

ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LA INCORPORACIÓN DE BACTERIAS
PROBIÓTICAS MICRO ENCAPSULADAS EN HELADOS

YANINA MARICEL CAICEDO CIPAGAUTA
Ingeniera Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
PROGRAMA INTERFACULTADES
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
BOGOTÁ
2010

ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LA INCORPORACIÓN DE BACTERIAS
PROBIÓTICAS MICRO ENCAPSULADAS EN HELADOS

YANINA MARICEL CAICEDO CIPAGAUTA

Código: 107372

Trabajo final presentado para optar al título de Especialista en Ciencia y
Tecnología de Alimentos

Director

MARTHA STELLA HOLGUÍN HERNÁNDEZ

MSc. Microbiología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

PROGRAMA INTERFACULTADES

ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

BOGOTÁ

2010

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	7
1.1. OBJETIVO GENERAL	7
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
2. MARCO REFERENCIAL	8
2.1. ORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	8
2.1.1. Mecanismos de acción de los probióticos	10
2.1.2. Los Lactobacillus	12
2.2. HELADOS	14
2.3. MICROENCAPSULACIÓN.....	15
2.3.1. Técnica de extrusión o goteo de solución de microorganismos	16
2.3.2. Técnica de emulsión.....	16
2.3.3. Materiales de encapsulación.....	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. METODOLOGÍA	21
4.1. UBICACIÓN	21
4.2. MATERIAS PRIMAS	21
4.2.1. Para microencapsulación.....	21
4.2.2. Activación y recuento del microorganismo	22
4.2.3. Elaboración del helado	22
4.3. MÉTODOS	23
4.3.1. Diseño Experimental.....	23
4.4. ENSAYOS PRELIMINARES.....	24
4.4.1. Técnica de encapsulado	25
4.4.2. Activación del cultivo liofilizado	26
4.4.3. Cantidad de encapsulados en el helado	26
4.5. ELABORACIÓN DEL PRODUCTO FINAL	26
4.6. MÉTODOS DE EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICOS Y SENSORIALES	28
4.6.1. Caracterización del encapsulado	28
4.6.1.1. Peso unitario del encapsulado	28
4.6.1.2. Diámetro unitario de los encapsulados	29
4.6.1.3. Densidad del encapsulado	29
4.6.1.4. Distribución celular.....	29
4.6.1.5. Caracterización de la materia prima.....	30
4.6.2. Caracterización del producto final.....	30
4.6.2.1. Sobreauento (Overrun)	30
4.6.2.2. Distribución de perlas en el helado	31
4.6.3. Seguimiento en línea	31
4.6.3.1. Análisis microbiológicos	32
4.6.4. Evaluación sensorial.....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34

5.1. ENSAYOS PRELIMINARES.....	34
5.1.1. TÉCNICA DE ENCAPSULADO	34
5.1.2. ACTIVACIÓN DEL CULTIVO LIOFILIZADO	35
5.1.2.1. AGUA POTABLE.....	35
5.1.2.2. BEBIDA DE SOJA.....	36
5.1.2.3. CALDO M.R.S. Y CALDO B.H.I.....	38
5.1.3. CANTIDAD DE ENCAPSULADOS EN EL HELADO	38
5.2. MÉTODOS DE EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICOS Y SENSORIALES	39
5.2.1. Caracterización del encapsulado	39
5.2.1.1. Distribución celular.....	40
5.2.2. Caracterización de la materia prima.....	41
5.2.3. Caracterización del producto final.....	42
5.2.3.1. Sobre aumento (Overrun)	43
5.2.3.2. Distribución de perlas en el helado	44
5.2.4. Seguimiento en línea	44
5.2.4.1. Tiempo de estudio 0-1, etapa de maduración de la mezcla de helado.	46
5.2.4.2. Tiempo de estudio 1-2, etapa de batido y endurecido de la mezcla de helado.	47
5.2.4.3. Tiempo de estudio 2-3, segunda semana de almacenamiento.....	48
5.2.4.4. Tiempo de estudio 3-7, almacenamiento.....	48
5.2.5. Análisis microbiológicos.....	48
5.2.5.1. Tiempo de estudio 0-1, etapa de maduración de la mezcla de helado.	49
5.2.5.2. Tiempo de estudio 1-2, etapa de batido y endurecido de la mezcla de helado.	50
5.2.5.3. Tiempo de estudio 2-3, segunda semana de almacenamiento.....	50
5.2.5.4. Tiempo de estudio 3-7, almacenamiento.....	52
5.2.6. Evaluación sensorial.....	52
6. CONCLUSIONES	54
7. RECOMENDACIONES.....	55

1. INTRODUCCIÓN

Los recientes estilos de vida son los principales responsables de las enfermedades del ser humano, pues estos han obligado al individuo a adoptar costumbres sedentarias, a aumentar el consumo de carbohidratos, grasas y alimentos escasos en fibra.

El desarrollo de productos con varias ventajas nutricionales constituyen una oportunidad real de contribuir al mejoramiento de la dieta, afectando positivamente la salud y el bienestar del individuo; de los nuevos productos se destacan aquellos que han sido modificados o les han sido incorporados nuevos elementos para ofrecer beneficios superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales.

Algunos microorganismos no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas, fisicoquímicas y reológicas de los alimentos, sino que generan beneficios a la salud del consumidor, es por ello que la industria de alimentos ha enfocado algunas investigaciones a la incorporación de estos microorganismos en los alimentos. Estos microorganismos son los denominados Probióticos, los cuales son “microorganismos vivos que, al ser ingeridos en cantidades adecuadas, le confieren beneficios a la salud del anfitrión” (FAO/WHO 2002), entre los probióticos más estudiados se destacan las cepas *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus delbruecki ssp*; y *Bulgaricus* de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Diferentes alimentos han sido vehículos para la incorporación de los probióticos, entre los más estudiados se destacan las leches fermentadas, y hoy por hoy, las investigaciones se sesgan a diferentes productos de la industria de alimentos, como son los quesos, las carnes, los vegetales, frutas, etc.

Aprovechando los estudios de los probióticos en lácteos de los últimos años, se propone como producto vehículo el helado de crema con las especificaciones de la normatividad colombiana.

Algunas investigaciones de incorporación de probióticos en helados realizadas en Italia y Chile manifiestan que los microorganismos sobreviven a las condiciones del proceso, pero la población microbiana desciende significativamente durante la etapa de almacenamiento del producto.

Es por ello que para el desarrollo de este trabajo se propone proteger físicamente al microorganismo con alginato de sodio utilizando técnicas de encapsulación

2. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de la encapsulación en la viabilidad del *Lactobacillus acidophilus* en helado.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar la encapsulación de cultivos probióticos en la elaboración de helado.
- Evaluar el comportamiento del probiótico durante el periodo de almacenamiento.
- Analizar las características sensoriales del producto final.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. ORGANISMOS PROBIÓTICOS

El intestino es el elemento más relevante para la actividad del sistema inmune y los mecanismos de protección inespecífica, ya que es en él, precisamente, donde son más activos los diferentes microorganismos pertenecientes a la flora gastrointestinal.

Cuando nacemos, el tracto gastrointestinal es estéril pero poco después se instala de forma permanente un complejo conjunto de aproximadamente 400 tipos diferentes de microorganismos que trabajan en armonía para el mantenimiento de la salud (entre estos microorganismos se encuentran los denominados probióticos), pero factores como el estrés, los malos hábitos alimentarios, el abuso de antibióticos y la edad, son los causantes de la disminución de la población de estos microorganismos en el intestino.

Teniendo en cuenta que estos microorganismos benefician la salud del huésped, es necesario mantener la población de los probióticos alta ($>1 \times 10^6$ ufc; *FAO/WHO, 2001*) en el intestino, esto se puede lograr mediante la introducción en nuestra dieta de alimentos probióticos y prebióticos (para estimular el crecimiento y la permanencia de los mismos).

En la actualidad se conocen varios beneficios de los probióticos y se considera una herramienta para la prolongación de la salud humana.

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe cumplir con unas características mínimas, (*Ivonne-Figueroa, co. 2006*).por ejemplo:

- Ser habitante normal del tracto gastrointestinal.
- No ser patógeno, ni tóxico.
- Tener un tiempo corto de reproducción.
- Ser viable en los vehículos o formulaciones de administración y resistentes a los procesos de fabricación.
- Ser estables al contacto con la bilis, ácido, enzimas y oxígeno.
- Tener habilidad para adherirse a la mucosa intestinal.
- Mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal humano.
- Producir sustancias antimicrobianas.
- Actuar como modulador de algunas respuestas inmunitarias y/o tener capacidad de influir en algunos procesos metabólicos. (*Cañedo, Arana Celina, 2008*)

La relación dosis-efecto de los probióticos tanto terapéuticos como preventivos, son muy variables y aún muy estudiadas. Además, el número de microorganismos que alcanzan a colonizar el intestino depende de diversos factores (como la formulación del probiótico, la coadministración con algunos alimentos o determinadas características del individuo (edad, estado de salud o enfermedad, pH gástrico, motilidad intestinal, microflora previa, etc)). La dosis mínima necesaria para conseguir un efecto terapéutico se estima en 1×10^6 - 1×10^9 unidades formadoras de colonias (ufc) (*Lee & Salminen, 1995*).

Los microorganismos probióticos han sido clasificados de manera amplia en *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y algunas bacterias con características probióticas semejantes.

Algunos microorganismos considerados como probióticos se exponen en la tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos considerados como probióticos.

Lactobacilos	Cocos Gram positivos	Bifidobacterias	Levaduras
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>L. casei</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>B. bifidum</i>	
<i>L. reuteri</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. brevis</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>B. animalis</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. fermentum</i>		<i>B. thermophilum</i>	
<i>L. plantarum</i>			

Fuente: Montijo y Col., 2008

2.1.1. Mecanismos de acción de los probióticos

Una parte fundamental de la funcionalidad de las bacterias probióticas es estimular su supervivencia y permanencia prolongada en el tracto gastrointestinal.

Existen varios mecanismos de acción, como los que se presentan en la tabla 2:

Tabla 2. Ventajas y mecanismo de acción de los probióticos.

VENTAJA	MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIA
<p>Disminución en los síntomas de intolerancia a la lactosa, reduciendo la concentración de la misma en leche fermentada por actividad de la lactasa bacteriana durante la fermentación.</p>	<p>La intolerancia a la lactosa es un problema que padece entre el 50 y el 70% de la población mundial en distinto grado. Este problema es debido a la ingestión de productos que contienen lactosa (principalmente leche no fermentada) y los bajos niveles de galactosidasa intestinal.</p> <p>La lactosa es una sustancia osmóticamente muy activa y su presencia en la luz intestinal ocasiona la salida de fluidos e iones de la mucosa intestinal al exterior hasta alcanzar el equilibrio osmótico, ocasionando una diarrea profusa.</p> <p>La ingestión de probióticos de forma continuada, bien liofilizados o como yogur, han permitido reducir considerablemente la mala absorción de la lactosa. Este efecto parece deberse al aporte de galactosidasa exógena proporcionada por <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i> del yogur.</p> <p>El tránsito intestinal se ralentiza permitiendo una mejor hidrólisis de la lactosa y la posterior adsorción de sus componentes.</p>	<p>Shah, N.P., R.N. Fedorak and P.J. Jelen. (1992). Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption. Int. Dairy J. 2:257-269.</p>
<p>Efecto inmunopromotor y propiedades antitumorales.</p>	<p>Estos microorganismos son capaces de eliminar la mayoría de metabolitos desfavorables y las enzimas precarcinogénicas en el colon; por lo tanto ayudarían a prevenir el cáncer de colon.</p>	<p>Moore, W.E. and L.H. Moore. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. Appl. Environ. Microbiol. 61:3202-3207.</p>
<p>Mejora la resistencia contra los microorganismos patógenos</p>	<p>Las bacterias probióticas pueden incrementar la resistencia contra los patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen la colonización competitiva, la producción de ácidos orgánicos, como los ácidos láctico y acético, bacteriocinas y otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono</p>	<p>Ivonne-Figueroa, co. (2006). El Beneficio de los probióticos. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Alfa Editores Técnicos.</p>

<p>Mejora el efecto protector ante infecciones y estimulación del sistema inmune.</p>	<p>La microbiota intestinal ejerce un papel importante en el efecto barrera de la mucosa intestinal frente a infecciones. Sus mecanismos de acción son muy variados: modifican los niveles de adhesión celular, producen sustancias antimicrobianas, estimulan los órganos linfoides asociados al tracto intestinal.</p>	<p>McFarland, L.V. (1999). Biotherapeutic agents for Clostridium difficile-associated disease, p. 159-193. In G. W. Elmer, L. McFarland, and C Surawicz (ed.), Biotherapeutic agents and infectious diseases. Humana Press Inc., Totowa, N.J.</p>
<p>Disminuye la concentración de colesterol en sangre.</p>	<p>El mecanismo podría ser debido a que los ácidos grasos de cadena corta pueden alterar la síntesis de colesterol. Además, las bacterias pueden conjugar ácidos grasos biliares y facilitar su eliminación a través de las heces. La disminución enterohepática de ácidos biliares hace imprescindible que el hígado retire colesterol de la circulación para poder sintetizar más sales biliares. Sin embargo, los estudios que han demostrado estos efectos de disminución del colesterol han utilizado dosis de yogur «irreales» (> 2 litros al día).</p>	<p>FAO y OMS. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición 85: 6-11.</p>
<p>Mejoran el tránsito intestinal.</p>	<p>Los probióticos producen ácidos que estimulan el peristaltismo intestinal y reducen el tiempo de tránsito de las heces. Así se consigue el alivio del estreñimiento, del síndrome del colón irritable y de las diarreas (incluso las producidas por antibióticos), entre otras dolencias gastrointestinales.</p>	<p>FAO y OMS. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición 85: 6-11.</p>

Fuente: La autora, 2010.

2.1.2. Los Lactobacillus

Son bacterias ácido lácteas y se ubican en la familia **Lactobacillaceae**, son bacterias gram-positivas, son microorganismos anaerobios y estrictamente fermentativos. Los carbohidratos les resultan indispensables para su buen

desarrollo, pues los fermentan para dar lugar al ácido láctico (a veces con ácidos volátiles), alcohol y dióxido de carbono como subproductos.

Estos microorganismos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados hasta sulfuro de hidrógeno (H₂S) y aminas en el queso.

Los *Lactobacillus* crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 – 4,5 y con un óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 3,6 hasta 4,0 en dependencia de especies y cepas, y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos.

Los *Lactobacillus* son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan, o al menos disminuyen considerablemente, el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras. (*Luz Samaniego y Maryla Sosa, 2000*).

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento en la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%; *Luz Samaniego y Maryla Sosa, 2000*) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos.

La mayor parte de los *Lactobacillus* son mesófilos (30-40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2°C y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de

5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados).

Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares en ácido láctico por homofermentación o bien, en otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación.

Los *Lactobacillus* son sensibles ante la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram positivas.

La resistencia a la bilis es también una propiedad importante a tener en cuenta para la colonización del intestino por los *Lactobacillus* y actualmente se encuentran estudios principalmente en el caso de *Lactobacillus acidophilus*, como los realizados por V. Chandramouli, K. Kailasapathy, P. Peiris y M. Jones. (2004).

2.2. HELADOS

Con la denominación genérica de helados, se entienden los productos obtenidos por mezclas líquidas a bajas temperaturas constituidas fundamentalmente, por leche, derivados lácteos, agua y otros ingredientes, con el agregado de los aditivos autorizados. El producto final presentará una textura y grado de plasticidad característicos que deben mantenerse hasta el momento de ser consumidos. (*Di Bartolo, Eduardo. 2005*)

De acuerdo a las características y/o los ingredientes empleados en la elaboración del helado, este se puede clasificar en: (*Di Bartolo, Eduardo. 2005*)

- Helados de agua o sorbetes: esta denominación corresponde a los productos en los que el componente básico es el agua. Deben responder a exigencias como, extracto seco, min: 20,0% p/p, materia grasa de leche, máx: 1,5 % p/p.
- Helados de leche: corresponde a los productos que han sido elaborados a base de leche. Deben responder a exigencias como, sólidos no grasos de leche, min: 6,0 % p/p. materia grasa de leche, min: 1,5 % p/p.
- Helados de crema: esta denominación corresponde a los productos que han sido elaborados a base de leche y han sido adicionados de crema de leche y/o mantequilla o grasa hidrogenada. Deben responder a exigencias como, sólidos no grasos de leche, min: 6,0 % p/p. Materia grasa de leche, min: 6,0 % p/p.

2.3. MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación es el proceso en el que los microorganismos son introducidos en una matriz o sistema de pared, con el objetivo de impedir su pérdida y protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento.

Las técnicas de encapsulación aplicadas a probióticos para uso en productos lácteos o en la producción de biomasa, se pueden clasificar en dos grupos dependiendo del método utilizado para formar las perlas.

2.3.1. Técnica de extrusión o goteo de solución de microorganismos

Es la técnica más antigua y común para elaborar cápsulas a base de hidrocoloides. Esta consiste en preparar una solución hidrocoloidal, adicionar los microorganismos a esta y hacerla pasar por una aguja de jeringa (a nivel laboratorio) o tubos de extrusión (para planta piloto), para formar gotas, estas se dejarán caer en caída libre a una solución endurecedora (como el cloruro de calcio). El tamaño y la forma de la perla dependen del diámetro de la boquilla y la distancia de adición. Este método es el más popular debido a su facilidad, simplicidad, bajo costo y condiciones discretas de formulación.

El material de soporte usado para la técnica de extrusión es el alginato, debido a las propiedades funcionales que este posee, como la fortaleza en su composición que contribuye a la formación del gel.

2.3.2. Técnica de emulsión

En esta técnica, un pequeño volumen de suspensión hidrocoloidal con microorganismos (fase discontinua) se adiciona a un gran volumen de aceite vegetal (fase continua). La mezcla se homogeniza para formar una emulsión de agua en aceite utilizando un emulsificante. Una vez la emulsión se forma, esta se puede insolubilizar para formar cápsulas de gel en la fase aceitosa. El tamaño de la perla es controlado por la velocidad de agitación. Esta técnica ha sido usada para encapsular bacterias ácido lácticas, como se reportó en el trabajo de A. Homayouni, co. (2008).

El aceite vegetal, es usado en esta técnica como fase continua. En algunos casos se adicionan emulsificantes para mejorar la emulsión, porque el emulsificante disminuye la tensión superficial y se refleja en el tamaño de las esferas. (*Wunwisa Krasaekoopt, Bhesh Bhandari, Hilton Deeth. 2003*)

2.3.3. Materiales de encapsulación

Existe una amplia variedad de materiales para cobertura que pueden ser usados para encapsular ingredientes alimentarios, donde se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones y gomas que proporcionan una encapsulación uniforme. En general existen tres categorías: grasas, proteínas y polímeros.

- **Grasas**

La cera de carnauba, el alcohol estearílico y el ácido esteárico son grasas que funden a una determinada temperatura y son erosionables por la acción de las lipasas que existen en la cavidad gástrica.

- **Proteínas**

La gelatina fue el primer material utilizado en la microencapsulación, y es, en la actualidad, un material con un importante potencial. La albúmina y el colágeno también se han empleado en la obtención de micropartículas.

- **Polímeros**

Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias. Dentro de ella están los polímeros naturales, los semisintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacarídica, de origen animal y vegetal; se

destacan el alginato, la dextrana, la goma arábica y la quitosana. (*Saez Vivian, Hernández José Ramón, Peniche Carlos. 2007*)

3. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos probióticos se requieren en los alimentos para aportar a la dieta humana, por sus grandes beneficios, es por eso que hoy por hoy se encuentran varios estudios de la incorporación de estos en los alimentos.

Teniendo en cuenta las experiencias que otros investigadores han desarrollado durante años en la inclusión de esta forma de vida en productos lácteos, surge la necesidad de incorporar los probióticos en helados, pues es un alimento que no tiene un mercado sesgado, y puede ser consumido por niños, adolescentes, adultos y ancianos; el consumo de este alimento no es muy alto en la población colombiana (1 kg a 2,3 kg / persona / anual; *Revista Dinero. 2006*), pero, se ha encontrado que este es un buen vehículo para incluir los probióticos en la dieta. Además, el helado tiene un pH cercano a siete lo que lo hace un poseedor de un ambiente adecuado para el microorganismo.

Se eligió como microorganismo probiótico el género de ***Lactobacillus acidophilus***, debido a que es la familia más estudiada, y se encuentra información en cuanto a las variables de crecimiento, es resistente a bajas temperaturas y en pequeña proporción al estrés generado mecánicamente.

Se ha determinado que los microorganismos probióticos tienen baja viabilidad en postres lácteos congelados, debido a la etapa de congelación y a la intoxicación por oxígeno (*A. Homayouni, co, 2008*), ya que para este tipo de productos se necesita la incorporación de aire para obtener la masa deseada en el helado, sin embargo el exceso de oxígeno afecta el crecimiento de los microorganismos microaerófilos y los anaeróbicos.

La encapsulación de las células bacterianas, se ha visto como una de las herramientas de protección contra el ambiente hostil al que puede ser sometidos los probióticos durante la elaboración, almacenamiento y consumo del producto lácteo. (*K. Kailasapathy; K. Sultana. 2003*).

4. METODOLOGÍA

4.1. UBICACIÓN

La experimentación se llevó a cabo en la planta de lácteos y en los laboratorios de microbiología y análisis fisicoquímico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

4.2. MATERIAS PRIMAS

A continuación se presentan las diferentes materias primas utilizadas según la fase del proceso, Adjuntando las fichas técnicas de todos los materiales en el anexo 1.

4.2.1. Para microencapsulación

En la encapsulación de los probióticos se utilizaron las siguientes materias primas:

- Alginato de Sodio
Para llevar a cabo la encapsulación de las bacterias probióticas se utilizó Alginato de sodio grado USP, distribuido por Disproalquímicos.

- Cloruro de calcio
Se utilizó cloruro de calcio calidad USP distribuido por el Centro Agro Lechero.

4.2.2. Activación y recuento del microorganismo

- Cultivo láctico
Se empleó un cultivo láctico mesófilo, liofilizado, de fermentación lenta, serie LYO 40, marca Danisco Cultor, conformado por *Lactobacillus acidophilus*.
- Caldo BHI (Brain Heart Infusión)
Medio nutritivo de activación de los microorganismos probióticos, referencia CM 0225, marca OXOID.
- Agar M.R.S. (de Man, rogosa, sharpe)
Marca OXOID y referencia CM0361.

4.2.3. Elaboración del helado

Se utilizaron las siguientes materias primas:

- Leche entera de vaca
Proveniente de la facultad de veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, con un contenido de grasa del 5,1% p/p.

- Grasa animal
Se utilizó crema de leche con un contenido de grasa del 32% p/p.
- Estabilizante/emulsificante
Se empleó un producto comercial que combina estabilizante y emulsificante de referencia SE448 marca CREMODAN.

4.3. MÉTODOS

Para el desarrollo experimental se determinó inicialmente el método a utilizar, por medio de ensayos preliminares; a continuación se escogió el alginato de sodio como material de soporte, debido al ambiente gentil que provee al material encapsulante, al bajo costo, simplicidad y compatibilidad con los microorganismos.

Se realizaron dos mezclas de helado con diferentes concentraciones de grasa permitidas por la legislación colombiana.

4.3.1. Diseño Experimental

La experimentación se realizó siguiendo un diseño factorial de 2 x 1 completamente aleatorio (ver tabla 3.), por duplicado, donde el primer factor corresponde al punto de adición de los probióticos encapsulados en el proceso de elaboración del helado y el segundo factor se refiere al porcentaje de grasa en el helado. Se establecieron dos puntos diferentes de adición de los probióticos encapsulados, los cuales fueron antes de la maduración y después de la

maduración de la mezcla de helado ya preparada. Se fijó el porcentaje de grasa en el helado con un valor de 8% p/p.

Tabla 3. Matriz de tratamientos

Forma de adición de los probióticos encapsulados		Contenido de grasa en el helado
2		1
1	Antes de la maduración de la mezcla de helado	8% p/p
2	Después de la maduración de la mezcla de helado	

Fuente: La autora, 2010

Además se tuvo en cuenta un ensayo de control negativo, el cual no contenía probióticos en capsulados.

4.4. ENSAYOS PRELIMINARES

Para lograr el cumplimiento de los objetivos se planearon ensayos preliminares para determinar la técnica de encapsulación con la cual se lograra un tamaño de perla a nivel "micro".

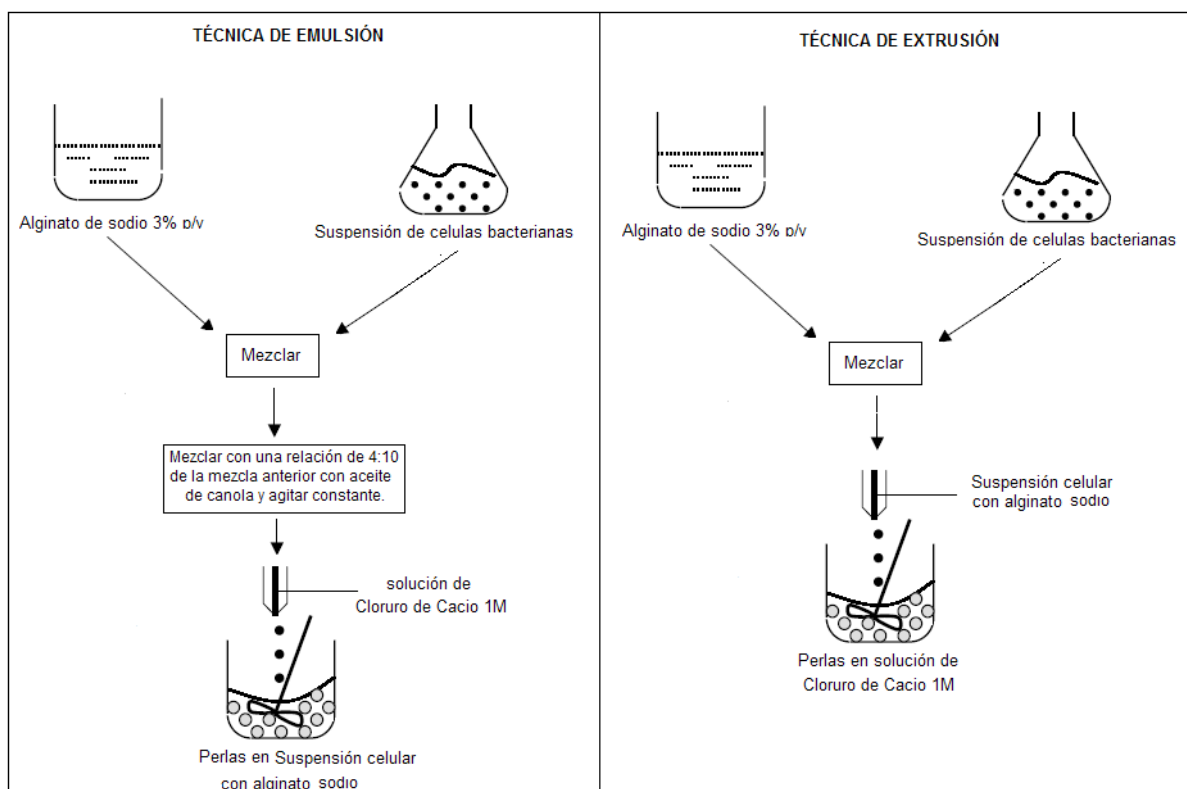
Otro de los ensayos realizados fue la determinación del medio de activación del cultivo liofilizado y que finalmente correspondería al fluido de suspensión de los microorganismos para la posterior inmovilización.

Finalmente se ensayó el porcentaje de perlas en el helado.

4.4.1. Técnica de encapsulado

Para determinar la técnica de encapsulación más adecuada, con la cual se obtuviera un tamaño de perla de dimensiones micro (menores a 1mm de diámetro), se propusieron dos metodologías (ver figura 1) halladas en investigaciones previas de otros autores, como Wunwisa Krasaekoopt, 2003. Los ensayos se realizaron con la técnica de emulsión y la técnica de extrusión o entrapamiento. Las metodologías seguidas fueron las siguientes:

Figura 1. Metodologías de encapsulamiento



Fuente: Adaptado de Wunwisa Krasaekoopt, 2003.

4.4.2. Activación del cultivo liofilizado

El microorganismo utilizado se obtuvo de una presentación liofilizada para lo que se necesitó estudiar el medio adecuado de activación que no influyera en la técnica de encapsulación y no aportara sabores indeseados al producto final.

Los medios de activación fueron: Agua potable, bebida de soja, caldo MRS y caldo BHI.

La activación del microorganismo se realizó en las condiciones óptimas del microorganismo, es decir a una temperatura entre 32-37°C, medio aeróbico, pH 6,4 por un tiempo mínimo de 4h, siguiendo el protocolo recomendado por Danisco.

4.4.3. Cantidad de encapsulados en el helado

Para determinar la cantidad de encapsulados en el helado se basó en la normatividad colombiana para este tipo de producto lácteo, (*NTC 1239:2002*), la cual dice que en la fabricación se permiten los agregados alimenticios destinados a conferir textura al producto final y que cuando se presente en combinación con otros ingredientes alimenticios, el helado debe ser el componente principal en un cantidad mínima del 50% en volumen.

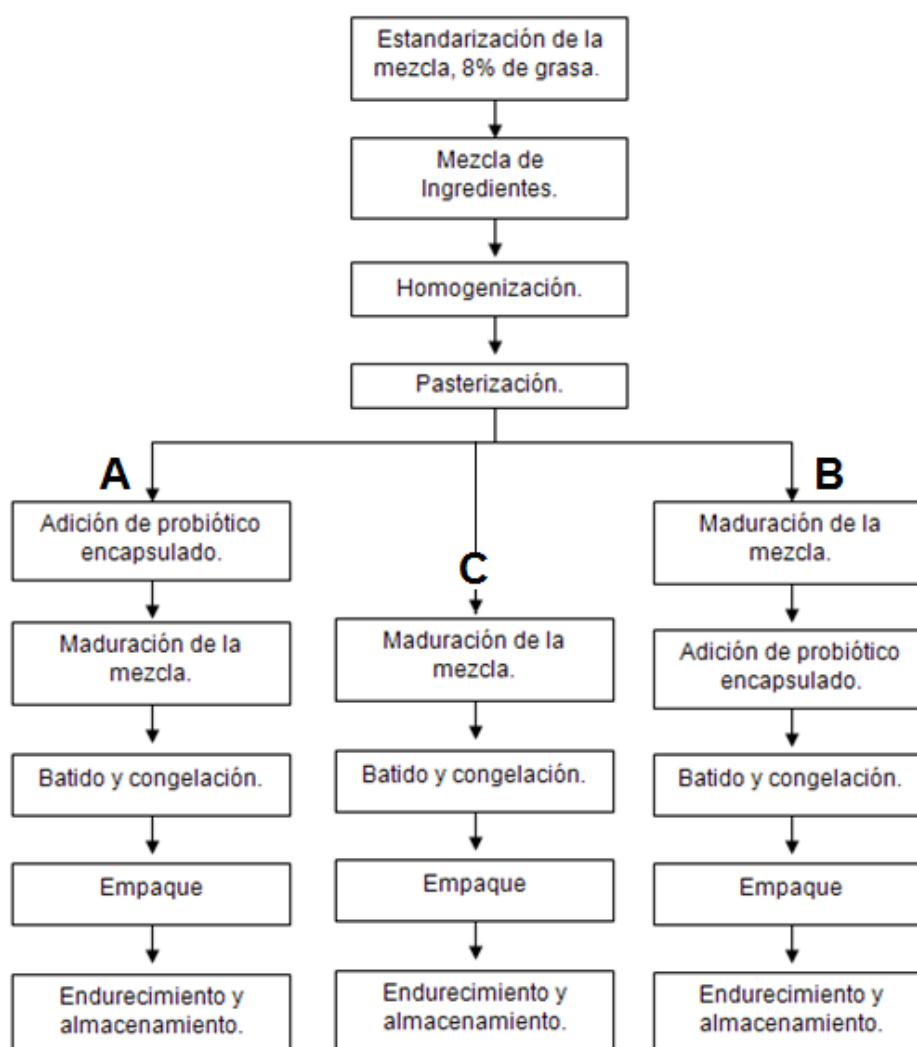
4.5. ELABORACIÓN DEL PRODUCTO FINAL

Ya definidos los parámetros de los ensayos preliminares se realizó el producto final, helado con probióticos encapsulados. Se elaboró una mezcla de 12kg, que

se dividió en tres grupos iguales (A, B y C) y se adicionaron los encapsulados en dos tiempos diferentes para A y B (antes de la maduración y después de la maduración de la mezcla de helado, respectivamente) y el grupo C correspondió al control.

En la figura 2 se presenta el diagrama de flujo del desarrollo del trabajo experimental.

Figura 2. Elaboración de helado con encapsulados de probióticos



Fuente: La autora, 2010

4.6. MÉTODOS DE EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICOS Y SENSORIALES

Se determinaron propiedades de los encapsulados y del helado final, por medio de diferentes fases de caracterización.

4.6.1. Caracterización del encapsulado

La determinación de las propiedades básicas de las perlas como son: peso, diámetro, densidad unitaria del encapsulado y distribución celular se realizaron teniendo en cuenta criterios estadísticos básicos, como son promedios y desviaciones estándar.

Para todas las mediciones se descartaron los datos que estuvieron alejados dos desviaciones estándar del promedio.

4.6.1.1. Peso unitario del encapsulado

Se pesaron tres grupos diferentes de 50 esferas en una balanza analítica, el valor resultante de cada grupo se dividió por 50 para obtener el peso promedio de cada esfera; a continuación se tomaron los tres pesos y se promedió finalmente.

4.6.1.2. Diámetro unitario de los encapsulados

Se determinó el diámetro promedio de un encapsulado, empleando para esto un calibrador o nonio, midiendo el diámetro de 10 perlas escogidas al azar. A continuación se calculó el volumen unitario, con base en la geometría y el diámetro del encapsulado.

4.6.1.3. Densidad del encapsulado

La medida de la densidad de los encapsulados se obtuvo tomando un volumen dado de agua, 70 ml, en una probeta previamente pesada y se adicionó una masa conocida de perlas, 2,5 g. La diferencia entre el peso y el volumen final e inicial de agua permitieron el cálculo de la densidad.

4.6.1.4. Distribución celular

Con el objeto de establecer cualitativamente la distribución de las bacterias probióticas en la perla, las muestras de los encapsulados se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando el método de bajo vacío (~1,3 mbar) en el microscopio electrónico de barrido Quanta 200 FEI, ubicado en el laboratorio de equipos robustos del centro de equipos Interfacultades, CEIF, edificio de Geociencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. .

4.6.1.5. Caracterización de la materia prima

La caracterización fisicoquímica de las materias primas (leche y crema de leche), se basó en el análisis de grasa por el método Gerber (AOAC. 989.09.2000), con el fin de conocer los parámetros necesarios para obtener la formulación del helado.

4.6.2. Caracterización del producto final

Al helado inoculado con los encapsulados se le realizaron los análisis fisicoquímicos mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis físico-químicos del helado

ANÁLISIS	MÉTODO
Humedad	Gravimétrico
Potencial de Hidrógeno (pH)	Potenciometro (AOAC. 981.12.2005)
Acidez titulable	Titulación con NaOH (AOAC. 942.15.2005)
Grasa	Gerber (AOAC. 989.09.2000)

4.6.2.1. Sobreamiento (Overrun)

Esta propiedad del helado se determinó con la mezcla control y consistió en pesar una unidad en volumen de mezcla de helado y luego del proceso de batido pesar la misma unidad en volumen, el porcentaje de sobreamiento se calculó de la siguiente forma:

$$\%Sobreaumento = \frac{(Pesomezcla - Pesohelado)}{Pesomezcla} \times 100$$

4.6.2.2. Distribución de perlas en el helado

Para determinar el número de perlas finalmente distribuidas en el producto, se pesó una cantidad inicial de helado, se dejó derretir y se filtraron los encapsulados procediendo a un lavado y conteo del número de esferas. La diferencia del número de encapsulados hallados por la masa de helado inicial arrojó un valor de distribución de estas en el producto final.

4.6.3. Seguimiento en línea

Para los tres tratamientos A, B y C se realizó un seguimiento en línea midiendo la presencia de ácido láctico por medio de la técnica de acidez titulable (AOAC. 942.15.2005), además se determinó el pH de cada muestra.

La determinación de ácido láctico se realizó por titulación con NaOH en el laboratorio de fisicoquímica perteneciente al ICTA en la Universidad Nacional de Colombia.

El pH se determinó utilizando un potenciómetro digital marca ORION modelo 420A, con electrodo de pH ubicado en el laboratorio de microbiología del ICTA.

4.6.3.1. Análisis microbiológicos

Para el análisis en línea también se realizaron conteos microbiológicos de las bacterias probióticas inoculadas.

Este análisis se llevó a cabo en las etapas críticas en la elaboración del producto, es decir, se realizó el conteo de bacterias probióticas al final de la etapa de maduración de la mezcla y al final de la etapa de batido y endurecimiento, luego de ello se realizaron los conteos microbiológicos al final de cada semana de almacenamiento.

Las siembras se realizaron por triplicado.

El análisis microbiológico consistió en la siembra en placa y en profundidad de las muestras. Se realizaron diluciones de las muestras de helado en agua peptonada, posteriormente se adicionó a cada caja de petri un mililitro de cada dilución, finalmente se dispensó agar MRS fundido, se homogenizó y se incubó a 32-37°C en aerobiosis durante un periodo de 48-72h, al cabo de las cuales se efectuó el conteo de las colonias formadas.

4.6.4. Evaluación sensorial

Se aplicó una prueba afectiva con el producto que contenía el mayor número de células viables probióticas después de tres semanas de almacenamiento.

Se diseñó y utilizó un formato (ver anexo 2) para la prueba donde se manejó una escala hedónica de tres puntos (me gusta, indiferente y no me gusta), donde se describieron los cinco atributos del helado estudiados (apariencia, color, aroma, sabor y textura).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ENSAYOS PRELIMINARES

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los ensayos preliminares como fueron: técnica de encapsulado, activación del cultivo liofilizado y cantidad de encapsulados en el helado.

5.1.1. Técnica de encapsulado

Las técnicas ensayadas fueron la de emulsión y la de extrusión,

La técnica de emulsión presentó resultados desfavorables, sin embargo hubo formación de perla esférica pequeña, con un tamaño aproximado de 1mm, éstas presentaron aglomeración en el fondo del recipiente colector y no fue posible separarlas.

En cuanto a la técnica de extrusión, esta fue la más adecuada presentando la formación de una perla esférica, maciza, fuerte con un tamaño aproximado de 2-3mm y la reacción fue inmediata, al finalizar la técnica las perlas se encontraban separadas unas de otras y nadaban en la solución remanente de cloruro de calcio. Finalmente las perlas se almacenaron, para ello se dividieron en dos grupos, el primero se filtró con la ayuda de un papel de fibra de vidrio (Schleicher & Schuell Microscience 595/ papel de filtro Ø 110mm, referencia No 10311610) y el segundo grupo se mantuvo en la solución remanente de cloruro de calcio; estos dos grupos se almacenaron a 4°C por 12 horas, al finalizar el tiempo se observó que para el

primer grupo de perlas presentaba una solución remanente y además las perlas habían perdido su forma esférica, debido a la deshidratación por frío, la estructura sufrió daño debido a la rápida formación de cristales de hielo generando la ruptura del gel y la permeabilidad del líquido de la matriz; para el segundo grupo se observó una maduración de la perla, es decir, un fortalecimiento de su estructura ya que al tocarla era firme y al cortarla en dos partes presentaba una estructura esponjosa.

Por lo tanto la técnica elegida para el desarrollo del proyecto fue la técnica de extrusión con un almacenamiento en solución de cloruro de calcio remanente por un tiempo de 12 h.

5.1.2. Activación del cultivo liofilizado

Los resultados hallados para los cuatro medios de activación, fueron los siguientes:

5.1.2.1. Agua potable

Se determinó la cantidad de microorganismos según la dosis recomendada por el fabricante, (Danisco) para obtener un recuento de 1×10^6 ufc/g, luego se adicionó 4,4 mg en 25 ml de agua potable a una temperatura ambiente de 20°C (± 1), esto se realizó para crear una suspensión de microorganismos en estado pasivo, es decir, sólo realizar una dilución de una cantidad conocida de microorganismos sin activar. Esta suspensión se mezcló con la solución de alginato de sodio a una relación de 1:1 y se procedió a encapsular según la metodología establecida.

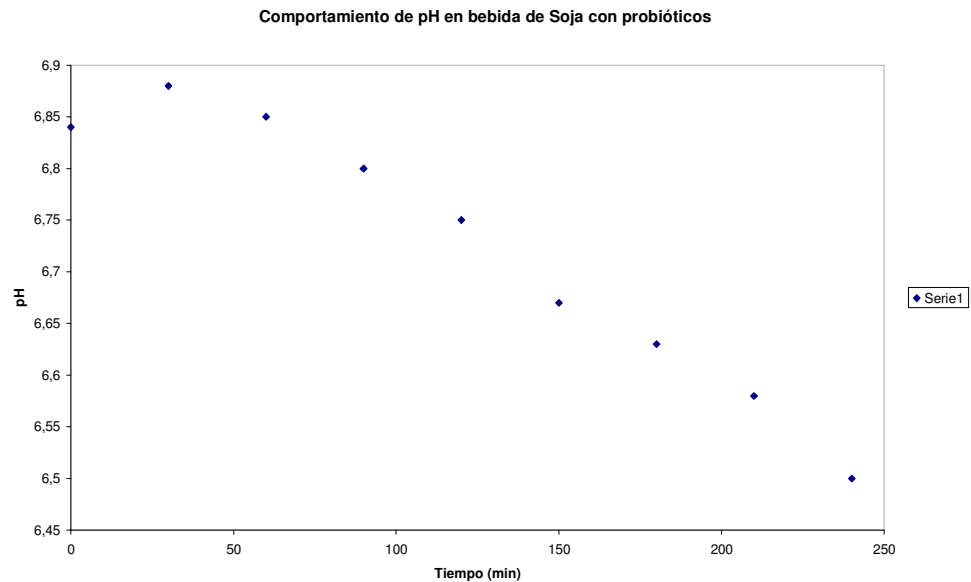
Al finalizar el tiempo de maduración del encapsulado se observaron pequeñas acumulaciones blancas alrededor de las perlas traslúcidas, se le realizó una tinción de gram a la perla y a la sustancia acumulada, los resultados arrojaron que en la perla se encontraba una cantidad mínima de bacilos (1 en lámina) y en la masa blanca una cantidad considerable de estos microorganismos (7 en lámina), lo que indicó que no era adecuado manejar los microorganismos de esta manera (liofilizados), por que ellos necesitan un tiempo prudente para hidratarse, como se observó en la evidencia de la masa blanca sobrenadante; posterior al contacto con el agua, las bacterias probióticas se activaron metabólicamente pero no hallaron alimento en el medio, comenzando un descenso en la población; por lo cual se descartó este procedimiento para el manejo del liofilizado.

5.1.2.2. Bebida de Soja

Se tomó 4,4 mg de liofilizado y se inoculó en 25 ml de bebida de soja previamente esterilizada, con un pH de 6,05, incubando en estufa a una temperatura de 37°C por un periodo de 12 h. Finalizado el tiempo de activación, se procedió a encapsular la bebida con probióticos, pero se encontró que al primer contacto con el alginato este presentó gelificación, y el pH de la bebida se encontró en 3,5 promedio. La gelificación se presentó debido a que el alginato de sodio a pH menores de 4 se ve afectado por efectos de despolimerización (ver anexo 1)

El ensayo se repitió y se midió el pH por un periodo de cuatro horas, tiempo estimado para que las bacterias se activen y comiencen la fase exponencial, el resultado se presenta en la gráfica no 1.

Gráfica 1. Comportamiento del pH en la bebida de soja.



Fuente: La autora, 2010.

Finalizado el tiempo de incubación se realizó un recuento por placa de la bebida de soja, arrojando una población de 25×10^7 ufc/ml, y se procedió a la elaboración de los encapsulados, dejando en maduración por un tiempo de 12 h, al cabo de este se percibió un aroma ácido en las perlas y un color más oscuro, de lo que se infiere que las bacterias se activaron metabólicamente estando atrapadas en el gel (Cuenca Quicazan, 2005).

Este efecto puede tener secuelas en el producto final (helado con encapsulados) ya que las perlas y las bacterias probióticas estarán en contacto con nutrientes suficientes para continuar con su metabolismo normal, aportando atributos especiales en el aroma, color y sabor del helado. Por estos motivos esta técnica se rechazó, porque no se deseaba que las bacterias se encontraran activas en el producto y continuaran creciendo.

5.1.2.3. Caldo M.R.S. y Caldo B.H.I.

En otro ensayo se hicieron crecer las bacterias liofilizadas en dos medios selectivos como fueron caldo MRS y BHI. Para 5 ml de cada caldo se inoculó 0,5g del cultivo liofilizado, finalmente se incubaron a las condiciones propias del mismo. Luego de finalizado el tiempo de incubación se observó que para el caldo MRS se obtuvo un recuento de 16×10^6 ufc/ml y que para el cultivo sembrado en caldo BHI se obtuvo un recuento de 10×10^8 ufc/ml, lo que indicó que para este tipo de microorganismos, *Lactobacillus acidophilus*, el mejor medio es el BHI.

5.1.3. Cantidad de encapsulados en el helado

Una de las variables que influyen en la determinación de la cantidad final de encapsulados en el producto final corresponde a la cantidad de microorganismos encapsulados por gramo de perlas.

Para fijar esta variable se realizó el siguiente procedimiento. Se obtuvo una suspensión (en caldo BHI) de microorganismos con una carga inicial de 12×10^8 ufc/ml, de ella se tomó 5ml y se mezcló con 5ml de solución de alginato de sodio al 3% p/p, esta se dejó gotear y se obtuvieron encapsulados con un recuento de 54×10^7 ufc/g.

Se realizó el cálculo teórico para determinar la cantidad de encapsulados necesarios para que cada gramo de helado tuviera un recuento final de 50×10^6 ufc, dando como resultado que para 100g de helado se necesitaban 5g de encapsulados.

Se realizó una prueba preliminar con una cantidad inoculada de encapsulados al 5%, observándose una distribución homogénea en toda la masa del helado.

También se realizó un recuento de las bacterias probióticas en la mezcla de helado inoculado y se obtuvo un valor de 10×10^6 ufc/g de mezcla, lo que quiere decir que hubo una pérdida de 0,4 unidades logarítmicas, esto puede deberse a las condiciones de maduración de los encapsulados, ya que luego de formados estuvieron en un tiempo prolongado bajo refrigeración y en un medio salino donde algunas de las bacterias sufrieron deshidratación.

5.2. MÉTODOS DE EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICOS Y SENSORIALES

5.2.1. Caracterización del encapsulado

Se determinaron propiedades como el peso unitario, el diámetro y la densidad del encapsulado. El resumen de los valores obtenidos se presenta en la tabla 5.

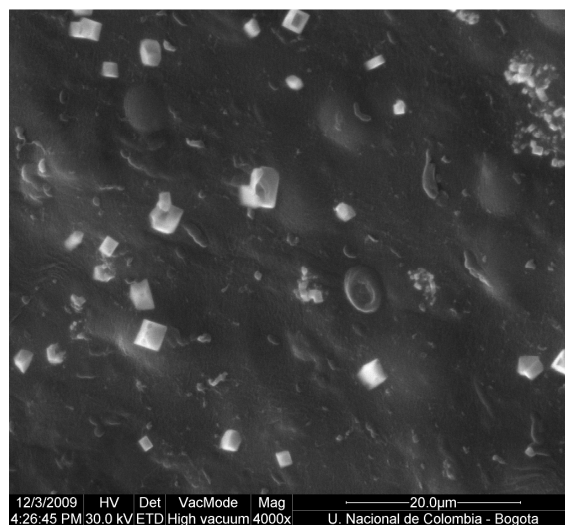
Tabla No. 5 Características del encapsulado

Geometría	Esférica
Peso unitario (mg)	11,53
Diámetro (mm)	3,0
Densidad (g/ml)	0,82
Volumen (mm ³)	13,74

5.2.1.1. Distribución celular

Se realizaron dos observaciones mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de la superficie de dos muestras del encapsulado (ver figura 3 y 4).

Figura 3. Microfotografía de la superficie del encapsulado con aumento de 20 μm .



Fuente: Laboratorio de equipos robustos del centro de equipos Interfacultades, CEIF, 2009.

En la figura 3 se observan cristales de cloruro de sodio (cubos claros) y protuberancias en la superficie que se puede deducir como bacterias en el interior recubiertas por alginato, también se observa en la superficie trazas de material orgánico.

Figura 4. Microfotografía de la superficie del encapsulado con aumento de 50 μm .



Fuente: Laboratorio de equipos robustos del centro de equipos Interfacultades, CEIF, 2009.

En la figura 4 hay un avistamiento más cercano del encapsulado, donde las protuberancias son más pronunciadas, posiblemente formadas debido a la técnica de vacío.

No se observan bacterias en la superficie de la perla, probablemente por la deshidratación como resultado del vacío a la que se sometió la placa para observarla al microscopio. Estos resultados indicaron que la preparación de los encapsulados (alto vacío) para la visualización por microscopía electrónica no fue la adecuada para este caso.

5.2.2. Caracterización de la materia prima

A la leche y la crema de leche se le realizaron análisis de grasa en el laboratorio de la planta de lácteos del ICTA en la Universidad Nacional de Colombia, los resultados se presentan en la tabla 6:

Tabla 6. Caracterización de la leche y crema de leche

MATERIA PRIMA	GRASA (% p/p)
Leche	5,1
Crema de leche	32

Fuente: La autora, 2010

Teniendo en cuenta que se deseaba un helado al 8% p/p en grasa, se tuvieron en cuenta la normatividad colombiana y los resultados arrojados del análisis de grasa; el balance de materia permitió el cálculo de los ingredientes necesarios para la elaboración de cada mezcla de 12 kg de helado, estos se registran en la tabla 7.

Tabla 7. Cantidad de ingredientes utilizados en la elaboración del helado

INGREDIENTES	CANTIDAD (kg)
Leche líquida entera	9,1
Leche en polvo	0,8
Crema de leche	1,107
Sacarosa	1,763
Estabilizante	0,06
TOTAL	12,83*

*Teniendo en cuenta un 7% de pérdida en el proceso, debido a evaporación.

Fuente: La autora, 2010

5.2.3. Caracterización del producto final

En la tabla 8 se presentan las propiedades físico-químicas del helado obtenido.

Tabla 8. Caracterización del helado final

ANÁLISIS	RESULTADOS
Humedad (% p/p)	35
pH*	6,42
Acidez titulable (%ácido láctico)	0,20
Grasa (%p/p)	8

Sobre aumento (% Aire incorporado)	63,2
------------------------------------	------

**Medida luego de envasado el producto.*

Fuente: La autora, 2010

Los resultados de la tabla 8, muestran que el valor del pH del helado se encuentra en el rango ácido, probablemente por la degradación de la lactosa y posterior producción de ácido láctico, corroborado con la acidez titulable, reacción que pudo presentarse debido a la posible presencia de microorganismos provenientes del ambiente.

5.2.3.1. Sobre aumento (Overrun)

La cantidad de aire incorporado en el helado dio como resultado un valor de 63,2% (ver tabla 8), es decir que por cada 100g de helado 63,2g corresponde a aire y 32,8g de mezcla.

Este valor generalmente lo presentan los helados de crema (60-70 %), ((*Di Bartolo, Eduardo. 2005*) debido a que gracias a la grasa contenida en la mezcla y luego del proceso de homogenización los glóbulos grasos son finamente divididos aumentando la superficie de los mismos y los espacios interglobulares que luego son ocupados por el aire en el proceso de aireación.

El hecho de obtener este valor de sobre aumento en el helado proporciona al producto características de calidad organolépticas únicas, donde finalmente el consumidor percibirá una textura suave, un producto con cuerpo y buena palatabilidad.

5.2.3.2. Distribución de perlas en el helado

Teniendo en cuenta el producto final, se tomaron tres muestras de helado con un peso inicial de aproximadamente 20g cada una, se le realizó el procedimiento descrito en el numeral 3.6.3.3 y se contaron las perlas, finalmente se obtuvo que para cada gramo de helado se encuentra distribuido 3 encapsulados.

5.2.4. Seguimiento en línea

Para los tratamientos de estudio, A (inoculación de encapsulados antes de la etapa de maduración de la mezcla de helado), B (inoculación de encapsulados después de la etapa de maduración de la mezcla de helado) y C (mezcla control) se le realizó un seguimiento en línea de seis semanas, los análisis para este periodo de tiempo correspondieron a la medida de ácido láctico y pH.

La especificación de los tiempos de estudio se presenta la tabla 9.

Tabla 9. Descripción de los tiempos de estudio

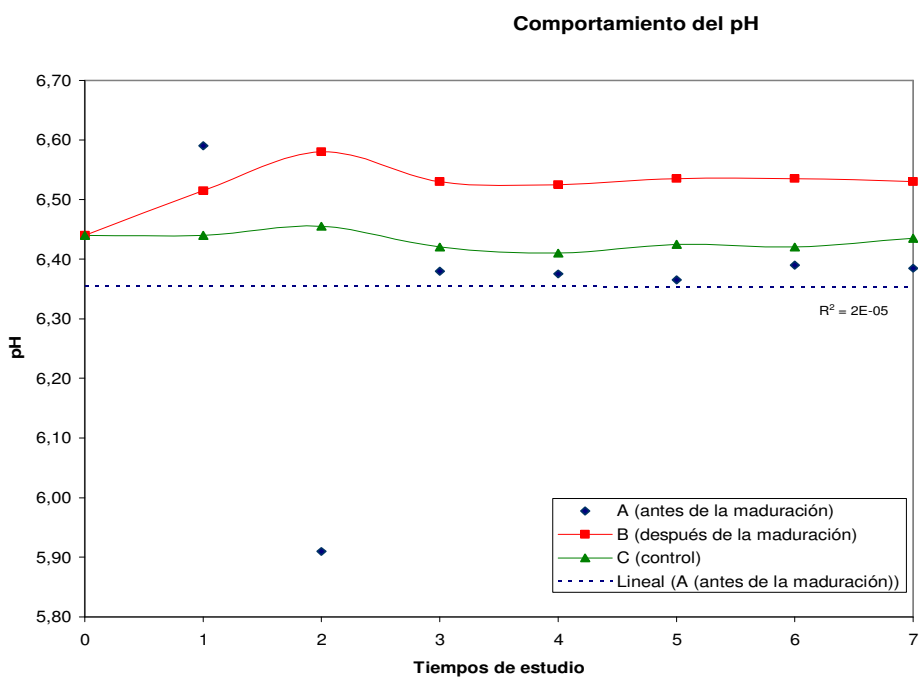
TIEMPOS DE ESTUDIO	
0	Antes de la etapa de maduración de la mezcla de helado.
1	Después de la etapa de maduración de la mezcla de helado.
2	Después del proceso de batido y endurecido del helado.
3	Semana 2 de almacenamiento.
4	Semana 3 de almacenamiento.
5	Semana 4 de almacenamiento.
6	Semana 5 de almacenamiento.
7	Semana 6 de almacenamiento.

Fuente: La autora, 2010.

Los resultados del seguimiento de pH y ácido láctico se presentan en las gráficas 2 y 3.

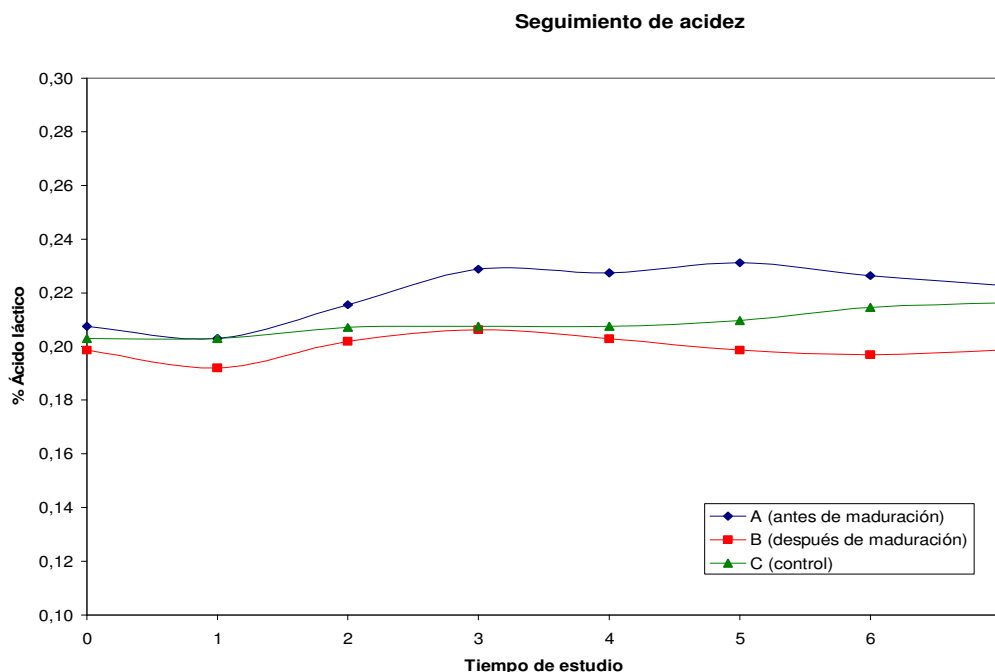
Se realizó un análisis por cada etapa estudiada y por cada ensayo, para observar el comportamiento del pH y de la acidez titulable.

Gráfica 2. Comportamiento del pH en el helado durante las etapas de estudio



Fuente: La autora, 2010

Gráfica 3. Comportamiento de la acidez en el helado durante las etapas de estudio



Fuente: La autora, 2010

5.2.4.1. Tiempo de estudio 0-1, etapa de maduración de la mezcla de helado.

Para el ensayo A (inoculación de encapsulados antes de comenzar la etapa de maduración), el pH de la mezcla aumentó probablemente por la presencia de iones de caseína y fosfatos presentes en la leche y crema de leche.

Para el ensayo B (inoculación de encapsulados después de terminada la etapa de maduración), se observó un aumento del pH, esto debido los fenómenos presentes en esta etapa, donde la solidificación de la grasa, la hidratación de las proteínas y el acomodamiento de los glóbulos grasos influyeron en el incremento de esta propiedad, debido a que moléculas como la caseína u otros aniones se

reacomodan bajando de esta manera la acidez de la mezcla. Este cambio de pH se corroboró al medir la acidez titulable.

Para el ensayo C (mezcla control), el valor del pH no varía, aunque la etapa de maduración de la mezcla ocurrió en las mismas condiciones que la del ensayo B y a ninguna de las dos se le adicionó microorganismos probióticos, no se observó ningún comportamiento en el ensayo C, debido a que los fenómenos de la etapa de maduración no se presentaron a la misma velocidad y la acidez para este ensayo fue constante.

5.2.4.2. Tiempo de estudio 1-2, etapa de batido y endurecido de la mezcla de helado.

Para este tiempo de estudio se observó que el pH para el ensayo A, cae drásticamente a un valor cercano a 5,9, debido a la producción de ácido láctico en la mezcla, gracias a la activación metabólica de los microorganismos probióticos.

Para el ensayo B se observó incremento en el pH y en la acidez, estas dos mediciones difieren en su correspondencia, pero lo que se esperaba realmente era que el pH disminuyera, y la medida de acidez aumentara, ya que debido al proceso de overrun y el congelamiento, se presenta una concentración de material y por lo tanto la acidez debería aumentar.

Para el ensayo C, tanto el pH como la acidez no presentaron ninguna variación significativa en su valor inicial.

5.2.4.3. Tiempo de estudio 2-3, segunda semana de almacenamiento.

En esta etapa de estudio, se observó que existió un aumento en el pH para el ensayo A, y un periodo de estabilidad, donde los probióticos encapsulados tuvieron oportunidad de adaptarse al medio y activarse nuevamente, por lo tanto, lo que se esperaba era un incremento en la acidez y una disminución del pH (lo que discrepa del resultado en la gráfica 2), sin embargo, en la gráfica 3 se aprecia un aumento considerable de la acidez, lo que corrobora la posible activación metabólica de los microorganismos.

Para los ensayos B y C se observó que el valor del pH disminuyó, posiblemente por el proceso de congelación, donde las moléculas tienden a concentrarse más por la congelación del agua existente en la matriz inicial que por otros factores como era el crecimiento de bacterias o cambios fisicoquímicos.

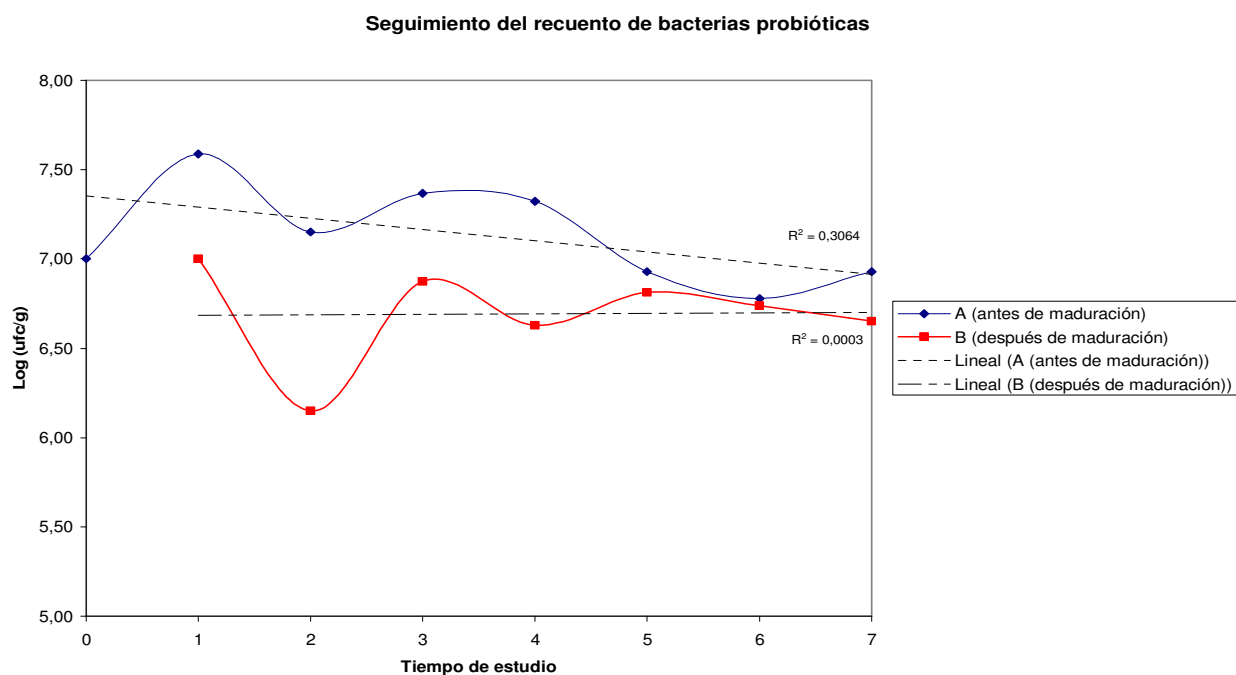
5.2.4.4. Tiempo de estudio 3-7, almacenamiento.

Para los periodos comprendidos del 3-7, se observó que el pH y la acidez fueron constantes.

5.2.5. Análisis microbiológicos

Los resultados de las siembras realizadas se enseñan en la gráfica 4,

Gráfica 4. Comportamiento de la población de *Lactobacillus acidophilus* en el helado durante el tiempo de estudio



Fuente: La autora, 2010

A continuación se encuentra el análisis de cada tiempo de estudio según la gráfica 4.

5.2.5.1. Tiempo de estudio 0-1, etapa de maduración de la mezcla de helado.

Se aprecia que para el ensayo A, la carga microbiana aumentó 0,6 unidades Log, probablemente porque los probióticos contenidos en la pared de la perla estuvieron expuestos a un medio nutritivo como lo es la mezcla de helado y un

tiempo adecuado para su activación metabólica, lo que estimuló el crecimiento de las bacterias.

5.2.5.2. Tiempo de estudio 1-2, etapa de batido y endurecido de la mezcla de helado.

Se observó una disminución en el número de microorganismos así: para el ensayo A: 0,42 unidades Log y para B: 0,82 unidades Log, resultados probables por el estrés mecánico, la incorporación de oxígeno y el choque térmico del proceso que afectan directamente la supervivencia de las bacterias probióticas.

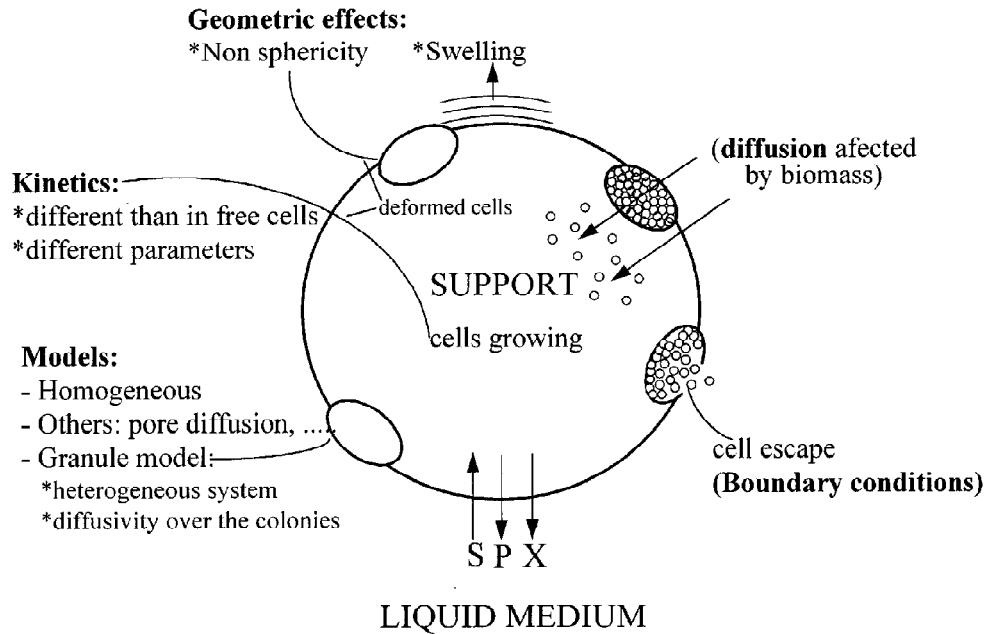
La mayor capacidad de supervivencia de las bacterias para el ensayo A, se debe a la mejor adaptación de estos microorganismos al medio, ya que previamente tuvieron un mayor tiempo para la adaptación a las condiciones de la mezcla.

5.2.5.3. Tiempo de estudio 2-3, segunda semana de almacenamiento.

Para la etapa de estudio se observó un crecimiento de las bacterias así: para A: 0,21 unidades Log y B: 0,77 unidades Log, luego de haber pasado por la etapa de batido y endurecimiento del helado. Algunas perlas sufrieron erosiones en la pared superficial y en la estructura misma, debido a la acción de las espas y la formación de cristales que rompieron la estructura y liberaron microorganismos al medio, en el tiempo de almacenamiento las bacterias se adaptaron, se activaron y crecieron.

Para entender mejor el comportamiento del producto en esta etapa, se retoma un modelo del encapsulado descrito por A. Laca, 2000,(ver figura 5), donde es preciso analizar las diferentes interacciones que existen en el sistema.

Figura 5. Modelo esquemático de los microorganismos en la perla.



Fuente: A. Laca, 2000

Según A. Laca, para el encapsulado se presenta una capa estacionaria en la superficie, a través de la cual se realizan tareas de transporte necesarias como difusión de los nutrientes del medio y de los microorganismos hacia el interior y el exterior, también el escape celular debido a factores externos, se reporta la probabilidad de un hinchamiento de la cápsula y la posibilidad de que se presenten defectos geométricos, es decir, que el encapsulado no sea exactamente esférico.

5.2.5.4. Tiempo de estudio 3-7, almacenamiento.

En el periodo de almacenamiento se observa que la población bacteriana comienza su descenso lentamente, sin embargo luego de seis semanas de almacenamiento el helado aun conserva propiedades de alimento funcional (carga de probióticos mínimo 1×10^6 ufc/g). Esta tendencia, se debe posiblemente a factores como el frío, el cual retarda la acción metabólica de las células vivas, haciendo que éstas entren en un estado de latencia; además la lenta congelación a la cual el helado es sometido, genera cristales de hielo que afectan directamente la membrana celular de los microorganismos, haciendo que estos mueran, por lo menos los que no se encuentran protegidos por el alginato.

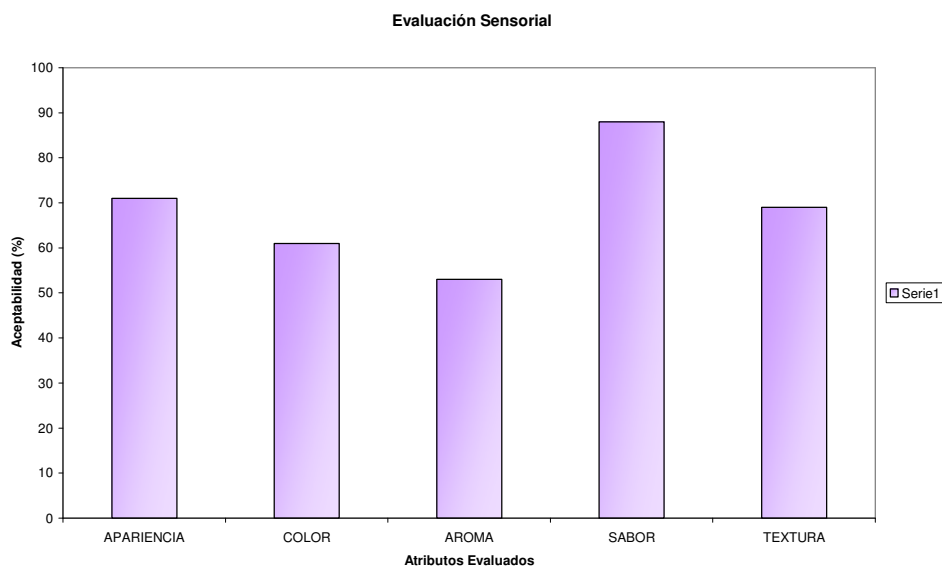
Otro de los factores que influyen en la disminución de la población bacteriana es la falta de alimento para el probiotico, ya que al estar protegido por la matriz de alginato y estar contenido en un alimento sólido como el helado, los nutrientes no se difunden por los poros del encapsulado.

5.2.6. Evaluación sensorial

Se realizó una prueba afectiva con consumidores, donde participaron 51 personas que habitualmente consumen helado. Las muestras de helado fueron las del tratamiento A (inoculación de encapsulados antes de la etapa de maduración de la mezcla de helado), ya que estas fueron las que mejores resultados arrojaron en el seguimiento en línea del recuento de bacterias probióticas en el helado.

Los resultados obtenidos se visualizan en la gráfica 5.

Gráfica 5. Aceptabilidad del helado con probióticos encapsulados.



Fuente: La autora, 2010

Los resultados muestran que todos los atributos obtuvieron valores superiores al cincuenta por ciento de aceptabilidad, lo que indica que el producto es aceptado por los consumidores, aun cuando la textura era granulosa debido a la presencia de los encapsulados.

Los atributos con menos aceptación como fueron color y aroma se relacionan más con una costumbre comercial, donde el alimento presenta un aroma descriptible y colores más atractivos.

6. CONCLUSIONES

- Se evaluó la influencia de la encapsulación en la viabilidad del *Lactobacillus acidophilus* en un helado de crema sin sabor específico y se encontró que para seis semanas de almacenamiento las bacterias probióticas sobreviven a las condiciones y se mantienen en un valor aceptable.
- La técnica de extrusión o goteo fue la que mejor resultados arrojó en el proceso de encapsulación de probióticos.
- Se evaluaron dos puntos de inoculación de los encapsulados en helado y se encontró que la mejor etapa de inoculación de los probióticos encapsulados fue antes de la maduración.
- Se encontró aceptabilidad del producto por parte del consumidor tal que se pueden iniciar estudios de comercialización.
- Se confirmó que un producto lácteo como el helado puede servir como vehículo para llevar microorganismos probióticos al ser humano.

7. RECOMENDACIONES

- Es necesario activar las bacterias para un manejo fácil y un conocimiento real de la población inicial de los microorganismos que se inoculan al producto.
- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede considerar la posibilidad de comercializar el producto con varias presentaciones. Estas presentaciones podrían llevar color y aroma, partiendo de la preparación de los encapsulados como serían “gomitas”.
- Por otra parte, la comercialización del producto debe ir acompañada de campañas de educación acerca de los probióticos con el objetivo de alentar a los consumidores hacia un consumo constante de este tipo de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- A. Laca, L.A. García, M. Díaz. (2000). Analysis and description of the evolution of alginate immobilised cells systems. *Journal of Biotechnology* 80: 203-215.
- Ada Lydia de las Cagigas. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Ediciones Mirasierra. Madrid. 2003.
- Becerra Español, Liliana Carolina. Obtención de helado de soya bajo en grasa saborizado con arazá. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2008.
- Cañedo, Arana Celina. Los probióticos en las infecciones. (v.1/2008) Guía ABE. Infecciones en pediatría Laganés, Madrid. 2008.
- Corrales Alejandro, Henderson Marjorie, Morales Ileana. Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. *Revista chilena de nutrición*. Santiago de Chile. 2007
- Cuenca Quicazan, Martha María. Evaluación de la fermentación láctica de una mezcla de bebida de soya y leche de vaca utilizando células inmovilizadas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2005.
- Dalla Lasta, María Silvia. Página en internet: www.monografias.com/trabajos12/alginato/alginato.shtml

- Di Bartolo, Eduardo. Guía para la elaboración de helados. Secretaría de Agricultura, ganadería, pesca y alimentos. 2005
- FAO/WHO Experts' Report. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- FAO y OMS. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición 85: 6-11.
- G. Cruz, Adriano. E. C. Antunes, Adriane. O. P. Sousa, Ana lucía. A. F. Faria, José, M. I. Saad, Susana. (2009). Ice – cream as a probiotic food carrier. Food Research International 42.
- Homayouni, A. Azizi, M.R. Ehsani, M.S. Yarmand, S.H. Razavi. Effect of microencapsulation and resistant Storch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chemistry. Iran. 2008
- Ivonne-Figueroa, co. (2006). El Beneficio de los probióticos. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Alfa Editores Técnicos.
- I.N. Haynes and M.J. Playne. Survival of probiótico cultures in low-fat ice-cream. Australian Journal of Dairy Technology; Apr 2002; 57,1; ABI/INFORM Trade & Industry pg 10.
- J. Yáñez F. co. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Departamento de biotecnología y bioingeniería del Cinvestav. Avance y perspectiva vol. 21. 2002.

- K. Kailasapathy; K. Sultana. Survival and (beta)-D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2003.
- Lee, Y. K. & Salminen, S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 241 – 244. 1995.
- Marquina, Domingo y Santos Antonio. Probióticos, prebióticos y salud. Dpto de microbiología III, Universidad Complutense, Madrid.
- McFarland, L.V. (1999). Biotherapeutic agents for *Clostridium difficile*-associated disease, p. 159-193. In G. W. Elmer, L. McFarland, and C Surawicz (ed.), *Biotherapeutic agents and infectious diseases*. Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- Montijo, E.; Bacarreza, D.; Díaz, S.; Cervantes, R.; Mata, N.; Zárate, F.; García, M.; López, L.; Ramírez, J. (2008). Utilidad de los probióticos en pediatría: revisión. *Revista de enfermedades infecciosas en Pediatría*, 22 (85), 24-31.
- Moore, W.E. and L.H. Moore. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3202-3207.
- Norma Técnica Colombiana 1239 de 2002 Helados y mezclas para helados
- P. Capela, T.K.C. Hay, N.P. Shah. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International* 40. Australia. 2007

- Revista Dinero. Edición 250. Abril 2006
- Saez Vivian, Hernández José Ramón, Peniche Carlos. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. Departamento de desarrollo de formulaciones, centro de ingeniería genética y biotecnología. Cuba. 2007.
- Shah, N.P., R.N. Fedorak and P.J. Jelen. (1992). Food consistency effects of quarg in lactose malabsortion. *Int. Dairy J.* 2:257-269.
- S. Mandal, A.K. Puniya, K. Singh. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal* 16 (2006).
- T.T. Sheu, R.T. Marshall, and H. Heymann. Improve survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Food science and human nutrition*. Columbia. 1993.
- Vargas Edgar Mauricio, Gómez Clara Juliana, Parra Mónica Ellana, Romero María Alexandra. Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (segunda parte). *Revista de ingeniería # 20 facultad de ingeniería universidad de los andes*. 2002
- V. Chandramouli, K Kailasapathy, P. Peiris, M. Jones. An improve method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods* 56. 2004

- W.K. Ding and N.P. Shah. Acid, bile, and heat tolerance of free and microcapsulated probiotic bacteria. Journal of Food science. Institute of food technologists. 2007.
- Wunwisa Krasaekoopt, Bhesh Bhandari, Hilton Deeth. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal. Australia.
- Y. Sanz. Co. Contribución de la microbiota y del género “Bifidobacterium” a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. Instituto Agroquímica y tecnología de alimentos. Valencia. 2006.

ANEXO 1

INFORMACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS

ALGINATO DE SODIO (DALLA L, María S)

Los alginatos son polímeros naturales que hacen parte de la pared celular de las algas cafés (*Phaeophyceae*) y son usados en diversas industrias; en la de alimentos se emplea como agente gelificante y viscosante, formador de películas para la protección de alimentos y estabilizador de espumas. En la industria farmacéutica este polímero se usa como agente desintegrador, gel absorbente, agente de suspensión, entre otros y en la agricultura como agente de retención de agua.

Los alginatos disponibles en el mercado se comercializan, en su mayoría, en forma de sales hidrosolubles, libres de celulosa, blanqueadas y purificadas, entre las que se incluyen las siguientes: Ácido algínico, Alginato de sodio, Alginato de potasio, Alginato de amonio, Alginato de calcio y Alginato de propilenglicol.

También se producen compuestos combinados, tales como:

- Alginato de amonio-calcio
- Alginato de sodio-calcio

Algunos de estos compuestos, principalmente el ácido algínico y sus sales de sodio, calcio y potasio, se ofrecen en tres calidades diferentes, determinadas por los procesos de purificación y blanqueado que sufren los productos durante su manufactura. Dichas calidades corresponden a:

- **Calidad alimentaria:** productos completamente libres de celulosa, de coloración blanca o ligeramente amarilla.
- **Calidad farmacéutica:** productos blancos, totalmente libres de celulosa.
- **Calidad técnica:** productos usualmente libres de celulosa (puede contener cierta proporción); color variable desde blanco a amarillo o marrón. Estos son empleados principalmente por la industria textil, de pinturas, papeles calco, maderas aglomeradas, etc.

Estabilidad: Alginatos sólidos

El grado de polimerización (GP) de un alginato es una medida del peso molecular promedio de sus moléculas y corresponde al número de unidades de ácidos urónicos en la cadena polimérica. La viscosidad de las soluciones de alginato se relaciona directamente con el grado de polimerización y el peso molecular; mientras que la pérdida de viscosidad de las mismas (que se produce comúnmente durante el almacenaje) es una medida de la extensión de un proceso de depolimerización del alginato.

Comercialmente se producen alginatos (principalmente alginato de sodio) de baja, media y alta viscosidad (esto se refiere a la viscosidad de sus soluciones acuosas al 1%), que presentan pequeñas diferencias en cuanto a estabilidad: con ciertas excepciones, la regla general es que los compuestos con un elevado grado de polimerización son menos estables que aquellos con un GP bajo.

El ácido algínico es el menos estable de los productos, más aún aquellos materiales con alto grado de polimerización en los cuales las largas cadenas pueden degradarse en unidades menores en unos pocos meses a temperatura ambiente. Sin embargo, los compuestos de cadenas más cortas resultan estables. A pesar de las diferencias mencionadas en cuanto a estabilidad, todo compuesto algínico comercial deberá almacenarse en un lugar fresco a temperaturas de 25°C o menores, pues la elevación de la misma puede causar una significativa

depolimerización que afecta las propiedades comercialmente útiles como la viscosidad y la fuerza de los geles.

Estabilidad: Soluciones de alginato

Las sales de cationes monovalentes [Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{NH}^+$] del ácido algínico y su éster de propilenglicol son solubles en agua; no así el ácido algínico y la sal cálcica. Las soluciones neutras de alginatos de baja a media viscosidad pueden ser mantenidas a 25°C por varios años sin apreciable pérdida de viscosidad y además con muy baja susceptibilidad al ataque microbiano.

Como ya se mencionó, las soluciones de alginatos altamente polimerizados son poco estables aún a temperatura ambiente y tienen tendencia a sufrir depolimerización a medida que se incrementa la temperatura.

En cuanto a la compatibilidad con otros compuestos, como las soluciones de alginatos contienen un polisacárido anión, pueden dar productos insolubles al mezclarse con ciertos cationes. Tales soluciones resultan incompatibles con la mayoría de los cationes di y trivalentes, con las sales de amonio cuaternarias usadas generalmente como bactericidas, con ácidos lo suficientemente fuertes como para producir la precipitación del ácido algínico y con álcalis fuertes, los cuales producen una ruptura gradual de las cadenas polisacáridas.

Factores físicos:

La solubilización de los compuestos de alginato se ve afectada tanto por el tamaño como por la forma de las partículas. Usualmente se prefiere un material basto o grosero cuyas partículas resultan más fáciles de dispersar y suspender, aunque tienen una baja velocidad de hidratación. Las partículas finas se disolverán más rápidamente, pero existe mayor riesgo de que se aglomeren; éste efecto puede disminuirse diluyendo el alginato en presencia de otro polvo, por ejemplo azúcar .

La cantidad de alginato que se disolverá en agua está limitada por la naturaleza física de las soluciones, más que por la solubilidad del compuesto en sí. Al incrementarse la concentración de alginato, la solución pasa de un estado de

líquido viscoso a una pasta espesa, punto en el cual se vuelve muy difícil de dispersar el alginato remanente.

Factores químicos:

La solubilización de estos productos en agua resulta dificultosa si se realiza en presencia de compuestos que compiten con las moléculas de alginato por el agua necesaria para su hidratación. Así, la presencia de azúcares, almidón o proteínas en el agua reducirá la proporción de hidratación y se requerirán mayores tiempos de mezcla. Las sales de cationes monovalentes (como el NaCl) tienen un efecto similar a concentraciones cercanas al 0.5%. Lo mejor es agregar todas estas sustancias después de que el alginato fue hidratado y disuelto.

La presencia de pequeñas cantidades de cationes polivalentes inhibe la hidratación de los alginatos y proporciones elevadas de los mismos causan su precipitación. El alginato sódico resulta de difícil disolución en aguas duras y leche debido a que ambas contienen iones calcio; éstos deben ser primero secuestrados con un agente complejante tal como hexametáfosfato de sodio o ácido etilenediamino tetraacético (EDTA).

Sus especificaciones son:

Especificación Valor

Pérdidas por secado Máximo 15%
Ash a 600°C 18.0 a 27.0%
pH (solución al 1%) 5.5 a 7.5
Tamaño de partícula 100 μ m \pm 2%
Viscosidad (solución 1%, 20°C) 350 a 450 mPa*s

Nutricionales (para 100 g)

Energía 0 Kcal

Fibra 67 g

Sodio 10 g

* Proteína, grasa y carbohidratos no aplican

CLORURO DE CALCIO

Propiedades químicas

Fórmula química CaCl_2

Presentación Gránulos blancos inodoros

Pureza 94-97% en peso

Densidad 55 lb/pie³

pH 7.0 a 10.0 en solución acuosa diluida

CULTIVO LÁCTICO

Nombre:

HOWARU Dophilus LYO 40 DCU – HOWARU Premium Probiotics

Descripción:

Cultivo probiótico liofilizado para aplicaciones en bebidas y productos lácteos.

Instrucciones de uso:

Desinfecte la zona de apertura con etanol al 70% antes de abrir el empaque. Corte el empaque para abrirlo y adicione el cultivo a la leche de proceso teniendo en cuenta condiciones asépticas.

Vida útil / Almacenamiento:

18 meses desde la fecha de producción a una temperatura menor o igual a -18°C y 6 meses después de la fecha de abierto conservándose a una temperatura de 4°C .

CALDO BHI (Brain Heart Infusion)

Uso:

El medio de Infusión Cerebro Corazón es utilizado para el cultivo de microorganismos fastidiosos como estreptococos, neumococos y meningococos. Este medio también es conocido como BHI por sus siglas en inglés.

Explicación:

El medio de Infusión Cerebro Corazón es una modificación de las formulaciones desarrolladas por Rosenow y Hayden en las que se adicionó infusión de cerebro de ternera y difosfato de sodio.

El medio de Infusión Cerebro Corazón está especificado en varios procedimientos estándares para la industria alimenticia y el análisis de aguas. También es recomendado por la NCCLS para preparar el inóculo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

En este medio la infusión de carne de corazón y de cerebro de ternera así como la peptona proveen la fuente de carbono, nitrógeno sulfuro y vitaminas. La dextrosa actúa como fuente de energía. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico del medio. El fosfato disódico actúa como buffer.

Fórmula:

Infusión de Cerebro de Ternera 200.0

Cloruro de Sodio 5.0

Infusión de Corazón de Res 250.0

Fosfato Disódico 2.5

Peptona de Gelatina 10.0

Dextrosa 2.0

pH 7.4 ± 0.2

Almacenamiento:

2-30 °C.

Caducidad:

5 años en frasco cerrado.

Presentación:

Frasco con 450 g

Caja con 20 sobres para un litro

Medio preparado en caja con 10 Tubos

ANEXO 2

FORMATO DE EVALUACIÓN SENSORIAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA PROGRAMA INTERFACULTADES ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS						
Evaluación con consumidores						
Fecha:	_____			Sexo:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Edad:	1-14	<input type="checkbox"/>	15-20	<input type="checkbox"/>	21-30	<input type="checkbox"/>
	31-40	<input type="checkbox"/>	41-50	<input type="checkbox"/>	>50	<input type="checkbox"/>
Con qué frecuencia consume helado?						
Diario	<input type="checkbox"/>	Semanal	<input type="checkbox"/>	Mensual	<input type="checkbox"/>	
Casi nunca	<input type="checkbox"/>					
MUESTRA # _____						
ATRIBUTO		CALIFICACIÓN				
APARIENCIA	me gusta	<input type="checkbox"/>	indiferente	<input type="checkbox"/>	no me gusta	<input type="checkbox"/>
COLOR	me gusta	<input type="checkbox"/>	indiferente	<input type="checkbox"/>	no me gusta	<input type="checkbox"/>
AROMA	me gusta	<input type="checkbox"/>	indiferente	<input type="checkbox"/>	no me gusta	<input type="checkbox"/>
SABOR	me gusta	<input type="checkbox"/>	indiferente	<input type="checkbox"/>	no me gusta	<input type="checkbox"/>
TEXTURA	me gusta	<input type="checkbox"/>	indiferente	<input type="checkbox"/>	no me gusta	<input type="checkbox"/>
OBSERVACIONES						
MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN						