



**UNIVERSIDAD POPULAR
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**Centro Interdisciplinario de Posgrados
Investigación y Consultoría
Departamento de Ciencias Biológicas
Maestría en Biotecnología**

TESIS

Desarrollo de un alimento con bacterias ácido lácticas
encapsuladas aisladas del pulque con potencial
probiótico

Para obtener el título de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

L.N Núñez Guzmán Ada Esmeralda

Directora

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Co-director

cDr Alfredo César Benítez Rojas

Asesor:

MCs Laura Márquez Morales



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Maestría en Biotecnología



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Centro Interdisciplinario de Posgrado
Investigación y Consultoría
Decanato Ciencias Biológicas
Maestría en Biotecnología

**Desarrollo de un alimento con bacterias ácido lácticas
encapsuladas aisladas del pulque con potencial probiótico**

Tesis para obtener el Grado de Maestro en Biotecnología

Ada Esmeralda Núñez Guzmán

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz
Directora

cDr Alfredo César Benítez Rojas
Codirector(a)

MCs Laura Márquez Morales
Asesor

Puebla, México

2020

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte del autor y director de la tesis; no hubiera sido posible la finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación mencionare; quienes han sido un soporte muy importante.

A la Doctora Beatriz Pérez Armendáriz, una gran persona con una inteligencia inigualable; gracias por haberme permitido ser parte de esta investigación, confiar en mis capacidades e inculcarme el amor por la biotecnología.

Al cDr Alfredo César Benítez Rojas, por enriquecer con sus conocimientos y sugerencias esta tesis. Y a la MCs Laura Márquez Morales; quién me dedicó horas de desvelo para enseñarme técnicas microbiológicas y sus conocimientos fueron de gran ayuda en todos mis experimentos.

A mi gran amiga Jimena Figueroa Castellanos, una pieza importante en esta investigación; gracias por tu apoyo incondicional.

A mi novio José Antonio Ortiz Rico, por siempre apoyarme y motivarme para concluir mi tesis.

Finalmente, agradezco a las personas más importantes en mi vida; mi familia. Que siempre ha procurado mi bienestar y que si no fuera por su esfuerzo, ahora no estaría aquí. Papá: gracias por siempre apoyarme, me enseñaste tu dedicación por el estudio y enseñarme a siempre esforzarme para lograr todo lo que me propongo. Mamá: te doy gracias por siempre motivarme y apoyarme, a pesar de la distancia siempre te preocupaste por mí. Mi hermana, mi pilar más fuerte: hemos estado juntas en muchas etapas, me has visto llorar y reír, gracias por siempre apoyarme, y por compartir conmigo momentos de desvelo y desesperación por terminar nuestras tesis. Mi hermano: a pesar de la distancia, siempre estás presente y me motivas a dar lo mejor de mí. Gracias familia, los amo, todos mis logros son para ustedes.

Agradezco a los docentes de la maestría en biotecnología por brindarme conocimientos importantes; y aprender a fusionar mi profesión de nutrióloga con la biotecnología; con la finalidad de mejorar la salud de las personas.

Gracias a Dios y a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en mí para la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO I ANTECEDENTES GENERALES.....	14
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
1.3 HIPÓTESIS	16
1.4 JUSTIFICACIÓN	16
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	19
2.1 PULQUE	19
2. 2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	21
2.2.1 <i>Clasificación</i>	22
2.2.2 <i>Funciones.....</i>	23
2.3 PROBIÓTICOS	23
2.3.1 <i>Requisitos para considerarse probiótico</i>	24
2.3.2 <i>Mecanismos de acción</i>	26
2.4 CONSUMO DE PROBIÓTICOS EN DISTINTAS PATOLOGÍAS	28
2.4.1 <i>Diarrea.....</i>	29
2.4.2 <i>Efecto inmunomodulador</i>	30
2.4.3 <i>Cáncer.....</i>	30
2.4.4 <i>Síndrome de intestino irritable</i>	31
2.4.5 <i>Enfermedad inflamatoria intestinal</i>	31
2.4.6 <i>Colitis ulcerosa</i>	32
2.4.7 <i>Pacientes de cuidados intensivos y quirúrgicos</i>	32
2.4.8 <i>Estreñimiento</i>	32
2.4.9 <i>Enfermedad hepática</i>	33
2.5 PREBIÓTICOS	33

2.5.1. Beneficios del consumo de prebióticos	34
2.5.2 Oligosacáridos como prebióticos	35
2.6. ENCAPSULACIÓN.....	35
2.6.1 Encapsulación por gelificación iónica	36
2.7.2 Beneficios de la encapsulación de probióticos	38
2.7.3 Criterios para encapsulación de probióticos.....	38
2.8 APARATO DIGESTIVO.....	40
Tabla 2.5. Partes del tracto gastrointestinal, pH y contenido.	41
2.8 MICROBIOTA INTESTINAL	41
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
FASE 1.....	44
AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEL PULQUE.....	44
Prueba de catalasa y tinción de gram	45
3.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO	45
3.3 REECUENTO DE CÉLULAS VIABLES.....	46
FASE 2.....	46
SELECCIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO	46
Resistencia a pH ácido.....	46
Resistencia a sales biliares	47
Resistencia a peróxido de hidrógeno	48
SIMULACIÓN GÁSTRICA RESISTENCIA A LIPOZIMA, pH ÁCIDO Y SALES BILIARES	48
Resistencia a liposima	48
Resistencia a pH ácido.....	48
Resistencia a sales biliares	49
FASE 3.....	49
IMPLEMENTACIÓN DEL PROCESO DE GELIFICACIÓN.....	49
Supervivencia de microorganismos encapsulados en sales biliares	50
Supervivencia de microorganismos encapsulados en pH ácido	50
FASE 4.....	50

3.7.1 Gomita de piña o mango con stevia.....	51
3.7.2 Gomita de mango o piña con azúcar	51
3.7.1 Prueba sensorial	52
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
FASE 1.....	53
4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS AISLADAS DEL PULQUE	53
4.1.1. Prueba de catalasa y tinción de gram	53
4.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO	54
4.3 REENCUENTRO DE CÉLULAS VIABLES	55
FASE 2.....	55
4.4 SELECCIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO	55
4.4.1 Resistencia a pH ácido.....	56
4.4.2 Resistencia a sales biliares	60
4.4.3 Concentración de peróxido de hidrógeno.....	64
FASE 3.....	66
SIMULACIÓN GÁSTRICA.....	66
FASE 4.....	71
ELABORACIÓN DEL ALIMENTO	71
CONCLUSIÓN.....	74
REFERENCIAS	75
CAPÍTULO VII ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2- 1 Proceso de elaboración del pulque	20
Figura 2- 2 Esquema de encapsulación de probióticos	37
Figura 2- 3 Niveles de pH en el tracto gastrointestinal	40
Figura 3- 1 Diseño metodológico	43
Figura 3- 2 Incubación de bacterias ácido lácticas; <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>	45
Figura 3- 3 Tubos de ensayo con diferentes concentraciones de sales biliares (1 %, 3%, 5%)....	47
Figura 3- 4 Cápsulas de alginato de las 4 bacterias ácido lácticas.....	49
Figura 3- 5 Tubos con caldo MRS, en diferentes concentraciones de pH.....	50
Figura 3- 6 Elaboración de pulpa de mango para las gomitas	51
Figura 4- 1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas en medio agar MRS	53
Figura 4- 2 Prueba de tinción de gram observadas al microscopio 100X y catalasa (-).....	54
Figura 4- 3 Cinética de crecimiento por densidad óptica	54
Figura 4- 4 Comportamiento del <i>L. brevis</i> sin encapsular y encapsulado en diferentes pH [A <i>L. brevis</i> sin encapsular; B <i>L. brevis</i> encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de los pH iniciales, y la comparación de las medias de los pH finales, letras iguales no representan diferencia significativa.	57
Figura 4- 5 Comportamiento de <i>L. paracasei</i> sin encapsular y encapsulado en diferentes pH [A <i>L. paracasei</i> sin encapsular; B <i>L. paracasei</i> encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de los pH iniciales, y la comparación de las medias de los pH finales, letras iguales no representan diferencia significativa.	58
Figura 4- 6 Comportamiento de <i>L. plantarum</i> sin encapsular y encapsulado en diferentes pH [A <i>L. plantarum</i> sin encapsular; B <i>L. plantarum</i> encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de los pH iniciales, y la comparación de las medias de los pH finales, letras iguales no representan diferencia significativa	58
Figura 4- 7 Comportamiento de <i>L. casei</i> sin encapsular y encapsulado en diferentes pH [A <i>L. casei</i> sin encapsular; B <i>L. casei</i> encapsulado] Se realizaron ANOVA comparando las medias de los pH iniciales, y la comparación de las medias de los pH finales, letras iguales no representan diferencia significativa.	59

Figura 4- 8 Comportamiento de 4 bacterias ácido lácticas en diferentes pH; sin encapsular y encapsuladas. [Lc L.casei; Lp L.plantarum; Lb L.brevis; Lp L.paracasei; s/e sin encapsular, e encapsulado]	59
Figura 4- 9 Comportamiento de L.paracasei sin encapsular y encapsulado en diferentes concentraciones de sales biliares [A L.paracasei sin encapsular, B L.paracasei encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de sales biliares, y la comparación de las medias de sales biliares finales, letras iguales no representan diferencia significativa.	61
Figura 4- 10 Comportamiento de L.plantarum sin encapsular y encapsulado en diferentes concentraciones de sales biliares [A L.plantarum sin encapsular, B L.plantarum encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de sales biliares, y la comparación de las medias de sales biliares finales, letras iguales no representan diferencia significativa.	62
Figura 4- 11 Comportamiento de L. casei sin encapsular y encapsulado en diferentes concentraciones de sales biliares [A L. casei sin encapsular, B L. casei encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de sales biliares, y la comparación de las medias de sales biliares finales, letras iguales no representan diferencia significativa	62
Figura 4- 12 Comportamiento de L.brevis sin encapsular y encapsulado en diferentes concentraciones de sales biliares [A L.brevis sin encapsular, B L.brevis encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de sales biliares, y la comparación de las medias de sales biliares finales, letras iguales no representan diferencia significativa.	63
Figura 4- 13 Comportamiento de 4 bacterias ácido lácticas en diferentes concentraciones de sales biliares; sin encapsular y encapsuladas. [Lc L.casei; Lp L.plantarum; Lb L.brevis; Lp L.paracasei; s/e sin encapsular, e encapsulado]	63
Figura 4- 14 Resistencia de Lactobacillus brevis en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se realizaron ANOVA comparando las medias de peróxido de hidrógeno, letras iguales no representan diferencia significativa.	64
Figura 4- 15 Resistencia de Lactobacillus plantarum en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se realizaron ANOVA comparando las medias de peróxido de hidrógeno, letras iguales no representan diferencia significativa.	65
Figura 4- 16 Resistencia de Lactobacillus paracasei en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se realizaron ANOVA comparando las medias de peróxido de hidrógeno, letras iguales no representan diferencia significativa.	65

Figura 4- 17 Resistencia de Lactobacillus casei en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se realizaron ANOVA comparando las medias de peróxido de hidrógeno, letras iguales no representan diferencia significativa.	66
Figura 4- 18 Viabilidad de bacterias probióticas en lisozima	67
Figura 4- 20 Viabilidad de bacterias probióticas en pH 4.05. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.....	68
Figura 4- 19 Viabilidad de bacterias probióticas en pH 3.08. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.....	68
Figura 4- 21 Viabilidad de bacterias probióticas en pH 2.08. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.....	68
Figura 4- 23 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.10 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.	70
Figura 4- 22 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.05 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.	70
Figura 4- 24 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.15 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.	70
Figura 4- 25 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.30 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.	71
Figura 4- 26 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.50 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.	71
Figura 4- 27 Evaluación de la gomita en cuanto a sabor	72
Figura 4- 28 Evaluación de la gomita en cuanto a olor	72
Figura 4- 29 Evaluación de la gomita en cuanto a textura en general	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2- 1 Características de microorganismos para considerarse probióticos	25
Tabla 2- 2 Meta análisis del consumo de probióticos en la salud.....	28
Tabla 3- 1 Elaboración de la gomita de piña o mango con stevia	51
Tabla 3- 2 Elaboración de gomita de mango o piña con azúcar	51
Tabla 4- 1 Parámetros cinéticos de bacterias ácido lácticas	55
Tabla 4- 2 Simulación gastrica de bacterias con potencial probiótico.....	69

RESUMEN

Introducción: Hoy en día las enfermedades gastrointestinales son una de las principales causas de consulta médica; causadas por bacterias, virus, parásitos entre otros. Los probióticos confieren un beneficio a la salud del hospedador, en diversas enfermedades como diarrea, síndrome de intestino irritable, estreñimiento, gastritis, colitis, etc.

Objetivo: Evaluar la capacidad probiótica de 4 bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis* y *L. casei*) aisladas del pulque a través de pruebas de funcionalidad (lisozima, ácido clorhídrico, sales biliares y superoxidación) para ser usados en el desarrollo de un alimento con bacterias encapsuladas.

Metodología:. Se realizaron pruebas de cinética microbiana de las bacterias y pruebas de funcionalidad *in vitro*; las cepas fueron expuestas a lisozima, pH, sales biliares y superoxidación, en diferentes tiempos realizando conteo de UFC/ml y absorbancia. Posteriormente las bacterias fueron encapsuladas con alginato de sodio, se sometieron a diferentes concentraciones de pH y sales biliares; para la elaboración de un alimento como propuesta de alimento funcional.

Resultados: En la cinética microbiana, *L. casei* logró un tiempo de duplicación (Td) de 66 min con una r^2 0.98, siendo la cepa con mayor crecimiento. La resistencia a la lisozima las 4 bacterias presentaron una resistencia del 85 %, mientras que en un pH 2.08 *L. brevis* mostró una resistencia de 2 log UFC/ml ($p < 0.05$), y en sales biliares en concentración de 0.3 % mostró resistencia de 4 log UFC/ml ($p < 0.05$). *L. brevis* fue la bacteria más resistente en todas las concentraciones.

Conclusión: Las cepas mostraron habilidad para sobrevivir a las condiciones gastrointestinales de lisozima, pH ácido, sales biliares y peróxido de hidrógeno. La encapsulación incremento significativamente las pruebas de estabilidad y viabilidad de los microorganismos probióticos.

Palabras claves: alimento, encapsulación, enfermedades gastrointestinales, probióticos, pulque.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México, es por eso que se considera un gran problema de salud ya que afecta a personas de cualquier edad; éstas se transmiten de manera fecal-oral, consumo de agua y alimentos contaminados. Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son causadas por bacterias (*Escherichia coli* y *Salmonella ssp*), parásitos (*Gardia lamblia* y amibas) y virus (Rotavirus y virus Norwalk) entre otros (Hernández, Aguilera & Castro, 2011). Por dicha razón la mayoría de los gastroenterólogos recomiendan el consumo de probióticos que son; microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del hospedador cuando se administran en cantidades adecuadas (WGO, 2011). El consumo de probióticos puede prevenir o ser útil en el tratamiento de diversas enfermedades, como en la enfermedad hepática, pancreatitis aguda, pacientes en cuidados intensivos y en el metabolismo de lípidos, pero particularmente en enfermedades gastrointestinales, como gastroenteritis, diarrea asociada a antibióticos, síndrome de intestino irritable, estreñimiento, gastritis y colitis; tanto en adultos como en niños (Oliveira & González, 2007; Girardin & Seidman, 2011).

Aunque la microbiota intestinal puede ser alterada por la dieta, estilo de vida, genética y el uso de antibióticos, los probióticos mejoran el equilibrio nutricional y microbiológico del tracto gastrointestinal (TGI), en donde entregan sus componentes bioactivos en los sitios diana del TGI, y así pueden ser capaces de mejorar la salud del hospedero y ayudar en el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales (Penner, Fedorak & Madsen, 2005; Islam, 2016).

Los beneficios de los probióticos dependen de la proliferación en el tracto gastrointestinal, ya que deben de ser capaces de sobrevivir a diversos factores como; presencia o ausencia de oxígeno, medio ambiente ácido, interacción entre otras bacterias, producción de peróxido de hidrógeno por metabolismo microbiano, y concentración de sales biliares (Mohammadi *et al.*,

2011). Es por eso que nuestro objetivo se enfoca en que las bacterias sean capaces de resistir a pruebas de funcionalidad (lisozima, pH, sales biliares y peróxido de hidrógeno), para usarlas en el desarrollo de un alimento con cuatro bacterias encapsuladas. Por otro lado la encapsulación es una tecnología que envuelve y cubre a los probióticos con una matriz sin que exista exposición superficial al medio externo; para así mejorar su liberación y eficacia en el tracto gastrointestinal (Pérez, *et al.*, 2013).

CAPÍTULO I ANTECEDENTES GENERALES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La microbiota del tracto gastrointestinal desempeña un papel importante en la absorción eficiente de nutrientes para lograr una adecuada salud humana, por lo que es necesario que exista un equilibrio óptimo entre la microbiota intestinal y el hospedador. En determinadas circunstancias la dieta, edad y etapas de la vida pueden ocasionar un desequilibrio con una colonización de bacterias patógenas ocasionando enfermedades gastrointestinales como, síndrome de intestino irritable, diarrea, colitis, estreñimiento, etc. (Biplap & Narayan, 2014)

Las enfermedades gastrointestinales son una de las principales causa de consulta médica y de muerte en México y en el mundo, por lo cual se considera un problema de salud pública a nivel mundial que afecta en cualquier etapa de vida y condición social, siendo los grupos más vulnerables niños y ancianos (Cortez, Arreola & Escarpulli, 2011). La Organización Mundial de la Salud en el 2011 estimó que cada año se presentan 1,500 millones de muertes en países en vías de desarrollo, mientras que en México, según la Secretaría de Salud 2001, los estados con mayor incidencia de enfermedades gastrointestinales ocasionados por bacterias o parásitos son Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla y Ciudad de México (Hernández, Aguilera & Castro, G, 2011).

El consumo de probióticos en enfermedades gastrointestinales ha logrado modificar la microbiota y actuar contra bacterias patógenas, ya que los mecanismos de acción de los probióticos produce alteraciones en la microbiota intestinal, refuerzo de la barrera intestinal, evita translocación bacteriana, y produce inmunomodulación (Manrique *et al.*, 2014). Se ha demostrado que el consumo de probióticos es benéfico para la salud, ya que disminuye el número de microorganismos patógenos gastrointestinales, reduce malestar estomacal, flatulencia y mejora la regularidad intestinal (Huang, Wang & Hu, 2016).

Los probióticos son considerados microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuada constituyen un beneficio para la salud en el hospedero, logrando beneficios en enfermedades gastrointestinales, hepáticas, pacientes en cuidados intensivos y mala absorción de lácteos (Valdovinos *et al*, 2017). Los probióticos que se han utilizado con mayor frecuencia en estudios clínicos y en lo que se ha encontrado un alto potencial son *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardi*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium bifidum* (Abreu, 2012; Kavita, Suresh & Babu, 2015).

Por lo que en esta investigación se busca demostrar que los probióticos del pulque tienen la capacidad de colonizar el tracto intestinal a través de pruebas *in vitro* y dar alternativas de una dieta sana empleando nuevos alimentos basados en nuestros alimentos endémicos. Por lo que se busca que en nuestra dieta, se aumente la ingesta de probióticos y prebióticos que sean capaces de generar un equilibrio gastrointestinal, logrando así una terapia prometedora y bastante segura en diferentes casos clínicos asociados a enfermedades gastrointestinales.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad probiótica de 4 bacterias ácido lácticas lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis* y *L. casei*) aisladas del pulque a través de pruebas de funcionalidad (lisozima, ácido clorhídrico, sales biliares y superoxidación) para ser usados en el desarrollo de un alimento con bacterias encapsuladas.

Objetivos específicos

1. Aislar microorganismos del pulque con capacidad de ser probióticos a través de pruebas microbiológicas.

2. Seleccionar 4 bacterias ácido lácticas a través de pruebas de funcionalidad por resistencia a ácido clorhídrico, sales biliares y superoxidación para mejorar su absorción en el tracto gastrointestinal.
3. Implementar el proceso de encapsulación por gelificación iónica para mejorar la funcionalidad del probiótico.
4. Desarrollar un alimento con bacterias ácido lácticas encapsuladas con potencial probiótico para combatir enfermedades gastrointestinales.

1.3 HIPÓTESIS

H₀: Las bacterias ácido lácticas encapsuladas aisladas del pulque serán capaces de resistir a lisozima, pH ácido y concentraciones del 3% de sales biliares para la elaboración de un alimento con potencial probiótico.

1.4 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de un alimento con bacterias ácido lácticas encapsulada aisladas del pulque, resulta importante, pues se puede emplear como tratamiento preventivo y/o curativo de enfermedades gastrointestinales.

Los probióticos por sus múltiples mecanismos de acción, han demostrado ser efectivos en la prevención de enfermedades infecciosas, inflamatorias y funcionales del aparato digestivo.

Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo, y son utilizados para prevenir enfermedades gastrointestinales. Para que puedan cumplir con estas funciones es fundamental que sean capaces de atravesar la barrera gástrica, para multiplicarse y colonizar el intestino del huésped, de esta manera deben sobrevivir en el intestino a un pH ácido y concentraciones osmóticas del 3% de sales biliares, ser seguros para el consumo humano, producir

sustancias antimicrobianas, y adherirse a células intestinales (Pardio, Krzysatof, Waliszewski & Robledo G, 2000). La realización del presente proyecto de investigación es trascendente, pues a través de una simulación gástrica, se buscará que los probióticos cumplan con las características mencionadas anteriormente y sean capaces de sobrevivir a ciertas condiciones para finalmente, ser benéficas en el huésped.

Para el presente proyecto se utilizaron distintas especies de lactobacilos, debido a su importancia de este género como probióticos, en este sentido se decidió trabajar con los Lactobacilos aislados de pulque, además de que existen trabajos previos en el grupo de trabajo que identificaron diferentes cepas de este género (alumna de doctorado Márquez, M) . Se ha probado que los Lactobacilos, ejercen efectos benéficos en la salud, mediante interacciones con el intestino y sus metabolitos.

Se ha observado que el estrés, acidez gástrica, sales biliares, sensibilidad a enzimas, niveles de oxígeno, pH, temperatura de almacenamiento y ciertos alimentos interfieren con pérdida de viabilidad y sobrevivencia de microorganismos probióticos. En respuesta a este problema, la encapsulación es un método para proteger la estabilidad, biodisponibilidad y conservación de los componentes bioactivos y así mismo la viabilidad en microorganismos (Fritzen *et al*, 2012). Por lo anteriormente mencionado, en esta investigación se empleó un método de encapsulación, con el objetivo de proporcionar una protección adecuada a las cepas probióticas contra diversos ambientes, los cuales pueden ser preservados por el método de gelificación iónica donde se mantienen aislados del entorno hasta su liberación, evitando degradación en el estómago, y al mismo tiempo estimulando una liberación controlada en el intestino, estabilidad de almacenamiento y mejoramiento en sus cualidades funcionales (López, Deladino & Martino, 2012). La técnica de encapsulación por gelificación iónica es una alternativa para proteger a los

microorganismos del efecto de agentes mediambientales como calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y consumo, para que exista mayor una mayor absorción en el tracto gastrointestinal (Rodríguez, Giraldo & Montes, 2016).

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Pulque

El pulque es una bebida tradicional mexicana que se define como bebida alcohólica de origen prehispánico de color blanco y consistencia viscosa y espesa, que se obtiene de la fermentación del aguamiel y extraído del corazón de diferentes especies del maguey (*Agave americana*, *A. artroviernas*, *A. feroz*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*). Esta bebida era consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente en áreas centrales (Peña *et al.*, 2004). El proceso de fermentación inicia en el maguey, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas y bacterias productoras de expopoliscaráridos: estos microorganismos se encargan de transformar de manera natural parte de los azúcares disponibles en el aguamiel, sin embargo el proceso se acelera por la adición de un inóculo (Escalante *et al.*, 2004). En la época prehispánica el pulque era considerado un don divino y se creía que el proceso estaba bajo el mando de los dioses. Únicamente los señores principales o ancianos, hombres y mujeres retirados de la vida activa podían consumirlo, y los que iban a ser sacrificados al dios Huitzilopochtli se les permitía beberlo hasta embriagarse.

En esta bebida existen diversos consorcios microbianos, que favorecen la captación de nutrientes y eliminación de ciertos metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos, además ayudar en la regulación de la microbiota. Lamentablemente su valor cultural y social se ha visto afectado durante el último siglo, debido a la falta de conocimiento. Existen diversos grupos de microorganismos como bacterias ácido lácteas homofermentativas y heterofermentativas: *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus kimchi*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Zymonas mobilis* (Marroquin, 1956).

El proceso de extracción del pulque y aguamiel se mantiene sin cambios desde la época prehispánica (Parsons and Darling, 2000; Jennings *et al.*, 2005). Las plantas de agave son fáciles de cultivar ya que la propagación se realiza en las plantas adultas, en etapa de maduración a partir de 7-25 años de edad. El proceso comienza en la selección de plantas maduras de 6-15 años de edad y comprende 4 pasos: castración, raspado y extracción de aguamiel, preparación de semillas y fermentación del pulque. Ver Figura 2.1.

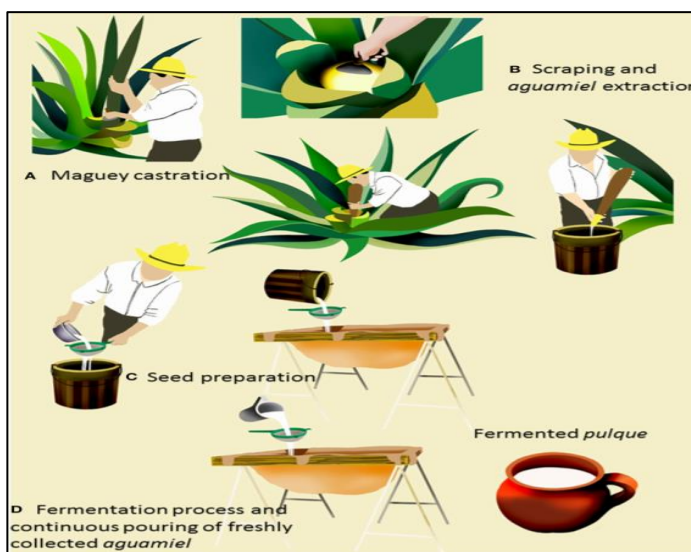


Figura 2- 1 Proceso de elaboración del pulque

Fuente: (Crist, 1939; Wilson and Pineda, 1963; García-Garibay and López-Munguía, 1993; Parsons and Darling, 2000; Jennings *et al.*, 2005)

El primer paso de la elaboración del pulque es la castración del maguey donde las plantas maduras son castradas destruyendo el pendúnculo floral embrionario que rodea la yema floral (quiote), en este proceso las hojas centrales de la planta se eliminan. El segundo paso, raspado y extracción de aguamiel, el cual es una savia ligeramente turbia, espesa, muy dulce de sabor fresco; se raspa la pared del cajete para inducir el flujo del aguamiel y acumulación de la misma en la cavidad. El aguamiel se extrae dos veces al día generalmente al amanecer y atardecer, por medio

de un acocote. Una planta madura puede producir aguamiel de 3-6 meses, produciendo de 4-6 litros. El tercer paso es la operación de semilla, el aguamiel extraído se coloca en un recipiente de vidrio destinado para la fermentación donde se le agrega la semilla de pulque o pie de pulque, la cual es una sustancia hecha a base de los asientos o sobrantes del pulque. Finalmente el último paso es la fermentación pero es fundamental estar agregando aguamiel fresca recién recolectada, el tiempo de fermentación varía dependiendo de la calidad del aguamiel, madurez de la semilla, estación y región productora. El aguamiel debe de ser filtrado para separar insectos o cualquier otro objeto (Crist, 1939; Wilson and Pineda, 1963; García-Garibay and López-Munguía, 1993; Parsons and Darling, 2000; Jennings et al., 2005).

El aislamiento y la evaluación del potencial probiótico de BAL de productos no lácteos para la elaboración de alimentos ha sido de gran tendencia para el tratamiento de enfermedades. (Tripathi and Giri, 2014). Las bacterias ácido lácticas (BAL) más abundantes en el pulque son *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* (Escalante et al., 2008).

2. 2 Bacterias ácido lácticas

La clasificación de bacterias ácido lácticas fue iniciada en 1919 por Orlando Jensen, comprenden un diverso grupo de organismos Gram-positivos, no formadoras de esporas, no motilidad y forma de cocos, estrictamente fermentativas, anaeróbicas y catalasa (-) (Savadozo *et al.*, 200). La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las bacterias, por lo que depende de cada microorganismo utilizado; la mayoría de las especies necesitan aminoácidos y vitaminas del complejo B para su crecimiento. Estas bacterias son quimioorganotrofos (fuente de carbono y energía) y solamente crecen en medios complejos (Guerra, Rua and Pastrana, 2001).

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos importantes en el cuerpo y medio ambiente de los seres humanos; algunas colonizan la boca y la mucosa nasofaríngea, intestino delgado y grueso. Para su multiplicación necesitan nutrientes como carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales; también existen factores externos de crecimiento como jugo de tomate, suero de leche, etc. Las bacterias ácido lácticas (BAL) degradan una cantidad de carbohidratos compuestos relacionados a través de diferentes rutas metabólicas (Holzapfel & Wood, 2014). Desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación y son utilizadas en la industria alimentaria por su habilidad de acidificar, preservando alimentos de las esporas, se emplean para mejorar textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (Huertas, 2010).

Las BAL son responsables de mejorar las características sensoriales de algunos alimentos, su capacidad probiótica es capaz de mejorar el sistema digestivo de los humanos. Son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a pH de 3.2 o 9.6, pero la mayoría crece a pH entre 4-4.5 permitiéndoles sobrevivir en medios donde otras bacterias no son capaces de sobrevivir (Carr *et al*, 2002). En la actualidad se encuentran en el tracto gastrointestinal de peces, crustáceos y humanos (Vázquez *et al*, 2009)

2.2.1 Clasificación

Las BAL pertenecen al phylum Firmicutes que comprenden alrededor de 20 géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, etc. De acuerdo a la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativos (produce sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) en las cuales se encuentran *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*; de acuerdo a su temperatura de crecimiento se consideran mesófilos creciendo a una T de incubación entre 20-40 ° C y termófilos T de 55-75

°C. (Bedolla, 2003). Las BAL producen una serie de sustancias llamadas metabolitos que pueden cumplir ciertas funciones en los alimentos como; producción de ácido propiónico, fermentación de ácido cítrico o ácido láctico, sustancias antimicrobianas, peróxido de hidrógeno, sustancias antimicrobianas y bacteriocinas (Huerta, 2010).

2.2.2 Funciones

La función de las BAL en la tecnología de alimentos, es la formación de sabor ácido, inhibición de microorganismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma, proteólisis para la maduración de los quesos y utilizadas como probióticos (Huerta, 2010). Producen pequeñas cantidades de acetaldehído y diacetilo por la fermentación de citratos otorgando sabor y aroma agradable. La actividad lipolítica y proteolítica tiene influencia en la formación del sabor y aroma típico de varios quesos madurados. La función principal; formación de ácidos orgánicos principalmente ácido láctico para asegurar una fermentación consistente y exitosa.

2.3 Probióticos

Actualmente la OMS en el 2002 define los probióticos como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidad adecuada confiere beneficio para la salud al hospedador” la cual fue aceptada por la FAO en el 2006. Si existe una ingesta frecuente de probióticos conduce beneficios para la salud (Huang, Wuang & Hu, 2016). Los probióticos son bacterias o levaduras que mantienen un equilibrio en el organismo, suprimiendo la colonización por patógenos y la propagación de enfermedades. Siendo capaces de ayudar al sistema inmunológico, inhibiendo mediadores proinflamatorios, combatiendo alergias, exposición a sustancias tóxicas y trastornos vinculadas con obesidad, diabetes tipo 2 y pérdida de la memoria (Alok *et al.*, 2017). Los microorganismos probióticos enfrentan

condiciones como pH ácido y sales biliares que afectan su viabilidad. La capacidad de soportar éstas agresiones constituye un criterio importante de selección (Amund,2016).

Las cepas más utilizadas son de los géneros lactobacilos como: *L. acidóphillus*, *L. rhamnosus*, *L. gassari*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii* y *L. lactis*, o bien, del género bifidobacterium, como: *B. bifidum animalis*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. adolescentis*, *B. longum* y *B. brevis*, además especies como: *Bacillus cereus*, *Sacharomyces boulardii*, *Streptococcus thermophilus*, *clostridium butyricum* (Alok et al., 2017). Los probióticos trabajan al influir positivamente en la composición y la actividad de los microorganismos en el intestino y ayudan a mantener un equilibrio benéfico de los microorganismos intestinales (Malaguarnera et al., 2012).

Los mecanismos por los que los probióticos afectan positivamente a la salud humana son la digestión y absorción de nutrientes de la dieta, el fortalecimiento de la función de barrera intestinal, la modulación de la respuesta inmune y la mejora del antagonismo frente a los patógenos, ya sea por medio de la producción de compuestos antimicrobianos o a través de la competencia por sitios de unión a la mucosa intestinal (Etxeberria, Milagro, Gonzalez & Martínez, 2016).

2.3.1 Requisitos para considerarse probiótico

Los lactobacilos son considerados excelentes probióticos por ser de carácter no patógeno, inocuos, estables y viables por resistir al cambio de pH y tener la capacidad de transformar carbohidratos. Las cepas deben presentar y mantener ciertas características para garantizar su crecimiento y supervivencia en el alimento adicionado, y también ser capaces de resistir en el

proceso de digestión al pasar por el estómago e intestino delgado y con cierta capacidad para adherirse a las mucosas del intestino grueso.

Los criterios para que los microorganismos sean considerados probióticos, de acuerdo a Teitelbaum son:

- Ser de origen humano
- No ser patogénicos por naturaleza
- Ser resistentes a la destrucción por procedimientos tecnológicos
- Ser resistentes a la destrucción por las secreciones gástricas y por la bilis
- Poder adherirse al epitelio intestinal
- Ser capaces de colonizar el tracto gastrointestinal
- Producir sustancias antimicrobianas
- Modular las respuestas inmunitarias
- Ejercer una influencia en algunas actividades metabólicas, como la asimilación del colesterol, producción de vitaminas, etc

(Salazar & Montoya, 2005)

Existen ciertas características que deben de cumplir los microorganismos considerados probióticos, como se puede observar en la Tabla 2-1.

Tabla 2- 1 Características de microorganismos para considerarse probióticos

(Rondon et al, 2015)

Características de las cepas probióticas	Especificación
	Importante para ser administración por vía oral
	y lograr efecto benéfico en diferentes patologías
Estabilidad en ácidos y sales biliares	

	Es necesario que exista una supervivencia, para que los probióticos sean capaces de llegar al intestino, donde son capaces de mantener la integridad celular, adhesividad y actividad metabólica.
Adhesión a la superficie de la mucosa	Modulación inmune, exclusión competitiva, colonización transitoria e interacción.
	Es necesario que exista una identificación de las cepas
Seguridad para uso clínico y alimentario	No deben generar degradación de la mucosa intestinal o resistencia a antibióticos.
Dosis y cantidades	La dosis de probióticos ingeridos es de acuerdo a la patología y el efecto que se desea lograr 10^6 UFC en adelante, es fundamental para modular y estabilizar la composición de la microbiota, confiriendo efectos inmunomoduladores.

2.3.2 Mecanismos de acción

El empleo de probióticos se basa en su capacidad de colonización por lo cual se produce a través de ciertos mecanismos (Isolauro, *et al.*, 2001):

- ✓ Producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas; estos

compuestos reducen el número de células viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas (Rolfe, 2001)

- ✓ Disminuyen el pH intestinal favoreciendo el crecimiento de organismos beneficiosos
- ✓ Aumentan la resistencia a la colonización por competir con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio intestinal. Algunas cepas han sido escogidas por su habilidad de adherencia a las células epiteliales como *Lactobacillus spp.*
- ✓ Estimulan la respuesta inmune; existe una estimulación de la inmunidad innata y adquirida protegen contra la enfermedad intestinal. Estos microorganismos pueden alertar al sistema inmune y favorecer el rechazo de agentes infecciosos estimulando la producción de inmunoglobulina A (IgA), activando macrófagos e incrementando interferón gamma (IFN-gamma) y citoquinas proinflamatorias. Bacterias probióticas pueden ejercer un efecto inmunomodulador, ya que tienen la capacidad de interactuar con células epiteliales y dendríticas y monocitos, macrófagos y linfocitos (Reid, Jass, Sebulsky, & McCormick, 2003)
- ✓ Ejercen un efecto competitivo con otras bacterias e inhibiendo el crecimiento de especies de enteropatógenos
- ✓ Aumento de la adherencia a la mucosa intestinal
- ✓ Producción de sustancias antimicrobianas
- ✓ Dificultan la translocación bacteriana
- ✓ Interacción de los probióticos con la microbiota intestinal

2.4 Consumo de probióticos en distintas patologías

Se ha encontrado en diversos estudios sobre los beneficios logrados al consumir probióticos en diferentes patologías como; enfermedades gastrointestinales, hepáticas, reumáticas, renales, autoinmunes y cáncer, etc. Ver tabla 2.2

Tabla 2- 2 Meta análisis del consumo de probióticos en la salud

Probióticos/Simbiótico	Efectos benéficos	Referencias
<i>Sacharomyces boulardi</i>	Redujo diarrea asociada a antibióticos tanto en niños como en adultos. 19 a 8.5 %.	Guslandi et al., 2000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Modificación del perfil lipídico, disminución de TG y colesterol LDL.	Ra Choi, Young, and Jin, 2018
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Prevención y tratamiento de diarreas asociadas a <i>Helicobacter pylori</i>	Wang, Dong and Yimin., 2012
<i>Lactobacillus casei</i>	Favorece frecuencia de evacuaciones intestinales y consistencia de la heces	Lamiki et al., 2010
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Alivio del síndrome de intestino irritable	Niedzielin et al., 2001
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , e inulina	Mejora en la frecuencia de defecación y síntomas de constipación	Jonkers, Penders, Masclee and Pierik, 2012
<i>Bifidobacterium lactis</i> e inulina	Aumentaron la cantidad de bifidobacterias en el intestino	Anzawa et al., 2018

S.boulardii y Redujeron el riesgo de diarrea Szajewska et al., 2006

Lactobacillus acidophilus asociada a antibióticos

S. boulardii, *Lactobacillus* Redujo el riesgo de diarrea aguda, Sazawal et al., 2006

GG,L. *acidophilus*, viajero e infecciosa.

Lactobacillus bulgaricus

2.4.1 Diarrea

La diarrea se define como un síndrome caracterizado por un incremento en la frecuencia, peso y contenido de agua en las heces; en varios estudios de intervención se evaluó la utilidad de los probióticos como tratamiento para la diarrea aguda, donde se demostró que la administración de *Lactobacillus*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus* se asocia a una disminución de la severidad y duración de las diarreas (Grandy *et al.*, 2010). En ciertos meta-análisis se ha introducido los probióticos para reducir la duración de la diarrea aproximadamente en un día (Szajewska & Radzikoski, 2006; Huang *et al.*, 2002). *Lactobacillus rhamnosus* previene diarrea asociada a los antibióticos y malnutrición, también otra cepa con buenos resultados fue *Bifidobacterium infantis*. Los mecanismos de acción muestran una producción de sustancias antimicrobianas y disminución del pH intestinal por el estímulo de organismos productores de ácido láctico, los cuales favorecen el crecimiento de organismos más beneficios. También otros probióticos aumentan la resistencia a la colonización al competir con microorganismos patógenos por los sitios de unión y por los nutrientes que requieren sobrevivir y desarrollarse (O'Hara & Shanahan, 2007)

2.4.2 Efecto inmunomodulador

Los probióticos pueden modular el sistema inmune a nivel mucosa pero también a nivel sistémico, se evalúa la utilidad de los probióticos en el manejo preventivo o terapéutico de enfermedades inflamatorias. Los probióticos presentan un efecto positivo en enfermedades donde existe un desbalance de la microbiota intestinal e influir en la respuesta inmune del individuo (Nova *et al*, 2007). Las bacterias ácido lácticas en diversos estudios se observó que pueden ser captadas por células M presentes en el epitelio y facilitar la estimación del tejido linfoide asociado a la microbiota; una modulación de la actividad fagocítica puede tener beneficios para las personas en diferentes etapas de la vida (Rome *et al*, 2010). Al utilizar probióticos, es capaz de potenciar la respuesta inmunitaria, previniendo infecciones y controlando el proceso inflamatorio. Existiendo una producción de citocinas (IL-6, IL-17, IL-10, IL-8), aumento de células NK e interferon gamma (IFN- γ)

2.4.3 Cáncer

El cáncer es una de las principales enfermedades responsables de la morbilidad y mortalidad de la población mundial. El cáncer colorrectal es el segundo en frecuencia entre las mujeres (cáncer de mama) y el tercero entre los hombres (tumor de pulmón y próstata) con un millón de nuevos casos al año. Existen demasiados factores que pueden promover la aparición de este tipo de cáncer como factores ambientales, fundamentalmente la dieta (Kich *et al*, 2016). Actualmente se desconocen los mecanismos específicos sobre como los probióticos presentan un efecto benéfico sobre el cáncer colorrectal. Diversos estudios *in vitro* han permitido encontrar diferentes mecanismos como la unión o adsorción de carcinógenos disminuyendo el riesgo de mutagenicidad que estos pueden inducir. Inhibición en la producción de metabolitos potencialmente carcinógenos, facilitan los procesos reductores de este tipo de metabolitos que pueden ser generados por algunas especies bacterianas del lumen intestinal.

Diversos estudios tambien han demostrado sobre la administración oral de lactobacilos reduce lesiones inducidas por carcinógenos químicos en la mucosa gastrointestinal. mostraron que *L. rhamnosus GG* puede interferir en la iniciación del tumor intestinal inducido por 1,2-dimetilhidrazina (Gibson and Roberfroid, 1995). Aunque existe poca evidencia sobre el consumo de probiótico con el cáncer colorrectal, pero los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer relacionados con el tracto gastrointestinal, ya que podria modificar la flora, dando lugar a una reducción de los niveles de sustancias carcinógenas(Aso & Akasan,1992).

2.4.4 Síndrome de intestino irritable

El síndrome de intestino irritable (SII) es un trastorno gastrointestinal que afecta entre 5-20% de la población, principalmente jóvenes y niños. En un meta-análisis en el que se analizaron 3452 pacientes se observó que el uso de probióticos disminuye sintomas del SII en un 21%, con efectos benéficos sobre el dolor y distensión abdominal y flatulencia(Ford *et al.*, 2014). La combinación de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium* mostraron mayor disminución de sintomas, por lo que se ha desmotrado en ciertos estudios sobre las ganancias terapéuticas al usar probióticos(Sandhu & Paul, 2014)

2.4.5 Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno crónico recurrente en el que se observa una interacción anómala de la microbiota y hospedador. En los últimos años se ha propuesto el uso de probióticos con el objetivo de restaurar la microbiota y reducir la inflamación. En un estudio en donde se emplearon 4 cepas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii sp. Bulgaicus* y *Lactobacillus plantarum*) se demostró una disminución de la inflamación del iléon (Floch *et al.*, 2015). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son dos formas de enfermedad

inflamatoria intestinal, de las que se plantea que un desbalance entre las bacterias “protectoras” y patogénicas de la flora intestinal (disbiosis) puede estar relacionado a su patogénesis (Tamboli *et al.*, 2004). El uso de probióticos en estas enfermedades es con la finalidad de colonizar el tracto gastrointestinal con cepas bacterianas benéficas que promuevan una respuesta protectora inmune.

2.4.6 Colitis ulcerosa

Se muestra en diversos estudios sobre la utilidad de probióticos con la mezcla de cuatro 4 cepas de lactobacilus, para la prevención y mantenimiento de la remisión en pacientes con pouchitis. Las cepas *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve* y *B. infantis*) han demostrado ser efectivas en el mantenimiento de la remisión de dichos pacientes. Por lo cual se puede administrar como tratamiento de primera línea en aquellos pacientes con alergia o intolerancia o como tratamiento (Jonkers, Penders, Mascle & Pierik, 2012).

2.4.7 Pacientes de cuidados intensivos y quirúrgicos

En la mayoría de los estudios donde se utilizaron simbióticos redujeron la incidencia de infecciones bacterianas. En otro estudio con 65 pacientes politraumatizados severos se observó una reducción significativa de la incidencia de infecciones, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis severa, días de UCI y de ventilación mecánica así como mortalidad (Kotzampassi *et al.*, 2006).

2.4.8 Estreñimiento

Existe mucha evidencia sobre la adición de probióticos y su capacidad para disminuir el estreñimiento, lo que resulta a deposiciones tres veces por semana con heces duras o difíciles de evacuar, dolor y distensión abdominal. La administración de *L. reuteri* en niños con estreñimiento crónico mostró efectos positivos en la frecuencia de la evacuación intestinal, aunque no se

encontro efectos sobre la consistencia (Chmielewska, Szajewska, 2010). El uso de *L. casei rhamnosus* y *Bifidobacterium breve* incrementó la frecuencia de las evacuaciones, mejoró la consistencia de la heces y disminuyó el dolor abdominal en niños con estreñimiento funcional (Lamiki et al, 2010). *Bifidobacterium lactis* ha demostrado efectos benéficos a nivel intestinal, la cual se relaciona con el aumento de las heces, consistencia y frecuencia de evacuación (Gotteland, Vizcarra & Maury, 2010)

2.4.9 Enfermedad hepática

En la esteatosis hepática no alcohólica se ha propuesto el uso de probióticos para modular la microbiota, en donde se ocasiona una influencia en el eje intestino-hígado y así poder mejorar la enfermedad. En pacientes sometidos a trasplante hepático en donde se administró *L. plantarum* y fibra de avena, en donde se observó una reducción de infecciones bacterianas postoperatorias, y también disminuyeron los días de estancia hospitalaria en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Sawaz et al., 2015)

2.5 Prebióticos

Un prebiótico es un componente no digerible que confiere beneficios a la salud del hospedador asociado con la modulación de la microbiota, puede ser una fibra aunque no todos los tipos de fibra son considerados prebióticos (Sáez-Lara et al., 2016).

Inicialmente se definió a los prebióticos como; “ingredientes no digestibles de los alimentos que afectan beneficiosamente al hospedador 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 hospedador” (Gibson y Roberfroid, 1995).

Los prebióticos son sustancias no digeribles de los alimentos que modulan la microbiota intestinal proporcionando un efecto benéfico a la salud del hospedador (Suarez, 2015).

Debe cumplir con tres criterios:

- No ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal (GIT) superior (esófago, estómago y duodeno) y, por lo tanto, ser resistente a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y no absorberse en el intestino delgado.
- Ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal
- Capaz de inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud, estimular selectivamente el crecimiento microbiano así como la actividad bacteriana contribuyendo a la salud intestinal y del huésped (Gibson y Roberfroid, 1995).

Las principales fuentes de prebióticos son los fructanos (extracto de raíz de achicoria, inulina, fructooligosacáridos de cadena corta y oligofructosa), galactooligosacáridos y lactulosa (IOM, 2013).

2.5.1. Beneficios del consumo de prebióticos

Los prebióticos pueden ejercer efectos fisiológicos beneficiosos para la salud y bienestar del organismo, para modular la microbiota intestinal, teniendo efectos beneficiosos no solo a nivel del colon sino en todo el organismo contribuyendo a reducir ciertas enfermedades intestinales y sistémicas. Los prebióticos estimulan el crecimiento de bacterias fermentativas, para que exista una proliferación bacteriana y así lograr que los metabolitos de los microorganismos logren un efecto positivo en la salud. Se ha encontrado evidencia científica sobre el uso de prebióticos y probióticos logrando una reducción en los síntomas de enfermedades intestinales como síndrome de intestino irritable y enfermedades inflamatorias intestinales como colitis y enfermedad de Crohn (Aziz & Quigley, 2013).

Los prebióticos pueden llegar a favorecer el crecimiento de determinados géneros o especies de microorganismos con efectos beneficiosos para la disminución de patógenos, ya que esto podría cambiar el perfil inmuno-interactivo de la microbiota. (Roberfroid *et al.*, 2014). Es por eso fundamental el consumo de los prebióticos, ya que estimulan el crecimiento de bacterias fermentativas como es el caso de los probióticos ocasionando efectos beneficiosos en el aparato gastrointestinal.

2.5.2 Oligosacáridos como prebióticos

Los carbohidratos no digeribles se clasifican en dos tipos, colónicos (fibra alimentaria) y prebióticos; los ingredientes colónicos son carbohidratos que llegan al colon, sirven como sustrato para los microorganismos que lo habitan originando energía, sustratos metabólicos y micronutrientes para el hospedador. Dentro de este grupo se incluyen los polisacáridos estructurales de plantas, tales como pectinas, hemicelulosas o celulosa, gomas o algunos oligosacáridos derivados de la soja, glucooligosacáridos, arabinooligosacáridos, etc. Además estimulan el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas (bifidobacterias, lactobacilos, etc.), de la microbiota intestinal. Actualmente en el mercado se comercializan como prebióticos un gran número de carbohidratos, pero únicamente existe evidencia científica sobre sus propiedades benéficas; fructanos tipo inulina y los fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), lactulosa y los oligosacáridos de la leche humana (Gibson *et al.*, 2010)

2.6. Encapsulación

La encapsulación es un proceso aplicado para proteger mediante un material de recubrimiento la estabilidad, biodisponibilidad y conservación de los componentes bioactivos y así mismo la viabilidad de los microorganismos (Fritzen *et al.*, 2012). Es una técnica para mejorar la supervivencia de bacterias probióticas en productos lácteos o en una matriz encapsulada para

protegerlos de factores adversos (Talwakar & Kailasaphaty, 2004). Existe una gran variedad de técnicas, algunos autores los clasifican en físicos y químicos; los métodos físicos son secado por atomización, liofilización, secado por extrusión mientras que los químicos se encuentran polimerización, gelificación iónica atrapamiento de liposomas y cristalización (Pedroza, 2002). Las microcápsulas permite proteger el componente bioactivo de medio ambiente como temperatura, luz, oxígeno, pH, enzimas y presencia de nutrientes, los cuales disminuyen el efecto benéfico (Chen *et al.*, 2006).

2.6.1 Encapsulación por gelificación iónica

El proceso de formación de gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna, donde el ión de calcio se difunde hasta alcanzar una cadena polimérica; por lo que se realiza un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato y la concentración de calcio (Funami *et al.*, 2009). Los mecanismos de gelificación iónica se han utilizado por dos procesos: gelificación externa e interna. Ver tabla 2.3

Tabla 2- 3 Diferentes procesos de gelificación

Gelificación externa	Gelificación interna
Es cuando la difusión de calcio, desde una fuente que rodea al hidrocólide va a la solución de alginato con un pH neutro. La formación de gel inicia en la interfase y avanza hacia el interior, a medida que la solución se encuentra saturada de iones de calcio.	Se refiere a la liberación controlada del ión de calcio desde una fuente interna de sal insoluble o parcialmente soluble dispersa en la solución de alginato de sodio. La liberación de calcio ocurre de dos formas; donde la liberación del ion calcio puede ocurrir de dos formas, si se

tiene una sal de calcio insoluble a pH neutro pero soluble a pH ácido, es necesario adicionar un ácido orgánico que al difundirse hasta la sal permita la acidificación del medio consiguiendo solubilizar los iones calcio.

Fuente: (Helgerud *et al.*, 2010)

La gelificación iónica es una técnica muy utilizada por su facil preparación; se utiliza alginato como agente encapsulante y su combinación con iones divalentes como calcio, para comenzar la gelificación, el gel se va endureciendo conforme aumente el tiempo de contacto con los iones de calcio. Las variables a controlar son pH, concentración de ionones, concentración de alginato, etc (Pedroza, 2002). Es un proceso que se desarrolló para inmovilizar células donde el alginato combinado con iones de calcio logrará que exista una gelificación (Pedroza,2002).

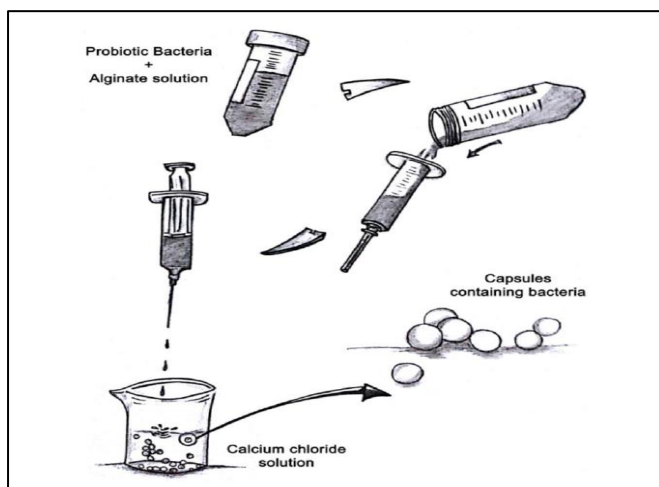


Figura 2- 2 Esquema de encapsulación de probióticos

Fuente: (Serna, L.; Vallejo, V, 2013)

La microencapsulación se hace con la finalidad de estabilizar los microorganismos, reforzar la viabilidad y estabilidad durante la producción, almacenamiento y manejo de los cultivo.

Las microcápsulas esta constituida por una membrana fuerte, delgada, esférica y semipermeable que envuelve enl núcleo; el tamaño depende de los materiales y métodos utilizados (Rokka and Rantamaki, 2010)

2.7.2 Beneficios de la encapsulación de probióticos

Las ventajas de que las bacterias próbioticas sean encapsuladas son; 1)protección del material activo frente a factores ambientales como calor, aire, luz, humedad y oxigeno, 2) liberación gradual del material encapsulado, 3) cobertura de sabores y olores, y 4) separación de ciertos componentes con el fin de evitar su reacción.

Se realiza con el objetivo de aislarlos del medio e inmovilizarlos dentro de la matriz, para asi mejorar su supervivencia por el paso del tracto gastrointestinal; pero se debe de tomar en cuenta que las cápsulas en los alimentos no debe de alterar su textura ni sabor original (Lopo *et al.*, 2012).

Diversos factores provocan una mortalidad en los probióticos antes de llegar al sitio de acción; pH estomacales, tempertura, oxígeno. Para evitar que los microorganismos mueran en el tracto gastrointestinal se utiliza la microencapsulación como medida de protección, mediante un paterial protector(Kailasapathy, 2006).

Por eso es la importancia de utilizar las perlas de alginato como material de encapsulación en probióticos, ya que se ha observador que ha aumentaod su viabilidad, ha logrado resistir a los jugos gástricos. Protege a las bacterias del calor, humedad; para aumentar su viabilidad y estabilidad. Es una técnica utilizada actualmente pero se debe seleccionar la técnica adecuada para no matar a los microorganismos y poder lograr mayor viabilidad (Ávila, 2011).

2.7.3 Criterios para encapsulación de probióticos

Para realizar el proceso de encapsulacion de probióticos se debe de tomar en cuenta lo siguiente(Martin *et al.*, 2009):

- El tamaño de la partícula deseado es entre 15-100 μm , las microcápsulas mayores a 100 μm son detectables en la boca y las inferiores a 15 μm no dan la suficiente protección frente agentes externos.
- La técnica no debe emplear agentes externos agresivos que pudieran limitar la supervivencia de los microorganismos
- Se requiere un bajo consumo energético, para que los costos sean adecuados en la industria

El material utilizado para encapsular debe de cumplir ciertas características: baja viscosidad a altas concentraciones, capacidad de emulsificar y estabilizar el material central, etc. Para encapsular probióticos normalmente son polisacáridos de diferentes orígenes, Ver tabla 2.4 (Pérez *et al.*, 2013)

Tabla 2- 4 Polisacáridos empleados en la encapsulación de probióticos

Orígen	Polisacáridos
Algas marinas	k-carragenano, alginato
Plantas	Almidón y sus derivados, goma arábica
Bacterias	Gelano, xantano
Animales	Quitosano
Proteínas animales	Leche, gelatina

El alginato es un polisacárido aniónico formado por residuos de los ácidos β -Dmanurónico y α -L-gulurónico. En la encapsulación de probióticos se usa en concentraciones de 0.5-4 %. Las cápsulas de alginato tienen la ventaja de formar fácilmente matrices de gel alrededor del probiótico, son seguras y biocompatibles con el organismo. Se han encontrado ciertas desventajas como dificultades en su aplicación a nivel industrial, susceptibilidad al ambiente ácido, pérdida de su integridad y estabilidad mecánica, formación de poros en la superficie de las cápsulas. Pero

estas desventajas pueden mejorar al mezclar alginato con almidón, cubrir cápsulas con quitosano y modificar su estructura utilizando aditivos como glicerol (Cho and Park, 2002)

2.8 Aparato digestivo

El aparato digestivo es un conjunto de órganos, con glándulas asociadas que se encargan de recibir, descomponer y absorber los alimentos y los líquidos; las partes del sistema se encuentran especializadas para realizar funciones de ingestión, digestión, absorción y excreción. Desde la boca al esfínter anal, el tubo digestivo mide unos 11 metros de longitud; en la boca inicia la digestión (Boticario and Cascales, 2012). El proceso digestivo y absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal se encuentra favorecido por el pH de la mucosa intestinal. El pH del estómago varía entre 1-3, en el intestino delgado 5-7, intestino grueso alrededor de 8. (Vázquez *et al.*, 2012). Ver figura 2.3

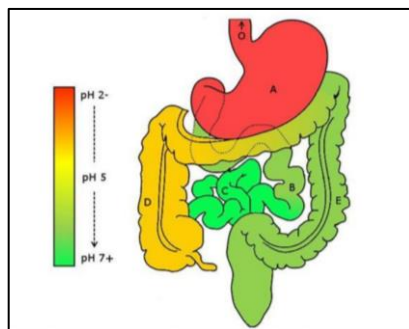


Figura 2- 3 Niveles de pH en el tracto gastrointestinal

Fuente: (Vázquez *et al.*, 2012)

Es importante mencionar la composición principal de las secreciones gástricas, intestinal, biliar y pancreática del tracto gastrointestinal: la primera está constituida por HCl, pepsina (que se activa con un pH de 3) y electrolitos (K, Na y Mg), sulfato (PO_4) y fosfato (SO_4), la segunda secreción está integrada por HCO_3 y K, mientras que la tercera está constituida por Na, K, Cl,

HCO₃ y sales biliares. Por último la secreción pancreática está compuesta por Na y HCO₃ (Mataix-Verdú, 2009) Ver tabla 2.5.

Tabla 2- 5 Partes del tracto gastrointestinal, pH y contenido.

Partes del tracto gastrointestinal	pH	Contenido
Estómago	1-2	HCl, pepsina y mucus
Intestino delgado		
-duodeno		
-yeyuno	3-6	Gastrina, secretina, sales
-ileón		biliares, mucus y bicarbonato (HCO ₃)
Intestino grueso		
-colon ascendente		
-colon transverso	5-7	Electrolitos y mucus
-colon descendente		

Fuente: (Adaptado por Parkash et al, 2011)

2.8 Microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal con una superficie de 200 m², es uno de los sistemas más expuestos a elementos exógenos derivados de la alimentación y a los microorganismos ingeridos por vía oral; los microorganismos que lo habitan se les denomina “microbiota”, una comunidad de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado, que establecen una relación de simbiosis con su hospedador, siendo esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Hooper y Macpherson, 2010, Guarner, 2011). El tracto gastrointestinal humano alberga alrededor de 10⁶ UFC/g bacterias, con un peso aproximado equivalente a 1,5-2 kg. Las secreciones ácidas,

biliares y pancreáticas destruyen la mayor parte de los microorganismos ingeridos, y la actividad motora propulsiva impide una colonización estable del lumen del intestino delgado. La microbiota intestinal está influenciada por la edad, dieta, condición socio-económica, uso de antibióticos y estado de salud (Parkes *et al.*, 2010). Los bacteroidetes y firmicutes son los principales grupos de la microbiota intestinal en adultos, seguido de las actinobacteria, las proteobacterias y la verrucomicrobia.

La microbiota intestinal ejerce varias funciones en el huésped entre las cuales destacan la protección del organismo de enteropatógenos actuando como una barrera y evitando la translocación bacteriana, contribuye en la inmunidad innata y adaptativa, participa en la señalización celular, sintetiza vitaminas K y B₁₂, participa en la digestión de carbohidratos complejos, realiza la fermentación de sustancias no digeribles como las fibras, extrae nutrientes y energía de la dieta, regula el gasto energético, la saciedad y homeostasis de la glucosa (Ariza-Andraca and García-Ronquillo, 2016)

La composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal puede verse influida por factores internos y externos del hospedador (Tojo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Cada individuo tiene una composición característica de la microbiota con especies particulares específicas, y las proporciones entre los componentes microbianos cambian como resultado de la adaptación al ecosistema debido a diferentes factores ambientales

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

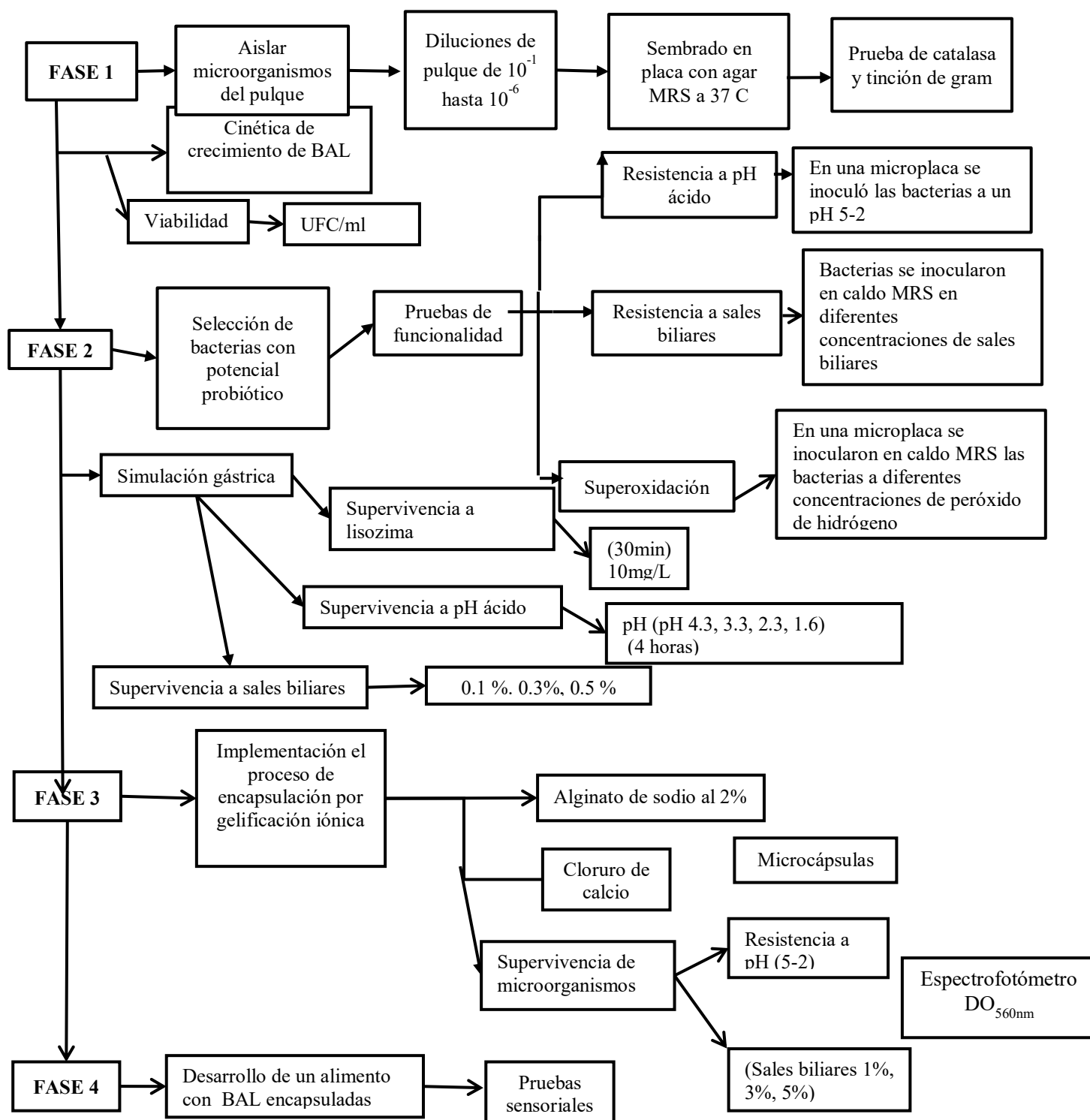


Figura 3- 1 Diseño metodológico

La metodología que se desarrolló se dividió en 4 fases. En la fase 1 se aislaron los microorganismos del pulque, para realizar experimentos microbiológicos como tinción de gram y catalasa, posteriormente se realizó una cinética de crecimiento de 24 horas y un recuento de células viables; la fase dos consistió en la selección de bacterias con potencial probiótico y una simulación gástrica; en la tercera fase se llevó a cabo la encapsulación de probióticos, y también se realizaron pruebas de pH y sales biliares para observar su resistencia; en la última fase se desarrolló el alimento con bacterias ácido lácticas encapsuladas, donde finalmente se realizó una prueba sensorial para observar la que tenía mayor preferencia.

El área de estudio para los análisis se realizó en el laboratorio de investigación de la Universidad Popular Autónoma de Estado de Puebla.

FASE 1

Aislamiento de microorganismos del pulque

El pulque se obtuvo de la región de Nanacamilpa de Mariano Arista, el cual se encuentra localizado al oeste del estado de Tlaxcala y en los límites del Estado de Puebla. En este estudio las bacterias ya se encontraban identificadas por alumnas de doctorado del equipo de trabajo de probióticos (Márquez, L)

Las bacterias aisladas ya identificadas, se reesembraron en caldo MRS; para tener un caldo semilla con la finalidad de poder realizar un experimento adecuado evitando contaminaciones y reesiembrar en agar MRS por estría cruzada, en donde se incubaron por 48 horas a una temperatura de 37 ° C, esto con la finalidad de ver el cambio de la morfología colonial y obtener colonias aisladas. El agar MRS se realizó por triplicado y lograr cepas aisladas.



Figura 3- 2 Incubación de bacterias ácido lácticas; *L. casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.brevis*

Prueba de catalasa y tinción de gram

Las bacterias utilizadas en este experimento fueron: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus paracasei*. (Identificadas por Márquez, L.)

Se sembraron en agar MRS. Se realizó un frotis en el portaobjetos para obtener una tinción de Gram y prueba catalasa. Con la finalidad de un diagnóstico de verificación de bacterias gram (+) y un resultado de catalasa (-), y finalmente se observaron en el microscopio para observar sus morfologías. Esta tinción nos permite examinar y diferenciar con exactitud los diversos colorantes en el microscopio.

3.2 Cinética de crecimiento

Se realizaron estudios cinéticos de crecimiento de 36 horas (turbidimetría) de los microorganismos aislados y en conjunto. Se realizó utilizando un espectrofotómetro UV visible (modelo 4255, Zuzi) y se determinó absorbancia, la longitud de onda se calibró en 560nm.

Se preparó caldo MRS según las indicaciones del fabricante, tubos de ensayo de 10ml y cultivo de las 4 bacterias de interés por separado y en consorcio. Las 4 cepas y el consorcio fueron reactivadas en caldo MRS, incubadas a 37°C durante 48h en condiciones de anaerobiosis.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en el mismo medio de cultivo con 10 ml en un periodo de 36 hrs, en condiciones de anaerobiosis, la medición se realizó por triplicado con una absorbancia de 560nm. Se tomaron muestras cada dos horas desde la hora 0 hasta la 36.

3.3 Recuento de células viables

Se determinó el número de microorganismos de la muestra en relación a las unidades formadoras de colonias (UFC). Se realizaron diluciones sucesivas de 10^{-1} hasta 10^{-6} cada 2 horas de la cinética de crecimiento, se procedió a la siembra por el método de extensión en placa con 0.1ml en medio sólido (MRS) y se incubó durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Se utilizó como diluyente caldo MRS, cuya función es dispersar, homogeneizar la carga y facilitar la recuperación de los microorganismos en estudio.

FASE 2

Selección de bacterias con potencial probiótico

Se realizaron varias pruebas de funcionalidad, para evaluar la resistencia de las cepas al tracto gastrointestinal. Para ello se realizaron ensayos específicos que permiten cuantificar la supervivencia de las cepas, tras el tratamiento con lisozima, sales biliares, peróxido de hidrógeno y pH ácido (Hyronimus *et al.*, 2000; Zago *et al.*, 200; Velázquez *et al.*, 2018)

Resistencia a pH ácido

Para la preparación del HCl a 1M, se tomaron 8.28 ml de HCl al 37% de pureza hasta aforar a 100 ml de agua destilada, posteriormente en un vaso de precipitado se agregaron los 15 ml de caldo MRS; en el vaso se introdujo una mosca de agitación, que se colocó en una parrilla de agitación junto con el potenciómetro.

Después se fueron adicionando de 100 µl en 100 µl de HCl en el medio MRS para conocer los cambios de pH. En un matraz de 50 ml se fueron agregando los diferentes pH previamente etiquetados.

En una microplaca de poliestireno transparente de 96 pocillos, se agregaron 20 µl de cada cepa y en consorcio, 200µl caldo MRS y finalmente 200µl de ácido clorhídrico en diferentes concentraciones (pH 5, 4, 3, 2). Este experimento se realizó por triplicado, teniendo un control con 200 µl de caldo MRS. Finalmente se pasó por el lector ELISA, tomando una densidad óptica inicial y una final después de 24 h, incubándolas a 37 ° C.

Resistencia a sales biliares

Para la preparación de sales biliares se tomaron 3 matraces con 210 ml con caldo MRS, en donde se le agregaron distintas concentraciones de sales biliares: 1 % se le agregó 0.21g, 3% 0.63g y 5% 1.05 g. Las sales biliares se abrieron en campana para evitar contaminación. En tubos de 10 ml, se agregó las diferentes concentraciones de sales previamente etiquetados para evitar errores, y se le agregó 200 µl de las 4 bacterias y consorcio. Se utilizó espectrofotómetro UV visible (modelo 4255, Zuzi) y se determinó absorbancia inicial y final después de 24 horas, la longitud de onda se calibró en 560nm. Este experimento se realizó por duplicado



Figura 3- 3 Tubos de ensayo con diferentes concentraciones de sales biliares (1 %, 3%, 5%)

Resistencia a peróxido de hidrógeno

Se preparó una dilución 1/10 de peróxido de hidrogeno concentrado al 30%. Para obtener las concentraciones deseadas de 30µg/ml, 20 µg/ml y 10 µg/ml. En una microplaca de poliestireno transparente de 96 pocillos, se agregaron se agregaron 200 µl de H₂O₂ en sus diferentes concentraciones y 20 µl de las cepas y consorcio. Se incubaron a 37 ° C por 30 minutos, se realizó una lectura en el lector ELISA para ver su densidad óptica inicial y final (Rodríguez, 2009)

Simulación gástrica resistencia a lisozima, pH ácido y sales biliares

Resistencia a lisozima

Se realizó una resiembra de la bacterias en caldo MRS, en tubos de 15 ml inoculando 150 µl; esto con la finalidad de tener un cultivo puro. Se preparon placas con agar MRS realizando triplicado; posteriormente en tubos de 10 ml se agregó 1mg lisozima, 9 ml de caldo MRS y 1 ml de bacterias ácido lácticas. Estos tubos fueron identificados por las 4 bacterias. Se metieron a incubar por 30 min en la incubadora a 37 ° C. Posteriormente se hicieron diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻⁶ para realizar el sembrado en placas de 20 ml agregando 10 µl a cada dilución. Se dejaron incubando por 48 horas a 37 ° C para realizar el conteo de UFC/ml.

Resistencia a pH ácido

Se realizó una resiembra de la bacterias en caldo MRS, en tubos de 15 ml inoculando 150 µl; esto con la finalidad de tener un cultivo puro. Se preparon placas con agar MRS realizando triplicado; posteriormente en tubos de 10 ml ajustando a pH 4.03, 3.01, 2.08, 1.55 y se le añadió, 9 ml de caldo MRS y 1 ml de bacterias ácido lácticas. Estos tubos fueron identificados por las 4 bacterias. Se metieron a incubar por 1 hora en la incubadora a 37 ° C. Posteriormente se hicieron diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻⁶ para realizar el sembrado en placas de 20 ml agregando 10 µl a cada dilución. Se dejaron incubando por 48 horas a 37 ° C para realizar el conteo de UFC/ml.

Resistencia a sales biliares

Se realizó una resiembra de la bacterias en caldo MRS, en tubos de 15 ml inoculando 150 μ l; esto con la finalidad de tener un cultivo puro. Se preparon placas con agar MRS realizando triplicado; ajustando sales biliares a 0.05 % 0.1 %, 0.15 % 0.30 % y 0.50 %. Posteriormente se hicieron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-6} para realizar el sembrado en placas de 20 ml agregando 10 μ l a cada dilución. Se dejaron incubando por 48 horas a 37 ° C para realizar el conteo de UFC/ml.

FASE 3

Implementación del proceso de gelificación

Se preparó la mezcla hidrocoloide 2% de alginato de sodio una vez logrado la mezcla homogénea se adiciona .5ml del inculo de *L. casei shirota*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.brevis* y *consorcio* este procedimiento fue de la misma manera para todos los probióticos.

Por último la mezcla hidrocoloide de alginato se sodio junto el probiótico, con ayuda de una jeringa de 10ml se extrae la mezcla para posteriormente dejarla caer gota por gota en el cloruro de calcio disuelto durante 10 segundos, se retira de la solución para posteriormente enjuagar en agua esterilizada o agua destilada y colocarlos en un recipiente estéril.



Figura 3- 4 Cápsulas de alginato de las 4 bacterias ácido lácticas

Supervivencia de microorganismos encapsulados en sales biliares

Para la preparación de sales biliares se tomaron 3 matraces con 210 ml con caldo MRS, en donde se le agregaron distintas concentraciones de sales biliares: 1 % se le agregó 0.21g, 3% 0.63g y 5% 1.05 g. Las sales biliares se abrieron en campana para evitar contaminación. En tubos de 10 ml, se agregó las diferentes concentraciones de sales previamente etiquetados para evitar errores, y se le agregó 4 perlitas de cada bacteria de y consorcio. Se utilizó espectrofotómetro UV visible (modelo 4255, Zuzi) y se determinó absorbancia inicial y final después de 24 horas, la longitud de onda se calibró en 560nm. Este experimento se realizó por duplicado.

Supervivencia de microorganismos encapsulados en pH ácido

Se tomaron 3 matraces con 210 ml con caldo MRS, en donde se le agregaron distintas concentraciones pH fueron ajustadas en 5, 4, 3, 2. En tubos de 10 ml, se agregó 4 perlitas de cada bacteria de y consorcio. Se utilizó espectrofotómetro UV visible (modelo 4255, Zuzi) y se determinó absorbancia inicial y final después de 24 horas, la longitud de onda se calibró en 560nm. Este experimento se realizó por duplicado



Figura 3- 5 Tubos con caldo MRS, en diferentes concentraciones de pH

FASE 4

3.7 Elaboración del alimento

Se realizaron gomitas con fruta natural en donde se utilizó grenetina, ácido cítrico, fruta natural (piña y maño), extracto de chía, glucosa, colorantes artificiales azúcar y stevia. Se realizaron varias formulaciones porque algunas fueron endulzadas con stevia y azúcar.



Figura 3- 6 Elaboración de pulpa de mango para las gomitas

Tabla 3- 1 Elaboración de la gomita de piña o mango con stevia

La gomita se realizó en el laboratorio de alimentos con medidas estériles y los ingredientes fueron:

Producto	Porcentaje
Extracto de chía	13.90 %
Fruta licuada (mango o chia)	52.12 %
Ácido cítrico	0.41 %
Stevia	0.52 %
Glucosa	20.85 %
Grenetina hidratada	12. 16%

Tabla 3- 2 Elaboración de gomita de mango o piña con azúcar

La gomita se realizó en el laboratorio de alimentos con medidas estériles y los ingredientes fueron:

Producto	Cantidad
Extracto de chía	11.70 %
Fruta licuada (mango)	41.50 %

Ácido cítrico	0.41 %
Azúcar	20.74 %
Glucosa	16.60 %
Grenetina hidratada	9.70 %

3.7.1 Prueba sensorial

Las gomitas ya elaboradas, se les clasifico por un número. Fueron evaluadas por 50 estudiantes de medicina para tener un resultado significativo. Se realizó una escala hedónica de 7 escalas; se calificaron en cuanto a sabor, olor y textura en general para saber la de mayor preferencia estadísticamente.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados, se explicaran de acuerdo a las 4 fases anteriormente mencionadas.

FASE 1

4.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas aisladas del pulque

En la figura 4-1 se muestra como fueron aisladas las 4 bacterias ácido lácticas, identificadas previamente por la alumna de doctorado Márquez, L(2018). Se realizó una reesembra por estría cruzada en agar MRS en condiciones anaeróbicas a 37°C por 42 horas, las cuales fueron activadas en caldo MRS en condiciones anaeróbicas a 37 ° C, para experimentos posteriores. El agar MRS fue desarrollado en 1960 por Man, Rogosa y Sharpe, este permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. Los ingredientes como la proteasa peptona, extracto de carne y extracto de levadura y glucosa son una gran fuente nutritiva que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales (De Man J, Rogosa M and Sharpe; 1960).

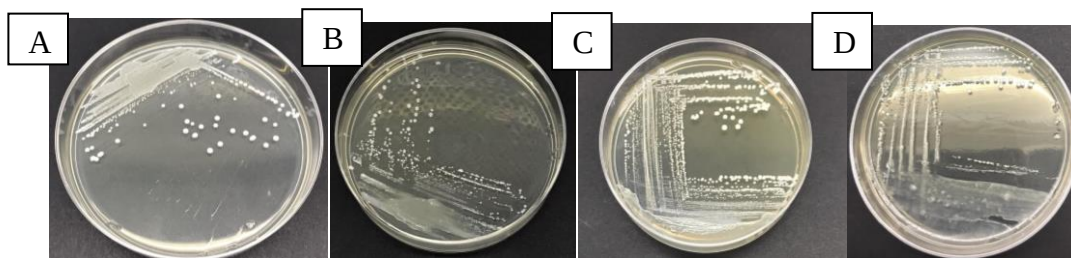


Figura 4- 1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas en medio agar MRS

A) *L. plantarum*, B) *L. casei*, C) *L. paracasei*, D) *L. brevis*

4.1.1. Prueba de catalasa y tinción de gram

Se realizó prueba de tinción de Gram para confirmar que la morfología y características de las bacterias ácido lácticas y una catalasa. Se obtuvo una catalasa (-) ya que en dicha prueba no hubo producción de gas al adicionar H₂O₂. Las bacterias ácido lácticas deben ser microorganismos

gram positivas, y de acuerdo su criterio taxonómico pueden tener una apariencia morfológica ya sea de bacilos o cocos. Por lo que se puede observar en la figura 4-2

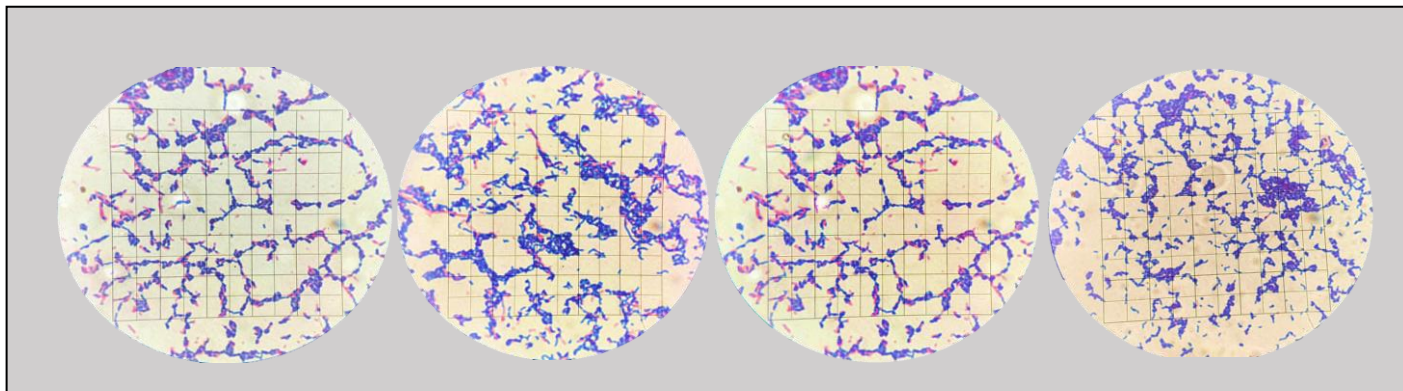


Figura 4- 2 Prueba de tinción de gram observadas al microscopio 100X y catalasa (-)

4.2 Cinética de crecimiento

En la figura 4-3 se presentan los diferentes comportamientos de las bacterias *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum* y *L.brevis* en una cinética de crecimiento de 36 horas midiendo por densidad óptica cada 2 horas. En donde se observa que *L. brevis* obtuvo un menor crecimiento, siendo *L. casei* la que obtuvo mayor densidad de crecimiento, con una velocidad de crecimiento de 0.22 h^{-1} .

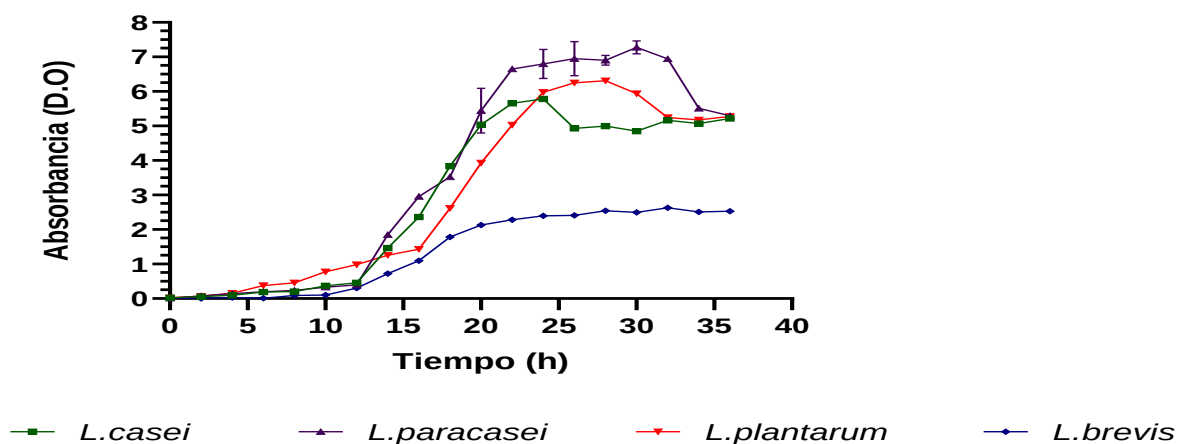


Figura 4- 3 Cinética de crecimiento por densidad óptica

4.3 Reencuentro de células viables

Para el reencuentro de células viables se realizó con la misma cinética, un conteo de células viables donde se realizó diluciones de 10^1 hasta 10^6 usando como diluyente caldo MRS, se realizó un conteo cada 2 horas. Se realizó con la finalidad de saber cuántos microorganismos le agregábamos a nuestro alimento, y conocer tiempo de duplicación de las bacterias. En la tabla 4-1 se resume los parámetros cinéticos, en donde se observa que la bacteria con mayor velocidad de crecimiento fue *L. casei* con un tiempo de duplicación de 66 min y una r^2 de 0.9859, por lo que los datos son aceptados por tener un crecimiento lineal. Por lo que en el alimento la agregamos 10^8 UFC/ml de cada cepa.

Tabla 4- 1 Parámetros cinéticos de bacterias ácido lácticas

Nombre de la bacteria	Tiempo de duplicación (Td)	Velocidad de crecimiento (h-1)	Nivel de ajuste (r^2)
<i>L.casei</i>	66 min	0.6535	0.9859
<i>L.paracasei</i>	89 min	0.8428	0.9535
<i>L.plantarum</i>	69 min	1.0053	0.9003
<i>L.brevis</i>	112 min	0.4565	0.9133

Fase 2

4.4 Selección de bacterias con potencial probiótico

Las bacterias probióticas deben de ser resistentes a la acidez del estómago, lisozima, sales biliares y enzimas pancreáticas para que sean consideradas en una terapia nutricional y con efecto benéfico en el huésped. La alta acidez en el estómago y las altas concentraciones de sales biliares en el intestino; son características que deben de resistir las bacterias para poder tener beneficios en el huésped (Salminen et al; 1998). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura

(FAO) y la Organización Mundial de la Salud establecieron criterios para la selección de bacterias probióticas; realización de ensayos *in vitro* como resistencia a la acidez gástrica y resistencia a sales biliares (FAO, 2015).

4.4.1 Resistencia a pH ácido

Para la resistencia a pH ácido, las 4 bacterias fueron sometidas a diferentes concentraciones de pH sin encapsular y encapsuladas para observar su resistencia y considerarlas como probióticas. En la figura 4-4 se puede observar que *L. brevis* al ser encapsulado tiene mayor resistencia, ya que en un pH de 1.6 tiene una absorbancia de 0.3, mientras que al ser sometidos a un pH menor a 2 sin encapsular no hubo crecimiento; los resultados presentaron una diferencia significativa entre encapsulados y sin encapsular ($p < 0.05$). Las especies de *Lactobacillus* se consideran intrínsecamente resistentes al ácido, pero todo dependen de las especies; ya que hay unos que son más sensibles a pH menor a 3 (Ronka et al; 2003). En la figura 4-7 se observa que la bacteria *L. casei* al ser encapsulado presenta una mayor resistencia a un pH 2, presentando una absorbancia de 0.8 en comparación con las otras 3 cepas. Se observó que las bacterias son resistentes a un pH de 3 por lo que pueden tener un efecto benéfico en la salud; al cumplir con uno de los criterios de probióticos.

Fujisawa et al., (1992) realizaron estudios en donde *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, provocaron un adecuado efecto probiótico en el intestino humano, dado que son capaces de resistir al pH ácido del intestino delgado. Jurado y Jarrin e (2015), encontraron que *L. plantarum* presentó un gran crecimiento en pH de 3.4, por lo que se puede comparar con nuestros resultados, ya que en la figura 4-6 se observa una supervivencia hasta en un pH 2 encapsulado y sin encapsular; por lo que se llega a la misma conclusión de Jurado al mencionar que dicha cepa presenta dicha resistencia. En un estudio

realizado por Brignon et al; en el 2017 utilizaron un pH de 2 en donde observaron que el crecimiento de *L. paracasei* se vio afectado, por lo que se puede comparar con nuestros resultados ya que en la figura 4-5 se puede observar como el crecimiento de *L.paracasei* se ve afectado conforme se va disminuyendo el pH. En la figura 4-8 se puede concluir que la encapsulación protege la viabilidad de los microorganismos en diferentes pH, ya que permite que exista mayor viabilidad en las bacterias que fueron encapsuladas, por lo que llegamos a la conclusión de que nuestras bacterias son capaces de resistir el pH ácido del estómago. Para ver todo los resultados ir a ANEXO 1

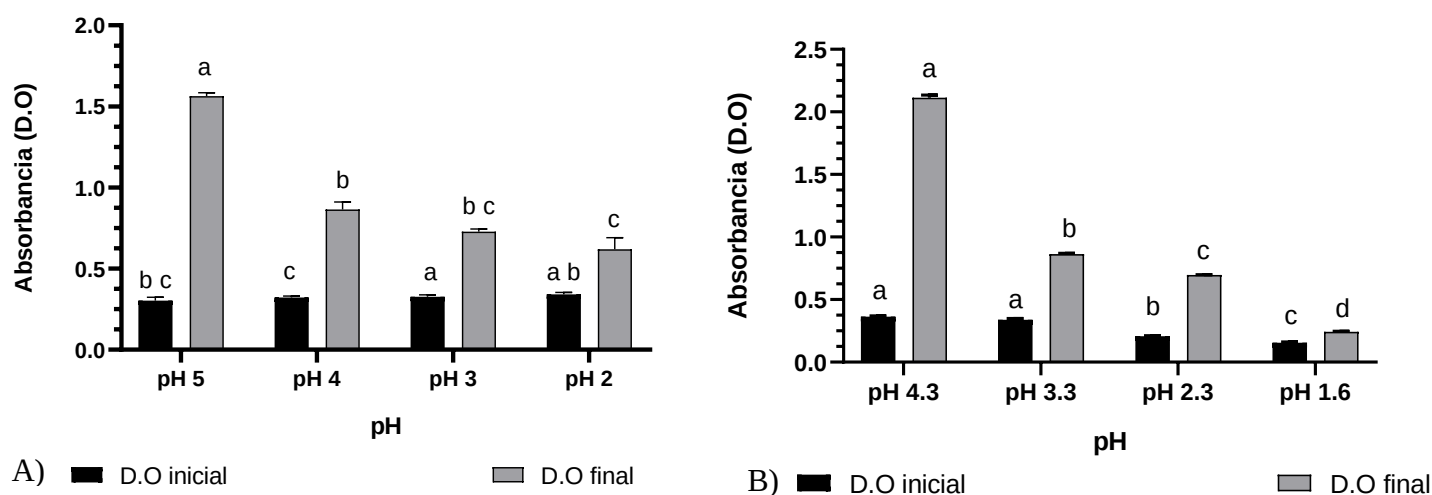


Figura 4- 4 Comportamiento del *L.brevis* sin encapsular y encapsulado en diferentes pH [A *L.brevis* sin encapsular; B *L. brevis* encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de los pH iniciales, y la comparación de las medias de los pH finales, letras iguales no representan diferencia significativa.

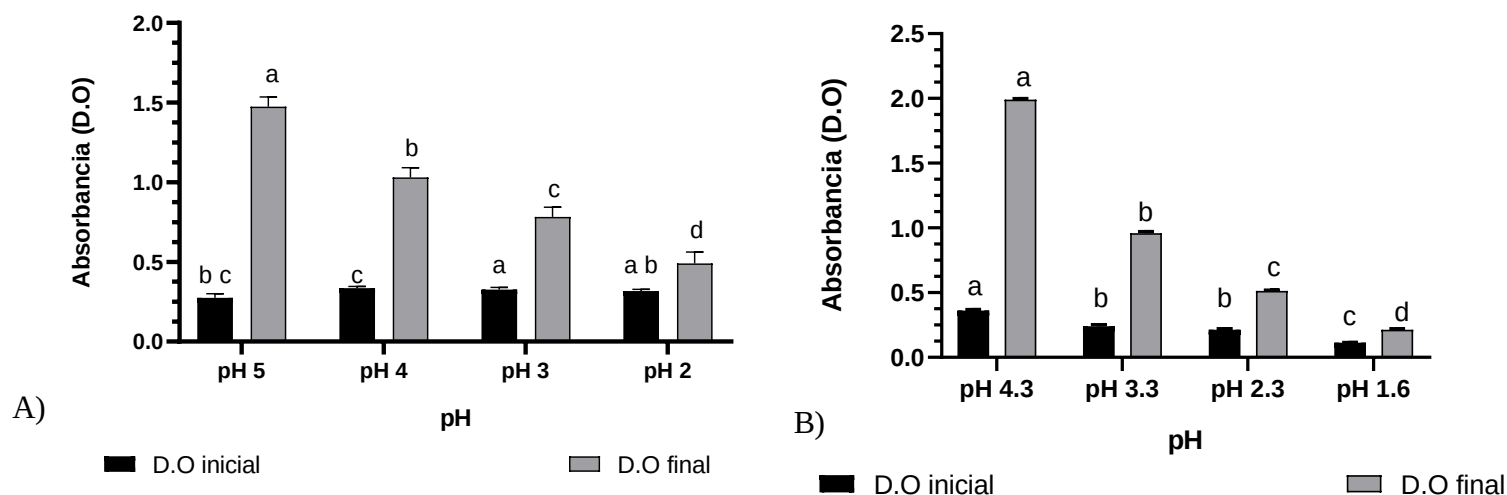


Figura 4- 5 Comportamiento de *L.paracasei* sin encapsular y encapsulado en diferentes pH [A *L.paracasei* sin encapsular; B *L. paracasei* encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de los pH iniciales, y la comparación de las medias de los pH finales, letras iguales no representan diferencia significativa.

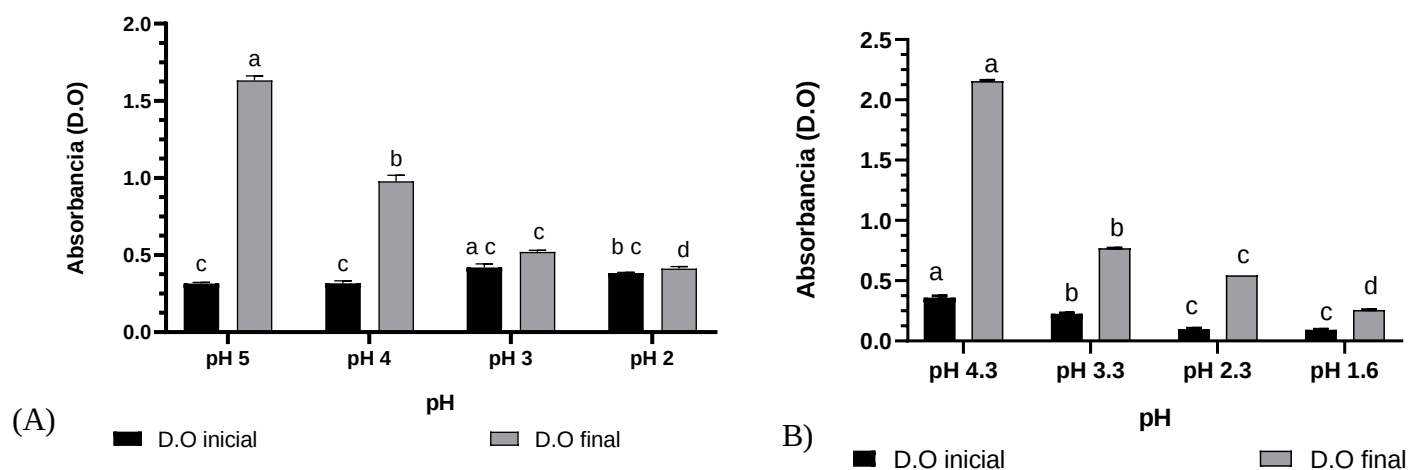


Figura 4- 6 Comportamiento de *L.plantarum* sin encapsular y encapsulado en diferentes pH [A *L.plantarum* sin encapsular; B *L. plantarum* encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las

medias de los pH iniciales, y la comparación de las medias de los pH finales, letras iguales no representan diferencia significativa

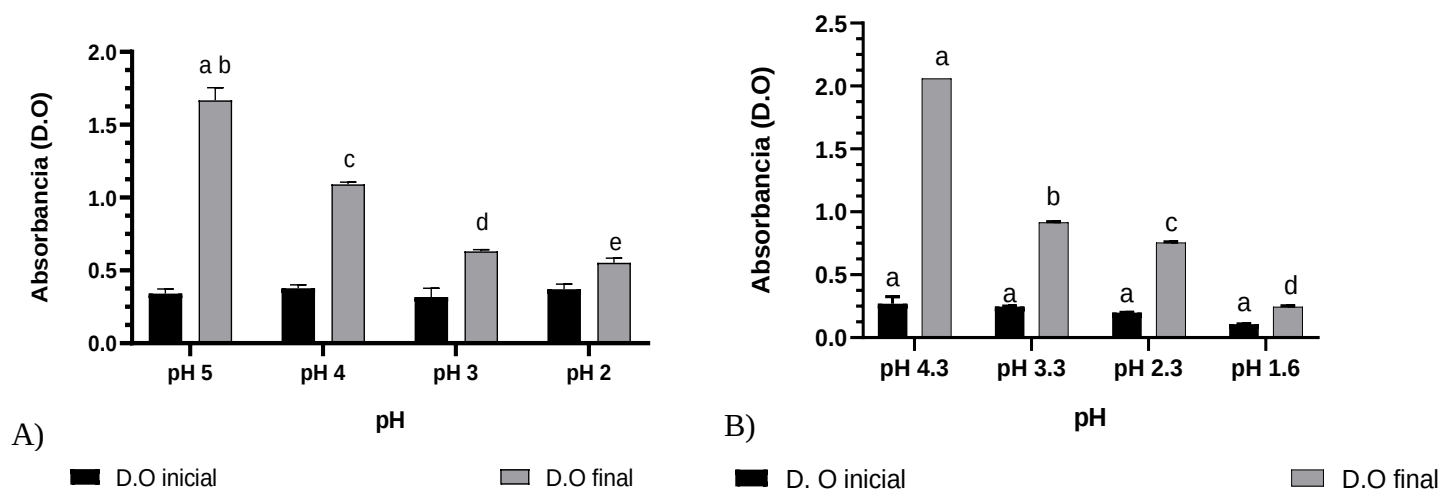


Figura 4- 7 Comportamiento de *L. casei* sin encapsular y encapsulado en diferentes pH [A *L. casei* sin encapsular; B *L. casei* encapsulado] Se realizaron ANOVA comparando las medias de los pH iniciales, y la comparación de las medias de los pH finales, letras iguales no representan diferencia significativa.

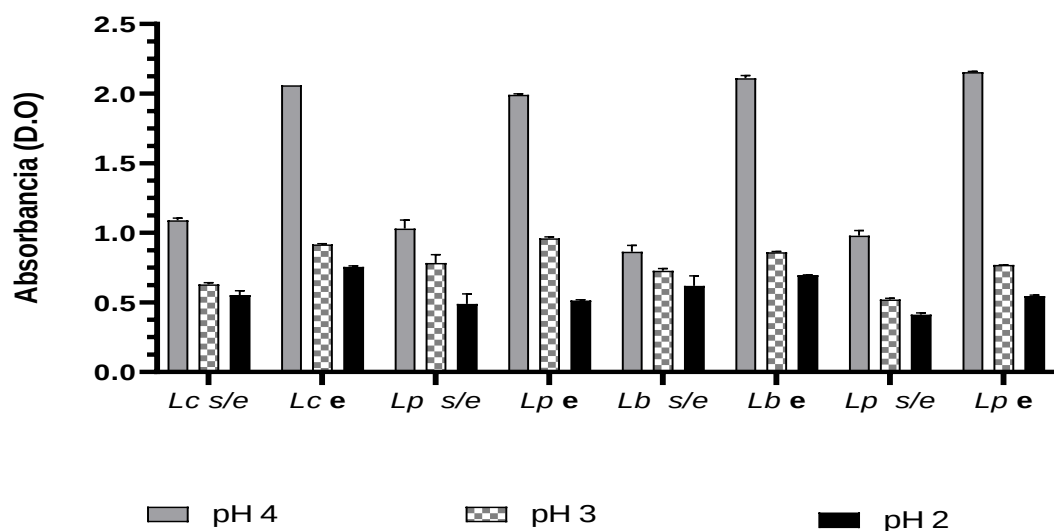


Figura 4- 8 Comportamiento de 4 bacterias ácido lácticas en diferentes pH; sin encapsular y encapsuladas. [Lc *L. casei*; Lp *L. plantarum*; Lb *L. brevis*; Lp *L. paracasei*; s/e sin encapsular, e encapsulado]

4.4.2 Resistencia a sales biliares

El hígado humano produce aproximadamente 1 litro de sales biliares al día, pero el cuerpo pierde ciertas cantidades en todo el proceso. Por lo tanto aproximadamente el 95 % de los ácidos biliares distribuidos en el duodeno se reabsorben en sangre venosa dentro del íleon y posteriormente llegan a la vena porta. Normalmente la concentración de sales biliares es de 0.3 – 0.5 %; lo cual ayuda a emulsionar y solubilizar los lípidos antes de la digestión de las grasas. Es por eso que es importante que los probióticos resistan a ciertas cantidades de sales biliares para considerarse probióticos (Patel *et al.*, 2009). En la figura 4-10 y 4-12 se puede observar que las cepas de mayor resistencia a sales biliares fueron *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum* en comparación con las otras dos cepas. Esta investigación, tuvimos resultados similares con el trabajo Saumi (2017); en donde se mostró que la cepa *Lactobacillus plantarum* fue capaz de resistir a las condiciones gastrointestinales que se le expusieron.

Se puede observar en la figura 4-11 que *Lactobacillus casei* al momento de someterse a un proceso de encapsulación sus parámetros de resistencia fueron significativos, ya que se obtuvo una densidad óptica de 0.6 a una concentración de 0.5 % de sales biliares; por lo que la encapsulación fue favorable para que el probiótico sea capaz de llegar al sitio activo y lograr el efecto benéfico.

En la figura 4-9 se observa el crecimiento de *Lactobacillus paracasei* encapsulado y sin encapsular, donde se obtuvieron resultados muy importantes; ya que dicha cepa fue capaz de resistir a las concentraciones de 0.3 % de sales biliares recomendadas por Gilliland en 1984. En la figura 4-13 al comparar nuestras bacterias encapsuladas con las no encapsuladas, observamos un gran crecimiento de bacterias encapsuladas al ser expuestas en concentraciones de sales biliares del 3 y 5 % ; por lo que dichas cepas presentan potencial probiótico. Para ver todos los resultados ir a ANEXO 2.

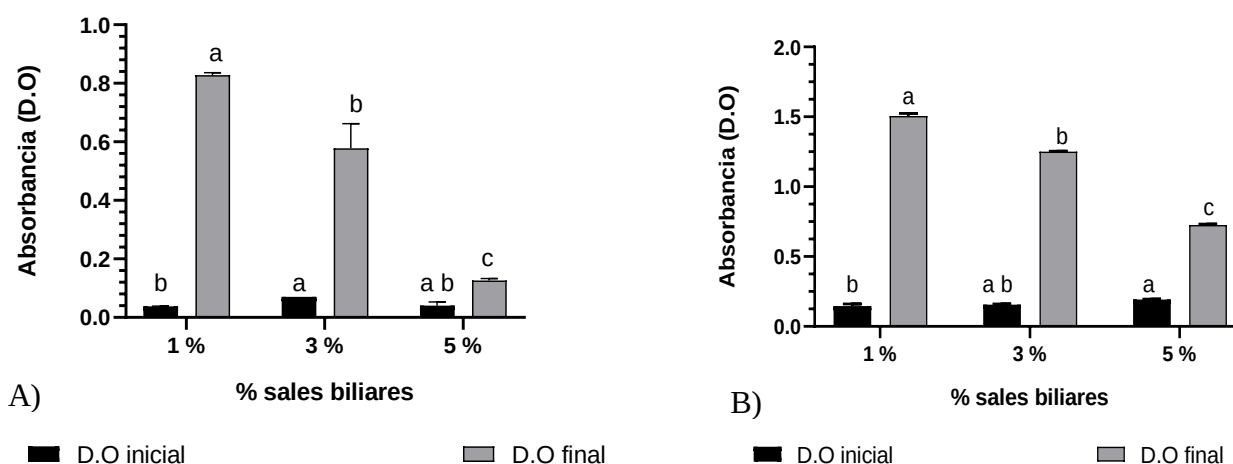


Figura 4- 9 Comportamiento de *L.paracasei* sin encapsular y encapsulado en diferentes concentraciones de sales biliares [A *L.paracasei* sin encapsular, B *L.paracasei* encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de sales biliares, y la comparación de las medias de sales biliares finales, letras iguales no representan diferencia significativa.

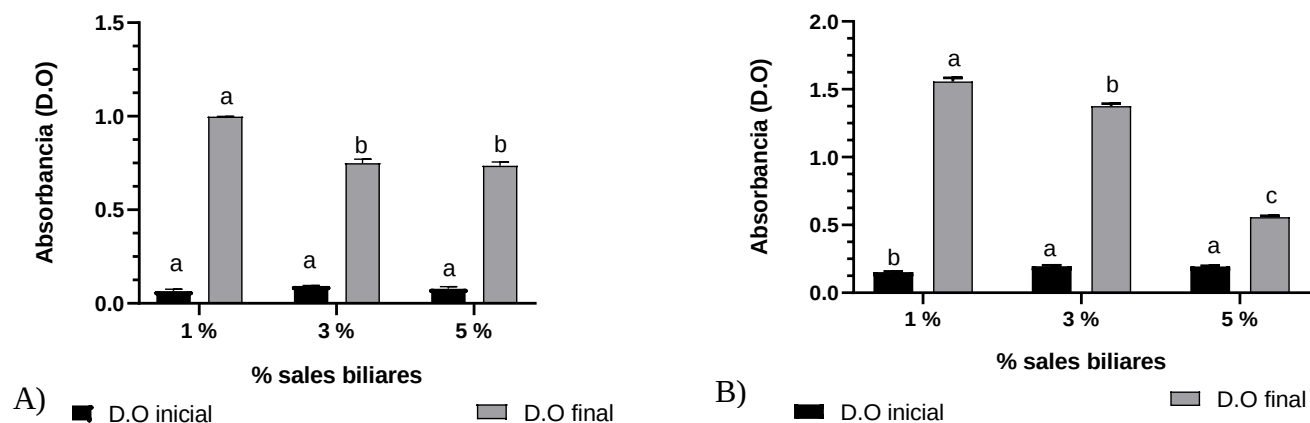


Figura 4- 10 Comportamiento de *L. plantarum* sin encapsular y encapsulado en diferentes concentraciones de sales biliares [A *L. plantarum* sin encapsular, B *L. plantarum* encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de sales biliares, y la comparación de las medias de sales biliares finales, letras iguales no representan diferencia significativa.

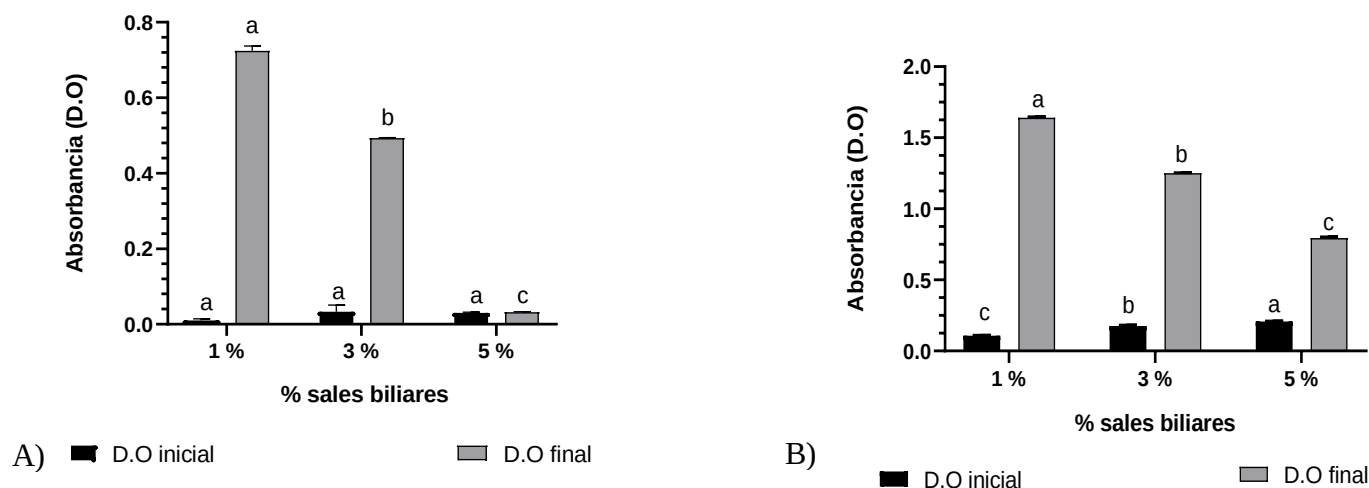


Figura 4- 11 Comportamiento de *L. casei* sin encapsular y encapsulado en diferentes concentraciones de sales biliares [A *L. casei* sin encapsular, B *L. casei* encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de sales biliares, y la comparación de las medias de sales biliares finales, letras iguales no representan diferencia significativa

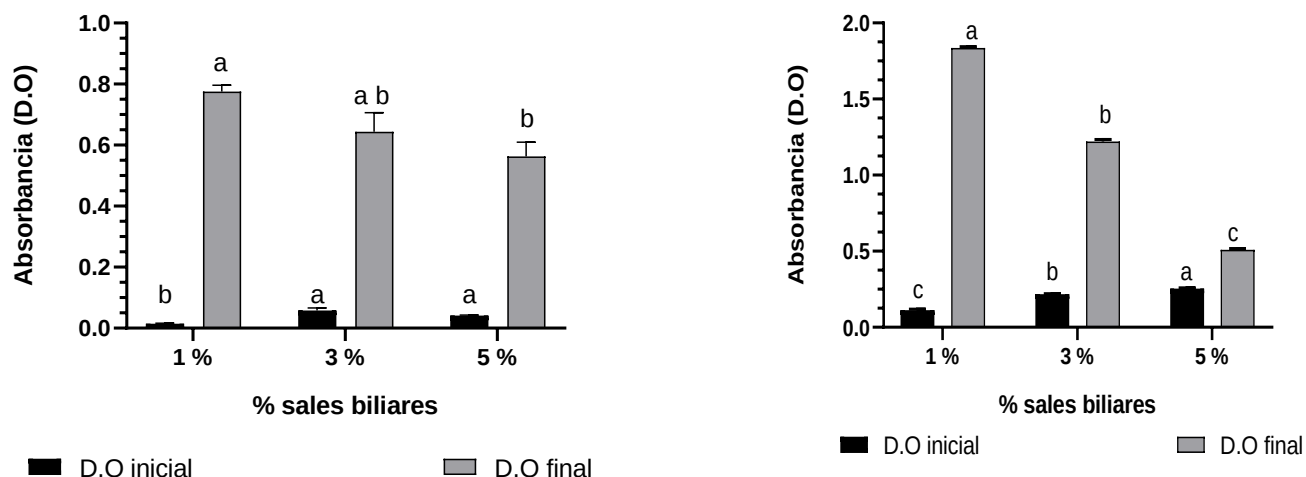


Figura 4- 12 Comportamiento de *L.brevis* sin encapsular y encapsulado en diferentes concentraciones de sales biliares [A *L.brevis* sin encapsular, B *L.brevis* encapsulado]. Se realizaron ANOVA comparando las medias de sales biliares, y la comparación de las medias de sales biliares finales, letras iguales no representan diferencia significativa.

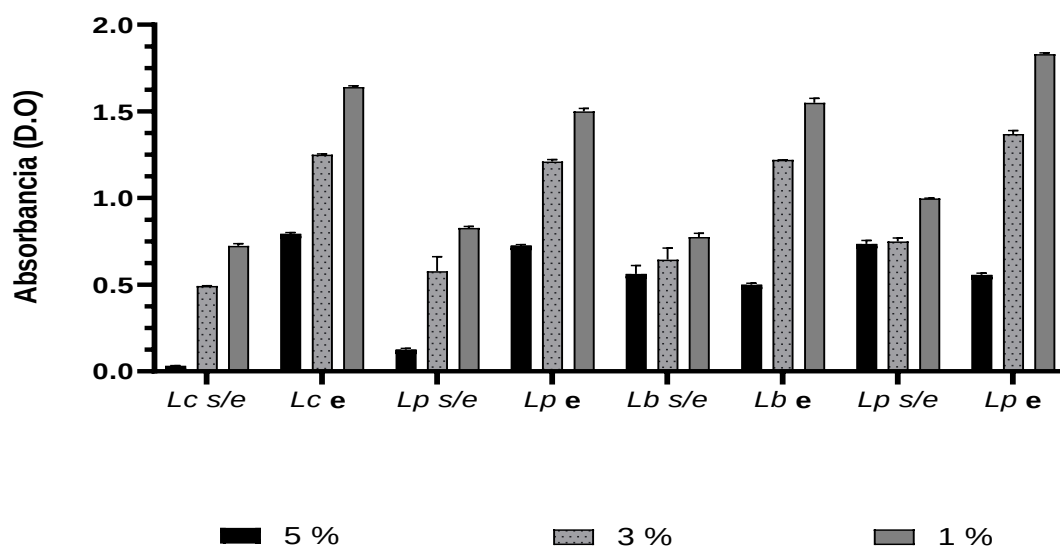


Figura 4- 13 Comportamiento de 4 bacterias ácido lácticas en diferentes concentraciones de sales biliares; sin encapsular y encapsuladas. [Lc *L.casei*; Lp *L.plantarum*; Lb *L.brevis*; Lp *L.paracasei*; s/e sin encapsular, e encapsulado]

4.4.3 Concentración de peróxido de hidrógeno

Las bacterias ácido lácticas son capaces de inhibir ciertos microorganismos patógenos y dañinos gracias a los productos finales de la fermentación; siendo sustancias como ácido láctico y acético, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y producción de bacteriocinas (Vazquez y col., 2009). Por tal motivo se evaluó si las cepas son capaces de resistir a ciertas concentraciones de peróxido de hidrógeno. En la figura 4-14 *L.brevis* resistió a concentraciones de 30µg/ml de peróxido, al presentar una densidad óptica de 0.09 pero en comparación con las otras cepas *L.paracaseri* fue la que tuvo mayor resistencia en las diferentes concentraciones, logrando una absorbancia de 0.19 en una concentración de 30µg/ml ver figura 4-16. En un estudio por Masaki en el 2016, se realizó experimentos con *L. casei shirota* donde se observó que si hubo resistencia en dicha cepa, al comparar con nuestros resultados obtuvimos igual dicha resistencia ya que se logró una absorbancia de 0.1 en una concentración de 30µg/ml de peróxido de hidrógeno, ver figura 4-17. Por lo que llegamos a la conclusión que nuestras bacterias son capaces de inhibir ciertos microorganismos patógenos y así ser considerados probióticos. Para ver todos los resultados ir a ANEXO 3

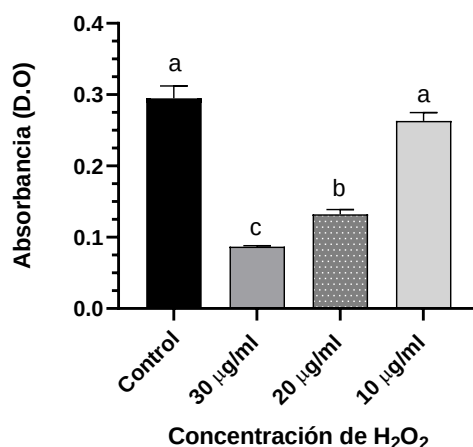


Figura 4- 14 Resistencia de *Lactobacillus brevis* en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se realizaron ANOVA comparando las medias de peróxido de hidrógeno, letras iguales no representan diferencia significativa.

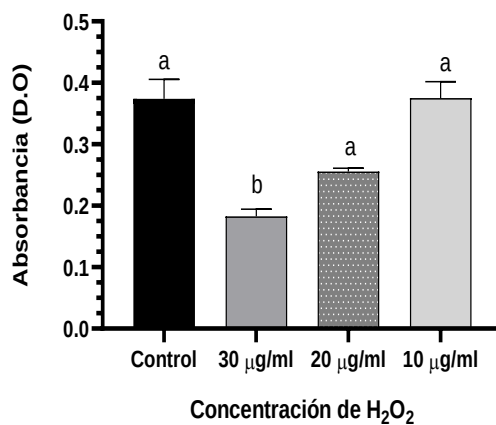


Figura 4- 15 Resistencia de *Lactobacillus plantarum* en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se realizaron ANOVA comparando las medias de peróxido de hidrógeno, letras iguales no representan diferencia significativa.

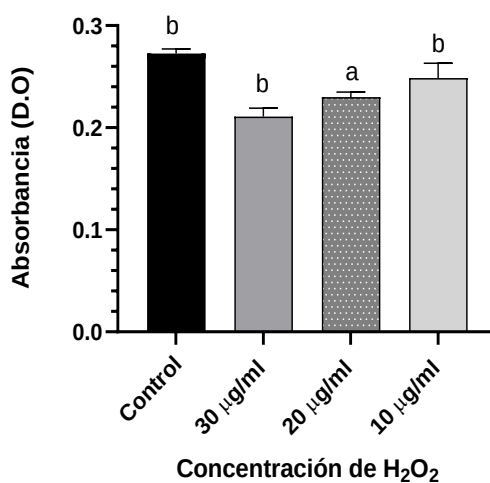


Figura 4- 16 Resistencia de *Lactobacillus paracasei* en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se realizaron ANOVA comparando las medias de peróxido de hidrógeno, letras iguales no representan diferencia significativa.

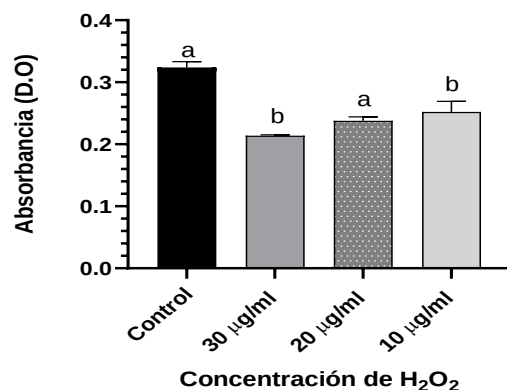


Figura 4- 17 Resistencia de *Lactobacillus casei* en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se realizaron ANOVA comparando las medias de peróxido de hidrógeno, letras iguales no representan diferencia significativa.

Fase 3

Simulación gástrica

Para realizar una selección de bacterias con potencial probiótico es necesario observar la viabilidad de las cepas en condiciones *in vitro* que simulan el tracto gastrointestinal. Como anteriormente se ha mencionado el proceso digestivo empieza en la boca con la enzima lisozima; presente en la saliva, luego continua por el estómago con un pH entre 1.5- 3 y termina en el intestino delgado, el cual contiene sales biliares conjugadas para la degradación de grasas (Corzo y Gilliland, 1999). Para dichas condiciones se evaluaron las 4 cepas *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum* y *L.brevis*. Para observar la resistencia de lisozima las bacterias fueron incubadas con 9 ml de caldo MRS, 1 mg de lisozima y 1 ml de cada una de las bacterias, esta metodología se llevo de acuerdo al protocolo de Vizoso-Pinto et al; 2006; a una temperatura de 37 ° C por 30 minutos. En nuestros resultados podemos observar que la cepa con mayor resistencia fue *L.brevis* con 9 log UFC/ml , y los resultados mostraron una resistencia significativa entre las cepas probadas de $p < 0.05$, ver figura 4-18. En la tabla 4-2 Se puede observar que la mayoría de las bacterias obtuvieron una resistencia

del 85 %, en donde a comparación con el estudio de Zago et al, 2011; lograron una resistencia del 99.5 %, en donde la cepa con mayor resistencia fue *L.plantarum*. Para ver todos los resultados ir a ANEXO 4

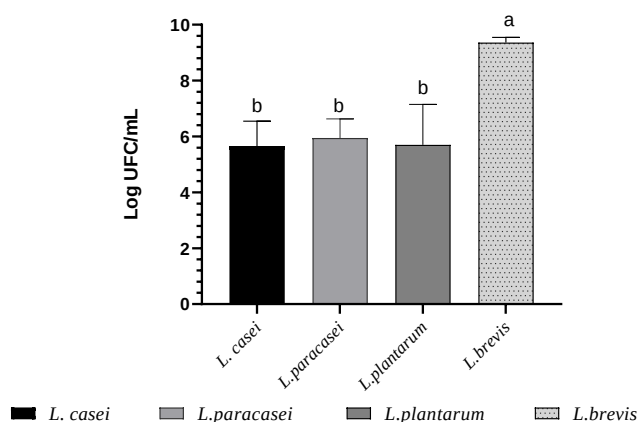


Figura 4- 18 Viabilidad de bacterias probióticas en lisozima

En cuanto a la resistencia de pH ácido, es fundamental que las bacterias probióticas resistan a un pH 1.5 a 3. Anteriormente Charteris y cols. (1998), informaron que el efecto más negativo sobre el crecimiento y viabilidad de los Lactobacilos durante su paso a través del estómago e intestino delgado es la acidez. Debido a que, el pH en el estómago humano oscila de 1.5 hasta 4.5 en función de los intervalos de alimentación o variabilidad de alimentos; de la duración de la digestión de alimentos, el cual puede tomar hasta 3 o 4 h. Algunos autores han propuesto que las cepas destinadas a fines probióticos deben ser examinados según su tolerancia a pH 2.5. En donde observamos en nuestros resultados que nuestras bacterias en un pH de 2.08 tuvieron una resistencia entre 32 y 35 % (ver tabla 4-2). Siendo la cepa con mayor resistencia *L.brevis* con 5 log UFC/ml con una diferencia significativa de $p<0.05$. En las figura 4-20 y 4-21 observamos una gran resistencia de las bacterias probióticas de aproximadamente un 69 % y 50 % de resistencia, siendo igual la cepa de *L.brevis* con mayor resistencia. Para ver todos los resultados ir a ANEXO 4

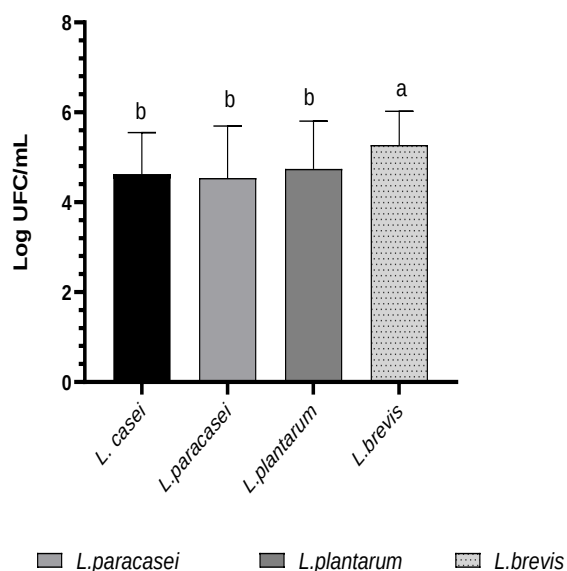


Figura 4- 19 Viabilidad de bacterias probióticas en pH 4.05. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.

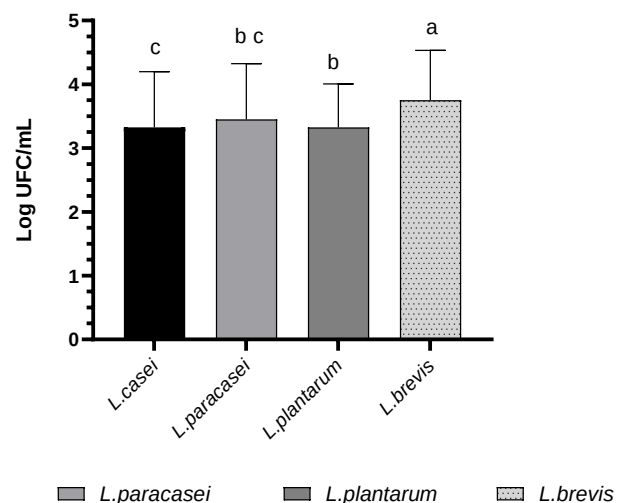


Figura 4- 20 Viabilidad de bacterias probióticas en pH 3.08. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.

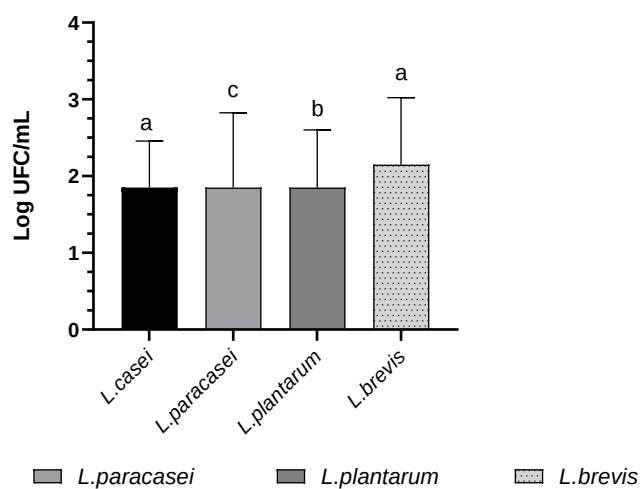


Figura 4- 21 Viabilidad de bacterias probióticas en pH 2.08. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.

Tabla 4- 2 Simulación gástrica de bacterias con potencial probiótico

Simulación gástrica (UFC/ml)									
Cepas	%	% supervivencia			% supervivencia				
	Lisozima	pH	pH	pH	0.05	0.10	0.15	0.30	0.50
		4.05	3.08	2.08	%	%	%	%	%
<i>L.casei</i>	85.10	69.62	50.04	35.00	75.6	75.6	73.6	72.3	72.3
<i>L.paracasei</i>	85.10	69.62	50.04	32.35	81.91	80.1	73.6	74.1	69.1
<i>L.plantarum</i>	85.10	69.62	50.04	32.35	78.93	76.4	73.6	70.6	69.6
<i>L.brevis</i>	85.10	69.62	50.04	32.35	100.70	88.6	83.5	76.4	72.9

En cuanto a la resistencia de sales biliares es igual una actividad probiótica fundamental. Las sales biliares conjugadas se secretan en el intestino delgado para ayudar en la absorción de las grasas en la dieta, colesteril, vitaminas hidrofóbicas y otros componenets antes mencionados grasa (Corzo y Gilliland, 2003). La mayoría de las cepas presentaron una supervivencia mayor al 70 % ver tabla 4-2. Ramos et al (2013), evaluaron la habilidad de los lactobacilos para tolerar concentraciones de sales biliares; en donde *L. brevis* y *L. plantarum* fueron capaces de soportar condiciones de 0.3 % sales biliares. En otra investigación propuesta por Ronka et al (2003) obtuvieron que *L. brevis* aislado de olivos es capaz de tolerar concentraciones de 0.3 % de sales biliares. En esta investigación observamos que las cepas al ser expuestas a una concentración de sales biliares de 0.30 % la cepa con mayor resistencia fue *L.brevis* con 5 log UFC/ml con una resistencia de 76.4 % por lo que llegamos a la misma conclusión de los anteriores científicos sobre la resistencia que presenta dicha cepa. Ver figura 4-25. También nuestras cepas fueron expuestas a concentraciones de sales biliares de 0.5 %, en donde de acuerdo a la Figura 4-26 podemos

observar un crecimiento aproximado de las 4 cepas de 4 log UFC/ml con una resistencia de 69 %-72 % por lo que concluimos que nuestras cepas aisladas del pulque presentan gran resistencia a sales biliares. Para ver todos los resultados ir a ANEXO 4.

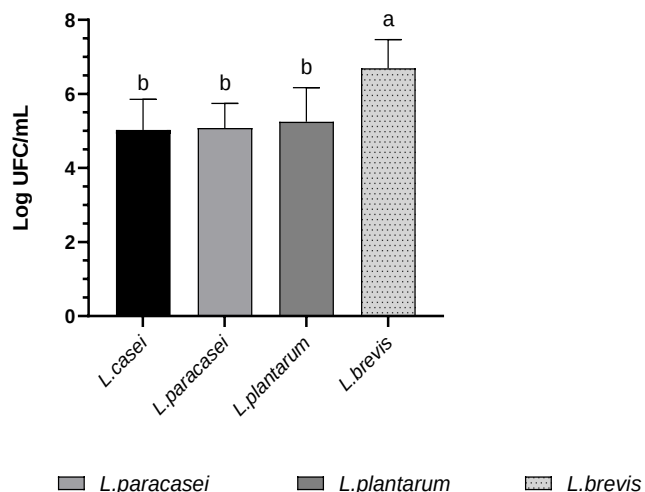


Figura 4- 23 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.05 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.

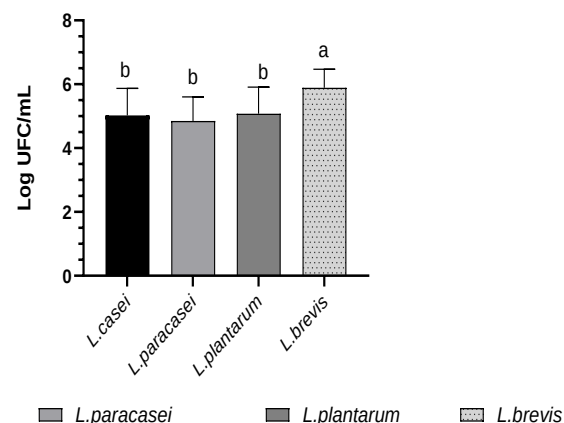


Figura 4- 22 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.10 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.

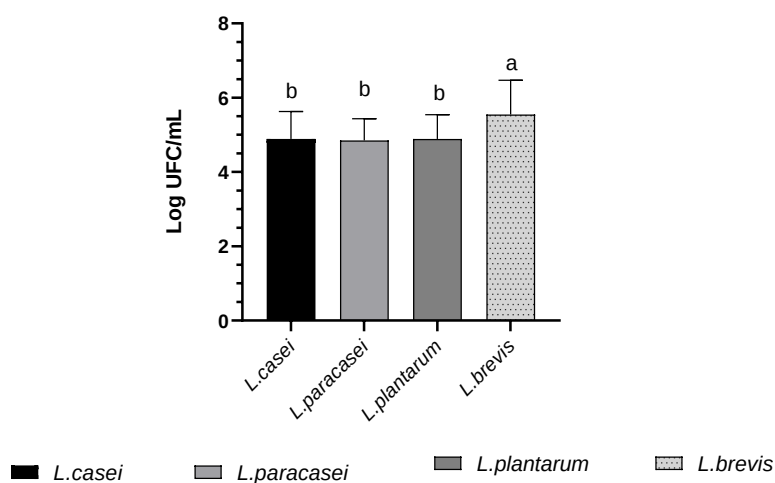


Figura 4- 24 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.15 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.

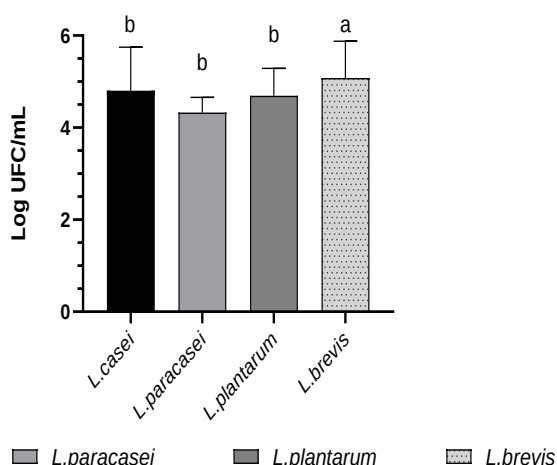


Figura 4- 25 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.30 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.

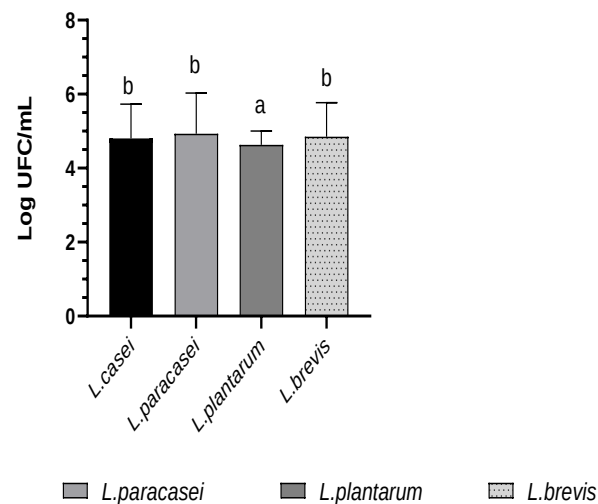


Figura 4- 26 Viabilidad de bacterias probióticas en 0.50 % de sales biliares. Se realizaron ANOVA comparando las medias, letras iguales no representan diferencia significativa.

Los microorganismos aislados del pulque y las pruebas microbiológicas, mostraron que las cepas tienen potencial probiótico; por lo que pueden ser capaces de resistir a pH ácido y sales biliares. Por lo cual las cepas son capaces de presentar beneficios en enfermedades gastrointestinales como; síndrome de intestino irritable, colitis, gastritis, enfermedad de Crohn, ERGE, etc. Siendo capaces de reducir síntomas como diarrea, vómito o inflamación intestinal.

Fase 4

Elaboración del alimento

Después de realizar nuestros alimentos sabor piña y mango endulzados con estevia o azúcar, realizamos una prueba sensorial, para evaluar la aceptación y preferencia del alimento, fueron evaluadas con respecto a la escala hedónica de 7 elementos, por Lawless y Heymann. En esta

investigación participaron 50 estudiantes de medicina de la UPAEP. En la figura 4-27 podemos observar que la gomita con mayor preferencia en cuanto a sabor es la 245; la cual es una gomita con piña natural endulzada con azúcar la cual obtuvo 290, con una diferencia significativa de $p < 0.05$. En la figura 4-28 también se evaluó en cuanto a su olor, en donde los 4 diferentes sabores fueron calificados adecuadamente y no hubo diferencia significativa

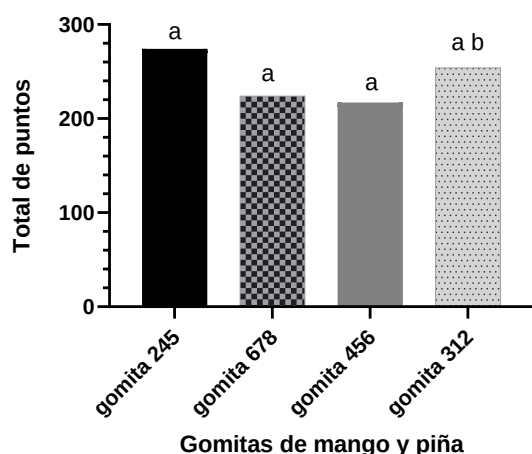


Figura 4- 27 Evaluación de la gomita en cuanto a sabor

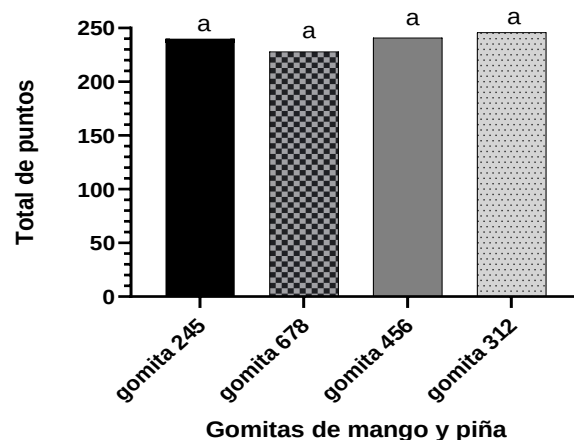


Figura 4- 28 Evaluación de la gomita en cuanto a olor

También fueron evaluadas en cuanto a textura en general, para observar si la gente al morderlas o probarlas sentían alguna consistencia que no era de su agrado. En la figura 4-29 no observamos diferencias significativas en los resultados, y llegamos a la conclusión que todas nuestras gomitas presentan una textttura adecuada; solo algunos estudiantes pusieron ciertos comentarios que debíamos agregar un poco más de dulzura a nuestras gomitas para que sean consumidas para todo tipo de público, tanto niños como adultos y así poder tratar enfermedades gastrointestinales.

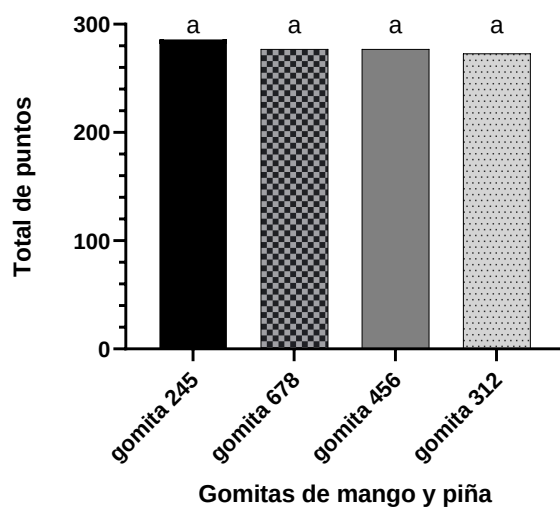


Figura 4- 29 Evaluación de la gomita en cuanto a textura en general

CONCLUSIÓN

El alimento fue elaborado con 4 bacterias aisladas del pulque, identificados bioquímica y molecularmente por alumna de Doctorado en Biotecnología, que corresponden a *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*.

Las cepas *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum* y *L. brevis* aisladas del pulque identificadas mostraron habilidad para sobrevivir a las condiciones gastrointestinales como lisozima, pH ácido, sales biliares y peróxido de hidrógeno. Estas podrían llegar viables a su sitio de acción; logrando efectos benéficos en el huésped para tratar enfermedades gastrointestinales como gastritis, colitis, estreñimiento, diarrea, etc; por lo que se llega a la conclusión que estas cepas son consideradas probióticas por cumplir con los requisitos de resistir pH ácido y sales biliares.

Las bacterias a ser encapsuladas presentaron mayor viabilidad, ya que al exponerse a concentraciones a un pH de 1.6 su densidad óptica era de 0.4, mientras que al ser sometidas a un pH menor a 2 las bacterias no lograron resistir, por otro lado al exponerse a sales biliares lograron una densidad óptica de 1.2 en una concentración de 0.3 %. Por lo que la encapsulación nos permite preservar la estabilidad y viabilidad de los microorganismos probióticos.

La importancia de esta investigación fue la diversificación e innovación de alimentos a partir de microorganismos benéficos del pulque para reactivar el consumo de la bebida tradicional mexicana, por ello se propone el uso de BAL con potencial probiótico aisladas a partir del pulque, e incidir en la dieta mexicana como un alimento funcional para mantener un equilibrio benéfico y así prevenir o tratar enfermedades gastrointestinales o crónicas degenerativas.

REFERENCIAS

1. Abreu, T. (2012). *Prebióticos, probióticos y simbióticos*. Revista de gastroenterología de México, 77: 26-28.
2. Alok, A, et al (2017). *Probiotics: A New Era of Biotherapy*. *Adv Biomed Res*; 6: 31.
3. Amund O. D. (2016). *Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria*. *Can. J.* 62 (9).pp(715-25)
4. Anzawa, D., Mawatari, T., Tanaka, Y., et al.(2018). *Effects of synbiotics containing **Bifidobacterium animalis** subsp. **lactis** GCL2505 and inulin on intestinal bifidobacteria: A randomized, placebo-controlled, crossover study*. *Food Sci Nutr*:7(5).pp.(1828-1837).
5. Aso Y, Akazan H. (1992). *Prophylactic effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer*. *BLP Study Group. Urologia internationalis*.49 (3).pp(125-9).
6. Axelsson, L.T. (1993). *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. Food Science and Technology. New York (2 ed)
7. Aziz, E., & Quigley, E. (2013). *Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions*. *Neurogastroenterol Motil*; 25.pp (4-15).
8. Bedolla, S. (2003). *Introducción a la tecnología de los alimentos*. México: Limusa Limusa S.A de C.V.pp (78).
9. Biplap, B., & Narayan, M.(2014). *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics- In Health improvement by modulating gut microbiota: the concept revisited*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*:3.pp(410-420).
10. Boticario, C., & Cascales, M. (2012) *Digestión y metabolismo de nutrientes*. UNED. Madrid.
11. Caplice, E. & Fitzgerald, G. (2002). *Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation*. *Int J Food Microbiol*. 50 (1-2). pp (131-149).
12. Carr, F., Chill, D & Maida, N. (2002). *The lactic acid bacteria: A literature survey*. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4).pp(281-370).
13. Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L & Collins, J. (1998). *Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5).pp (759-768).
14. Chen, L., Remondetto, G., Subirade, M. (2006). *Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems*. *Trends in Food Science and Technology*. 17(5).pp (272-283).
15. Chmielewska, A., & Szajewska, H. (2010) *Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation*. *World J Gastroenterol*; 16.pp (69-75).
16. Cho, Y.H., & Park, J.(2002). *Characteristics of double encapsulated flavor powder prepared by secondary fat coating process*. *J Food Sci* 67 (3).pp(968-973).
17. Cortez, C., Arreola, G., & Escarpulli, G. (2011). *Situación de las enfermedades gastrointestinales en México*. *Enfermedades infecciosas y microbiología, ENF INF MICROBIOL* 31 (4).pp(137-151).
18. Corzo, G., & Gilliland, S.(1999). *Bile Salt Hydrolase Activity of Three Strains of Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 82 (3).pp (472-80).
19. Corzo, N., et al. (2015). *Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficios*. *Nutrición Hospitalaria*, 31.pp(99-18).
20. De Man, J., Rogosa, M., and Sharpe, M. (1960). *A medium for the cultivation of lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.*, 23(1).pp(130).
21. Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, E., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., et al. (2001). *In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings*. *Am J Clin Nutr*; 73 (Suppl).pp (386-392).
22. Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M., López-Munguía, A., Gosset, G., et al. (2008). *Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach*. *Int. J. Food Microbiol*. 124.pp(126-134).

23. Escalante, A., Rodriguez, M., Martínez, A., López, A., Bolivar, F., Gosset, G. (2004) *Characaterizacion of bacterial diversity in pulque traditional mexican alcoholic fermented beverage as determined by 16S rDNA analysis*. FEMS Microbiol Letters :235. pp(237-279).
24. Etxeberria, U., Milagro, F., González-Navarro, C., & Martínez, J. (2016). *Role of gut microbiota in obesity*. Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia, 82(Especial).pp(234–259).
25. Floch, M., Walker, W., Sanders, M., Nieuwdorp, M., & Brenner, D.(2015). *Recommendation for probiotic use update: Proceedings and consensus opinion*. J Clin Gastroenterol;49 Suppl 1.pp(69-73).
26. Ford, AC., Quigley, EM., Lacy, BE., Lembo, AJ., Saito, YA., & Schiller, LR. (2014) *Efficacy of Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics in Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopathic Constipation: Systematic Review and Meta-analysis*. Am J Gastroenterol;109.pp (1547-1561).
27. Fox, PF., Guinee, TP., Cogan, TM., & Mcsweemey. P. (2000) *Fundamentals of cheese sciencie*, An Aspen Publication, USA.pp(588).
28. Fritzen, C., Prudencio, E., Amboni R., et al. (2012). *Microencapsulation of bifidobacterium by spray drying in the presence of prebiotics*. Food Research International; 45.pp(06-312).
29. García-Garibay, M., & López-Munguía, A. (1993). “*Bebidas alcohólicas no destiladas*,” in *Biología Alimentaria*. México: LIMUSA.pp (263–311).
30. Gibson, G., Peobert, H., Loo, J., Rastall, R., & Roberfrod, M. (2004) *Diertary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics*. Nutrition Research Review 17.pp(259-275).
31. Gibson, GR., & Roberfroid, MB. (1995).*Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. J Nutr;125.pp(1401-1412).
32. Gibson, GR., Scott, KP., Rastall, RA., Tuohy, KM., Hotchkiss, A., & et al. (2010) *Dietary prebiotics: current status and new definition*. Food Sci Technol Bull; 7.pp (1-19).
33. Girardin, M., Seidman, E. (2011).*Indications for the use of probiotics in gastrointestinal diseases*. Dig Dis;29.pp(574-87).
34. Gotteland, M., Vizcarra M., & Maury E. (2010).*Effect of milk product containing probiotcs and prebiotics on the digestive function of healthy and constipated subjects*. Rev Chil Nutr; 37:3.pp(340-5).
35. Grandy, G., Medina, M., Soria, R., Terán, CG., & Araya, M. (2010). *Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children*. BMC Infect Dis; 10.pp (253).
36. Guerra, N., Rua, M., & Pastram, L. (2001). *Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey*. Internationl Journal of Food Microbiology.pp(167-28).
37. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos [WGO]. (2011).
38. Guslandi, M., Mezzi, G., Testoni, P. (2000). *Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease*. Dig Dis Sci; 45(7).pp(1462-4).
39. Helgerud, T., Gåserød, O., Fjæreide, T., Andersen, P., & Christian, K. (2010).*Food stabilizers, thickeners and gelling agents*. United Kingdom: WileyBlackwell. pp (50-72).
40. Hernández, C., Aguilera, G., & Castro, G. (2011). *Situación de las enfermedades gastrointestinales en México*. Enf Inf Microbiol, 4.pp(137-151).
41. Holzapfel, H., & Wood, B. (2014). *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy*. British: Wiley Blackwell.
42. Hooper, LV., & Macpherson, AJ. (2010). *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota*. Nat Rev Immunol;10. pp(159-169).
43. Huang, J., Bousvaros, A., Lee, J., Diaz, A., & Davidson, E.(2002). *Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis*. Dig Dis; 47(11).pp(2625-34).
44. Huang, R., Wang, K., & Hu, J. (2016). *Effect of probiotics on depression: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*.Nutrients;8.pp (483).
45. Huerta. R. (2010) *Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos*. Facultad de ciencias agropecuarias: 8(1).
46. Hyronimus, B., Marrec, C., Hadj, A., & Deschamps, A. (2000). *Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology 61.pp(193–197).

47. IOM (Institute of Medicine). (2013). *The human microbiome, diet , and health: Workshop summary*. (The National Academies Press, Ed.). Washington, DC.
48. Islam, S (2016). *Clinical uses of probiotics*. Medicine (Baltimore);95(5).
49. Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P., & Arvilommi, H., et al (2001). *Probiotics: effects on immunity*. Am. J. Clin. Nutr., 73.pp(444-450).
50. Jennings, J., Antrobus, KL., Atencio, SJ., Glavich, E., Johnson, R., & Loffler, G., et al. (2005). *“Drinking beer in a blissful mood”: alcohol production, operational chains, and feasting in the Ancient World*. Curr. Anthropol. 46.pp(275–303).
51. Jonkers, D., Penders, J., Masclee, A., Pierik, M.(2012) *Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients*. Drugs; 72.pp(803-823).
52. Juárez, A., Jímenes, M.(2013). *Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados*. Temas selectos de ingeniería de alimentos 7-2.pp(15-24).
53. Kailasapathy, K. (2006). *Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt*. Lebensmittel-wissenschaft Technologie 39:10.pp (1221-1227).
54. Kavita, R., Suresh. & Babu, V. (2015). *Probiotics, prebiotics and synbiotics*. J Food Sci Technol, 52:12.pp(7577-7587).
55. Kechaou, N., Chain, F., Gratadoux, JJ., Blugeon, S., Bertho, N., Chevalier, C., et al. (2013). *Identification of one novel candidate probiotic Lactobacillus plantarum strain active against influenza virus infection in mice by a large-scale screening*. Appl Environ Microbiol 79:5.pp(1491-1499).
56. Khagwai, N., Sharma, P., & Chand, D. (2014). *Screening and evaluation of Lactobacillus spp. for the development of potential probiotics*. African Journal of Microbiology Research. 8(15).pp(1573-1579).
57. Kich, M., Vincenzi A., Majolo, F. Volken C., Goettert et al. (2016). *Probiotic: effectiveness nutrition in cancer treatment and prevention*. Nutr Hosp; 33.pp(1430-1437).
58. Kotzampassi, K, Giamarellos, EJ., Voudouris, A., Kazamias, P., & Eleftheriadis E. (2006) *Benefits of a Synbiotic Formula in Critically Ill Trauma Patients: Early Results of a Randomized Controlled Trial*. World J Surg; 30.pp (1848-1855).
59. Lamiki, P., Tsuchiya, J., Pathak, S., Okura, R., Solimene, U., & Jain S, et al. (2010). *Probiotics in diverticular disease of the colon: an open label study*. J Gastrointest Liver Dis; 19.pp(31-6).
60. López, A., Deladino, L., Navarro, A., & Martino, M. (2012) *Encapsulación de compuestos bioactivos con alginatos para la industria de alimentos*. Ciencia y Tecnología Alimentaria; 10.pp(18-27).
61. Lopo, P.B. Gonzales, A.C. y Maestro, G.A. (2012). *Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones*. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología, 3(1).pp(135-143).
62. Makinen, M., & Bigret, A. (1993). *Industrial use and production of lactic bacteria*. New York:EEUU.
63. Malaguarrera, G., Leggio, F., Vacante, M., & Motta, M., et al. (2012). *Probiotics in the gastrointestinal diseases of the elderly*. J Nutr Health Aging. ;16.pp(402–10).
64. Manzano, C., Estupiñán, G., & Poveda, E (2012). *Efectos clínicos de los probióticos: que dice la evidencia*. Rev Chil Nutr; 39,1.
65. Marroquin, S.(1956). *Estudios sobre la microbiología del pulque*. En Revista hispano-americana de ciencias puras y aplicadas. 15(6).pp(129-140).
66. Martín, M., Morales, ME., Gallardo, V., & Ruiz, M.(2009). *Técnicas de micro-encapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos*. Ars Pharm 50 (1): pp(43-50).
67. Mataix-Verdu, J.(2009). *Tratado de Nutrición y Alimentación* (Vol.1). Barcelona: OCEANO/ergon.
68. Mohammadi, R., & et al. (2011). *Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties*. Ann Microbiol, 61.pp(411–424).
69. Nguyen, T., Kang, J., Lee, M. (2007). *Characterization of Lactobacillus plantarum PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects*. Int J Food Microbiol; 113(3).pp(358-61).
70. Niedzielin, K., Kordecki, H., Birkenfeld, B. (2001). *A controlled, doubleblind, randomized study on the efficacy of Lactobacillus plantarum299V in patients with irritable bowel syndrome*. Eur J Gastroenterol Hepatol;12.pp(1143-7).
71. Nova, E., Wärnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz, LE., Romeo, J., et al. (2007) *Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life*. Br J Nutr; Suppl 1.pp(90-5).
72. O’Hara, M., & Shanahan, F.(2007). *Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases*. Scientific World,7.pp(31-46).

73. Olveira, G., & González, I. (2007). *Probióticos y prebióticos en la práctica clínica*. Nutr Hosp;22.pp(26-34).
74. Padio, V., Krzysatof, N., Waliszewski, K., & Robledo, G. (2000). *Los probióticos y su futuro*. Arch Latinoam Nutr-pp(6-10).
75. Parkash, S., Tomaro, D., Saha, S., & Cantor, A. (2011). *The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulation bacteria cells*. Journal of Biomedicine and Biotechnology,
76. Parkes, GC., Sanderson, JD., & Whelan, K. (2010). *Treating irritable bowel syndrome with probiotics: the evidence*. Proc Nutr Soc 69.pp(187-194).
77. Parsons, JR., & Darling, JA. (2000). Maguey (*Agave spp.*) utilization in Mesoamerican civilization: a case for Precolumbian "pastoralism." Bol. Soc:66.pp(81-91).
78. Patel, A., Reeta, R., & Pandey et al. (2010). *Probiotic bile salt hidrolase: current developments and perspectives*. App Biotechnol; 162.pp(166-180).
79. Patel, A., Singhanian, R., Pandey, A., & Chincholkar, S. (2010). *Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives*. Appl Biochem Bitechmol 162(1).pp(166-80).
80. Pedroza, R (2002). *Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas*
81. Peña, A., Díaz, L., Medina, A., Labastida, C., et al(2004).Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid phase microextraction-gas chromatography. J Chromatography,1027.pp(131-136).
82. Penner, R., Fedorar, R., & Madsen, K. (2005). *Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases*. Curr Opin Pharmacol;5.pp(596-603).
83. Pérez, H., Bueno, G., & Brizuela, A., et al (2013). *Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos*. CIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar; 47, 1, pp(14-25).
84. Ra Choi, B., Young, E., Jin, H., & Sook, M.(2018). *Role of Synbiotics Containing D-Allulose in the Alteration of Body Fat and Hepatic Lipids in Diet-Induced Obese Mice*.Nutrients:10(11).pp(1797).
85. Rajilić-Stojanović, M., Hans, G., Tims, S., Zoetendal, E., & Willem, B.(2013). *Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition*. Environmental Microbiology, 15(4).pp(1146–1159).
86. Reid, G., Jass, J., Sebulsky MT & McCormick, JK.(2003).*Potential uses of probiotics in clinical practice*. Clin Microbiol Rev; 16.pp (658- 672).
87. Roberfroid, M et al. (2014) *Prebiotics effects: metabolic and health benefits*. Brit J Nutr; 104.
88. Rodriguez, S., Giraldo, G. & Montes, L. (2016). *Encapsulación de alimentos probióticos mediante Liofilización en presencia de prebióticos*. Información tecnológica,27.
89. Rodríguez, Y., Rojas, A., Rodríguez, S (2016). *Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias*; 15(2).pp (106-115).
90. Rokka, S., & Rantamäki, P. (2010).*Protecting probiótica bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications*. Eur. Food Technol. 231: pp(1-12).
91. Rolfe, RD.(2001). *The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health*. J Nutr; 130.pp(396-402).
92. Rome, J., Nova, E., Wänberg, J., Gómez, S., Díaz, L., et al. (2010). *Inmunomodulatory effect o fibres, probiotics and synbiotics in different life-stages*. Nutr Hosp; 25.pp(341-9).
93. Rondon, L; Añez, M; et al (2015). *Probióticos: Generalidades*; 78 (4).pp(123 – 128).
94. Sáez-Lara, MJ., Robles-Sanchez, C., Ruiz-Ojeda, FJ., Plaza-Diaz, J., & Gil, A. (2016). *Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: A review of human clinical trials*. International Journal of Molecular Sciences, 17(6).pp(1–15).
95. Salazar, B., & Montoya, O. (2005) *Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud*. Vitae, 10.pp(20-26).
96. Salminen, S., Isolauri, E., & Salminen, E., (1998). *Clinical uses of coagulans probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: succesful strains and future challenges*. Antonie van Leeuwenhoek 70, 347–358.
97. Sánchez-Marroquin, A. (1967) *Estudios sobre la microbiología del pulque XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida*. Rev. Lat. Microbiol. Parasit. 9.pp(87–90)

98. Sandhu, BK., Paul, SP. (2014) *Irritable bowel syndrome in children: pathogenesis, diagnosis and evidence-based treatment*. World J Gastroenterol : 28;20.pp(6013-23).
99. Savadogo et al.(2006) *Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview*. African Journal of Biotechnology. Vol 5. pp(678-683).
100. Sawaz, T., Halabi, S., Hernaez R., Carey, W., & Cho W. (2015). *Patients receiving prebiotics and probiotics before liver transplntation develop fewer infections tan controls: A systematic review and meta-anaylis*. Clin Gastroenterol Hepatol; 13(9).pp(1467-74).
101. Sazawal, S., Hiremath, G., & Dhingra, U.(2006). *Efficacy of probiotics in prevention of accute diarrhoea: A meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials*. Lancet Infect Dis; 6.pp(374-82).
102. Serata, M., Kiwaki, M., & Tohru, I. (2016). *Functional analysis of a novel hydrogen peroxide resistance gene in Lactobacillus casei strain Shirota*. Microbiology,162.pp(1885–1894).
103. Serna, L., & Vallejo, V. (2013). *Probiotic encapsulation*. African Journal of microbiology research, 7(40).
104. Suarez, J. (2015), *Microbiota autóctona,probióticos y prebióticos*. Nutrición hospitalaria;31(Suppl 1).pp(3-9).
105. Szajewska, H., Ruszcynski, M., & Radzikoski, A.(2006). *Probiotics in the prevention of acute diarrhoea: A meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials*. J Pediatr 149.pp(367-72).
106. Talwalkar, A. & Kailasaphaty, K. (2003). *Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria*. Australian Journal of Dairy Technology. 58(1).pp(36-39).
107. Tamboli, CP., Neut, C., Desreumaux, P., & Colombel, F.(2004).*Dysbiosis in inflammatory bowel disease*. Gut. 1.pp(1-4).
108. Tesis: Ávila S. (2011). *Efecto del agente encapsulante en la viabilidad de un microorganismo probiótico (Lactobacillus rhamnosus B442)*. (Licenciatura). Instituto politécnico nacional, Yautepec – Morelos.
109. Tesis: Rodriguez, M.(2009) (Doctorado). *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiotica e inmunomoduladora*. Universidad Autónoma de Barcelona
110. Tripathi, M., & Siri, S. *Probiotic functioonal foods: Survival during and storage*. Journal of Functional Foods: 9.pp(225.241).
111. Valdovinos et al.(2017). *Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología*. Revista de gastroenterología de México, 82, 156-178.
112. Vásquez, M., Rodríguez, J., Lira, B., Cueva, S., Ayón, M., & Mallma, Y.(2012). *Ph de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad*. Rev. investig. vet. Perú: Lima.
113. Vazques, S., Suarez, H., & Zapata, S. (2009). *Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne*. Revista chilena de nutrición. 36 (1).pp(64-71).
114. Vázquez, S., Suárez, H., and Zapata, S. (2009). *Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne*. Revista Chilena de Nutrición, 36(1).pp(64-7).
115. Velázquez, A., Covatzin, D., Dolores, M., Vela, G.(2018). *Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco*. 13(1).pp(165-178).
116. Vizoso, MG., Franz, CMAP., Schillinger, U & Holzapfel, WH. (2006). *Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products*. International Journal of Food Microbiology (109).pp (205-214).
117. Wang, Q., Dong, J, Yimin, Z.(2012). *Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterolitis and mortality in preterm ver low birth*

- weight infants: An updated meta-analysis of 20 randomized controlled trials. J Pediatr Surg; 47.pp(241-8).*
118. Wang, Z., Gao, Q., & Fang, J (2013). *Meta-analysis of the efficacy and safety os Lactobacillus-containing and Bifidobacterium-containing probiotic compound preparation in Helicobacter pylori eradication therapu. J Clin Gastroenterol;47.pp(25-32).*
 119. Wilkins, T., & Sequoia, J (2017). *Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. Am Fam Physician; 96(3).pp(170-178).*
 120. Wilson, I., & Pineda, A. (1963). *Pineda's report on the beverages of New Spain. Ariz. West 5, 79–90.*
 121. Zago, M., et al (2011). *Characterizacion and probiotic potencial of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. Food Microbiology 28.pp(1033-1040).*

CAPÍTULO VII ANEXOS

1. Resistencia de 4 bacterias ácido lácticas en diferentes concentraciones de pH sin encapsular y encapsuladas

1.1. *Lactobacillus brevis*, densidad óptica final sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de $\alpha = 0.05$
 significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	5	pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	4	0.014468	0.003617	25.18	0.000
Error	7	0.001005	0.000144		
Total	11	0.015473			

Resumen del modelo

R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R-cuad. cuad. (pred)	R- *
0.0119841	93.50%	89.79%	*

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 2	3	0.44800	0.01249	(0.43164, 0.46436)
pH 3	3	0.46967	0.01201	(0.45331, 0.48603)

pH	3	0.40867	0.00764	(0.39231,
	4			0.42503)
pH	2	0.3720	0.0170	(0.3520,
	5			0.3920)
pH	1	0.4020	*	(0.3737,
	5			0.4303)

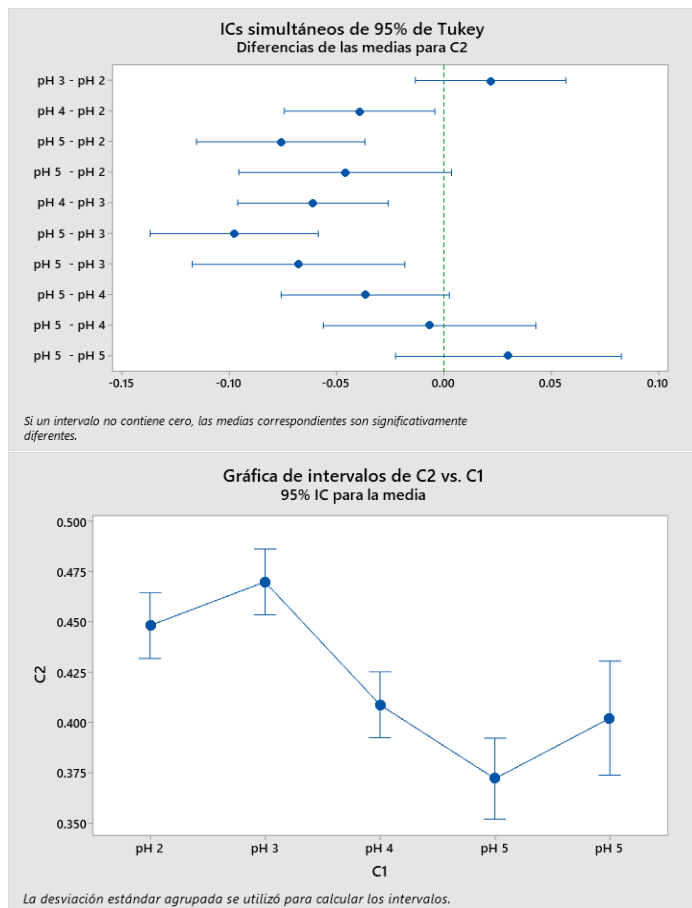
Desv.Est. agrupada = 0.0119841

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1 N Media Agrupación

pH	3	0.46967	A
	3		
pH	3	0.44800	A B
	2		
pH	3	0.40867	C
	4		
pH	1	0.4020	B C
	5		
pH	2	0.3720	C
	5		



1.1.1 *Lactobacillus brevis*, densidad óptica inicial encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de $\alpha = 0.05$
 significancia

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 5 pH 1.6, pH 2.3, pH 3.3, pH 3.3, pH 4.3

Análisis de Varianza

		SC	MC	Valor	Valor
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	F	p
C1	4	0.060719	0.015180	462.33	0.000
Error	3	0.000098	0.000033		
Total	7	0.060818			

Resumen del modelo

	R-	R-	R-
S	cuad.	cuad.	cuad.
	(ajustado)	(pred)	
0.0057300	99.84%	99.62%	*

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 1.6	2	0.15500	0.00707	(0.14211, 0.16789)
pH 2.3	2	0.20800	0.00283	(0.19511, 0.22089)
pH 3.3	1	0.3450	*	(0.3268, 0.3632)
pH 3.3	1	0.3300	*	(0.3118, 0.3482)
pH 4.3	2	0.36350	0.00636	(0.35061, 0.37639)

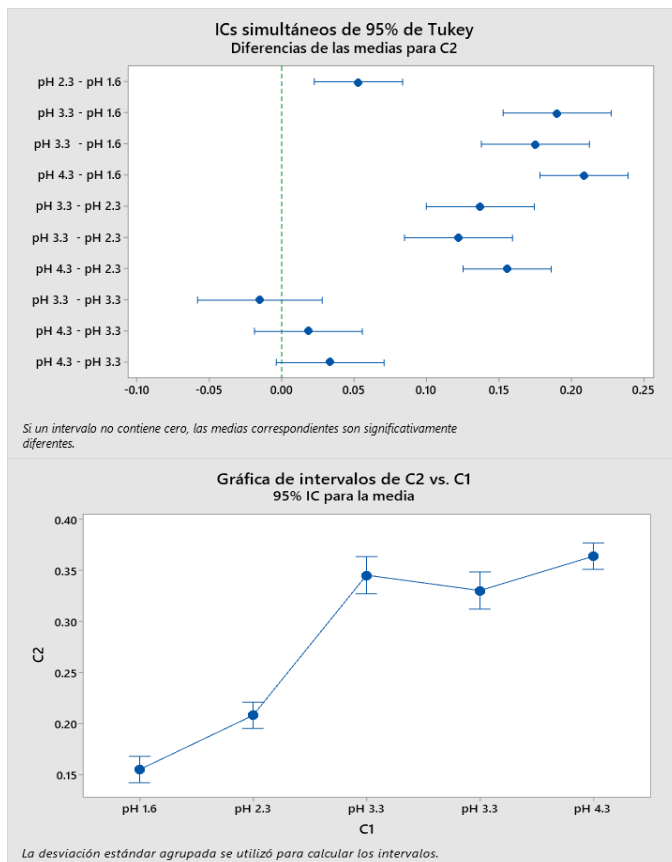
Desv.Est. agrupada = 0.00573004

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1 N Media Agrupación

pH	2	0.36350	A
4.3			
pH	1	0.3450	A
3.3			
pH	1	0.3300	A
3.3			
pH	2	0.20800	B
2.3			
pH	2	0.15500	C
1.6			



1.1.2 *Lactobacillus brevis*, densidad óptica final encapsulado

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	5 pH 1.6, pH 2.3, pH 3.3, pH 3.3, pH 4.3
----	---

Análisis de Varianza

		SC	MC	Valor	Valor
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	F	p
C1	4	3.84992	0.962479	7568.65	0.000
Error	3	0.00038	0.000127		
Total	7	3.85030			

Resumen del modelo

	R-	R-	R-
S	cuad. (ajustado)	cuad. (pred)	cuad.
0.0112768	99.99%	99.98%	*

Medias

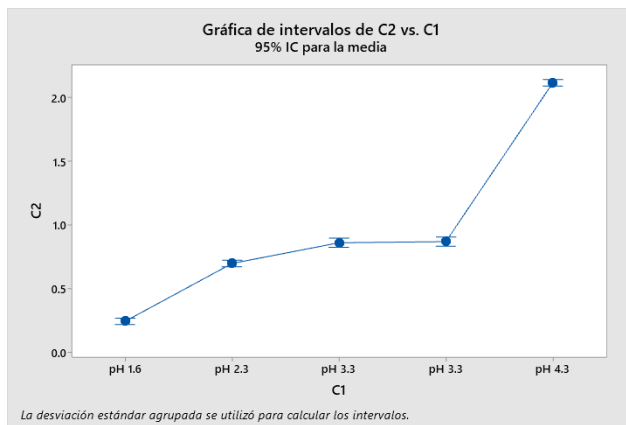
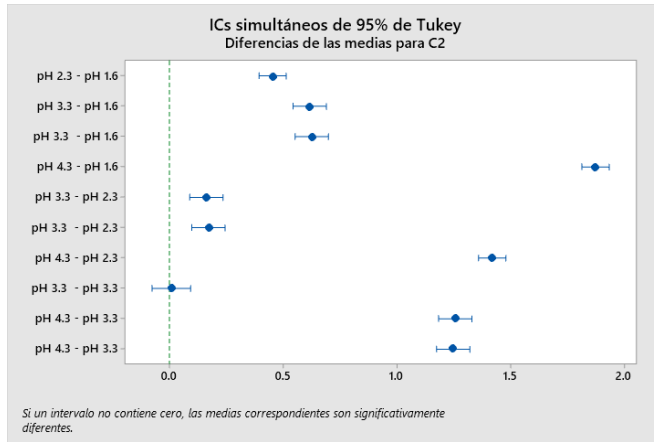
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 1.6	2	0.24250	0.00354	(0.21712, 0.26788)
pH 2.3	2	0.69650	0.00212	(0.67112, 0.72188)
pH 3.3	1	0.8590	*	(0.8231, 0.8949)
pH 3.3	1	0.8680	*	(0.8321, 0.9039)
pH 4.3	2	2.1145	0.0191	(2.0891, 2.1399)

Desv.Est. agrupada = 0.0112768

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
pH 4.3	2	2.1145	A
pH 3.3	1	0.8680	B
pH 3.3	1	0.8590	B
pH 2.3	2	0.69650	C
pH 1.6	2	0.24250	D



1.2. *Lactobacillus paracasei*, densidad óptica inicial sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	5 pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 5
----	--------------------------------

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

C1	4	0.024044	0.006011	21.29	0.001
Error	7	0.001976	0.000282		
Total	11	0.026021			

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0168035	92.40%	88.06% *

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
pH 2	3	0.42467	0.01102	(0.40173, 0.44761)
pH 3	3	0.46867	0.01457	(0.44573, 0.49161)
pH 4	3	0.37433	0.01012	(0.35139, 0.39727)
pH 5	2	0.3485	0.0332	(0.3204, 0.3766)
pH 5	1	0.3660	*	(0.3263, 0.4057)

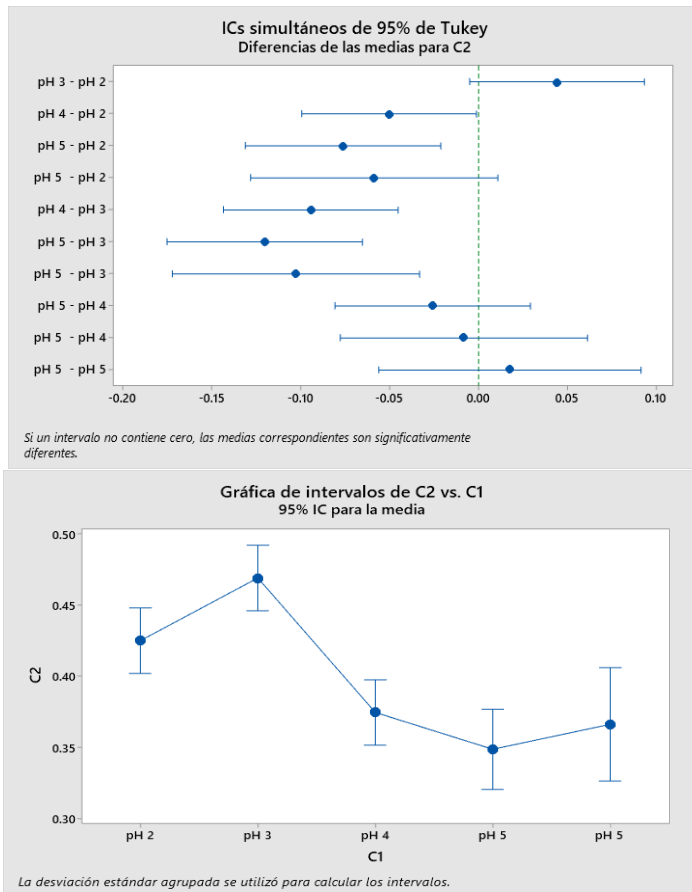
Desv.Est. agrupada = 0.0168035

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
pH 3	3	0.46867	A
pH 2	3	0.42467	A B
pH 4	3	0.37433	C
pH 5	1	0.3660	B C
pH 5	2	0.3485	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



1.2.1 *Lactobacillus paracasei* densidad óptica final, sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 5 pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	4	1.46226	0.365566	107.47	0.000

Error 7 0.02381 0.003401
 Total 11 1.48607

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0583224	98.40%	97.48% *

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 2	3	0.5733	0.0668	(0.4937, 0.6530)
pH 3	3	0.8837	0.0605	(0.8040, 0.9633)
pH 4	3	1.1047	0.0611	(1.0250, 1.1843)
pH 5	2	1.56450	0.01061	(1.46698, 1.66202)
pH 5	1	1.460	*	(1.322, 1.598)

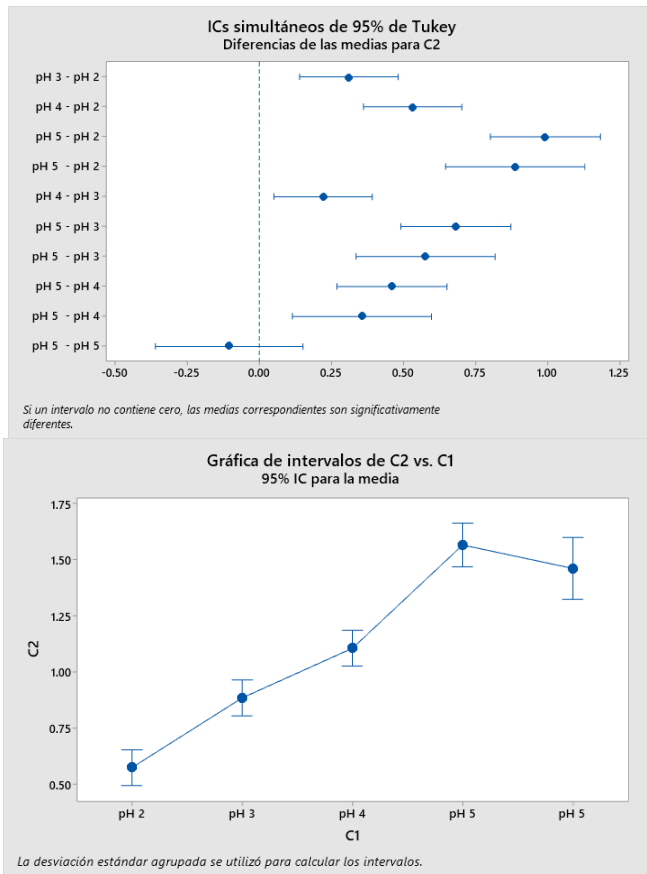
Desv.Est. agrupada = 0.058322

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
pH 5	2	1.56450	A
pH 5	1	1.460	A
pH 4	3	1.1047	B
pH 3	3	0.8837	C
pH 2	3	0.5733	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



1.2.2 *Lactobacillus paracasei*, densidad óptica inicial encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor	Niveles	Valores
C1	5	pH 1.6, pH 2.3, pH 3.3, pH 3.3, pH 4.3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

C1	4	0.062585	0.015646	507.45	0.000
Error	3	0.000092	0.000031		
Total	7	0.062678			

Resumen del modelo

	R-	R-cuad.	cuad.
S	cuad. (ajustado)	(pred)	
0.0055528	99.85%	99.66%	*

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 1.6	2	0.11400	0.00141	(0.10150, 0.12650)
pH 2.3	2	0.21450	0.00636	(0.20200, 0.22700)
pH 3.3	1	0.2300	*	(0.2123, 0.2477)
pH 3.3	1	0.2500	*	(0.2323, 0.2677)
pH 4.3	2	0.36200	0.00707	(0.34950, 0.37450)

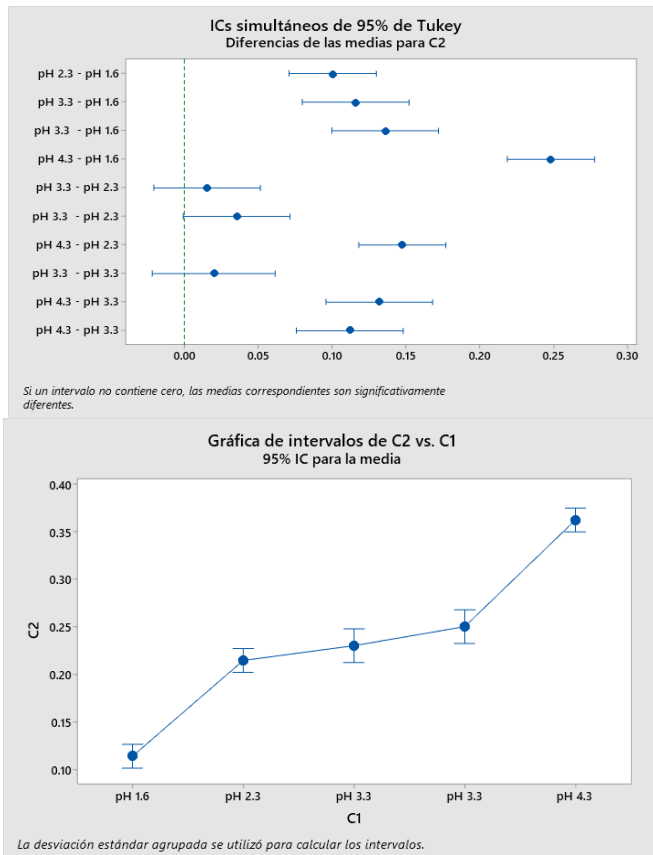
Desv.Est. agrupada = 0.00555278

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
pH 4.3	2	0.36200	A
pH 3.3	1	0.2500	B
pH 3.3	1	0.2300	B
pH 2.3	2	0.21450	B
pH 1.6	2	0.11400	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



1.2.3 *Lactobacillus paracasei*, densidad óptica final encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 5 pH 1.6, pH 2.3, pH 3.3, pH 3.3, pH 4.3

Análisis de Varianza

	SC	MC	Valor	
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	Valor F p
C1	4	3.62537	0.906341	16330.47 0.000
Error	3	0.00017	0.000056	
Total	7	3.62553		

Resumen del modelo

			R-
	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0074498	100.00%	99.99%	*

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 1.6	2	0.21350	0.00919	(0.19674, 0.23026)
pH 2.3	2	0.51400	0.00566	(0.49724, 0.53076)
pH 3.3	1	0.9520	*	(0.9283, 0.9757)
pH 3.3	1	0.9680	*	(0.9443, 0.9917)
pH 4.3	2	1.99100	0.00707	(1.97424, 2.00776)

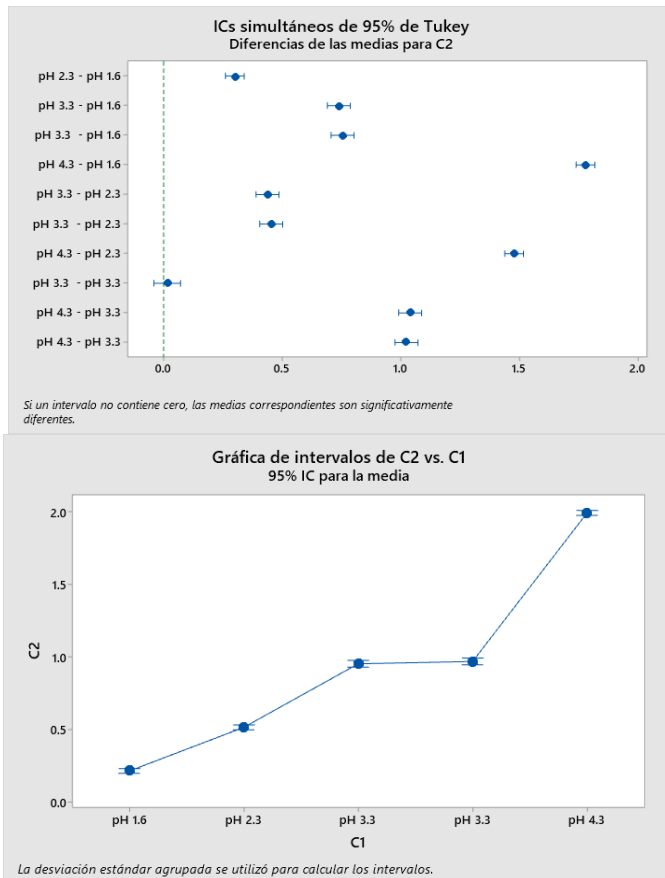
Desv.Est. agrupada = 0.00744983

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
pH 4.3	2	1.99100	A
pH 3.3	1	0.9680	B
pH 3.3	1	0.9520	B
pH 2.3	2	0.51400	C
pH 1.6	2	0.21350	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



1.3 *Lactobacillus plantarum*, densidad óptica inicial sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de $\alpha = 0.05$
 significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	5 pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 5
----	--------------------------------

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	4	0.056842	0.014210	61.26	0.000

Error	7	0.001624	0.000232
Total	11	0.058466	

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0152308	97.22%	95.64% *

Medias

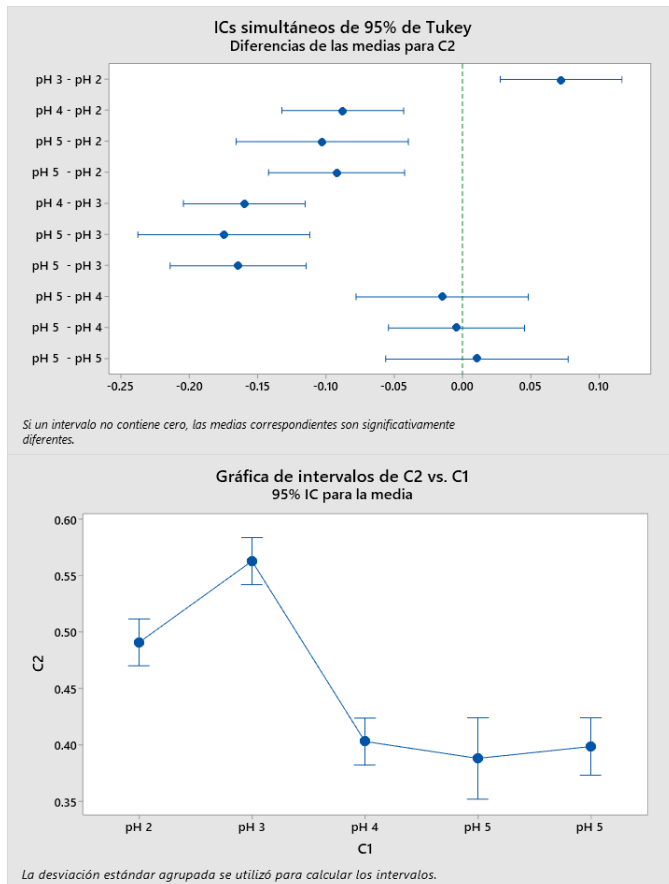
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 2	3	0.49067	0.00451	(0.46987, 0.51146)
pH 3	3	0.5627	0.0225	(0.5419, 0.5835)
pH 4	3	0.40300	0.01646	(0.38221, 0.42379)
pH 5	1	0.3880	*	(0.3520, 0.4240)
pH 5	2	0.39850	0.00495	(0.37303, 0.42397)

Desv.Est. agrupada = 0.0152308

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
pH 3	3	0.5627	A
pH 2	3	0.49067	B
pH 4	3	0.40300	C
pH 5	2	0.39850	C
pH 5	1	0.3880	C



1.3.1 *Lactobacillus plantarum*, densidad óptica final sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor	Niveles	Valores
C1	5	pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	4	2.60220	0.650550	1212.90	0.000
Error	7	0.00375	0.000536		
Total	11	2.60595			

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0231594	99.86%	99.77% *

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 2	3	0.49833	0.01290	(0.46672, 0.52995)
pH 3	3	0.62133	0.01069	(0.58972, 0.65295)
pH 4	3	1.0533	0.0388	(1.0217, 1.0850)
pH 5	1	1.720	*	(1.665, 1.775)
pH 5	2	1.67250	0.01344	(1.63378, 1.71122)

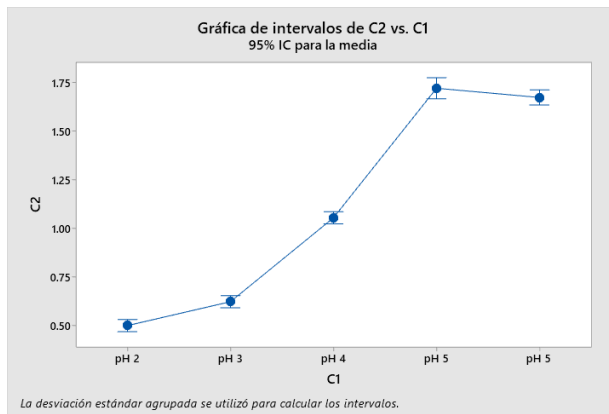
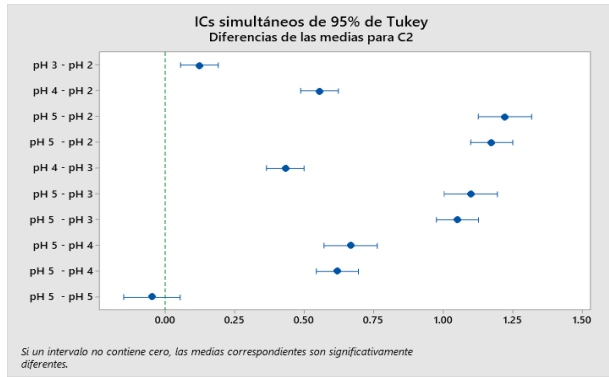
Desv.Est. agrupada = 0.0231594

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
pH 5	1	1.720	A
pH 5	2	1.67250	A
pH 4	3	1.0533	B
pH 3	3	0.62133	C
pH 2	3	0.49833	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



1.3.2 *Lactobacillus plantarum*, densidad óptica inicial encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 5 pH 1.6, pH 2.3, pH 3.3, pH 3.3, pH 4.3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	4	0.095345	0.023836	276.63	0.000
Error	3	0.000259	0.000086		
Total	7	0.095604			

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0092826	99.73%	99.37% *

Medias

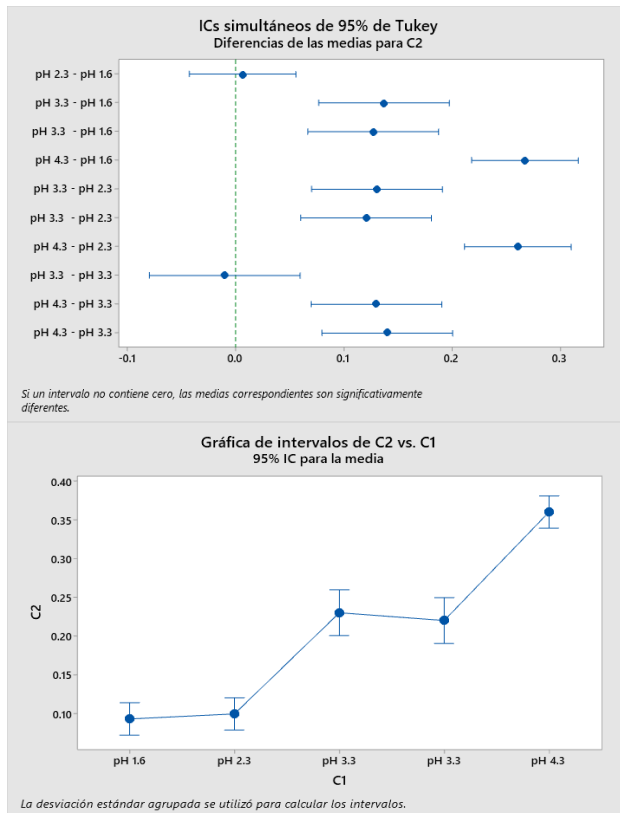
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 1.6	2	0.09300	0.00424	(0.07211, 0.11389)
pH 2.3	2	0.09950	0.00636	(0.07861, 0.12039)
pH 3.3	1	0.2300	*	(0.2005, 0.2595)
pH 3.3	1	0.2200	*	(0.1905, 0.2495)
pH 4.3	2	0.3600	0.0141	(0.3391, 0.3809)

Desv.Est. agrupada = 0.00928260

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
pH 4.3	2	0.3600	A
pH 3.3	1	0.2300	B
pH 3.3	1	0.2200	B
pH 2.3	2	0.09950	C
pH 1.6	2	0.09300	C



1.3.3 *Lactobacillus plantarum*, densidad óptica final encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$ significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 5 pH 1.6, pH 2.3, pH 3.3, pH 3.3, pH 4.3

Análisis de Varianza

		SC	MC		Valor
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	Valor F	p
C1	4	4.25024	1.06256	75004.26	0.000
Error	3	0.00004	0.00001		
Total	7	4.25028			

Resumen del modelo

			R-
		R-cuad.	cuad.
	S	R-cuad. (ajustado)	(pred)
	0.0037639	100.00%	100.00% *

Medias

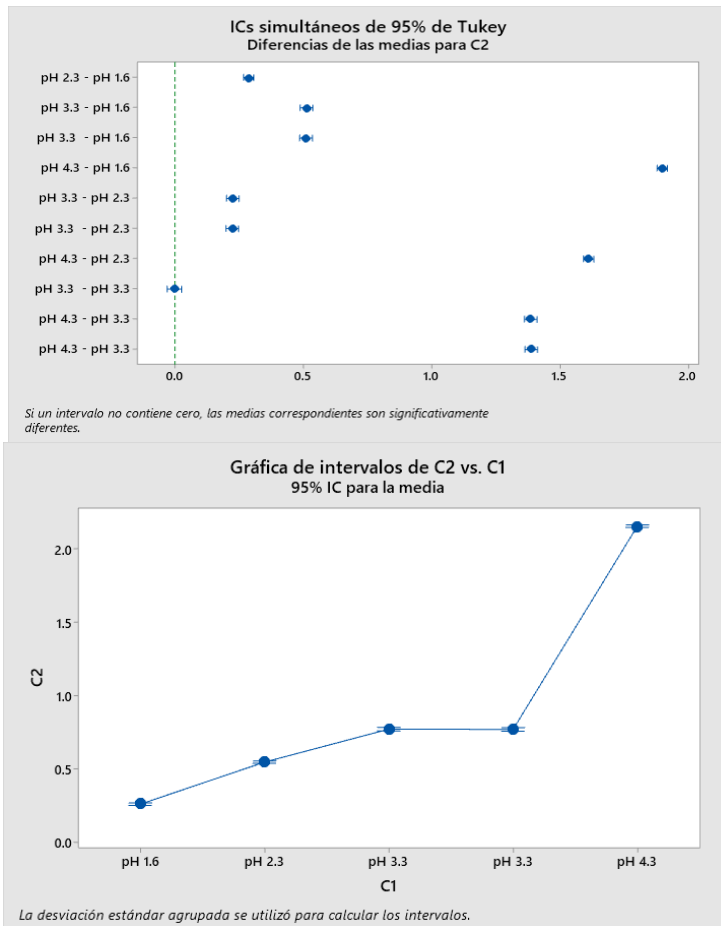
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
pH 1.6	2	0.25800	0.00141	(0.24953, 0.26647)
pH 2.3	2	0.5450	0.0000	(0.5365, 0.5535)
pH 3.3	1	0.7700	*	(0.7580, 0.7820)
pH 3.3	1	0.7680	*	(0.7560, 0.7800)
pH 4.3	2	2.15450	0.00636	(2.14603, 2.16297)

Desv.Est. agrupada = 0.00376386

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
pH 4.3	2	2.15450	A
pH 3.3	1	0.7700	B
pH 3.3	1	0.7680	B
pH 2.3	2	0.5450	C
pH 1.6	2	0.25800	D



1.4 *Lactobacillus casei*, densidad óptica inicial sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor	Niveles	Valores
C1	5	pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 5

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

C1	4	0.006314	0.001578	0.92	0.502
Error	7	0.011981	0.001712		
Total	11	0.018295			

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0413714	34.51%	0.00% *

Medias

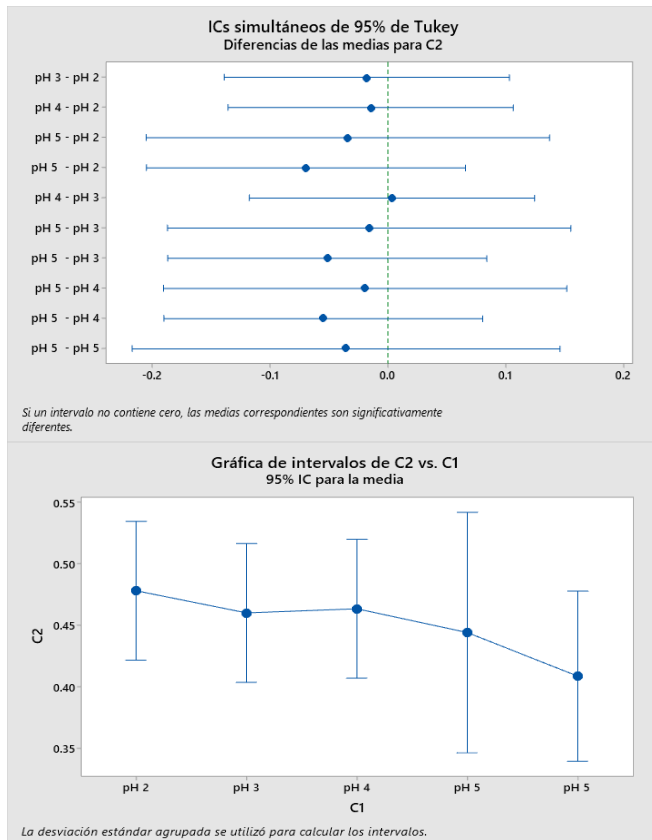
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
pH 2	3	0.4780	0.0350	(0.4215, 0.5345)
pH 3	3	0.4600	0.0599	(0.4035, 0.5165)
pH 4	3	0.4633	0.0240	(0.4069, 0.5198)
pH 5	1	0.4440	*	(0.3462, 0.5418)
pH 5	2	0.4085	0.0346	(0.3393, 0.4777)

Desv.Est. agrupada = 0.0413714

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
pH 2	3	0.4780	A
pH 4	3	0.4633	A
pH 3	3	0.4600	A
pH 5	1	0.4440	A
pH 5	2	0.4085	A



1.4.1 *Lactobacillus casei*, densidad óptica final sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 5 pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 5

Análisis de Varianza

		SC	MC	Valor	Valor
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	F	p
C1	4	2.22161	0.555402	734.96	0.000
Error	7	0.00529	0.000756		
Total	11	2.22690			

Resumen del modelo

		R-	R-cuad.	R-cuad.
	S	cuad. (ajustado)	(pred)	
	0.0274898	99.76%	99.63%	*

Medias

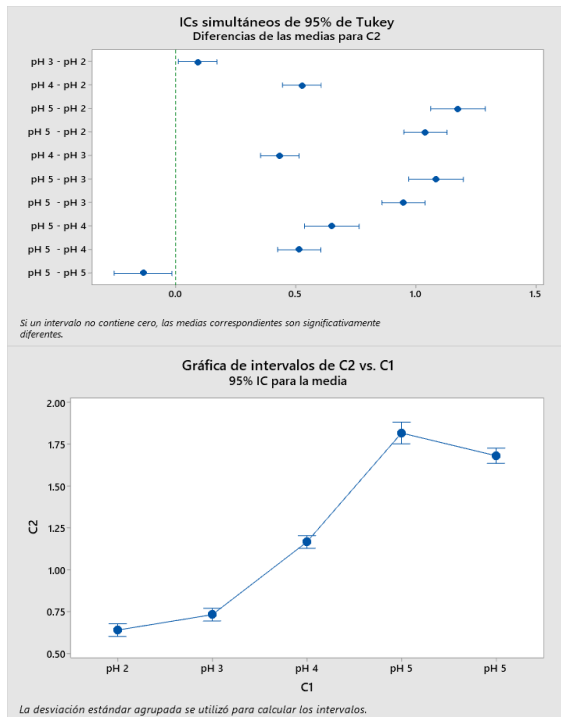
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 2	3	0.6393	0.0311	(0.6018, 0.6769)
pH 3	3	0.73100	0.01277	(0.69347, 0.76853)
pH 4	3	1.16433	0.01601	(1.12680, 1.20186)
pH 5	1	1.814	*	(1.749, 1.879)
pH 5	2	1.6785	0.0502	(1.6325, 1.7245)

Desv.Est. agrupada = 0.0274898

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
pH 5	1	1.814	A
pH 5	2	1.6785	B
pH 4	3	1.16433	C
pH 3	3	0.73100	D
pH 2	3	0.6393	E



1.4.2 *Lactobacillus casei*, densidad óptica inicial encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 6 pH 1.6, pH 2.3, pH 2.3, pH 3.3, pH 3.3, pH 4.3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
C1	5	0.031026	0.006205	3.78	0.222
Error	2	0.003285	0.001642		
Total	7	0.034311			

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0405278	90.43%	66.49% *

Medias

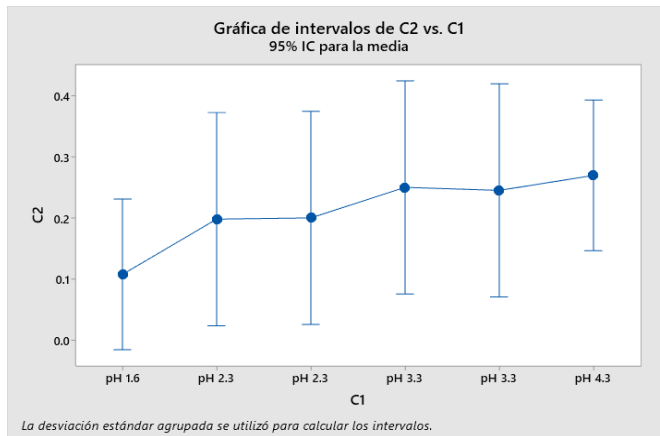
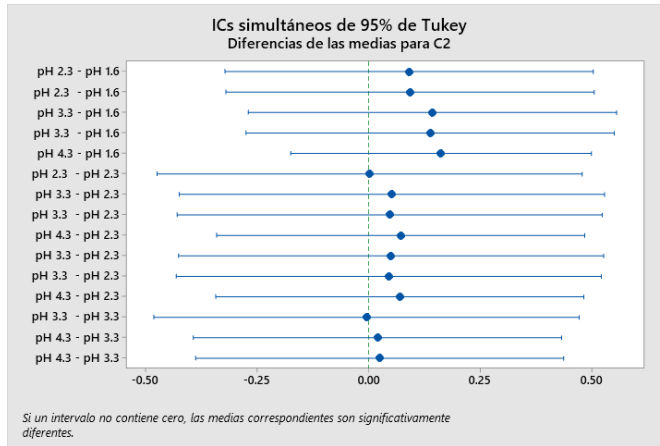
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
pH 1.6	2	0.10750	0.00212	(-0.01580, 0.23080)
pH 2.3	1	0.1980	*	(0.0236, 0.3724)
pH 2.3	1	0.2000	*	(0.0256, 0.3744)
pH 3.3	1	0.2500	*	(0.0756, 0.4244)
pH 3.3	1	0.2450	*	(0.0706, 0.4194)
pH 4.3	2	0.2695	0.0573	(0.1462, 0.3928)

Desv.Est. agrupada = 0.0405278

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media Agrupación
pH 4.3	2	0.2695 A
pH 3.3	1	0.2500 A
pH 3.3	1	0.2450 A
pH 2.3	1	0.2000 A
pH 2.3	1	0.1980 A
pH 1.6	2	0.10750 A



1.4.3 *Lactibacillus casei*, densidad óptica final encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 6 pH 1.6, pH 2.3, pH 2.3, pH 3.3, pH 3.3, pH 4.3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	5	3.52207	0.704414	19432.12	0.000
Error	2	0.00007	0.000036		

Total 7 3.52214

Resumen del modelo

			R-
	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0060208	100.00%	99.99%	*

Medias

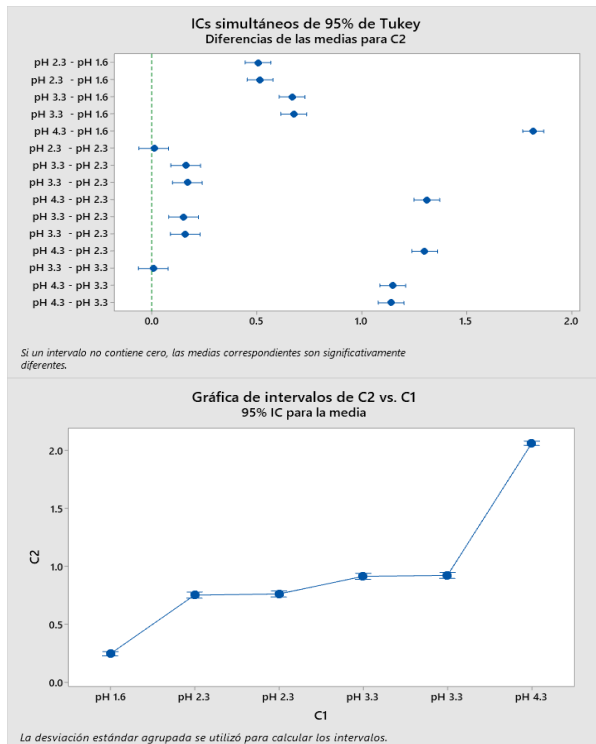
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
pH 1.6	2	0.24400	0.00849	(0.22568, 0.26232)
pH 2.3	1	0.7500	*	(0.7241, 0.7759)
pH 2.3	1	0.7600	*	(0.7341, 0.7859)
pH 3.3	1	0.9120	*	(0.8861, 0.9379)
pH 3.3	1	0.9200	*	(0.8941, 0.9459)
pH 4.3	2	2.05950	0.00071	(2.04118, 2.07782)

Desv.Est. agrupada = 0.00602080

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
pH 4.3	2	2.05950	A
pH 3.3	1	0.9200	B
pH 3.3	1	0.9120	B
pH 2.3	1	0.7600	C
pH 2.3	1	0.7500	C
pH 1.6	2	0.24400	D



2. Resistencia de 4 bacterias ácido lácticas en diferentes concentraciones de sales biliares encapsuladas y no encapsuladas

2.1 *Lactobacillus casei*, densidad óptica inicial sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%
----	---	---------------------------

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	0.000597	0.000299	2.67	0.215
Error	3	0.000335	0.000112		
Total	5	0.000932			

Resumen del modelo

	R-	R- R-cuad.	R- R-cuad.
S	cuad.	(ajustado)	(pred)
0.0105672	64.06%	40.09%	0.00%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	0.01000	0.00424	(-0.01378, 0.03378)
3.00%	2	0.0325	0.0177	(0.0087, 0.0563)
5.00%	2	0.02950	0.00212	(0.00572, 0.05328)

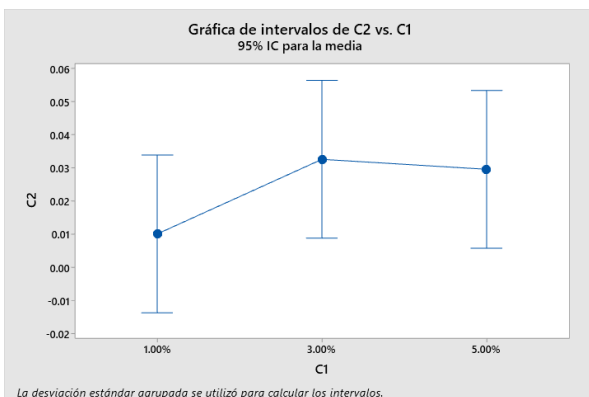
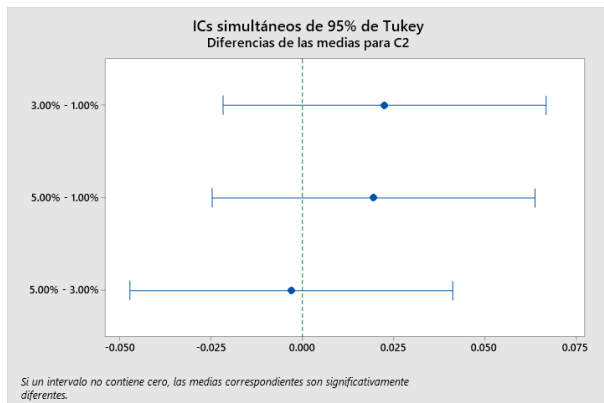
Desv.Est. agrupada = 0.0105672

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
3.00%	2	0.0325	A
5.00%	2	0.02950	A
1.00%	2	0.01000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.1.1 *Lactobacillus casei*, densidad óptica final sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%
----	---	---------------------------

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	0.497266	0.248633	4534.34	0.000
Error	3	0.000165	0.000055		
Total	5	0.497431			

Resumen del modelo

S	R- cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
0.0074050	99.97%	99.94% 99.87%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
1.00%	2	0.72400	0.01273	(0.70734, 0.74066)
3.00%	2	0.49300	0.00141	(0.47634, 0.50966)
5.00%	2	0.031500	0.000707	(0.014836, 0.048164)

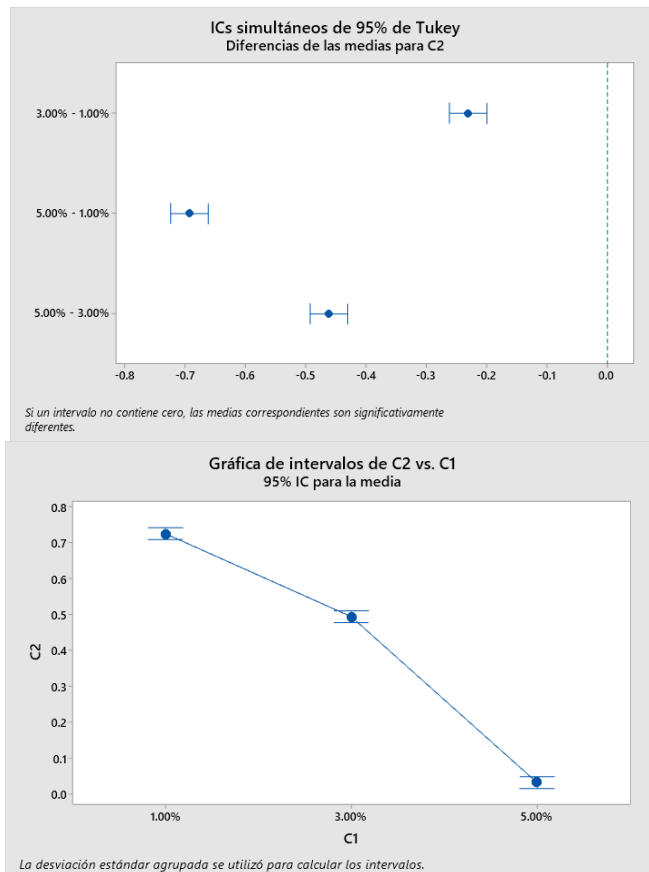
Desv.Est. agrupada = 0.00740495

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media Agrupación
1.00%	2	0.72400 A
3.00%	2	0.49300 B
5.00%	2	0.031500 C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.1.2 *Lactobacillus casei*, densidad óptica inicial encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$ significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	0.010456	0.005228	209.13	0.001
Error	3	0.000075	0.000025		
Total	5	0.010531			

Resumen del modelo

S	R- cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)	R- cuad.
0.005	99.29%	98.81%	97.15%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	0.10750	0.00354	(0.09625, 0.11875)
3.00%	2	0.17600	0.00707	(0.16475, 0.18725)
5.00%	2	0.20750	0.00354	(0.19625, 0.21875)

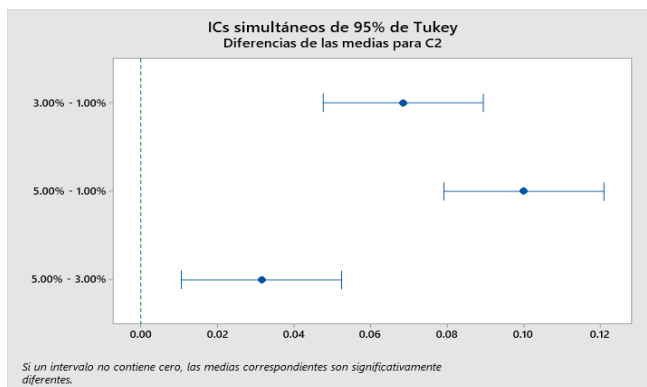
Desv.Est. agrupada = 0.005

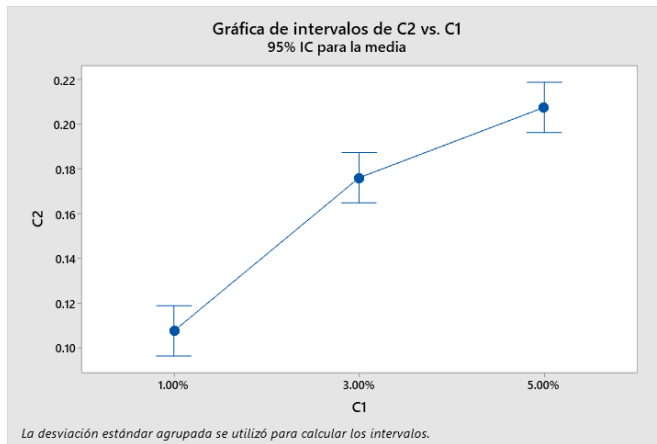
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
5.00%	2	0.20750	A
3.00%	2	0.17600	B
1.00%	2	0.10750	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





2.1.3 *Lactobacillus casei*, densidad óptica final encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 3 1.00%,
3.00%,
5.00%

Análisis de Varianza

	SC	MC	Valor	Valor
Fuente GL	Ajust.	Ajust.	F	p
C1	2 0.717949	0.358974	8380.73	0.000
Error	3 0.000129	0.000043		
Total	5 0.718077			

Resumen del modelo

	R-	R-	R-
S	cuad.	cuad.	cuad.
	cuad.	(ajustado)	(pred)
0.0065447	99.98%	99.97%	99.93%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	1.64100	0.00707	(1.62627, 1.65573)
3.00%	2	1.25000	0.00424	(1.23527, 1.26473)
5.00%	2	0.79450	0.00778	(0.77977, 0.80923)

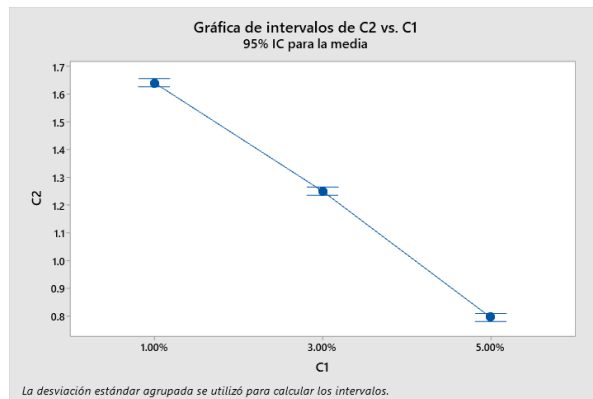
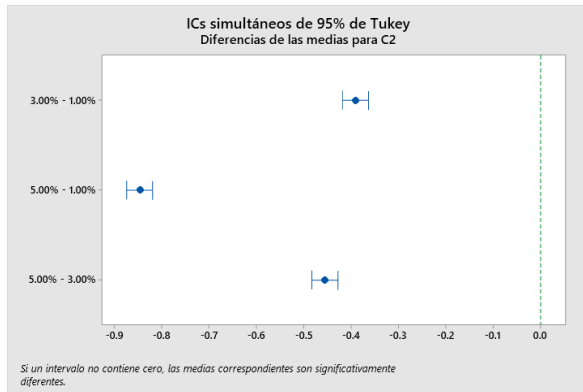
Desv.Est. agrupada = 0.00654472

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
1.00%	2	1.64100	A
3.00%	2	1.25000	B
5.00%	2	0.79450	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.2 *Lactobacillus paracasei*, densidad óptica inicial sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
--------	---------	---------

C1 3 1.00%,
 3.00%,
 5.00%

Análisis de Varianza

		SC	MC	Valor	Valor
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	F	p
C1	2	0.001327	0.000664	11.00	0.042
Error	3	0.000181	0.000060		
Total	5	0.001508			

Resumen del modelo

	R-	R-	R-
S	cuad.	cuad.	cuad.
	(ajustado)	(pred)	
0.0077675	88.00%	80.00%	51.99%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
1.00%	2	0.037500	0.000707	(0.020021, 0.054979)
3.00%	2	0.07000	0.00000	(0.05252, 0.08748)
5.00%	2	0.03950	0.01344	(0.02202, 0.05698)

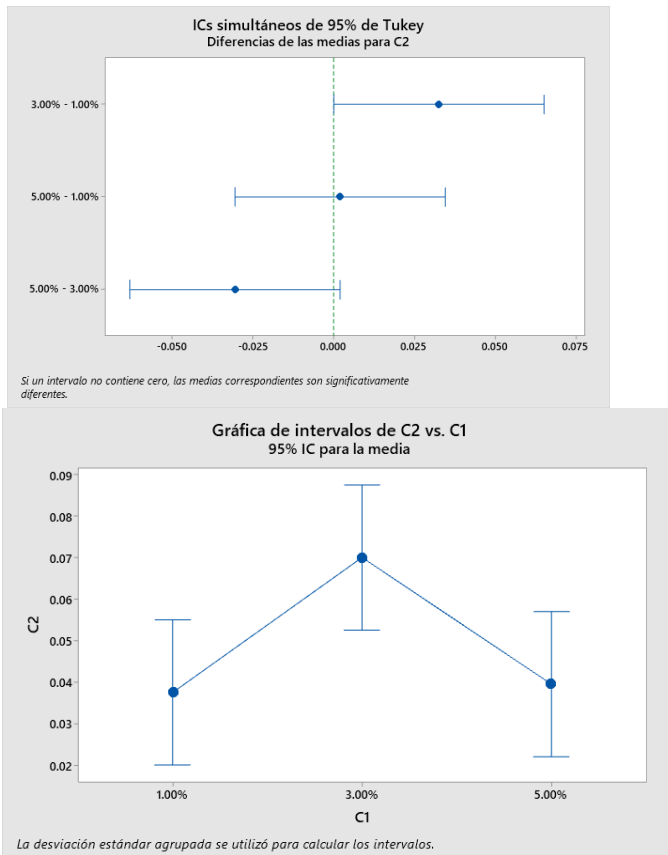
Desv.Est. agrupada = 0.00776745

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
3.00%	2	0.07000	A
5.00%	2	0.03950	A B
1.00%	2	0.037500	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.2.1 *Lactobacillus paracasei*, densidad óptica final sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor	Niveles	Valores
C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	0.505636	0.252818	105.47	0.002
Error	3	0.007191	0.002397		
Total	5	0.512827			

Resumen del modelo

	R-	R-cuad.	R-cuad.
S	cuad. (ajustado)	(pred)	
0.0489592	98.60%	97.66%	94.39%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	0.82750	0.00778	(0.71733, 0.93767)
3.00%	2	0.5775	0.0841	(0.4673, 0.6877)
5.00%	2	0.12600	0.00707	(0.01583, 0.23617)

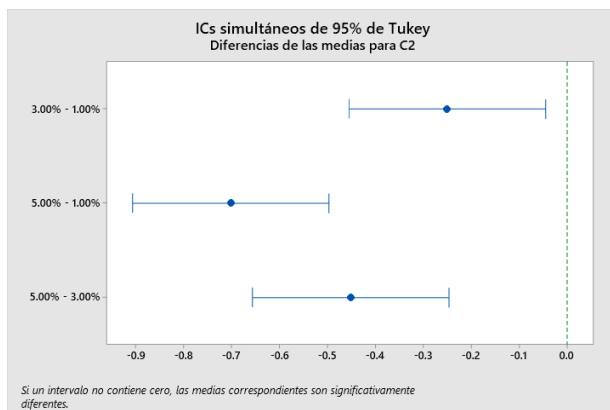
Desv.Est. agrupada = 0.0489592

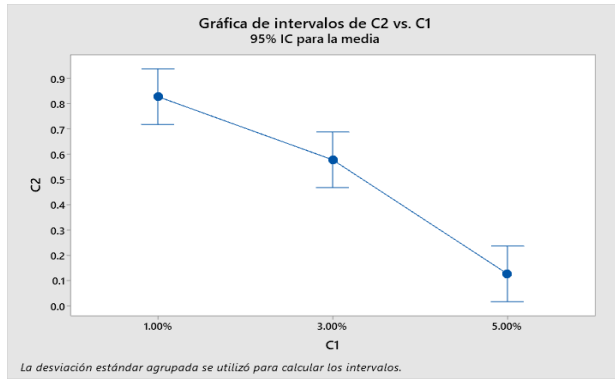
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
1.00%	2	0.82750	A
3.00%	2	0.5775	B
5.00%	2	0.12600	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





2.2.2 *Lactobacillus paracasei*, densidad óptica inicial encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$ significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%
----	---	---------------------------

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor	Valor
		Ajust.	Ajust.	F	p
C1	2	0.002452	0.001226	14.28	0.029
Error	3	0.000257	0.000086		
Total	5	0.002709			

Resumen del modelo

R-S	R-cuad.		
	cuad.	(ajustado)	(pred)
0.0092646	90.50%	84.16%	61.99%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	0.1455	0.0148	(0.1247, 0.1663)
3.00%	2	0.15550	0.00495	(0.13465, 0.17635)
5.00%	2	0.19250	0.00354	(0.17165, 0.21335)

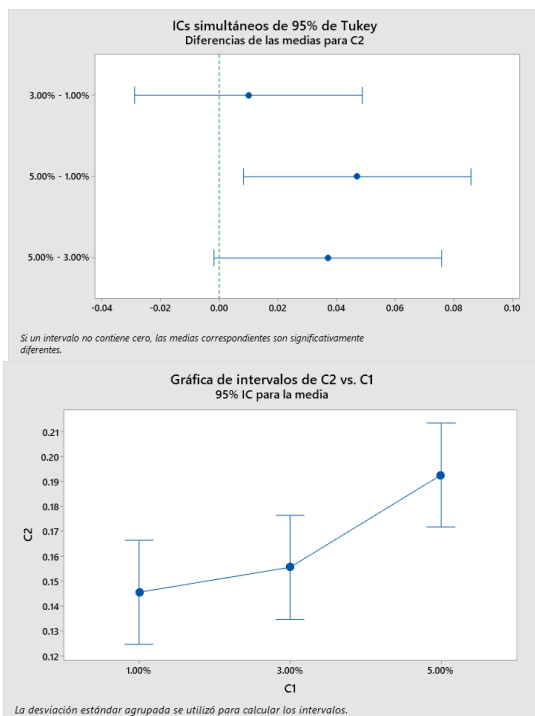
Desv.Est. agrupada = 0.00926463

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
5.00%	2	0.19250	A
3.00%	2	0.15550	A B
1.00%	2	0.1455	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.2.3 *Lactobacillus paracasei*, densidad óptica final encapsulado

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%
----	---	---------------------------

Análisis de Varianza

	SC	MC	Valor	Valor
Fuente GL	Ajust.	Ajust.	F	p
C1	2 0.621994	0.310997	1811.63	0.000
Error	3 0.000515	0.000172		
Total	5 0.622509			

Resumen del modelo

	R-	R-	R-
S	cuad.	cuad.	cuad.
	(ajustado)	(pred)	
0.0131022	99.92%	99.86%	99.67%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	1.5065	0.0177	(1.4770, 1.5360)
3.00%	2	1.21100	0.01273	(1.18152, 1.24048)
5.00%	2	0.72550	0.00636	(0.69602, 0.75498)

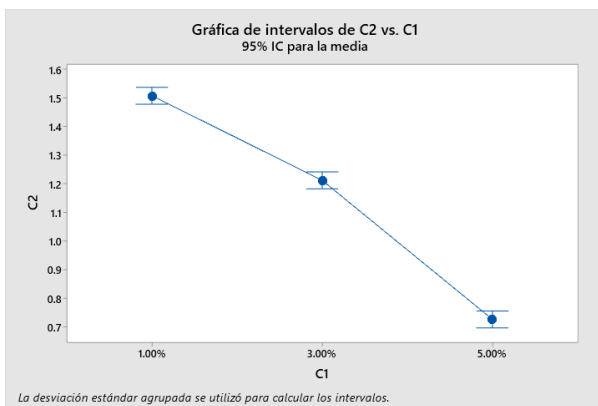
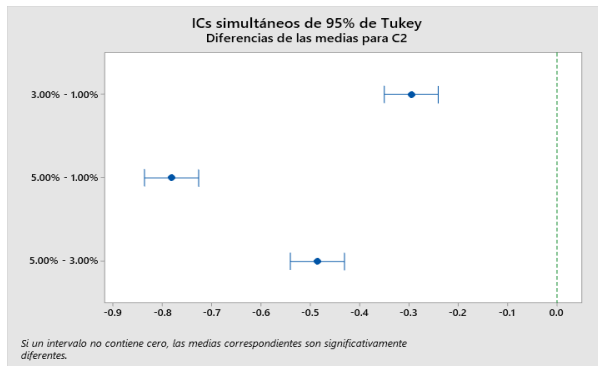
Desv.Est. agrupada = 0.0131022

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
1.00%	2	1.5065	A
3.00%	2	1.21100	B
5.00%	2	0.72550	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.3 *Lactobacillus plantarum*, densidad óptica inicial sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor	Niveles	Valores
C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor	Valor
		Ajust.	Ajust.	F	p
C1	2	0.000785	0.000393	4.46	0.126
Error	3	0.000264	0.000088		

Total 5 0.001049

Resumen del modelo

	R- S	R- cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0093808	74.84%	58.07% 0.00%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	0.06500	0.01131	(0.04389, 0.08611)
3.00%	2	0.09300	0.00283	(0.07189, 0.11411)
5.00%	2	0.07800	0.01131	(0.05689, 0.09911)

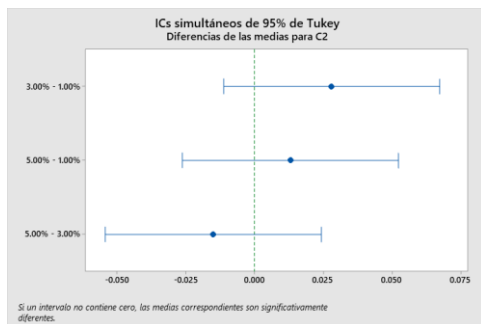
Desv.Est. agrupada = 0.00938083

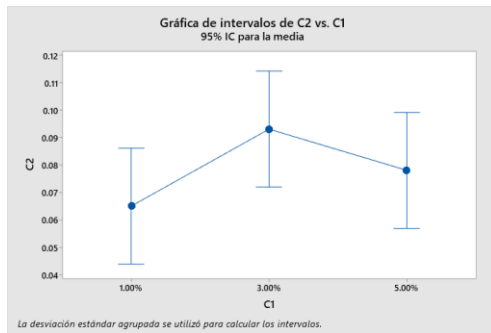
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
3.00%	2	0.09300	A
5.00%	2	0.07800	A
1.00%	2	0.06500	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





2.3.1 *Lactobacillus plantarum*, densidad óptica final sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%
----	---	---------------------------

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	0.087734	0.043867	141.13	0.001
Error	3	0.000933	0.000311		
Total	5	0.088667			

Resumen del modelo

R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R-cuad. cuad. (pred)
0.0176305	98.95%	98.25%
		95.79%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	0.99800	0.00141	(0.95833, 1.03767)
3.00%	2	0.7485	0.0219	(0.7088, 0.7882)

5.00% 2 0.7350 0.0212 (0.6953,
0.7747)

Desv.Est. agrupada = 0.0176305

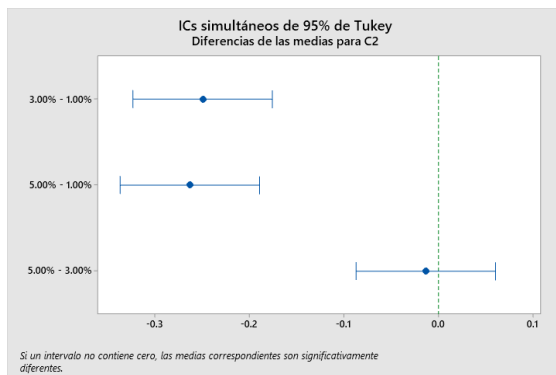
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1 N Media Agrupación

1.00% 2 0.99800 A
3.00% 2 0.7485 B
5.00% 2 0.7350 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.3.2 *Lactobacillus plantarum*, densidad óptica inicial encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$ significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1 3 1.00%,
3.00%,
5.00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	0.002439	0.001220	35.01	0.008

Error	3	0.000105	0.000035
Total	5	0.002544	

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0059020	95.89%	93.15% 83.57%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	0.15200	0.00566	(0.13872, 0.16528)
3.00%	2	0.19550	0.00636	(0.18222, 0.20878)
5.00%	2	0.19400	0.00566	(0.18072, 0.20728)

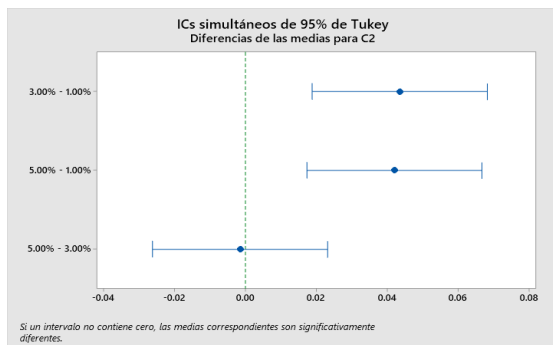
Desv.Est. agrupada = 0.00590198

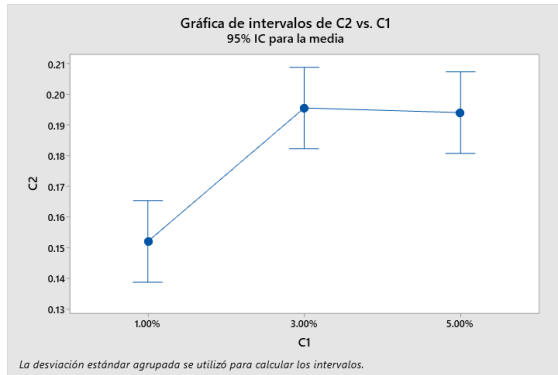
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media Agrupación
3.00%	2	0.19550 A
5.00%	2	0.19400 A
1.00%	2	0.15200 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





2.3.3 *Lactobacillus plantarum*, densidad óptica final encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$ significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%
----	---	---------------------------

Análisis de Varianza

		SC	MC	Valor	Valor
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	F	p
C1	2	1.13562	0.567810	1514.16	0.000
Error	3	0.00112	0.000375		
Total	5	1.13675			

Resumen del modelo

	R-	R-cuad.	R-
S	cuad.	(ajustado)	cuad. (pred)
0.0193649	99.90%	99.84%	99.60%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
----	---	-------	-----------	-----------

1.00%	2	1.5580	0.0255	(1.5144, 1.6016)
3.00%	2	1.3755	0.0191	(1.3319, 1.4191)
5.00%	2	0.55750	0.01061	(0.51392, 0.60108)

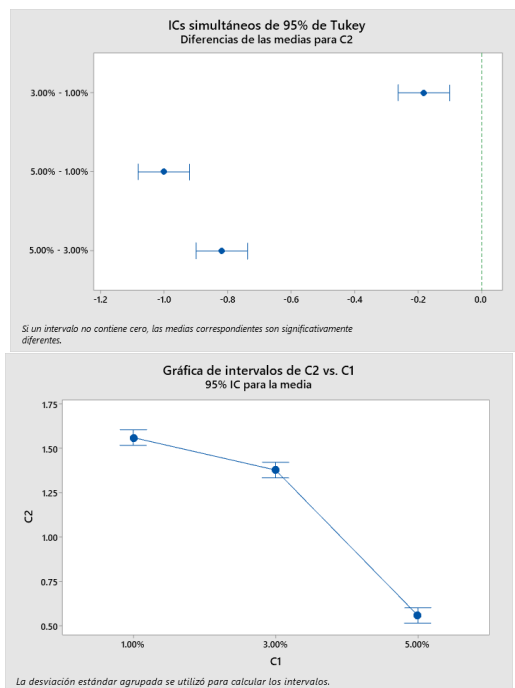
Desv.Est. agrupada = 0.0193649

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>C1</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
1.00%	2	1.5580	A
3.00%	2	1.3755	B
5.00%	2	0.55750	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.4 *Lactobacillus brevis*, densidad óptica inicial sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%
----	---	---------------------------

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	0.001870	0.000935	35.74	0.008
Error	3	0.000078	0.000026		
Total	5	0.001949			

Resumen del modelo

S	R- cuad.	R- cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
0.0051153	95.97%	93.29%	83.89%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
1.00%	2	0.01500	0.00141	(0.00349, 0.02651)
3.00%	2	0.05800	0.00849	(0.04649, 0.06951)
5.00%	2	0.04050	0.00212	(0.02899, 0.05201)

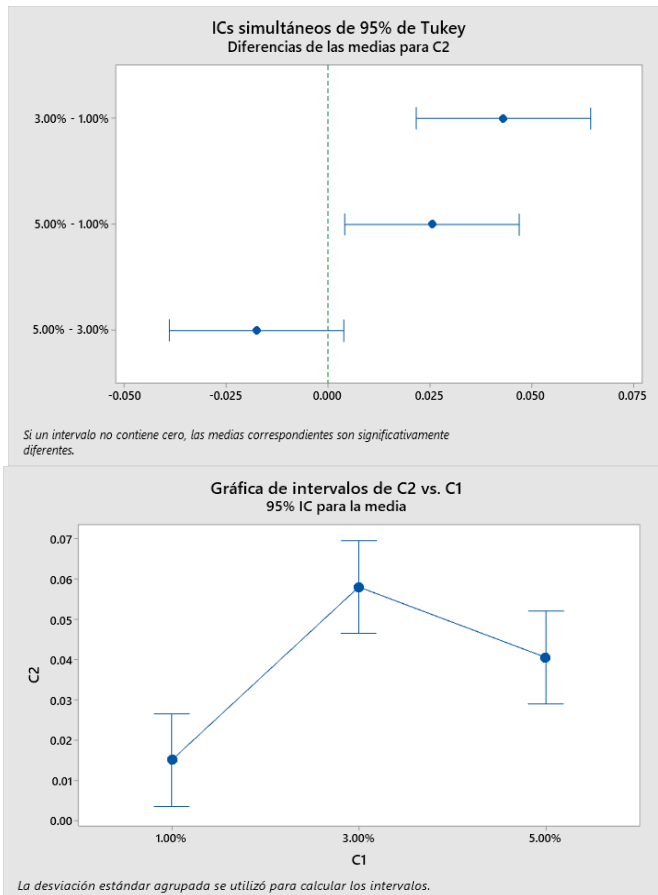
Desv.Est. agrupada = 0.00511534

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
3.00%	2	0.05800	A
5.00%	2	0.04050	A
1.00%	2	0.01500	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.4.1 *Lactobacillus brevis*, densidad óptica final sin encapsular

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

C1	2	0.046006	0.023003	10.65	0.043
Error	3	0.006479	0.002160		
Total	5	0.052485			

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0464722	87.66%	79.43% 50.62%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
1.00%	2	0.7750	0.0212	(0.6704, 0.8796)
3.00%	2	0.6435	0.0615	(0.5389, 0.7481)
5.00%	2	0.5625	0.0474	(0.4579, 0.6671)

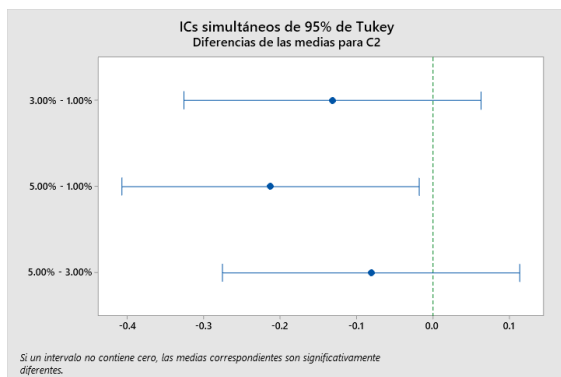
Desv.Est. agrupada = 0.0464722

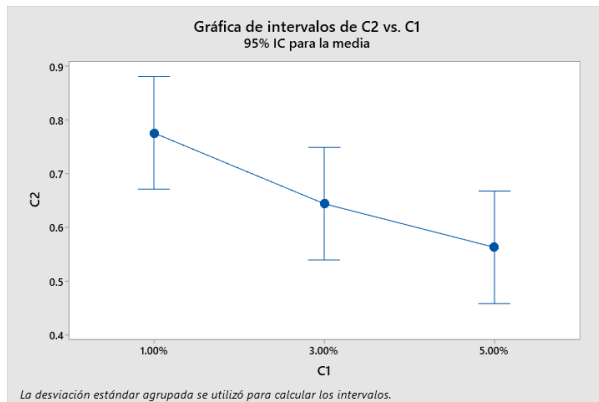
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
1.00%	2	0.7750	A
3.00%	2	0.6435	A B
5.00%	2	0.5625	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





2.4.2 *Lactobacillus brevis*, densidad óptica inicial encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%
----	---	---------------------------

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	2	0.021751	0.010875	345.25	0.000
Error	3	0.000094	0.000031		
Total	5	0.021846			

Resumen del modelo

R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R-cuad. cuad. (pred)
0.0056125	99.57%	99.28%
		98.27%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
----	---	-------	-----------	-----------

1.00%	2	0.11200	0.00707	(0.09937,
				0.12463)
3.00%	2	0.21750	0.00354	(0.20487,
				0.23013)
5.00%	2	0.25400	0.00566	(0.24137,
				0.26663)

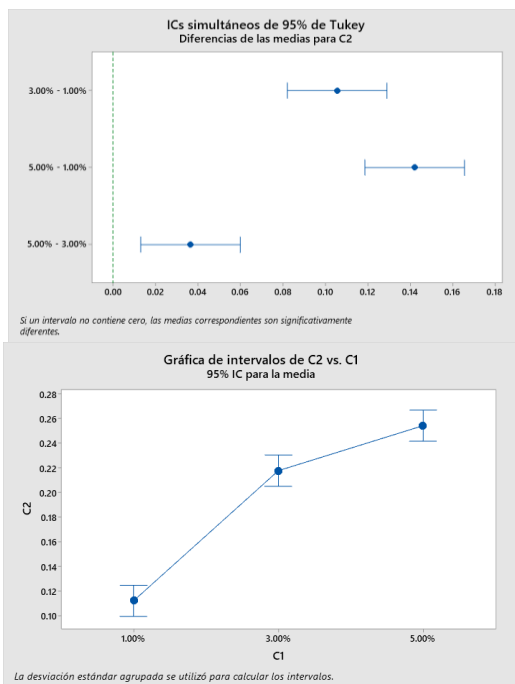
Desv.Est. agrupada = 0.00561249

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

<u>C1</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
5.00%	2	0.25400	A
3.00%	2	0.21750	B
1.00%	2	0.11200	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



2.4.3 *Lactobacillus brevis*, densidad óptica final encapsulado

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	3	1.00%, 3.00%, 5.00%

Análisis de Varianza

	SC	MC	Valor	Valor
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	F p
C1	2	1.76542	0.882712	8314.40 0.000
Error	3	0.00032	0.000106	
Total	5	1.76574		

Resumen del modelo

	R-	R-	R-
S	cuad.	cuad.	cuad.
	(ajustado)	(pred)	
0.0103037	99.98%	99.97%	99.93%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1.00%	2	1.83600	0.00849	(1.81281, 1.85919)
3.00%	2	1.22100	0.01273	(1.19781, 1.24419)
5.00%	2	0.50850	0.00919	(0.48531, 0.53169)

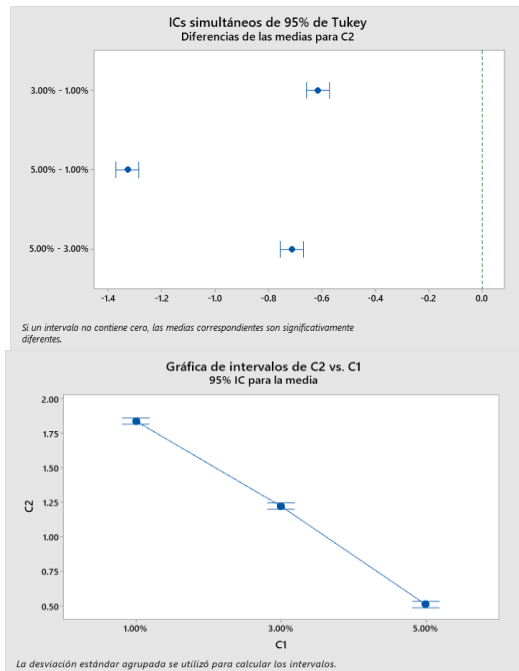
Desv.Est. agrupada = 0.0103037

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
1.00%	2	1.83600	A
3.00%	2	1.22100	B
5.00%	2	0.50850	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



3. Resistencia de bacterias ácido lácticas en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

3.1 *Lactobacillus casei* resistencia en peróxido de hidrógeno

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	4	10, 20, 30, control

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	3	0.010925	0.003642	34.63	0.000
Error	8	0.000841	0.000105		
Total	11	0.011767			

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0102551	92.85%	90.17% 83.91%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10	3	0.36533	0.01692	(0.35168, 0.37899)
20	3	0.43800	0.00624	(0.42435, 0.45165)
30	3	0.381333	0.001528	(0.367680, 0.394987)
control	3	0.42600	0.00964	(0.41235, 0.43965)

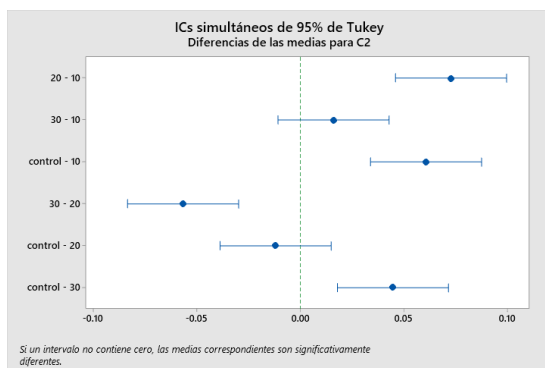
Desv.Est. agrupada = 0.0102551

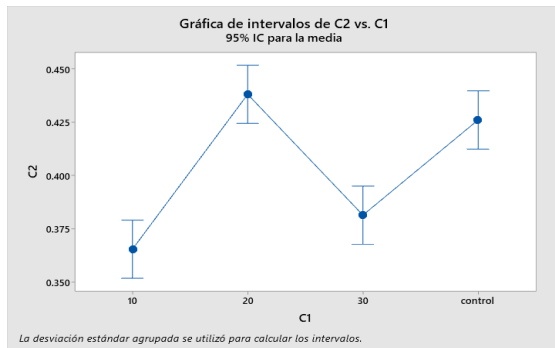
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
20	3	0.43800	A
control	3	0.42600	A
30	3	0.381333	B
10	3	0.36533	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





3.2 *Lactobacillus paracasei* resistencia en peróxido de hidrógeno

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	4	10, 20, 30, control

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	3	0.008107	0.002702	33.61	0.000
Error	8	0.000643	0.000080		
Total	11	0.008751			

Resumen del modelo

R-S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0089675	92.65%	89.89%
		83.46%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
----	---	-------	-----------	-----------

10	3	0.36167	0.01457	(0.34973, 0.37361)
20	3	0.43000	0.00500	(0.41806, 0.44194)
30	3	0.37867	0.00808	(0.36673, 0.39061)
control	3	0.37500	0.00436	(0.36306, 0.38694)

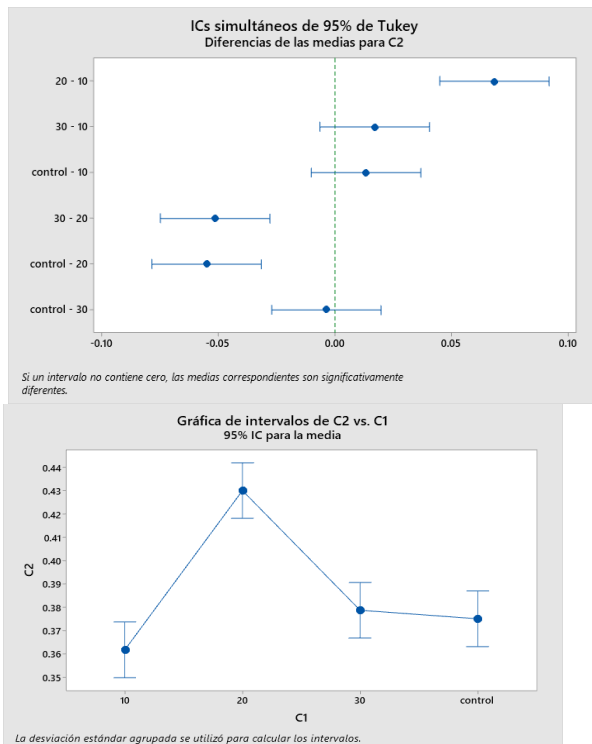
Desv.Est. agrupada = 0.00896753

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
20	3	0.43000	A
30	3	0.37867	B
control	3	0.37500	B
10	3	0.36167	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



3.3 *Lactobacillus plantarum* resistencia en peróxido de hidrógeno

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	4	10, 20, 30, control

Análisis de Varianza

	SC	MC	Valor	Valor	
Fuente	GL	Ajust.	Ajust.	F	p
C1	3	0.035740	0.011913	25.51	0.000
Error	8	0.003737	0.000467		
Total	11	0.039477			

Resumen del modelo

	R-	R-	R-
S	cuad.	cuad. (ajustado)	cuad. (pred)
0.0216121	90.53%	86.98%	78.70%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10	3	0.4883	0.0266	(0.4596, 0.5171)
20	3	0.45567	0.00551	(0.42689, 0.48444)
30	3	0.35033	0.01168	(0.32156, 0.37911)
control	3	0.4763	0.0315	(0.4476, 0.5051)

Desv.Est. agrupada = 0.0216121

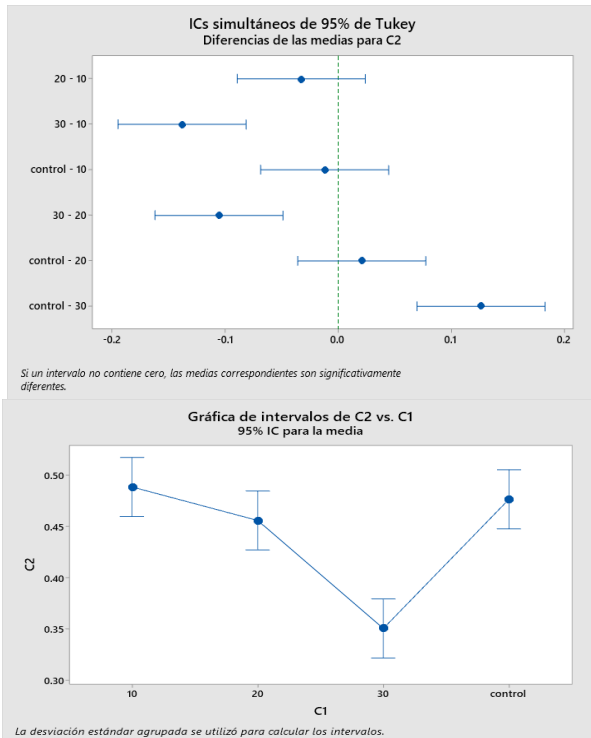
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
10	3	0.4883	A

control 3 0.4763 A
 20 3 0.45567 A
 30 3 0.35033 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



3.4 *Lactobacillus brevis* resistencia en peróxido de hidrógeno

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	4	10, 20, 30, control

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	3	0.035900	0.011967	100.77	0.000

Error 8 0.000950 0.000119
 Total 11 0.036850

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	0.0108972	97.42%	96.46% 94.20%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10	3	0.37633	0.01137	(0.36183, 0.39084)
20	3	0.33233	0.00651	(0.31783, 0.34684)
30	3	0.254333	0.001528	(0.239825, 0.268842)
control	3	0.3970	0.0173	(0.3825, 0.4115)

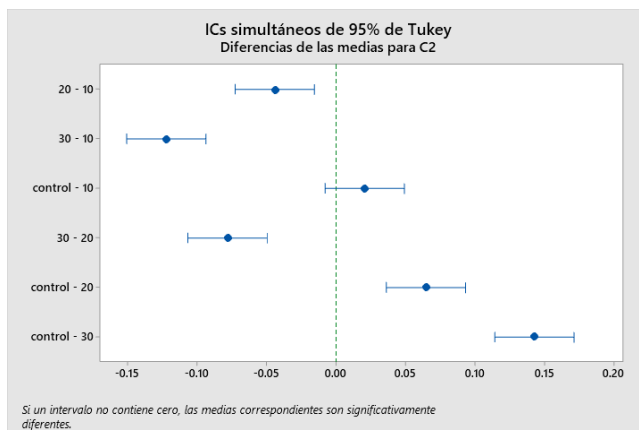
Desv.Est. agrupada = 0.0108972

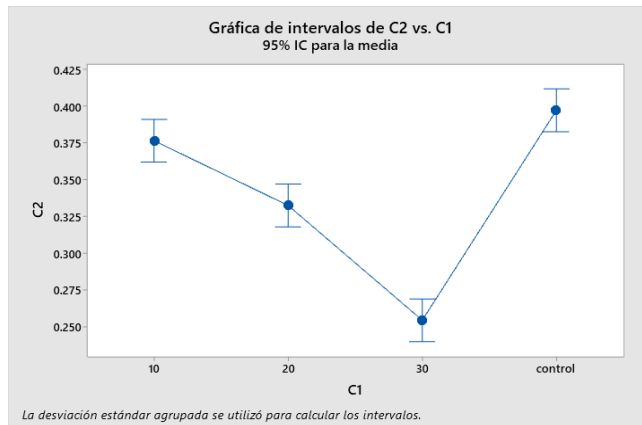
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
control	3	0.3970	A
10	3	0.37633	A
20	3	0.33233	B
30	3	0.254333	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





4. Simulación gástrica de bacterias probióticas

4.1 Resistencia de 4 bacterias probióticas expuestas a lisozima

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	6	.paracasei, l.brevis, l.casei, l.paracasei, l.plantarum, l.plantarum

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	5	8.03459E+18	1.60692E+18	2571.07	0.000
Error	2	1.25000E+15	6.25001E+14		
Total	7	8.03584E+18			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.
	S R-cuad. (ajustado)	(pred)
25000012	99.98%	99.95%

Medias

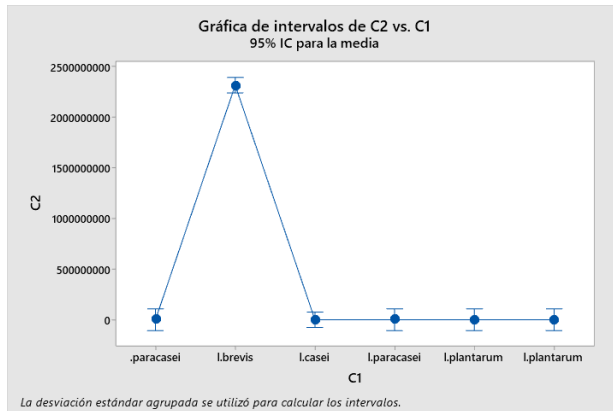
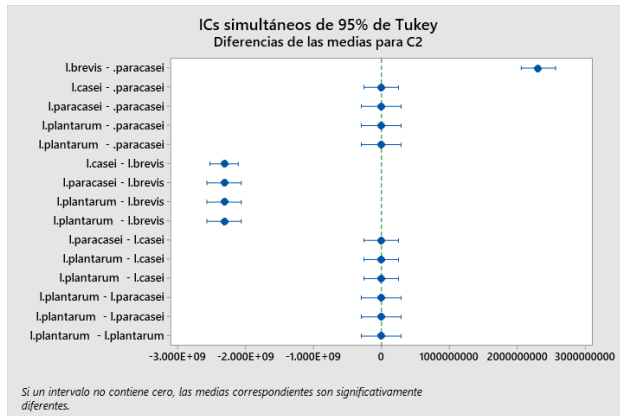
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
.paracasei	1	850000	*	(-106716372, 108416372)
l.brevis	2	2315000000	35355339	(2238939089, 2391060911)
l.casei	2	455000	35355	(-75605911, 76515911)
l.paracasei	1	910000	*	(-106656372, 108476372)
l.plantarum	1	400000	*	(-107166372, 107966372)
l.plantarum	1	600000	*	(-106966372, 108166372)

Desv.Est. agrupada = 25000012

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media Agrupación
l.brevis	2	2315000000 A
l.paracasei	1	910000 B
.paracasei	1	850000 B
l.plantarum	1	600000 B
l.casei	2	455000 B
l.plantarum	1	400000 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



4.2 Resistencia de bacterias probióticas a diferentes pH

4.2.1 Resistencia a pH 4.05

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	5 l.brevis, l.brevis, l.casei, l.paracasei, l.plantarum
----	---

Análisis de Varianza

Fuente GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	4 31378500000	7844625000	303.66	0.000
Error	3 77500000	25833333		
Total	7 31456000000			

Resumen del modelo

	R- S	R- cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)	
	5082.65	99.75%	99.43%	*

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
l.brevis	1	195000	*	(178825, 211175)
l.brevis	1	180000	*	(163825, 196175)
l.casei	2	42500	3536	(31062, 53938)
l.paracasei	2	34500	4950	(23062, 45938)
l.plantarum	2	55500	6364	(44062, 66938)

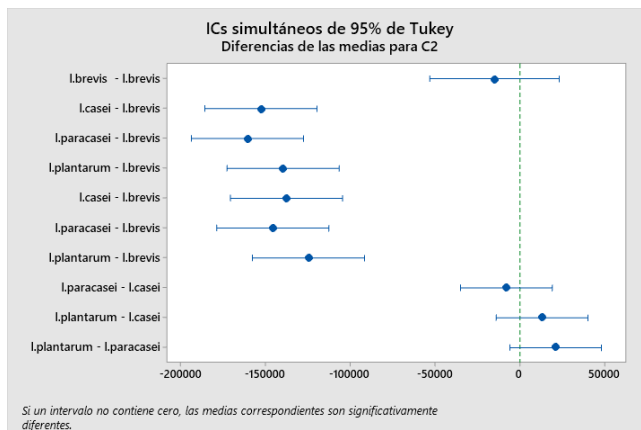
Desv.Est. agrupada = 5082.65

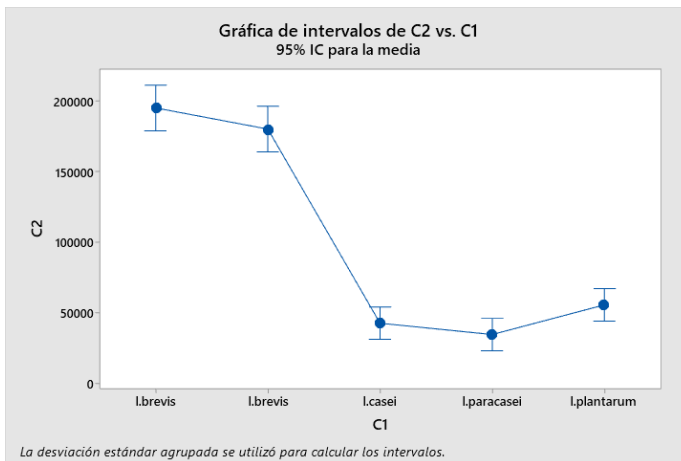
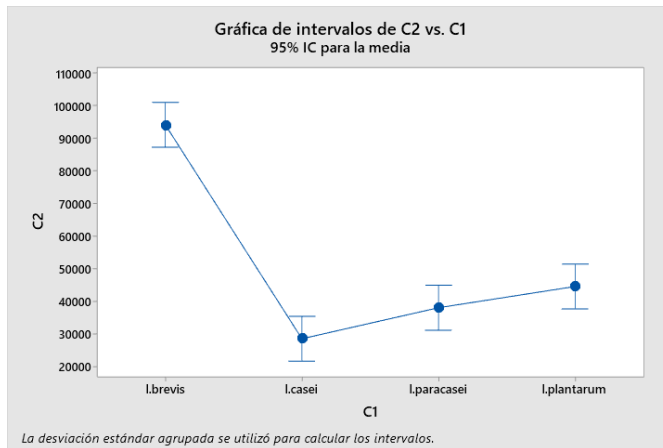
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
l.brevis	1	195000	A
l.brevis	1	180000	A
l.plantarum	2	55500	B
l.casei	2	42500	B
l.paracasei	2	34500	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





4.2.2 Resistencia a pH 3.05

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor	Niveles	Valores
C1	4	l.brevis, l.casei, l.paracasei, l.plantarum

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

C1	3	5132500000	1710833333	139.66	0.000
Error	4	49000000	12250000		
Total	7	5181500000			

Resumen del modelo

	R- S	R-cuad. cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	3500 99.05%	98.35%	96.22%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
l.brevis	2	94000	5657	(87129, 100871)
l.casei	2	28500	2121	(21629, 35371)
l.paracasei	2	38000	2828	(31129, 44871)
l.plantarum	2	44500	2121	(37629, 51371)

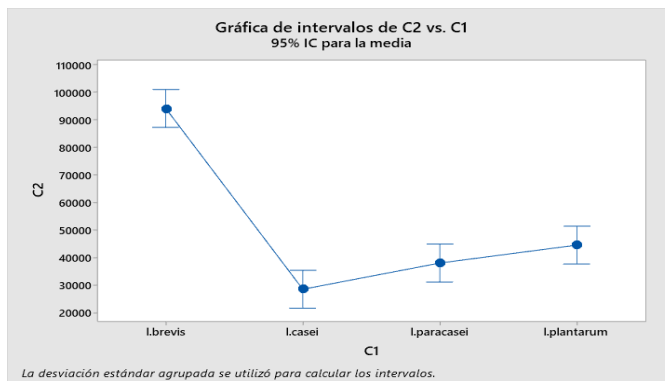
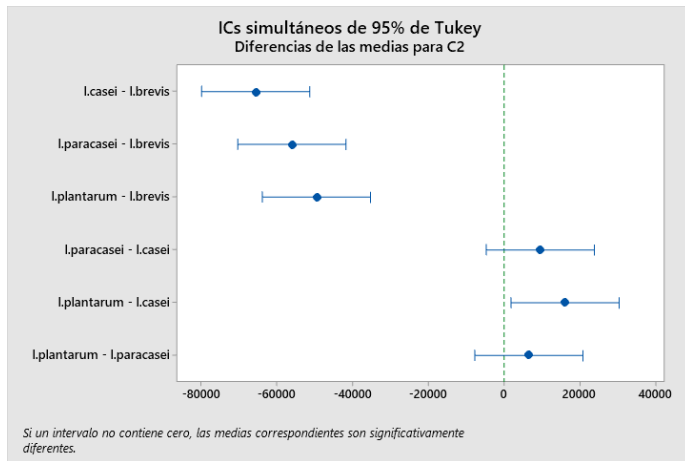
Desv.Est. agrupada = 3500

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
l.brevis	2	94000	A
l.plantarum	2	44500	B
l.paracasei	2	38000	B C
l.casei	2	28500	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



4.2.3 Resistencia a pH 2.05

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	4 l.brevis,	l.casei,
	l.paracasei, l.plantarum	

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
C1	3	1633750	544583	62.24	0.001
Error	4	35000	8750		

Total 7 1668750

Resumen del modelo

	R- S	R- cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
	93.5414	97.90%	96.33%
			91.61%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
l.brevis	2	1900	141	(1716, 2084)
l.casei	2	1750.0	70.7	(1566.4, 1933.6)
l.paracasei	2	750.0	70.7	(566.4, 933.6)
l.plantarum	2	1250.0	70.7	(1066.4, 1433.6)

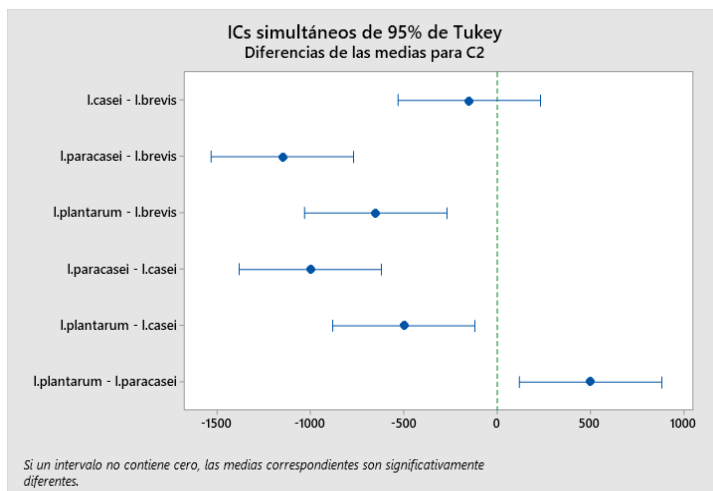
Desv.Est. agrupada = 93.5414

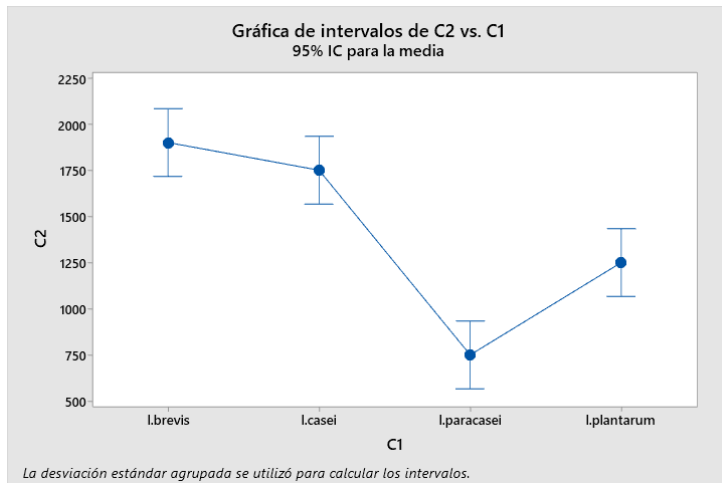
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
l.brevis	2	1900	A
l.casei	2	1750.0	A
l.plantarum	2	1250.0	B
l.paracasei	2	750.0	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





4.2 Resistencia de bacterias probióticas a diferentes concentraciones de sales biliares

4.3.1 Concentración de sales biliares 0.05 %

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor	Niveles	Valores
C1	4	l.brevis, l.casei, l.paracasei, l.plantarum

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor	
				F	p
C1	3	9.93880E+15	3.31293E+15	539.63	0.000
Error	4	2.45570E+13	6.13924E+12		
Total	7	9.96336E+15			

Resumen del modelo

		R-
R-	R-cuad.	cuad.
S	cuad. (ajustado)	(pred)

2477748 99.75% 99.57% 99.01%

Medias

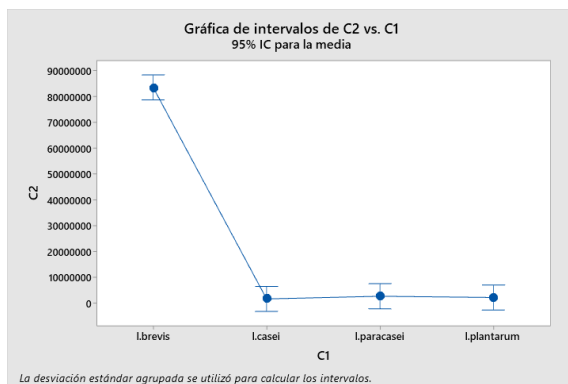
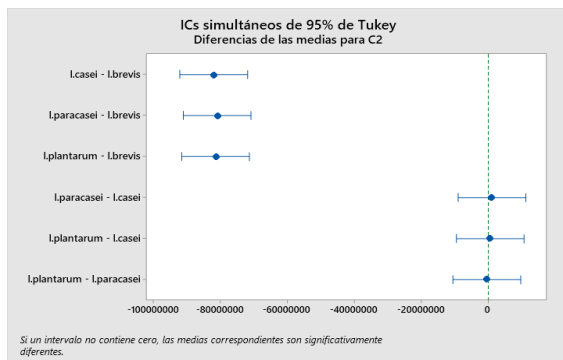
C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
l.brevis	2	83500000	4949747	(78635577, 88364423)
l.casei	2	1575000	106066	(-3289423, 6439423)
l.paracasei	2	2615000	120208	(-2249423, 7479423)
l.plantarum	2	2125000	176777	(-2739423, 6989423)

Desv.Est. agrupada = 2477748

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media Agrupación
l.brevis	2 83500000	A
l.paracasei	2 2615000	B
l.plantarum	2 2125000	B
l.casei	2 1575000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



4.3.2 Concentración de sales biliares 0.10 %

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de $\alpha = 0.05$
 significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	4	l.brevis, l.casei, l.paracasei, l.plantarum

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	3	5.38162E+14	1.79387E+14	1128.75	0.000
Error	4	6.35700E+11	1.58925E+11		
Total	7	5.38797E+14			

Resumen del modelo

S	R- cuad.	R-cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
398654	99.88%	99.79%	99.53%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
l.brevis	2	20450000	777817	(19667345, 21232655)
l.casei	2	1525000	106066	(742345, 2307655)
l.paracasei	2	1250000	70711	(467345, 2032655)
l.plantarum	2	1765000	120208	(982345, 2547655)

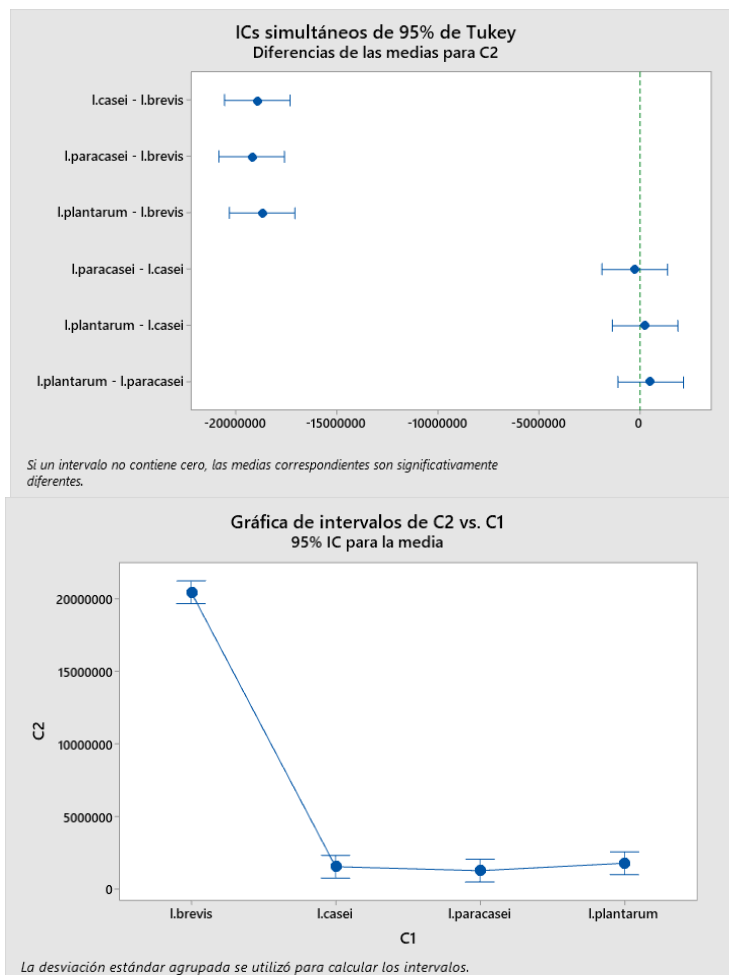
Desv.Est. agrupada = 398654

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación
l.brevis	2	20450000	A
l.plantarum	2	1765000	B
l.casei	2	1525000	B
l.paracasei	2	1250000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



4.3.3 Concentración de sales biliares 0.15 %

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	4	l.brevis, l.casei, l.paracasei, l.plantarum

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	3	1.01779E+13	3.39263E+12	95.50	0.000
Error	4	1.42100E+11	35525000000		
Total	7	1.03200E+13			

Resumen del modelo

S	R- cuad.	R- cuad. (ajustado)	R- cuad. (pred)
188481	98.62%	97.59%	94.49%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
l.brevis	2	4250000	353553	(3879966, 4620034)
l.casei	2	1425000	77782	(1054966, 1795034)
l.paracasei	2	1850000	70711	(1479966, 2220034)
l.plantarum	2	1735000	77782	(1364966, 2105034)

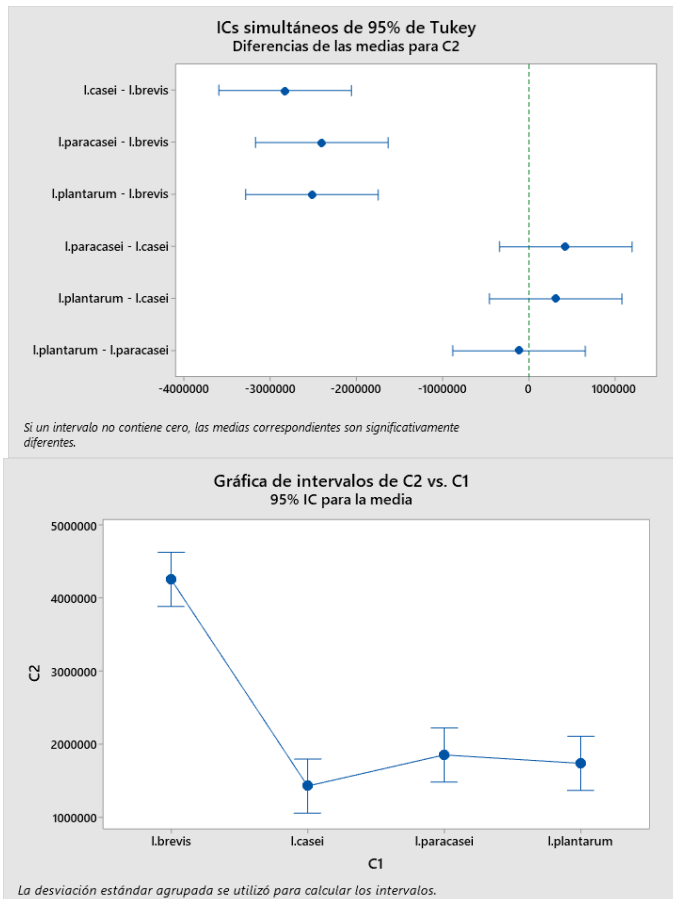
Desv.Est. agrupada = 188481

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
l.brevis	2	4250000	A
l.paracasei	2	1850000	B
l.plantarum	2	1735000	B
l.casei	2	1425000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



4.3.4 Concentración de sales biliares de 0.3 %

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

C1	4 l.brevis,	l.casei,
	l.paracasei, l.plantarum	

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1		3 9.93880E+15	3.31293E+15	539.63	0.000
Error		4 2.45570E+13	6.13924E+12		

Total 7 9.96336E+15

Resumen del modelo

	R-	R-cuad.	R-cuad.
	S	cuad. (ajustado)	cuad. (pred)
	2477748	99.75%	99.57% 99.01%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
l.brevis	2 83500000	4949747		(78635577, 88364423)
l.casei	2 1575000	106066		(-3289423, 6439423)
l.paracasei	2 2615000	120208		(-2249423, 7479423)
l.plantarum	2 2125000	176777		(-2739423, 6989423)

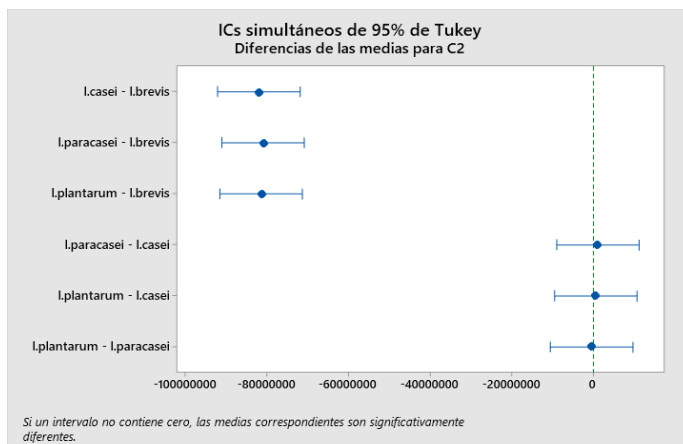
Desv.Est. agrupada = 2477748

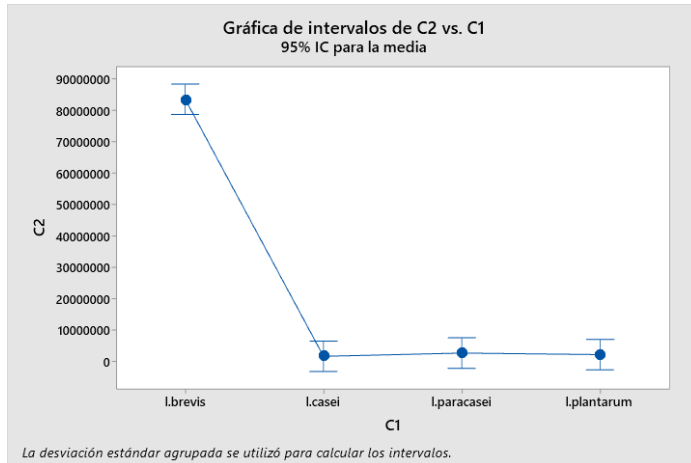
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media	Agrupación
l.brevis	2 83500000		A
l.paracasei	2 2615000		B
l.plantarum	2 2125000		B
l.casei	2 1575000		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.





4.3.5 Concentración de sales biliares de 0.5 %

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de $\alpha = 0.05$
significancia

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores

Factor	Niveles	Valores
C1	4	l.brevis, l.casei, l.paracasei, l.plantarum

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor	
				F	p
C1	3	1.62894E+12	5.42979E+11	120.33	0.000
Error	4	18050000000	4512500000		
Total	7	1.64699E+12			

Resumen del modelo

S	R-		
	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
67175.1	98.90%	98.08%	95.62%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
l.brevis	2	850000	70711	(718119, 981881)
l.casei	2	755000	63640	(623119, 886881)
l.paracasei	2	670000	84853	(538119, 801881)
l.plantarum	2	1790000	42426	(1658119, 1921881)

Desv.Est. agrupada = 67175.1

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media Agrupación
l.plantarum	2	1790000 A
l.brevis	2	850000 B
l.casei	2	755000 B
l.paracasei	2	670000 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95 %

C1	N	Media Agrupación
l.plantarum	2	1790000 A
l.brevis	2	850000 B
l.casei	2	755000 B
l.paracasei	2	670000 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

