 40% de las personas aceptaron el producto de esta investigación. Los resultados permiten afirmar que el producto con *L. casei* y la inulina, como agente prebiótico, fue aceptado y bien valorado por los consumidores. Los resultados de las pruebas afectivas se realizaron a 25 personas que según Vergara et al., (2011), se necesita un grupo de panelistas no entrenados en un número inferior a 30 individuos.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que la mezcla de los componentes (suero de leche, gredina, glicerol, inulina y probiótico) tiene las características adecuadas para la formación del recubrimiento comestible y mediante el análisis estadístico se estableció una fórmula aceptable para recubrir un confite. Además, los componentes de la película no tuvieron efectos significativos en el pH del recubrimiento y la humedad del producto alimentario se encontraba dentro de lo indicado por la normativa nacional. Al mismo tiempo, la cantidad de microorganismos patógenos se vio reducida por la actividad antimicrobiana del probiótico.

Se observó una mejora significativa en la viabilidad del microorganismo probiótico incorporado bajo el efecto de la inulina en la mezcla. Quedó en evidencia la viabilidad que la viabilidad de *L. casei* se mantuvo mayor a 1×10^6 UFC/g durante 18 días. Las evaluaciones de los recuentos indican que el caramelo blando es un vehículo adecuado para la administración de microorganismos probióticos.

Los panelistas apreciaron el caramelo blando y la evaluación permitió determinar que el producto si es aceptado por el consumidor con un porcentaje del 40%, los individuos consideran que el producto no muestra diferencias significativas al producto original. La incorporación del probiótico y la inulina en el caramelo es de alta factibilidad para mejorar el valor nutritivo del producto final y es conveniente para la salud del consumidor.

Se logró obtener un alimento simbiótico con efectos probióticos y prebióticos a base de *Lactobacillus casei* e inulina, con la concentración del microorganismo probiótico recomendada para que pueda ejercer sus efectos benéficos sobre la salud del huésped.

RECOMENDACIONES

Es importante, para disminuir un riesgo de contaminación microbiana, la implementación de buenas prácticas de manufactura en la elaboración y aplicación del recubrimiento comestible aplicado en el caramelo blando.

Es altamente recomendable ampliar esta investigación de modo que se pueda conocer los efectos de almacenamiento a largo plazo y los posibles riesgos de contaminación de microorganismos que puedan causar deterioro.

Es necesario experimentar en otros tipos de alimentos a fin de mejorar el nivel de aceptación por parte del consumidor, además de analizar otros factores que puedan beneficiar la creación del recubrimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aranceta, Javier, et al. *Atención Primaria de Calidad: Guía de Buena Práctica Clínica En Alimentos Funcionales*. 2011.
- Bedoya, Oscar, et al. "Extracción, Cristalización y Caracterización de Inulina a Partir de Yacón (*Smallanthus Sonchifolius* (Poepp. & Endl.)) Para Su Utilización En La Industria Alimentaria y Farmacéutica." *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, vol. 6, no. 4, 2008, pp. 14–20.
- Blanco, Jorge, and Ada Lydia Cagigas. "Prebióticos y Probióticos, Una Relación Beneficiosa." *Revista Cubana Aliment Nutr*, vol. 16, no. 1, 2008, pp. 63–68.
- Calpa, Fredy, and Aura Chaspuengal. *Evaluación in Vitro de Lactobacillus Casei Con Características Probióticas Sobre Yersinia Pseudotuberculosis*. 2013.
- Candico. *Soft Candy Sugar*. 2012, https://bsgcraftbrewing.com/Resources%5CCraftBrewing%5CPDFs%5CProduct_Sheets%5CCandico/Soft_Candy_Sugar_PRODUCT_DATA_SHEET_V2_9_1_2012.ashx.pdf.
- Cartes, Paula. *Viabilidad de Las Cepas de Lactobacillus Casei Shirota y Bifidobacterium Lactis En Un Postre de Leche Con Salsa de Cranberry*. Universidad Austral De Chile, 2005.
- Castañeda, Carlos. "Probióticos, Puesta Al Día." *Revista Cubana de Pediatría*, vol. 90, no. 2, 2018, pp. 286–98.
- Castro, Luz, and Consuelo Rovetto. "Probióticos : Utilidad Clínica Colombia Médica." *Colombia Médica*, vol. 37, no. 4, Octubre-Diciembre, 2006, pp. 308–14.
- Codex Alimentarius. *Codex Stan 243-2003*. 2010.
- Cultimed. *Manual Básico de Microbiología*. 2010, <http://www.ictsl.net/downloads/microbiologia.pdf>.
- Delavenne, Emilie, et al. "Assessment of Lactobacilli Strains as Yogurt Bioprotective Cultures." *Food Control*, vol. 30, no. 1, Elsevier Ltd, 2013, pp. 206–13.
- FAO, and OMS. *Probióticos En Los Alimentos. Propiedades Saludables y Nutricionales y Directrices Para La Evaluación*. 2006, <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>.
- Fernández, Daybelis, et al. "Películas y Recubrimientos Comestibles: Una Alternativa Favorable En La Conservación Poscosecha de Frutas y Hortalizas Eatable Films and Coverings : A Favorable Alternative in the Postharvesting . Conservation of Fruits and Vegetables." *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, vol. 24, no. 3, 2015, pp. 52–57.

- Figiel, Adam, and Agnieszka Tajner. "The Effect of Candy Moisture Content on Texture." *Journal of Foodservice*, vol. 17, no. 1, 2006, pp. 189–95.
- Fuente, Norma Margarita, and José Eleazar Barboza. "Inocuidad y Bioconservación de Alimentos." *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, vol. 20, no. 1, 2010, pp. 43–52.
- Fuentes, Lorenzo, et al. "Alimentos Funcionales: Impacto Yretos Para El Desarrollo y Bienestar de La Sociedad Colombiana." *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 13, no. 2, 2015, pp. 140–49.
- García Argueta, Imelda. *Efecto de Un Recubrimiento Comestible Adicionado Con Lactobacillus Casei Shiota, Sobre Las Características Fisicoquímicas, Texturiales y Sensoriales de Una Galleta Tipo Habanera*. Universidad Autónoma Del Estado De México Facultad De Ciencias Agrícolas, 2014.
- González, Silvia, et al. "Inhibition of Enteropathogens by Lactobacilli Strains Used in Fermented Milk." *Food and Environmental Sanitarians Journal Of Food Protection*, vol. 56, no. 9, 1993, pp. 773–76.
- GSO. *Soft Candy*. 2002, http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/..%5Cpontofocal%5Ctextos%5Cregulamentos%5CSAU_63.pdf.
- Gúzman, Manuel, and Henry Jurado. "Determinación de La Cinética, Pruebas de Crecimiento y Efecto de Inhibición in Vitro de Lactobacillus Casei En Staphylococcus Aureus, Staphylococcus Epidermidis, Streptococcus Agalactiae y Escherichia Coli." *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, vol. 62, no. 2, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia, July 2015, pp. 23–39.
- Hosseini, Nezhad, et al. "Effect of Growth at Low PH on the Cell Surface Properties of a Typical Strain of Lactobacillus Casei Group." *Iranian Journal of Microbiology*, vol. 2, no. 3, Tehran University of Medical Sciences, Sept. 2010, pp. 147–54.
- Hough, G., and Susana Fiszman. "Estimación de La Vida Útil Sensorial de Los Alimentos." *Estimación de La Vida Útil Sensorial de Los Alimentos*, 2005.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. *NTE INEN 2217: Productos de Confitería*. 2012.
- . *NTE INEN 2395: Leches Fermentadas. Requisitos*. 2011, <https://ia801904.us.archive.org/27/items/ec.n.te.2395.2011/ec.n.te.2395.2011.pdf>.
- Lozano, Martha. *Estudio de La Viabilidad de Lactobacillus Casei Shiota En Una Gelatina de*

Pitaya (Stenocereus Griseus H.). 2011.

- Madrigal, Lorena, and Elba Sangronis. "La Inulina y Derivados Como Ingredientes Claves En Alimentos Funcionales." *Organo Oficial de La Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, vol. 57, no. 4, 2007, pp. 387–96.
- Malagón, Diana. *Estandarización y Validación de Formulaciones Base Para Confitería En Caramelo Duro y Blando Para La Aplicación de Agentes Saborizantes En Disoromas S.A.* 2007.
- Mejía, José, et al. "Obtención de Cepas de Lactobacillus Caracterización in Vitro Como Potenciales Probióticas." *Revista Científica*, vol. XVII, no. 2, Universidad del Zulia, 2007, pp. 178–85.
- Montero, Diego. *Determinación de Producción de Bacteriocinas a Partir de Lactobacillus Casei*. 2014.
- Morales, Miguel. *Generalidades y Aplicación de Películas y Recubrimientos Comestibles En La Cadena Hortofrutícola*. 2011.
- Muñoz, Segundo, et al. "Revisión : Inulina En Algunos Derivados Cárnicos." *Revista Facultad de Agronomía, Medellín*, vol. 65, no. 2, 2012, pp. 1–10.
- Olveira, G., and I. González. "Probióticos y Prebióticos En La Práctica Clínica." *Nutricion Hospitalaria*, vol. 22, no. SUPPL. 2, 2007, pp. 26–34.
- Rodriguez, M. *Estudio Respirometrico de Lactobacillus Casei ATCC 393 En Presencia de Iones Cu(II) y Zn (II)*. 2000.
- Rodríguez, Patricia, and Roberto Arenas. "Hans Christian Gram y Su Tinción." *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, vol. 16, no. 2, 2018, pp. 166–67.
- Rondón, Ana, et al. "Identificación y Actividad Antimicrobiana de Cepas de Lactobacillus de Origen Avícola." *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 46, no. 4, 2012, pp. 403–09.
- Salazar, Blanca, and Olga Montoya. "Importancia de Los Probióticos y Los Prebióticos En La Salud Humana." *Revista de La Fac. de Química Farmacéutica, U. de Antioquia, Colombia*, vol. 10, no. 2, 2003, pp. 20–26.
- Solis, Sandra Itzel. "Elaboración y Caracterización de Películas Comestibles Elaboradas Con Hidroxipropilmetilcelulosa (Hpmc)." *Universidad Autonoma Del Estado de México*, 2016.
- Työppönen, Susanna, et al. "Bioprotectives and Probiotics for Dry Sausages." *International Journal of Food Microbiology*, vol. 83, no. 3, 2003, pp. 233–44.

- Vallejo, M., et al. "Inhibición de Escherichia Coli O157:H7 Por Cepas Lactobacillus Aisladas de Queso Ovino." *Indian Veterinary Journal*, vol. 29, no. 1, 2009, pp. 15–19.
- Velásquez, John, et al. "Crecimiento de Lactobacillus Casei Ssp Casei ATCC 393 En Suero Clarificado." *Bioteconología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 13, no. 1, 2015, pp. 19–27.
- Velázquez, A., and J. Guerrero. "Algunas Investigaciones Recientes En Recubrimientos Comestibles Aplicados En Alimentos." *Temas Seleccionados de Ingeniería de Alimentos - Universidad de Las Américas Puebla*, vol. 8, no. 2, 2014, pp. 5–12.
- Vergara, Ana. *Estudio de La Viabilidad de Lactobacillus Casei*. 2007, <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fav4941e/doc/fav4941e.pdf>.
- Vergara, Omaris, et al. "Evaluación Sensorial de Arroz Biofortificado, Variedad IDIAP Santa Cruz 11, En Granjas Autosostenibles Del Patronato de Nutrición En La Provincia de Coclé, Panamá." *Perspectivas En Nutrición Humana*, vol. 13, no. 2, 2011, pp. 147–60.

ANEXOS

ANEXO 1. Activación del *Lactobacillus casei* ATCC 393*Lactobacillus casei* ATCC 393

Crecimiento de bacterias en leche en polvo



Crecimiento en agar MRS de bacterias obtenidas de la leche en polvo

ANEXO 2. Norma INEN 1529-5. Control microbiológico de los alimentos

CÁLCULOS

9.1 Caso general (placas que contienen entre 15 y 300 colonias).

9.1.1 Calcular el número N de microorganismo por gramo o cm³ de producto como la media ponderada de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

En donde:

- $\sum c$ = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas;
- V = Volumen inoculado en cada caja Petri;
- n_1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada;
- n_2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada;
- d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d = 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

9.1.2 Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas. Cuando la tercera cifra comenzando por la izquierda es menor que 5, mantener inalterada la segunda cifra. Si la tercera cifra es mayor o igual a cinco, incrementar en una unidad la segunda cifra. Expresar como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x, donde x es la correspondiente potencia de 10.

ANEXO 3. Norma INEN 2395. Probióticos

PRODUCTO	Yogur, kumis, kéfir, leche cultivada, leches fermentadas con ingredientes y leche fermentada concentrada Mínimo	kéfir y kumis Mínimo
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	10 ⁷ UFC/g	
Bacterias probióticas	10 ⁶ UFC/g	
Levaduras		10 ⁴ UFC/g

ANEXO 4. Norma INEN 2217. Humedad**TABLA 3**

Requisito	Toffess		Caramelos blandos		Método de ensayo
	Min	Max	Min	Max	
Humedad, %	4,0	10,0	4,0	10,0	NTE INEN 265
Azúcares reductores totales, %	-	22,0	-	22,0	NTE INEN 266
Sacarosa, %	-	65,0	-	65,0	
Lactosa, %	3,0	-	-	-	
Grasa total, %	3,0	-	3,0	-	
Grasa láctea, %	2,0	-	-	-	
Proteína, % (% N x 6,38)	2,5	-	-	-	
Dióxido de azufre, mg/kg		15,0		15,0	NTE INEN 274

ANEXO 5. Norma INEN 2217**TABLA 4. Requisitos microbiológicos**

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Aeróbios mesófilos, UFC/g	3	< 1,0x10 ²	1,0x10 ³	1	NTE INEN 1529-17
NMP Coliformes totales/g	3	< 3	1,0x10 ¹	1	NTE INEN 1529-6
NMP Coliformes fecales/g	3	< 3	-	0	NTE INEN 1529-8
Mohos y levaduras, UP/g	3	< 1,0x10 ¹	1,0x10 ²	1	NTE INEN 1529-10
Estafilococos aureus UFC/g	3	< 1,0x10 ¹	-	0	NTE INEN 1529-14

