FORTHCOMING N1-**02-24-01**

ESTUDIO ESTADÍSTICO SOBRE LA VIABILIDAD DEL *LACTOBACILLUS CASEI* MICROENCAPSULADO CON JUGO DE YACÓN MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN PARA SU USO COMO ALIMENTO PROBIÓTICO

Edson Hilmer Julca-Marcelo[*], Manuel Michael Beraún-Espíritu[**], Ketty Marilú Moscoso-Paucarchuco [***], Shalin Carhuallanqui-Avila[****], Crhistian Omar Larrea-Cerna[*****], Jesús César Sandoval-Trigos [******], Wilfredo Fredy Paco Huamaní [*******]

[*]Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú. E-mail: edsonjm@uncp.edu.pe
[**]Universidad Continental, Huancayo, Perú. E-mail: mberaun@continental.edu.pe
[***]Universidad Nacional Autónoma Altoandina de Tarma, Tarma, Perú. E-mail: kmoscoso@unaat.edu.pe
[****]Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú. E-mail: scarhuallanqui@uncp.edu.pe
[*****]Universidad Nacional Autónoma de Tayacaja Daniel Hernández Morillo, Huancavelica, Perú. E-mail: crhistian.larrea@unat.edu.pe
[*******]Universidad Peruana Los Andes, Huancayo, Perú. E-mail: d.jsandoval@upla.edu.pe
[********]Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica, Perú. E-mail: wilfredo.paco@unh.edu.pe

ABSTRACT
Probiotic foods are those that contain incorporated bacteria that have beneficial effects on the intestinal flora. The present article consists of the experimental study to create a probiotic food that contains the bacteria *lactobacillus casei* microencapsulated in yacon juice. Yacon is an Andean tuber with nutritional properties advantageous for human health. In this work, this preparation is subjected to biochemical tests to determine the efficiency of the microencapsulation, the survival percentage after 30 days of storage and after being subjected to simulated gastric juices, and simulated intestinal juices, all of this for several parameters such as temperature, pH of simulated gastric juices and simulated intestinal juices. Because there are different combinations to study, a factorial design of experiments was used and the data obtained were analyzed with the help of the analysis of variance method (ANOVA).

KEYWORDS: Probiotic food, *lactobacillus casei*, yacon, Kolmogorov-Smirnov normality test, analysis of variance, factorial experiment design.

MSC: 97K80, 97M60.

RESUMEN
Los alimentos probióticos son aquellos que contienen bacterias incorporadas que tienen efectos beneficiosos en la flora intestinal. El presente artículo consiste en el estudio experimental para crear un alimento probiótico que contenga la bacteria *lactobacillus casei* microencapsulada en jugo de yacón. El yacón es un tubérculo andino con propiedades nutricionales ventajosas para la salud humana. En el trabajo, este preparado se somete a pruebas bioquímicas para determinar la eficiencia del microencapsulado, el porcentaje de supervivencia después de 30 días de almacenamiento y luego de sometido a jugos gástricos simulados y jugos intestinales simulados, todo ello para varios parámetros como temperatura, pH de los jugos gástricos simulados y de los jugos intestinales simulados. Debido a que existen diferentes combinaciones a estudiar se utilizó un diseño de experimentos factorial y los datos obtenidos se analizaron con ayuda del método de análisis de varianzas (ANOVA).

PALABRAS CLAVES: Alimento probiótico, *lactobacillus casei*, yacón, test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, análisis de varianza, diseño de experimento factorial.

1. INTRODUCCIÓN

Recientemente, la demanda de alimentos funcionales en el mercado mundial se ha incrementado rápidamente como consecuencia de la creciente incidencia de enfermedades no transmisibles y al avance tecnológico. En los países europeos, la popularidad de los alimentos funcionales que contienen probióticos se incrementa día a día, debido a los avances en la investigación y en el desarrollo de nuevos productos, que han dado como resultado la adición de probióticos, no solo en productos lácteos, sino también en bebidas, cereales y productos cárnicos. Sin embargo, la viabilidad y estabilidad de estos microorganismos es un desafío tecnológico.

Debido a estas consideraciones, este artículo tiene como objetivo evaluar la viabilidad del *lactobacillus casei* ATCC 393 microencapsulado con jugo de yacón mediante secado por aspersión; empleando caseinato de sodio como material de pared. Además, se propuso evaluar la influencia del encapsulante (caseinato de sodio) y la temperatura de ingreso del aire de secado en la eficiencia y la supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393. Asimismo, se determinó el porcentaje de supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 sometido a jugos gástricos simulados, con la finalidad de determinar la cantidad de bacterias probióticas disponibles en el tracto gastrointestinal para su llegada hasta el colon del ser humano. Finalmente se cuantificó el contenido de fructanos tipo inulina-fructooligosacáridos en el producto obtenido con el fin de dar respuesta al problema planteado, que es determinar cuál es la viabilidad del *lactobacillus casei* microencapsulado con jugo de yacón mediante secado por aspersión.

Para ello el trabajo se dividió en tres etapas: la primera fue la obtención del jugo de yacón y las cepas de *lactobacillus casei* ATCC 393 para realizar el microencapsulado. Luego se determinó la supervivencia de estas bacterias microencapsuladas sometidas a condiciones del tracto digestivo. Se sometieron a jugos gástricos simulados (JGS) y jugos intestinales simulados (JIS). Finalmente se determinaron los fructanos tipo inulina – fructooligosacáridos (FOS).

El *lactobacillus casei* ATCC 393 es una bacteria presente en la boca, la vagina y el tracto gastrointestinal del ser humano, que posee una potente actividad antitumoral y efectos anti metastáticos en las células tumorales trasplantables y para suprimir la carcinogénesis. Además, tiene notables beneficios para el sistema inmunológico del ser humano, pero para ello es necesario tener un óptimo equilibrio de la flora intestinal, la llamada “eubiosis”, para lo cual el *lactobacillus* y *bifidobacterium* deben constituir al menos el 85% de las bacterias totales, lo que representa una barrera para las bacterias patógenas.

El yacón empleado para la ejecución del trabajo fue adquirido del distrito de Ulcumayo en la provincia peruana de Junín, debido a que en la actualidad es considerada como un alimento funcional dado que contiene fructooligosacáridos (FOS), compuestos de inulina y fenólicos, lo que lo convierte en un prebiótico (ingrediente alimenticio no digerible que benefician al huésped, promoviendo el desarrollo selectivo y en cantidades adecuadas de bacterias benéficas en el colon).

Para el microencapsulado se empleó el método de secado por aspersión o atomización y como material de pared, el caseinato de sodio. Este método brinda una posibilidad económica y accesible, con elevados niveles de rendimiento si se compara con otros métodos. Para verificar la eficiencia fue necesario determinar la concentración de encapsulante y la temperatura de microencapsulación adecuadas para mantener vivas el mayor porcentaje de bacterias.

Para asegurar la viabilidad del *lactobacillus casei* ATCC 393 a nivel del colon del ser humano se realizó el microencapsulado y las pruebas de supervivencia a los jugos gástricos. Es así que el microencapsulado resultó ser una técnica bastante útil para optimizar la entrega de los componentes bioactivos como probióticos, vitaminas, minerales, fitoesteroles, ácidos grasos, luteína, licopeno y antioxidantes. Hasta hoy, la industria alimentaria ha desarrollado diversas técnicas de microencapsulación, algunas de ellas resultan muy prometedoras para la producción de “alimentos funcionales”, debido a que algunas de estas tecnologías optimizarían la liberación gradual y exitosa de los componentes bioactivos en el tracto gastrointestinal.

Para el estudio se obtuvo una muestra aleatoria con muestreo aleatorio simple por cada combinación posible de parámetros. A la muestra obtenida se le aplicó el Análisis de la Varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) que son métodos relacionados con la regresión lineal que tienen como objetivo principal determinar si existe diferencia significativa en la aplicación de varios tratamientos ([4]). La determinación de la existencia de normalidad de los datos se midió con la aplicación del método de Kolmogorov-Smirnov, que es una prueba no paramétrica ([2]). El experimento contó con un diseño factorial para estudiar todas las combinaciones posibles de parámetros en la creación del producto probiótico ([9]).

El artículo se divide en una sección de Preliminares donde se explican los principales métodos estadísticos utilizados para el estudio realizado. La sección llamada Resultados contiene el resumen de los valores numéricos obtenidos de aplicar los métodos explicados en la sección anterior. El artículo termina con las conclusiones.

2. PRELIMINARES

El diseño factorial es muy común en estudios experimentales relacionados con la agricultura y la nutrición. La definición formal se expone en la Definición 1.

Definición 1 ([1][5][11][13][14]). Un *diseño factorial* de cada nivel de un factor ocurre asociado a cada nivel de cada uno de los otros factores.

Por ejemplo, supongamos que existen tres factores con niveles $I = 3, J = 2$ y $K = 4$. Entonces se tienen $3 \times 2 \times 4 = 24$ combinaciones de tratamientos. Si se tienen tres observaciones por combinación entonces se necesitarán 72 unidades experimentales. Cuando el diseño factorial es factible de realizarse se obtienen buenas ventajas económicas y permite mayor exactitud en las evaluaciones conjuntas si se compara con las evaluaciones hechas una sola a la vez.

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor es un método estadístico para examinar las medias de tres o más grupos. Por tanto, la prueba de hipótesis nula es H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \ldots = \mu_k$ y la hipótesis alternativa es que no todas las medias son iguales ([3][8][15]). En este caso se calcula si hay diferencia de medias entre las combinaciones posibles entre tratamientos.

Si n_i es el número de observaciones, N es el número total de observaciones; Y_{ij} es la j-ésima observación de la i-ésima combinación; $\bar{Y}_i$ es la media de la muestra de la i-ésima combinación; mientras que $\bar{\bar{Y}}$ es la media de todas las observaciones. Se calcula la suma de cuadrados como se indica a continuación:

$$\sum_i \sum_j \left(Y_{ij} - \bar{\bar{Y}}\right)^2 = N \sum_i (Y_i - \bar{Y}_i)^2 + \sum_i \sum_j \left(Y_{ij} - \bar{Y}_i\right)^2 \quad (1)$$

Esta ecuación se reescribe frecuentemente como:

SC(Total) = SC(Factor)+SC(Error) (2)

Donde:

SC(Factor) es un número relacionado con la varianza que mide la variación debida al "factor", "tratamiento" o tipo de situación estudiado.

SC(Error): es un número relacionado con la varianza que mide la variación dentro de cada "factor", "tratamiento" o tipo de situación.

Los grados de libertad se calculan por la fórmula:

GL_{Total} = N-1, GL_{error} = N-k, GL_{factor} = k-1; donde k es el número de niveles y N es el número total de observaciones.

Luego se calculan los cuadrados medios por las fórmulas: $T = \frac{SC(Factor)}{k-1}$ y $E = \frac{SC(Error)}{N-k}$ y por último se tiene el valor de la razón F que se calcula como: $\mathrm{F} = \frac{\mathrm{T}}{\mathrm{E}}$ que se compara con la distribución F correspondiente, para los grados de libertad calculados anteriormente.

Si el valor p es pequeño comparado con los valores de la distribución F se rechazaría la hipótesis nula de igualdad de las medias.

Para probar la normalidad de la muestra se aplica el test no paramétrico de Kolmogórov-Smirnov, que consiste en lo siguiente ([6][7][10][16]):

Se parte de la Ecuación 3:

$$\mathrm{F_N(x)} = \frac{1}{\mathrm{n}} \sum_{\mathrm{i=1}}^{\mathrm{n}} \begin{cases} 1, & \text{si } \mathrm{y_i} \leq \mathrm{x} \\ 0, & \text{en caso contrario} \end{cases} \quad (3)$$

Si F(x) es la distribución normal, se tienen las ecuaciones siguientes de las dos colas para la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov:

$$D_N^+ = max(\mathrm{F_N(x)} - \mathrm{F(x)}) \text{ y } D_N^- = max(F(\mathrm{x}) - \mathrm{F_N(x)}) \quad (4)$$

3. RESULTADOS

La obtención del jugo de yacón, el cultivo de las bacterias y el microencapsulado se realizaron en el laboratorio de investigación de la facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional del Centro del Perú, ubicada en el distrito de El Mantaro, provincia de Jauja. Los ensayos de supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal y la determinación de fructanos tipo inulina – fructooligosacáridos se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Humanas de la Universidad Nacional del Centro del Perú sede Junín.

Para la determinación de la viabilidad del *lactobacillus casei* ATCC 393 microencapsulado en jugo yacón (*Smallanthus sonchifolius*) se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 2×3 con 30 repeticiones con un nivel de significación de α = 0,05. Para medir la eficiencia de la microencapsulación, se usaron dos factores de variación: la concentración de encapsulante, usándose dos porcentajes de caseinato de sodio: C1 = 7,5% y C2 = 10%, y tres niveles de temperatura de atomizado: T1 = 100°C, T2 = 120°C y T3 = 140°C (Figura 1). En esta etapa la variable respuesta es la eficiencia de la microencapsulación.

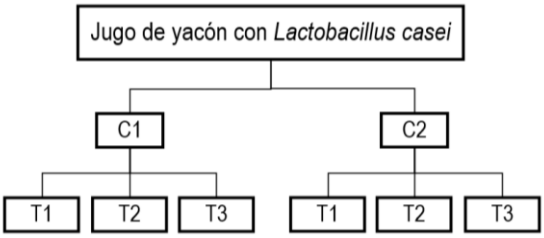

Figura 1. Diseño experimental para medir la eficiencia de microencapsulación

Para la determinación de la proporción de supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 microencapsulado con jugo de yacón, sometido a jugo gástrico simulado (JGS) y jugo intestinal simulado (JIS) se hizo uso del diseño DCA con arreglo factorial 3×2 con 30 repeticiones y un nivel de significación de α = 0,05, véase Figura 2.

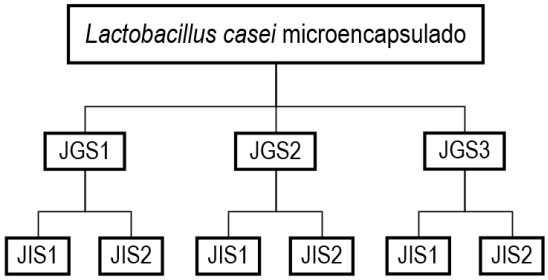

Figura 2. Diseño experimental para ensayo de supervivencia

Para medir la supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 se utilizaron dos factores de variación: El JGS con tres pH diferentes: JGS1 = 1, JGS2 = 1,5 y JGS3 = 2 y el JIS con dos pH diferentes: JIS1 = 7, JIS2 = 8 (Figura 2). En esta etapa la variable respuesta es el porcentaje de supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393.

La población estuvo constituida por raíces tuberosas de yacón amarillo que fueron adquiridos en el distrito de Ulcumayo, provincia y región Junín y cepas puras de *lactobacillus casei* ATCC 393. Para la ejecución del trabajo se emplearon 5 kg de raíces tuberosas de yacón amarillo, producidos en el distrito de Ulcumayo, provincia de Junín. Solo se adquirió un tubo de *lactobacillus casei* ATCC 393.

La selección de la muestra para desarrollar el experimento se realizó mediante muestreo aleatorio simple para una cantidad de 30 elementos por cada combinación posible de estudio, considerando que la población de raíces tuberosas de yacón era uniforme en su composición.

Se realizó la observación experimental a través de todo el estudio que se manipularon las variables independientes (concentración de encapsulante, temperatura de atomizado, pH del jugo gástrico simulado, pH del jugo intestinal simulado). Estas siempre estuvieron controladas por el investigador, y se observaron cómo influyen estas sobre las variables respuesta o dependientes (eficiencia de encapsulación, supervivencia del *lactobacillus casei*, cantidad de fructanos tipo inulina-fructooligosacáridos). Se empleó la ficha de registro de datos como instrumento.

Los resultados obtenidos en el trabajo de investigación se analizaron estadísticamente a través de los diseños descritos para cada caso con la ayuda de los softwares estadísticos SPSS v.25 e Infostat v.2020 ([9][12]).

La evaluación estadística tuvo como objetivo proporcionar los valores de medias, desviaciones estándar, la ocurrencia de diferencias significativas y comparaciones múltiples entre medias a través del análisis de varianzas (ANOVA), con un nivel de significancia del 5% (p-valor < 0,05). Todos los tratamientos fueron repetidos 30 veces, expresando los resultados como el promedio ± la desviación estándar (DS).

Primero se realizó la prueba de normalidad de los datos. Luego de probar que estos obedecían a una distribución normal se realizó la prueba de ANOVA para cada uno de los factores y para la interacción de la concentración de encapsulante y la temperatura de microencapsulado con un nivel de significancia de 0,05.

Para evaluar la eficiencia de encapsulación.

Primero se realizó la prueba de normalidad de los datos. Luego de probar que estos obedecían a una distribución normal se realizó la prueba de ANOVA para cada uno de los factores y para la interacción de la concentración de

encapsulante y la temperatura de microencapsulado con un nivel de significancia de 0,05. Los resultados se muestran a continuación:

Tratamientos	Conteo inicial UFC/ml	Conteo después del secado UFC/g	Conteo inicial Log (UFC/ml)	Conteo después del secado Log (UFC/g)	Eficiencia de la microencapsulación (%)
TR1	$3{,}90 \times 10^{12}$	$5{,}50 \times 10^{10}$	12,591 ± 0,011	10,737 ± 0,064	85,27 ± 0,472
TR2	$4{,}00 \times 10^{12}$	$3{,}47 \times 10^{09}$	12,602 ± 0,011	9,524 ± 0,148	75,57 ± 1,113
TR3	$3{,}97 \times 10^{12}$	$1{,}17 \times 10^{08}$	12,598 ± 0,022	8,053 ± 0,131	63,92 ± 0,936
TR4	$4{,}13 \times 10^{12}$	$4{,}90 \times 10^{11}$	12,616 ± 0,012	11,685 ± 0,080	92,62 ± 0,566
TR5	$3{,}93 \times 10^{12}$	$2{,}97 \times 10^{10}$	12,594 ± 0,028	10,461 ± 0,119	83,07 ± 0,885
TR6	$3{,}90 \times 10^{12}$	$1{,}18 \times 10^{09}$	12,590 ± 0,040	9,052 ± 0,155	71,90 ± 1,111

Tabla 1. Eficiencia de la microencapsulación de *lactobacillus casei*

* Los valores son medias ± DE de determinaciones por 30 veces

Luego para verificar la diferencia que se observa se realiza la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov obteniéndose un valor p de 0,299 > 0,05. Se concluye que la distribución de la variable es igual a la distribución normal, razón por la cual se realizó el análisis de varianza (ANOVA).

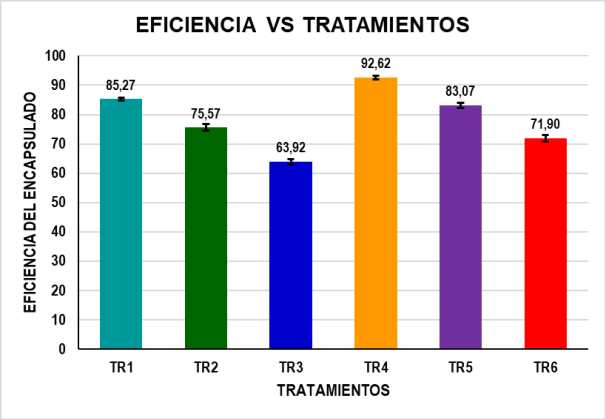

Figura 3. Eficiencia del microencapsulado del *lactobacillus casei* ATCC 393

Prueba	Estadístico	gl	p-valor
Kolmogorov-Smirnov	0,941	18	0,299

Tabla 2. Prueba de normalidad para la eficiencia del microencapsulado del *L. casei*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Temperatura	1331,00	2	665,50	853,70	$1{,}16 \times 10^{-13}$
CC Encapsulante	260,53	1	260,53	334,20	$3{,}97 \times 10^{-10}$
Tº* CC encap.	0,33	2	0,16	0,21	0,814
Error	9,35	12	0,78		
Total	1601,21	17			

Tabla 3. ANOVA de T * CC para la eficiencia del microencapsulado.
a. R al cuadrado = ,994 (R al cuadrado ajustada = ,992)

El análisis de varianza (Tabla 3) para la temperatura y concentración de encapsulante muestra diferencia estadística significativa (p < 0,05) en relación con la eficiencia de la microencapsulación del *lactobacillus casei* ATCC 393 con jugo de yacón y empleando caseinato de sodio como material encapsulante, para cada nivel de temperatura y porcentaje de encapsulante empleado. Además, en el mismo análisis con un p-valor de 0,814 > 0,05 se observa que

la interacción entre la temperatura de atomizado y la concentración de encapsulante no presenta diferencias estadísticas significativas.

Para evaluar la supervivencia a 30 días de almacenamiento.

Primero se realizó la prueba de normalidad de los datos para los 6 tratamientos. Luego de probar que estos obedecían a una distribución normal se realizó la prueba de ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Los resultados se muestran a continuación:

Tratamientos	Conteo inicial UFC/ml	Conteo después de 30 días UFC/g	Conteo inicial Log (UFC/ml)	Conteo después de 30 días Log (UFC/g)	Supervivencia después de 30 días (%)
TR1	3,90 × 1012	6,20 × 1009	12,591 ± 0,011	9,790 ± 0,057	77,75 ± 0,40
TR2	4,00 × 1012	2,37 × 1008	12,602 ± 0,011	8,331 ± 0,253	66,11 ± 1,96
TR3	3,97 × 1012	2,57 × 1006	12,598 ± 0,022	6,390 ± 0,156	50,72 ± 1,15
TR4	4,13 × 1012	5,50 × 1010	12,616 ± 0,012	10,731 ± 0,111	85,06 ± 0,80
TR5	3,93 × 1012	3,53 × 1009	12,594 ± 0,028	9,525 ± 0,181	75,63 ± 1,34
TR6	3,90 × 1012	6,57 × 1007	12,590 ± 0,040	7,815 ± 0,057	62,07 ± 0,32

Tabla 1. Supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393, 30 días después
* Los valores son medias ± DE de determinaciones por 30 veces

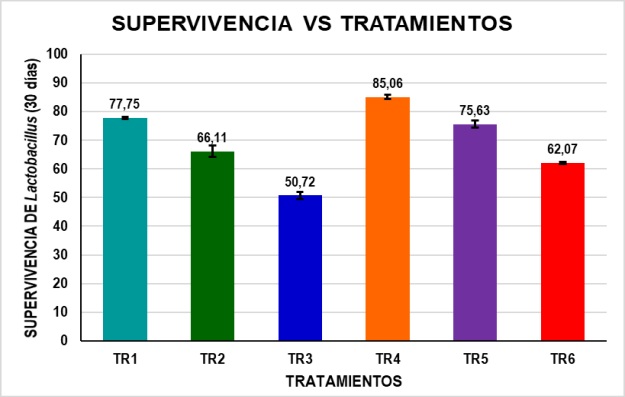

Figura 4. Supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393, 30 días después

Posteriormente, los datos de supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 almacenados por 30 días fueron sometidos a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 5) obteniéndose un p-valor de 0,173 > 0,05; por lo que se concluye que la distribución de la variable es igual a la distribución normal, razón por la cual se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA).

Prueba	Estadístico	gl	p-valor
Kolmogorov-Smirnov	0,927	18	0,173

Tabla 2. Prueba de normalidad para la supervivencia del *L. casei* a 30 días

El análisis de varianza (Tabla 6) indica que los tratamientos mostraron diferencia estadística significativa entre por lo menos dos de ellas (p – valor 1,40 × 10-12 < 0,05) en relación con la supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 después de 30 días, para cada uno de los tratamientos.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	2302,01	5	460,40	351,89	$1,40x10^{-12}$
Error	15,70	12	1,31		
Total	2317,71	17			

Tabla 6. ANOVA para la supervivencia del l. *casei* a 30 días
a. R al cuadrado = ,994 (R al cuadrado ajustada = ,992)

De acuerdo con estos resultados es posible afirmar que se han conformado cinco grupos que muestran diferencias estadísticas significativas, tanto en la eficiencia del microencapsulado como en la supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 después de almacenado 30 días, que son las muestras más relevantes, pues el trabajo pretende brindar una alternativa de alimento funcional que deberá tener como mínimo 30 días de vida útil, de otra manera este no llegaría al mercado en tan corto tiempo. Razón por la que deberá de cumplir con los requerimientos técnicos para este caso.

Para evaluar los ensayos de supervivencia a jugos gástricos simulados.

Primero se realizó la prueba de normalidad de los datos. Luego de probar que estos obedecían a una distribución normal se realizó la prueba de ANOVA para cada uno de los factores y para la interacción entre el pH de JGS y JIS con un nivel de significancia de 0,05.

Para realizar un mejor análisis, los datos del recuento de *lactobacillus casei* ATCC 393 en condiciones de jugo gástrico simulado (JGS) son expresados como Log (UFC/g), los mismos que se aprecian en la Tabla 7.

Tratamientos	Conteo inicial Log (UFC/ml)	Conteo después de 30 días Log (UFC/g)	Conteo de bacterias sometidas a JGS – Log (UFC/ml)		
			pH 1,00	pH 1,50	pH 2,00
T1	12,591 ± 0,011	9,790 ± 0,057	7,866 ± 0,044	8,190 ± 0,195	8,387 ± 0,122
T2	12,602 ± 0,011	8,331 ± 0,253	6,394 ± 0,113	6,588 ± 0,172	6,790 ± 0,228
T3	12,598 ± 0,022	6,390 ± 0,156	4,670 ± 0,082	4,856 ± 0,080	5,006 ± 0,094
T4	12,616 ± 0,012	10,731 ± 0,111	8,747 ± 0,089	9,097 ± 0,116	9,336 ± 0,187
T5	12,594 ± 0,028	9,525 ± 0,181	7,556 ± 0,104	7,895 ± 0,116	8,044 ± 0,165
T6	12,590 ± 0,040	7,815 ± 0,057	6,001 ± 0,104	6,247 ± 0,143	6,443 ± 0,110

Tabla 7. Supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 sometidos a JGS
* Los valores son medias ± DE de determinaciones por 30 veces

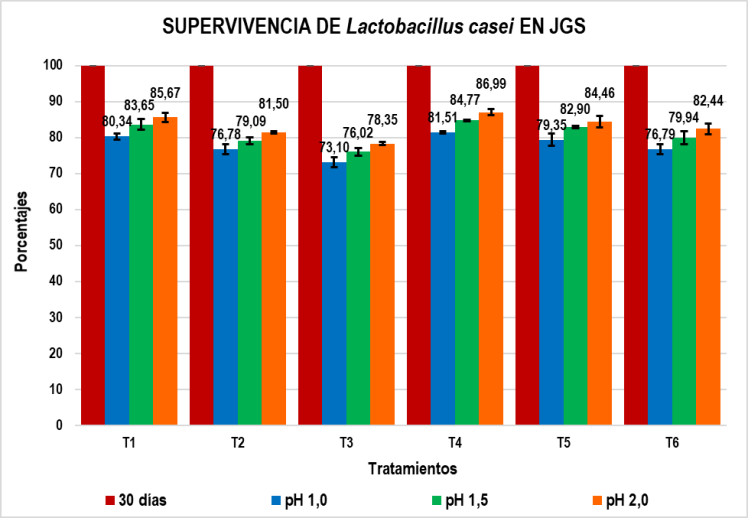

Figura 5. Supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 en JGS

Posteriormente los datos de supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 almacenados por 30 días y sometidos a JGS fueron sometidos a la prueba de normalidad de Kolmogorov – Smirnov (Tabla 8) obteniéndose un p-valor de 0,200 que resulta mayor a 0,05. Por lo que se concluye que la distribución de la variable es igual a la distribución normal, razón por la cual se realizó el ANOVA.

Variable	Estadístico	gl	p-valor
Supervivencia en JGS	0,099	54	0,200*

Tabla 8. Prueba de normalidad para la supervivencia del *L. casei* en JGS
* Esto es un límite inferior de la significación verdadera

Los resultados del ANOVA (Tabla 9) indican que los tratamientos tienen diferencia estadística significativa entre ellas ($p < 0,05$) en relación con la supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393, encapsulado con jugo de yacón sometidas a JGS, para cada tratamiento y pH del JGS empleados durante las pruebas experimentales.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	447,93	5	89,59	79,99	$1,57x10^{-21}$
pH del JGS	251,11	2	125,55	112,11	$2,06x10^{-18}$
Error	51,52	46	1,12		
Total	750,56	53			

Tabla 9. Análisis de varianza para la supervivencia al pH del JGS
a. R al cuadrado = ,931 (R al cuadrado ajustada = ,921)

Para evaluar la cantidad de fructanos tipo inulina-fructooligosacáridos.

Primero se realizó la prueba de normalidad de los datos. Luego de probar que estos obedecían a una distribución normal se realizó la prueba de ANOVA.

pH de JGS	Tratamiento	Recuento inicial	Recuento de Lactobacillus casei ATCC 393 sometido a JIS pH 7,0		Recuento de Lactobacillus casei ATCC 393 sometido a JIS pH 8,0	
		Log (UFC/g) 0 horas	Log (UFC/g) 2 horas	Log (UFC/g) 4 horas	Log (UFC/g) 2 horas	Log (UFC/g) 4 horas
1,00	T1	7,866 ± 0,044	7,551 ± 0,043	7,786 ± 0,043	7,321 ± 0,042	7,628 ± 0,046
	T2	6,394 ± 0,113	6,153 ± 0,166	6,340 ± 0,109	5,964 ± 0,072	6,201 ± 0,174
	T3	4,670 ± 0,082	4,430 ± 0,096	4,560 ± 0,102	4,287 ± 0,098	4,475 ± 0,099
	T4	8,747 ± 0,089	8,398 ± 0,086	8,660 ± 0,086	8,223 ± 0,226	8,486 ± 0,085
	T5	7,556 ± 0,104	7,248 ± 0,098	7,484 ± 0,100	7,026 ± 0,096	7,343 ± 0,088
	T6	6,001 ± 0,104	5,896 ± 0,238	5,990 ± 0,122	5,715 ± 0,237	5,964 ± 0,251
1,50	T1	8,190 ± 0,195	7,869 ± 0,191	8,108 ± 0,193	7,615 ± 0,184	7,945 ± 0,190
	T2	6,588 ± 0,172	6,323 ± 0,162	6,524 ± 0,165	6,127 ± 0,159	6,389 ± 0,168
	T3	4,856 ± 0,080	4,661 ± 0,077	4,808 ± 0,079	4,514 ± 0,076	4,708 ± 0,079
	T4	9,097 ± 0,116	8,733 ± 0,114	9,012 ± 0,119	8,458 ± 0,108	8,825 ± 0,111
	T5	7,895 ± 0,116	7,578 ± 0,115	7,818 ± 0,114	7,347 ± 0,104	7,657 ± 0,111
	T6	6,247 ± 0,143	6,006 ± 0,156	6,227 ± 0,167	5,874 ± 0,160	6,121 ± 0,167
2,00	T1	8,387 ± 0,122	7,989 ± 0,047	8,305 ± 0,116	7,796 ± 0,112	8,137 ± 0,109
	T2	6,790 ± 0,228	6,509 ± 0,207	6,722 ± 0,229	6,313 ± 0,205	6,587 ± 0,216
	T3	5,006 ± 0,094	4,776 ± 0,118	4,962 ± 0,102	4,653 ± 0,090	4,855 ± 0,091
	T4	9,336 ± 0,187	8,966 ± 0,181	9,242 ± 0,195	8,684 ± 0,176	9,059 ± 0,181
	T5	8,044 ± 0,165	7,722 ± 0,162	7,962 ± 0,163	7,482 ± 0,152	7,804 ± 0,158
	T6	6,443 ± 0,110	6,194 ± 0,112	6,375 ± 0,117	5,999 ± 0,102	6,253 ± 0,111

Tabla 10. Supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 sometidos a JIS. Fuente: elaboración propia

Variable	Estadístico	gl	p-valor
Supervivencia en JIS	0,045	216	0,200*

Tabla 11. Prueba de normalidad para la supervivencia del *L. casei* en JIS
* Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

Los resultados del ANOVA (Tabla 12) indican que los tratamientos tienen diferencia estadística significativa entre ellas ($p < 0,05$) en relación con la supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393, encapsulado con jugo de yacón

para cada pH del JIS y pH del JGS empleados durante las pruebas experimentales. Pero no registran diferencias significativas cuando se analiza la interacción entre pH JIS * pH JGS.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
pH_JIS	195,93	1	195,93	16,119	$8,28x10^{-05}$
pH_JGS	860,01	2	430,00	35,377	$5,74x10^{-14}$
pH JIS*pH JGS	0,54	2	0,27	0,022	0,978
Error	2552,56	210	12,16		
Total	3609,05	215			

Tabla 3 Análisis de varianza para la supervivencia al pH del JGS
a. R al cuadrado = ,897 (R al cuadrado ajustada = ,892)

Se observó también para todos los tratamientos tuvieron una supervivencia mayor a 72,65% de las células de *lactobacillus casei A*TCC 393 eran resistentes a las condiciones adversas simuladas. Pero para el análisis comparativo se toma como referencia el mejor tratamiento T4 con un valor de recuento de 9,32 × 108 UFC/g lo que resulta superior a lo reportado en la literatura; que indica una tasa de viabilidad de la cepa de *lactobacillus paracasei* KS-199 nanoencapsulada con alginato de 70,8%, lo que significa una reducción de células encapsuladas de 3,24 × 108 UFC/g a 1,05 × 106 UFC/ml al llegar al intestino delgado. De otra parte, sacando el promedio de recuentos expresados como logaritmo se encuentra un valor de 8,88 ± 0,28 Log UFC/g (81,34%) que resulta un tanto superior a lo reportado en la literatura con un conteo de 8,74 ± 0,38 Log UFC/g (82,74%), lo que podría explicarse por el material de encapsulado empleado.

4. CONCLUSIONES

En este artículo se realizó un estudio experimental mediante métodos estadísticos para evaluar la viabilidad del *lactobacillus casei* ATCC 393 microencapsulado con jugo de yacón mediante secado por aspersión en la obtención de un alimento probiótico.

Los resultados del trabajo de investigación demostraron que es viable el microencapsulado de *lactobacillus casei* ATCC 393 con jugo de yacón empleando el método de secado por aspersión y utilizando como agente encapsulante el caseinato de sodio, que permitió reducir la adherencia y agregación de partículas a causa de la presencia de FOS, clasificando el producto como simbiótico.

Al evaluar las dos concentraciones de caseinato de sodio (7,5 y 10%) y las tres temperaturas de ingreso de aire (100 °C, 120 °C y 140 °C) se pudo analizar que a mayor concentración de encapsulante (10%) y menor temperatura de ingreso de aire caliente (100°C) al secador, la eficiencia del microencapsulado de *lactobacillus casei* ATCC 393 con jugo de yacón es mayor. Además, tuvo mayor viabilidad después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente bajo condiciones de la ciudad de Junín. Estadísticamente la interacción entre las concentraciones de encapsulante y temperatura de secado no muestra diferencias significativas.

El porcentaje de supervivencia del *lactobacillus casei* ATCC 393 microencapsulado con jugo de yacón mediante secado por aspersión sometidos a diferentes pH del jugo gástrico simulado y jugo intestinal simulado fue de T3 (72,65%), T2 (76,19%), T6 (77,43%), T5 (79,16%), T1 (80,06%) y T4 (81,34%), destacando que el mejor tratamiento fue T4 con un recuento de células de 8,70 Log UFC/g con una concentración de encapsulante de 10% (p/v) de caseinato de sodio y una temperatura de entrada de aire de 100°C, demostrando que a mayor pH de jugo gástrico y a menor pH de jugo intestinal, el porcentaje de supervivencia del *L. casei* será mayor y tiene acción probiótica. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas para la interacción entre las concentraciones de encapsulante y temperatura de secado.

El contenido de fructanos tipo inulina-fructooligosacáridos en el *Lactobacillus casei* microencapsulado con jugo de yacón mediante secado por aspersión fue de TR3 (6,37 g/l), TR2 (6,91 g/l), TR6 (7,20 g/l), TR1 (7,26 g/l), TR5 (7,61 g/l) y TR4 (7,96 g/l), donde todos los tratamientos conservaron el contenido de fructanos tipo inulina-fructooligosacáridos, encontrándose diferencias significativas por acción de la temperatura de microencapsulado y concentración de encapsulante, siendo mejor el tratamiento de menor temperatura y mayor concentración de encapsulante.

RECEIVED: FEBRUARY, 2024.
REVISED: MARCH, 2024

REFERENCIAS

[1]. BANDA, J. A. V., LIRA, A. J. R., ESQUIVIAS, M. T. y LÓPEZ, J. A. V. (2022): Aplicación del Método NOBA a diseños factoriales de tres niveles. **Pistas Educativas**, 43, 1-14.
[2]. BERGER, V. W. and ZHOU, Y. (2014): **Kolmogorov–Smirnov test: Overview**. Wiley statsref: Statistics reference online.
[3]. BERTINETTO, C., ENGEL, J., and JANSEN, J. (2020): ANOVA simultaneous component analysis: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, X, 100061-100061.
[4]. CONNELLY, L. M. (2021): Introduction to analysis of variance (ANOVA): **Medsurg Nursing**, 30, 218-158.
[5]. FERNÁNDEZ BAO, S. (2020): **Diseño de experimentos: Diseño factorial** (Tésis de Maestría, Universitat Politècnica de Catalunya):
[6]. HONG, Y., LINTON, O., MCCABE, B., SUN, J., and WANG, S. (2024): Kolmogorov–Smirnov type testing for structural breaks: A new adjusted-range based self-normalization approach. **Journal of Econometrics**, 238, 105603-105603.
[7]. KINI, K. R., MADAKYARU, M., HARROU, F., MENON, M. K., and SUN, Y. (2023): Improved Fault Detection in Chemical Engineering Processes via Non-Parametric Kolmogorov–Smirnov-Based Monitoring Strategy. **ChemEngineering**, 8, 1-1.
[8]. LIU, Q. and WANG, L. (2021): t-Test and ANOVA for data with ceiling and/or floor effects. **Behavior Research Methods**, 53, 264-277.
[9]. PÉREZ LÓPEZ, D. D. J., FRANCO MARTÍNEZ, J., GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ, F., HERNÁNDEZ ÁVILA, J., BALBUENA MELGAREJO, A. y GONZÁLEZ HUERTA, A. (2021): Diseño de experimentos factoriales 2n para su análisis con InfoStat e InfoGen. **Revista mexicana de ciencias agrícolas**, 12, 1087-1099.
[10]. QURAISY, A. (2020): Normalitas Data Menggunakan Uji Kolmogorov-Smirnov dan Saphiro-Wilk: Studi kasus penghasilan orang tua mahasiswa Prodi Pendidikan Matematika Unismuh Makassar. **Journal of Health Education Economics Science and Technology (J-HEST)**, 3, 7-11.
[11]. RODRÍGUEZ, A. R. M. (2021): Métodos alternativos ante la violación de supuestos en diseños de experimentos factoriales. En **Anales Científicos** (Vol. 82, No. 2, pp. 318-335): Universidad Nacional Agraria La Molina.
[12]. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. y REGUANT-ÁLVAREZ, M. (2020): Calcular la fiabilidad de un cuestionario o escala mediante el SPSS: el coeficiente alfa de Cronbach. **REIRE Revista d'Innovació i Recerca en Educació**, 13, 1-13.
[13]. ROSAS, L. V., TÉLLEZ, R. D., HERNÁNDEZ, M. L. C., TORRES, J. R. P. y AGUILAR, J. B. (2021): Diseño experimental factorial 2 3 para la determinación de valores óptimos en la producción de joyería de plata. **Journal de Objetos y Objetivos Matemáticos**, 2021, 18-22.
[14]. VALENCIA, T. E. S., CABALLERO, L. E. U., ANGUIANO, A. D. C. T., HERNÁNDEZ, H. J. V. y ROBLES, D. R. (2020): Análisis Estadístico en Aplicación de Soldadura GTAW Usando Diseño de Experimentos Factorial Completo. **Soldagem & Inspeção**, 25, 1-1.
[15]. YUCE, B. E., NIELSEN, P. V. and WARGOCKI, P. (2022): The use of Taguchi, ANOVA, and GRA methods to optimize CFD analyses of ventilation performance in buildings. **Building and Environment**, 225, 109587-109587.
[16]. ZIERK, J., ARZIDEH, F., KAPSNER, L. A., PROKOSCH, H. U., METZLER, M. and RAUH, M. (2020): Reference interval estimation from mixed distributions using truncation points and the Kolmogorov-Smirnov distance (kosmic): **Scientific reports**, 10, 1704-1704.