**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

**Tema:** Evaluación de la estabilidad de W*eizmannia coagulans* en una bebida carbonatada de *Ananas comosus* (piña) para la obtención de una bebida probiótica

---

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Doménica Salomé Ortiz Flores

**Tutor:** Mg. María Daniela Garcés Moncayo

**Ambato – Ecuador**

**Enero - 2026**

## APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

**CERTIFICA:**

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de diciembre de 2025



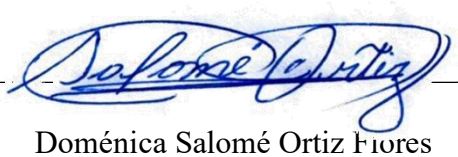

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

1803571585

**TUTOR**

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Doménica Salomé Ortiz Flores. Manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las referencias bibliográficas.



Doménica Salomé Ortiz Flores

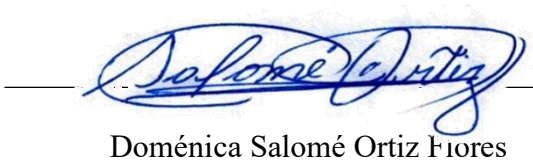
1805468939

**AUTOR**

## DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de discusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice representando mis derechos de autor.



Doménica Salomé Ortiz Flores

1805468939

**AUTOR**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final, del Trabajo de Titulación, Opción Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LORENA DE LOS ANGELES NUNEZ VILLACIS
Validar únicamente con FirmaEC

**Presidente del Tribunal**

Firmado electrónicamente por:
GABRIELA ELENA VIZUETE FIALLOS
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. Gabriela Elena Vizuete Fiallos

1715956213

Firmado electrónicamente por:
DANAE FERNANDEZ RIVERO
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Danae Fernández Rivero

1757181209

Ambato, 6 de enero de 2026

## DEDICATORIA

*A Dios,*

*A mis padres,*

*A mi hermana.*

**Doménica Salomé Ortiz Flores**

**AGRADECIMIENTO**

*Dios, por sostenerme con su amor infinito y darme la fuerza para seguir incluso en los momentos más difíciles; por su luz, su paz y su guía constante, que han sido refugio en cada paso y han formado mi corazón y mi fe.*

*A mi madre, Mery de los Ángeles Flores Correa, por amarme con un amor que no se cansa, por cuidarme, impulsarme y creer en mí aun cuando yo dudaba; por estar presente en cada esfuerzo, cada lágrima y cada victoria. Este logro también es tuyo, porque en tu amor encontré mi mayor seguridad.*

*A mi padre, José Félix Ortiz Velastegui, por tu amor firme y tu confianza en mí, por enseñarme con tu ejemplo a levantarme y seguir; gracias por ser mi guía, mi apoyo y mi más grande mentor. Tu orgullo y tus palabras siempre han sido motor para mí.*

*A mi hermana, Valeria Cristina Ortiz Flores, mi mejor amiga y mi complemento, por quererme como nadie, por acompañarme sin condiciones, por tu alegría, tu paciencia y tus abrazos en los días buenos y en los difíciles. Contigo la vida siempre se siente más ligera.*

*A mi tutora, Mg. María Daniela Garcés Moncayo, por su guía constante, su acompañamiento cercano en cada etapa de este proceso y por compartirme sus conocimientos con profesionalismo y dedicación.*

*Al Ing. Edwin Álvaro Solorzáno Saltos, por su apoyo y colaboración durante el desarrollo de este estudio.*

*Finalmente, a mí, por no rendirme, por darme la oportunidad de aprender de mis errores y convertirme en una mejor versión de mí misma cada día. Este trabajo me enseñó la resiliencia, la disciplina y reafirmó el amor que siento por mi carrera, recordándome que soy capaz de lograr lo que me propongo.*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ..... ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN ..... iii
DERECHOS DE AUTOR ..... iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO ..... v
DEDICATORIA ..... vi
AGRADECIMIENTO ..... vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS ..... viii
ÍNDICE DE FIGURAS ..... xi
ÍNDICE DE TABLAS ..... xiii
RESUMEN EJECUTIVO ..... xiv
ABSTRACT ..... xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO ..... 1
1.1. Antecedentes Investigativos ..... 1
1.1.1. Generalidades ..... 1
1.1.2. Probióticos ..... 2
1.1.2.1. Definición y características de los probióticos ..... 2
1.1.2.2. Beneficios para la salud humana ..... 3
1.1.2.3. Mecanismos de acción ..... 3
1.1.3. Bebidas probióticas ..... 5
1.1.3.1. Tipos de bebidas probióticas ..... 5
1.1.3.2. Tendencias actuales de mercado de las bebidas probióticas ..... 6
1.1.3.3. Limitaciones tecnológicas ..... 6
1.1.3.4. Limitaciones sensoriales y de consumo ..... 7
1.1.4. Bebidas carbonatadas probióticas: preferencias del mercado y estudios ..... 8
1.1.4.1. Contexto de mercado y oportunidades de innovación ..... 8

1.1.4.2. Estudios sobre la incorporación de probióticos en gaseosas ..... 8
1.1.5. *Ananas comosus* (piña): características generales y aceptación sensorial ..... 9
1.1.6. *Weizmannia coagulans*: características y ventajas en la industria alimentaria. 10
1.2. Objetivos ..... 11
1.2.1. Objetivo general ..... 11
1.2.2. Objetivos específicos ..... 11
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA ..... 12
2.1. Materiales ..... 12
2.1.1. Equipos de laboratorio ..... 12
2.1.2. Equipos de producción ..... 12
2.1.3. Reactivos ..... 12
2.1.4. Material fungible ..... 13
2.1.5. Material adicional ..... 13
2.2. Métodos ..... 14
2.2.1. Formulación de bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* con adición de *Weizmannia coagulans* en función del estado de madurez de la fruta y del nivel de carbonatación ..... 14
2.2.1.1. Selección de materia prima, extracción y tratamiento térmico del jugo de piña 14
2.2.1.2. Inoculación de *Weizmannia coagulans* ..... 15
2.2.1.3. Carbonatación, envasado y almacenamiento ..... 16
2.2.2. Determinación del efecto del estado de madurez y del nivel de carbonatación sobre la estabilidad de *Weizmannia coagulans* en las formulaciones durante el almacenamiento ..... 17
2.2.2.1. Diseño experimental y variable de respuesta ..... 17
2.2.2.2. Determinación de la estabilidad de *Weizmannia coagulans* ..... 17
2.2.3. Análisis de parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos de las formulaciones para determinar su calidad y aceptabilidad como bebida probiótica ..... 18

2.2.3.1. Evaluación fisicoquímica de las formulaciones ..... 18
2.2.3.2. Análisis microbiológico e inocuidad ..... 19
2.2.3.3. Evaluación de las características organolépticas a través de catación ..... 19
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 21
3.1. Análisis y discusión de resultados ..... 21
3.1.1. Formulación de las diferentes composiciones de bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* con adición de *Weizmannia coagulans*, utilizando frutos en distintos estados de maduración y niveles de carbonatación. ..... 21
3.1.2. Efecto del estado de maduración de la fruta y del nivel de carbonatación sobre la estabilidad microbiológica de *Weizmannia coagulans* en las formulaciones durante el almacenamiento ..... 24
3.1.2.1. Comportamiento general de la estabilidad de *Weizmannia coagulans* durante el almacenamiento ..... 24
3.1.2.2. Efecto del nivel de carbonatación (Gas) ..... 27
3.1.3. Análisis de los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos de las formulaciones para la determinación de su calidad y aceptabilidad como bebida probiótica ..... 33
3.1.3.1. Parámetros fisicoquímicos ..... 33
3.1.3.2. Parámetros microbiológicos ..... 36
3.1.3.3. Catación: evaluación de características organolépticas ..... 37
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ..... 44
4.1. Conclusiones ..... 44
4.2. Recomendaciones ..... 46
BIBLIOGRAFÍA ..... 47
ANEXOS ..... 58

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Mecanismos de acción de los probióticos..... 4
**Figura 2**. Estados de maduración de *Ananas comosus* (piña) según el color de la cáscara. ... 14
**Figura 3.** Clasificación de piñas según su estado de maduración en base al color de su cáscara. ..... 21
**Figura 4.** Bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* inoculadas con *Weizmannia coagulans* almacenadas en refrigeración (4 °C). ..... 23
**Figura 5.** Viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) en bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* durante ocho semanas (dos meses) de almacenamiento refrigerado. ..... 26
**Figura 6.** Promedio global de la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) según el nivel de carbonatación. ..... 28
**Figura 7.** Interacción Semana × Gas para la estabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) durante el almacenamiento. ..... 29
**Figura 8.** Promedio global de la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) según el estado de madurez de la piña..... 30
**Figura 9.** Interacción Semana × Madurez para la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) durante el almacenamiento. ..... 32
**Figura 10.** Evaluación semanal de pH de cada tratamiento durante el almacenamiento. ..... 34
**Figura 11.** Evaluación semanal de sólidos solubles (°Brix) de cada tratamiento durante el almacenamiento. ..... 34
**Figura 12.** Evaluación semanal de la acidez titulable de cada tratamiento durante el almacenamiento. ..... 35
**Figura 13.** Puntuación media del color para cada tratamiento. ..... 38
**Figura 14.** Puntuación media del olor para cada tratamiento. ..... 39
**Figura 15.** Puntuación media del sabor para cada tratamiento. ..... 40
**Figura 16.** Puntuación media de la textura para cada tratamiento. ..... 40
**Figura 17.** Puntuación media de la aceptación global para cada tratamiento. ..... 41
**Figura 18.** Morfología de *Weizmannia coagulans* a través del microscopio..... 58
**Figura 19.** Pelado de la piña……47
**Figura 20.** Cortado de la piña en trozos. ..... 58
**Figura 21.** Extracción de jugo de piña……....47
**Figura 22.** Pasteurización del jugo de piña. ..... 59
**Figura 23.** Adición de *Weizmannia coagulans* al jugo pasteurizado. ..... 59

Figura 24. Llenado de la bebida carbonatada. ..... 59
**Figura 25.** Bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* con adición de *Weizmannia coagulans* para catación. ..... 60
**Figura 26.** Organización de la catación: colocación de los vasos codificados con las bebidas, limpiador de paladar (agua simple) y la hoja de catación en las mesas de catadores. ..... 60
**Figura 27.** Catadores probando cada uno de los tratamientos de las bebidas realizadas. ..... 61
**Figura 28.** Placas de coliformes totales en agar MacConkey. ..... 61
**Figura 29.** Placas de aerobios mesófilos en PCA. ..... 62
**Figura 30.** Placas de mohos y levaduras en PDA. ..... 62
**Figura 31.** *Weizmmania coagulans* en agar Glucosa Extracto – Levadura. ..... 63
**Figura 32.** Certificado de análisis (CoA) del polvo liofilizado de *Bacillus coagulans* ( *Weizmannia coagulans*) utilizado en el estudio. ..... 64
**Figura 33.** Especificación del producto (ficha técnica) del polvo liofilizado de *Weizmannia coagulans* empleado en el estudio. ..... 65
**Figura 34.** Registro de instalación alimentaria del proveedor WECARE BIOENGINEERING CO., LTD. ante la U.S. FDA (Food Facility Registration, FFR). ..... 66

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos del jugo de piña según el estado de maduración. ..... 21
**Tabla 2.** Parámetros físicos y concentración de *Weizmannia coagulans* iniciales. ..... 22
**Tabla 3.** Análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas para la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) en bebidas carbonatadas de *Ananas comosus*. Efecto dentro de los sujetos. ..... 25
**Tabla 4.** Análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas, efecto entre sujetos. ..... 28
**Tabla 5.** Promedio global de pH, sólidos solubles y acidez titulable de las bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* según el tratamiento durante el almacenamiento. ..... 31
**Tabla 6.** Prueba de Kruskal – Wallis (ANOVA no paramétrico de un factor) para las características organolépticas de las bebidas probióticas de piña. ..... 37
**Tabla 7.** Promedio semanal del recuento de *Weizmannia coagulans* (UFC/mL) por tratamiento de bebida. ..... 67
**Tabla 8.** Promedio semanal del pH por tratamiento de bebida. ..... 67
**Tabla 9.** Promedio semanal de los °Brix por tratamiento de bebida. ..... 68
**Tabla 10.** Promedio semanal de la acidez por tratamiento de bebida. ..... 68

## RESUMEN EJECUTIVO

Las bebidas carbonatadas probióticas no fermentadas elaboradas con fruta se presentan como una alternativa de interés frente a las gaseosas tradicionales, al responder a la demanda de productos con menor contenido de azúcares añadidos, sin conservantes químicos y con beneficios probióticos, lo que abre la oportunidad de incorporar microorganismos esporulados estables en bebidas gaseosas de base frutal. En este trabajo se desarrollaron y evaluaron seis formulaciones de bebida carbonatada de jugo de piña con adición de *Weizmannia coagulans*, variando el estado de madurez de la fruta y el nivel de carbonatación; el jugo se sometió a pasteurización, se mezcló con agua y se gasificó con dióxido de carbono, para luego ser envasado y almacenado bajo refrigeración durante dos meses, periodo en el que se monitorearon parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, así como la viabilidad del probiótico y la aceptación sensorial mediante un panel de consumidores jóvenes. Los resultados evidenciaron que todas las formulaciones mantuvieron recuentos de *Weizmannia coagulans* por encima del mínimo recomendado para ejercer efecto probiótico, sin indicios de fermentación indeseada y con estabilidad en pH, acidez y sólidos solubles, mientras que las bebidas elaboradas con piña madura alcanzaron las mejores puntuaciones sensoriales, por lo que se perfilan como la alternativa más prometedora para su validación tecnológica y eventual escalado industrial como bebida probiótica carbonatada con etiqueta limpia dirigida a población joven.



**Palabras clave:** *Weizmannia coagulans, probiótico, bebida probiótica, jugo de piña, estabilidad del probiótico.*

## ABSTRACT

Non fermented probiotic carbonated beverages made with fruit are emerging as an attractive alternative to traditional soft drinks, as they respond to the demand for products with lower added sugar content, no chemical preservatives and probiotic benefits, creating an opportunity to incorporate stable spore forming microorganisms into fruit based carbonated beverages. In this study, six formulations of a carbonated pineapple juice beverage with added *Weizmannia coagulans* were developed and evaluated, varying the ripeness stage of the fruit and the level of carbonation; the juice was pasteurized, mixed with water and carbonated with carbon dioxide, then bottled and stored under refrigeration for two months, during which physicochemical and microbiological parameters, probiotic viability and sensory acceptance were monitored using a panel of young adult consumers. The results showed that all formulations maintained *Weizmannia coagulans* counts above the minimum recommended to exert a probiotic effect, with no evidence of undesirable fermentation and with stable pH, titratable acidity and soluble solids, while beverages made with ripe pineapple achieved the highest sensory scores and therefore stand out as the most promising alternative for technological validation and eventual industrial scale up as a clean label carbonated probiotic beverage targeted at young consumers.



**Keywords:** *Weizmannia coagulans, probiotic, probiotic beverage, pineapple juice, probiotic stability.*

# CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

## 1.1. Antecedentes Investigativos

### 1.1.1. Generalidades

La creciente concientización sobre el impacto de los probióticos en la salud humana ha impulsado el desarrollo y la expansión del mercado de alimentos y bebidas que los incorporan, en respuesta al aumento de la demanda por parte de los consumidores **(Abdul, 2025).** A escala global, el mercado de alimentos y bebidas probióticos fue valorado en 53.742,1 millones USD en 2023 y se proyecta que alcance los 135.055,5 millones USD para 2030 **(Grand View Research, 2024).** Este panorama refleja una gran oportunidad para el desarrollo de nuevos productos funcionales; sin embargo, también evidencia la necesidad de abordar desafíos tecnológicos y sensoriales, especialmente relacionados con la estabilidad de probióticos durante el almacenamiento y la aceptación de las matrices alimentarias disponibles.

En este contexto, bebidas fermentadas como el kéfir y la kombucha se han consolidado como vehículos tradicionales de probióticos y cuentan con un segmento de consumidores que valoran sus cualidades funcionales **(Chong et al., 2023).** No obstante, los estudios sensoriales revelan que las características organolépticas propias de la fermentación probiótica, como la acidez pronunciada y los sabores fermentativos intensos, pueden limitar su aceptación entre consumidores que prefieren perfiles sensoriales más suaves **(Cohen et al., 2023; Larosa et al., 2021).** Esta situación ha incentivado a la industria y a la comunidad científica a explorar nuevas matrices probióticas con sabores más suaves y familiares, entre las que destacan las bebidas a base de frutas y las bebidas carbonatadas.

Los jugos de frutas y las bebidas carbonatadas son medios populares para el consumo de probióticos; los primeros, por la percepción de naturalidad y los compuestos bioactivos que ofrecen, y las segundas, por la gasificación que mejora la experiencia sensorial de las bebidas **(Barker et al., 2021; Rahman et al., 2023)**. Sin embargo, ambas constituyen matrices desafiantes para la estabilidad de cepas como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, debido a su bajo pH, contenido de oxígeno disuelto y ácidos orgánicos **(Fiocco et al., 2019; Tan et al., 2023)**. En el caso particular de las gaseosas, el dióxido de carbono disuelto puede intensificar este estrés sobre los microorganismos **(Azeredo et al., 2016; Thinkohkaew et al., 2025).** A esto se suma que las formulaciones comerciales se caracterizan por altas concentraciones de azúcares añadidos y aditivos artificiales **(Barker et al., 2021).**

Frente a esta problemática, las bebidas carbonatadas a base de jugos de frutas surgen como una alternativa para fusionar la aceptación sensorial de las gaseosas con los beneficios nutricionales de la fruta. La piña (*Ananas comosus*) emerge como una matriz ideal por su perfil dulce – ácido, su alta aceptación y su composición rica en compuestos bioactivos **(Ali et al., 2020).** Por otro lado, la bacteria probiótica *Weizmannia coagulans* representa una opción tecnológicamente favorable, ya que tiene la capacidad de formar esporas resistentes al pH ácido y a diversos factores de estrés asociados al procesamiento y almacenamiento de alimentos **(Fijan et al., 2023).** A pesar de ello, la información disponible sobre la estabilidad de *Weizmannia coagulans* en bebidas carbonatadas de base frutal sigue siendo limitada.

Considerando que el grado de maduración de la piña modifica parámetros clave de la matriz, como el pH y el contenido de azúcares, y que el nivel de carbonatación determina la cantidad de dióxido de carbono disuelto y, por ende, la intensidad del estrés al que se somete al probiótico, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la estabilidad de *Weizmannia coagulans* en una bebida carbonatada de *Ananas comosus* en función de la maduración de la fruta y la carbonatación. Esta evaluación se plantea como base para el desarrollo de una bebida probiótica sensorialmente aceptable y alineada con las tendencias actuales de consumo de productos más saludables.

### 1.1.2. Probióticos

#### 1.1.2.1.Definición y características de los probióticos

El término "probiótico", derivado del latín *pro* ("para") y del griego *bios* ("vida"), fue propuesto a mediados del siglo XX, pero su concepto científico se fundamenta en las investigaciones realizadas por el biólogo ruso Elie Metchnikoff **(Ji et al., 2023).** Metchikoff postuló "la teoría de la longevidad" al observar que poblaciones con alto consumo de leches fermentadas, ricas en bacterias ácido – lácticas, presentaban una mayor esperanza de vida **(Mackowiak, 2013).** Tras años de estudio, este principio se concretó en la definición actual: "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped" **(FAO/WHO, 2001).**

Para cumplir con esta definición, un microorganismo debe reunir requisitos esenciales de seguridad (identificación genética, ausencia de patogenicidad y toxicidad) **(Staniszewski & Kordowska, 2021)** y de funcionalidad. En cuanto a este último, el microorganismo debe resistir las condiciones del tracto gastrointestinal (ácido gástrico, bilis y enzimas digestivas) para llegar viable al intestino y colonizarlo transitoriamente **(Sarita et al., 2025).** Para asegurar su

supervivencia, se suele formular en alimentos o matrices protectoras que mantengan una viabilidad mínima de $10^6$ UFC/g o UFC/mL hasta el final de su vida útil **(Rodrigues et al., 2024).**

Diversos géneros de microorganismos cumplen con estas características y han sido utilizados como probióticos. Tradicionalmente, las bacterias ácido – lácticas de los géneros *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. han sido las más comunes, junto a la levadura *Saccharomyces* spp. **(Sarita et al., 2025).** En años recientes también destacan cepas esporuladas como *Weizmannia coagulans* (antes *Bacillus coagulans*) debido a su resistencia y versatilidad **(Fijan et al., 2023).**

### 1.1.2.2.Beneficios para la salud humana

A nivel gastrointestinal, los probióticos han demostrado múltiples beneficios. En primer lugar, ciertas cepas ayudan a prevenir y acortar diarreas infecciosas, incluidas las asociadas a antibióticos. Este efecto se logra mediante mecanismos como la exclusión competitiva de patógenos y la producción de sustancias antimicrobianas **(Goodman et al., 2021; Kopacz & Phadtare, 2022)**. En segundo lugar, se emplean en el manejo de trastornos crónicos como el síndrome del intestino irritable y enfermedades inflamatorias intestinales. Su acción se basa en la reducción de la inflamación local y la regulación de la motilidad intestinal **(Cristofori et al., 2021).** Por último, también mejoran la intolerancia a la lactosa gracias a la expresión de enzimas β – galactosidasas y reducen la incidencia de úlceras gástricas por *Helicobacter pylori,* al interferir con su adhesión a la mucosa gástrica **(Ahn et al., 2023; Yang et al., 2024).**

A nivel sistémico, los probióticos modulan la inmunidad a través del eje intestino – pulmón, lo que se traduce en una menor incidencia de infecciones respiratorias **(Mazziotta et al., 2023).** Así mismo, ejercen efectos metabólicos beneficiosos. Por ejemplo, promueven una reducción moderada del colesterol debido a su capacidad para incorporar y metabolizar ácidos biliares. También tienen un efecto favorable en el control de la obesidad y la diabetes al influir en la producción de hormonas reguladoras del apetito y en la sensibilidad a la insulina **(Nadeem et al., 2024).** Cabe mencionar que las propiedades de los probióticos son específicas, es decir, los beneficios documentados para un microorganismo en particular no pueden generalizarse automáticamente para otros.

### 1.1.2.3. Mecanismos de acción

Los probióticos ejercen sus efectos a través de cuatro mecanismos de acción principales interconectados. El primero es la exclusión competitiva, donde compiten con los patógenos por nutrientes y sitios de adhesión en el epitelio intestinal. Complementan esta acción actuando

como agentes microbianos mediante la producción de sustancias como: bacteriocinas, ácidos grasos de cadena corta, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno. El segundo mecanismo es el fortalecimiento de la barrera intestinal, el cual se consigue al estimular la producción de mucinas y regular la expresión de proteínas de unión estrecha (como ocludina y claudina – 1), lo que reduce la permeabilidad (evita la translocación de patógenos del intestino a la sangre) y modula la respuesta inflamatoria local. El tercero es la inmunomodulación, donde regulan tanto la respuesta innata como la adaptativa al interactuar con células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y T, promoviendo la producción de citocinas antiinflamatorias, Por último, el cuarto mecanismo involucra la producción de neurotransmisores (como serotonina, GABA y dopamina) a través del eje intestino – cerebro, influyendo en la motilidad intestinal, el estado de ánimo y la respuesta al estrés **(Latif et al., 2023; Plaza et al., 2019).**

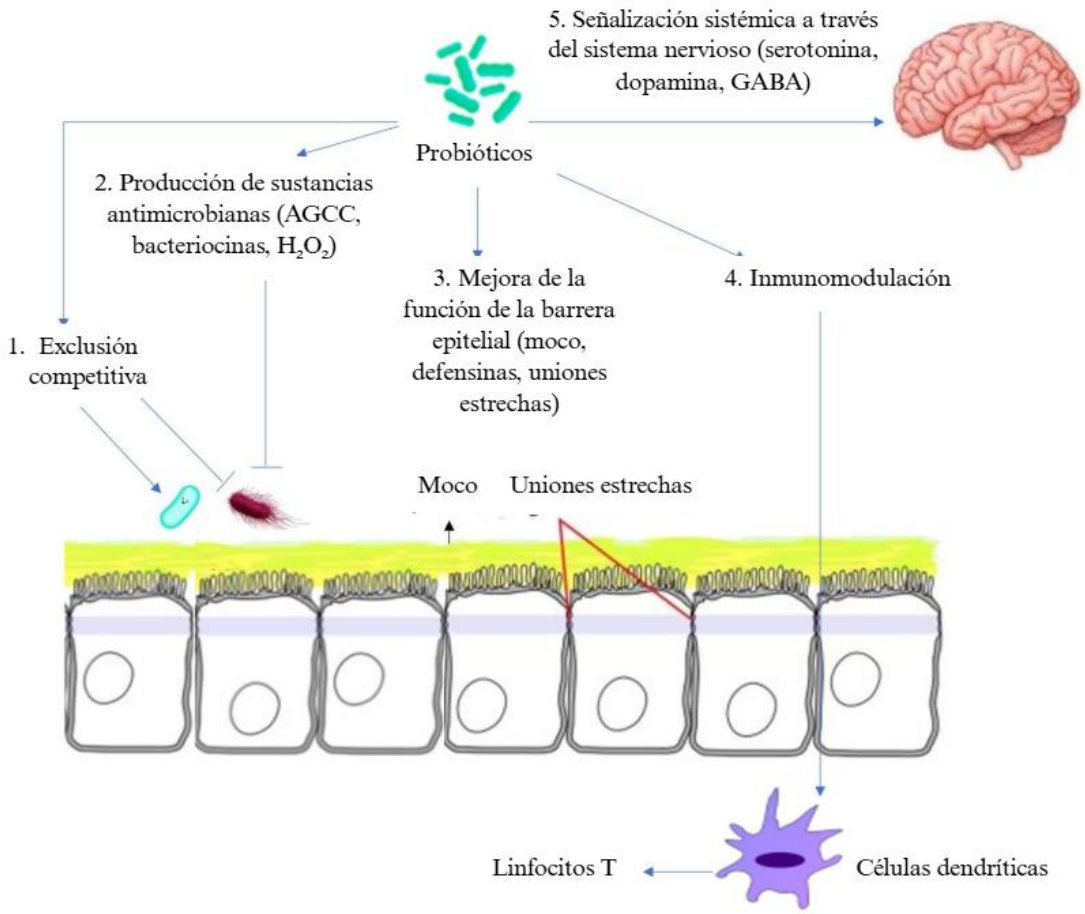



**Figura 1.** Mecanismos de acción de los probióticos.

**Nota:** La figura describe los principales mecanismos de acción de los probióticos. (1) Exclusión competitiva de patógenos, (2) producción de sustancias antimicrobianas, (3) fortalecimiento de la barrera intestinal, (4) modulación de la respuesta inmunitaria y (5) producción de

neurotransmisores en el eje intestino – cerebro. Adaptada de los mecanismos descritos por **Latif et al. (2023).**

### 1.1.3. Bebidas probióticas

Las bebidas probióticas se han consolidado como una de las categorías más consumidas dentro de los alimentos funcionales. Esto se debe a que integran tres beneficios clave: hidratación, aporte nutricional y la inclusión de microorganismos vivos los cuales pueden modular la microbiota intestinal y contribuir a la salud del consumidor **(Lei et al., 2025)**. Para ser consideradas probióticas, las bebidas deben aportar al menos $10^6$ UFC/mL de microorganismos viables al momento de consumo **(Rodrigues et al., 2024)**.

#### 1.1.3.1. Tipos de bebidas probióticas

En función de la matriz y el modo en que se incorporan los cultivos, las bebidas probióticas se clasifican en:

a) **Bebidas lácteas fermentadas**

   Incluyen yogures, leches fermentadas y kéfir. Se elaboran a partir de la inoculación de bacterias ácido – lácticas, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales fermentan lactosa y generan ácido láctico. El proceso se lleva a cabo mediante incubación controlada (entre 30 y 45 ° C) hasta alcanzar recuentos viables iguales o superiores a $10^6 \frac{UFC}{mL}$ **(Jang et al., 2024; Sun et al., 2023).**

b) **Bebidas a base de frutas, vegetales y cereales**

   Incluyen jugos de frutas y vegetales, extractos, néctares y bebidas de cereales/pseudocereales. Se pueden obtener de dos formas principales:

   - **Fermentación *in situ*:** El jugo o extracto vegetal se inocula con cepas probióticas (generalmente *Lactobacillus* spp.) y se fermenta bajo condiciones controladas de temperatura (30 – 40 ° C) **(Žvirdauskienė et al., 2025).**
   - **Fortificación sin fermentación:** El jugo pasteurizado se enriquece con probióticos liofilizados o encapsulados sin provocar fermentación. La finalidad es mantener el sabor, color y dulzor originales de la fruta **(Condurso et al., 2025).**

c) **Bebidas a base de leguminosas y "leches" vegetales**

   Comprenden bebidas de soja, almendra, avena, arroz u otras matrices vegetales. Pueden fermentarse con bacterias lácticas o fortificarse con probióticos ofreciendo una alternativa no láctea para personas con intolerancia a la lactosa o que siguen dietas vegetales **(Valero et al., 2020).**

**d) Bebidas fermentadas de té y otras infusiones**

La kombucha y otras bebidas de té fermentado se han popularizado como bebidas "vivas", donde coexisten bacterias lácticas, acéticas y levaduras. Aunque no todas las kombuchas cumplen estrictamente con la concentración mínima de $10^6$ UFC/mL al momento de consumo, varias se comercializan como bebidas funcionales que aportan microorganismos fermentadores y metabolitos bioactivos **(Budimac et al., 2025)**.

**e) Bebidas probióticas carbonatadas**

Son sodas o aguas saborizadas que incorporan probióticos, normalmente encapsulados para resistir el pH bajo y la presencia de $CO_2$. Se trata de una categoría emergente y aún poco explorada en comparación con leches y jugos fermentados **(Tan et al., 2023).**

### 1.1.3.2. Tendencias actuales de mercado de las bebidas probióticas

Las bebidas probióticas se han posicionado como uno de los segmentos de mayor crecimiento dentro de las bebidas funcionales. En 2023 el mercado global de probióticos en bebidas y alimentos se valoró en 53.742,1 millones de dólares y se provee que incrementará a una tasa de crecimiento anual compuesta del 14,1% entre 2023 y 2030 **(Grand View Research, 2024)**. Con respecto al mercado latinoamericano, se estima que el mercado de yogur y bebidas probióticas generó 7.012,8 millones de dólares en 2021 y se espera que alcance unos ingresos proyectados de 15.185,8 millones de dólares para 2030. Se espera una tasa de crecimiento anual compuesta del 8,5% entre 2025 y 2030 **(Grand View Research, 2022)**. Estas cifras demuestran la rentabilidad de este mercado y la factibilidad de producirlas a escala industrial.

Este crecimiento está impulsado por:

- Mayor conciencia sobre la salud intestinal y la microbiota,
- Preferencia por productos listos para consumir que facilitan la ingesta diaria de probióticos,
- Interés en alimentos funcionales que combinen sabor, conveniencia y beneficios para la salud digestiva inmunológica y metabólica **(Khatun & Bhattacharya et al., 2024).**

### 1.1.3.3. Limitaciones tecnológicas

Aunque el mercado se ha expandido hacia matrices no lácteas (jugos, bebidas vegetales, bebidas carbonatadas), no todos los probióticos se comportan igual en estos medios. Las bacterias lácticas clásicas, seleccionadas inicialmente para leches fermentadas, suelen ser más sensibles a las condiciones de jugos ácidos y refrescos que a la leche debido a varios factores:

- pH más bajo (2.5 – 3.7 típico de muchos jugos) frente al pH inicial de la leche (6.6); el rango óptimo de crecimiento de muchas cepas de Lactobacillus se sitúa alrededor de 5.5 – 6.2 **(Spinasse et al., 2023).**
- Menor capacidad tampón de los jugos frente a la leche; pequeños descensos de pH generan grandes aumentos de acidez percibida y estrés ácido para las células **(Condurso et al., 2025).**
- Oxígeno disuelto y, en el caso de las bebidas carbonatadas, la combinación de oxígeno, $CO_2$ y presión que incrementa al estrés oxidativo y acidificante sobre las células **(Condurso et al., 2025).**

Debido a estos factores se han adoptado distintas estrategias claves detalladas a continuación:

- Selección de microorganismos tolerantes, incluidas bacterias esporuladas como *Weizmannia coagulans*, que resisten mejor el pH bajo y la presencia de oxígeno o $CO_2$ **(Fijan et al., 2023).**
- La microencapsulación de las células con biopolímeros como alginatos, que las protege de la acidez y el estrés osmótico **(Sbehat et al., 2022).**
- Y, por último, ajuste del pH y formulación mediante combinaciones de frutas, azúcares o prebióticos que amortiguan el estrés ácido **(Valero et al., 2020).**

#### 1.1.3.4. Limitaciones sensoriales y de consumo

Además de las limitaciones tecnológicas, existen barreras de consumo que impide que un sector del mercado adquiera este tipo de bebidas. Una de las principales restricciones es el uso de matrices lácteas en formulaciones tradicionales, por lo que no son adecuadas para personas con intolerancia a la lactosa, alergia a proteínas de la leche de vaca o que siguen dietas vegetarianas o veganas **(Hidalgo et al., 2024).**

Además de las restricciones dietéticas, el perfil sensorial representa otro desafío significativo. Muchos consumidores perciben a las bebidas fermentadas como excesivamente ácidas o difíciles de digerir, lo que limita su adopción cotidiana. Estudios específicos confirman esta tendencia: en kéfir, por ejemplo, los catadores señalaron que les disgustaba las notas ácidas y fermentadas, por lo que era necesario corregir estas características a través de la adición de endulzantes **(Larosa et al., 2021)**. Así mismo, la kombucha es calificada como una bebida con sabores avinagrados, poco atractivos para los consumidores **(Cohen et al., 2023).**

En respuesta, la industria ha empezado a indagar nuevas matrices alimentarias que se adapten mejor a las preferencias del consumidor, entre ellas, jugos no fermentados y bebidas carbonatadas debido a su alta aceptación por parte del mercado.

### 1.1.4. Bebidas carbonatadas probióticas: preferencias del mercado y estudios

#### 1.1.4.1. Contexto de mercado y oportunidades de innovación

Las bebidas carbonatadas (gaseosas) mantienen una posición dominante en el mercado global de bebidas, representando alrededor del 33,56% de las bebidas sin alcohol en 2024 **(Mordor Intelligence, 2025)**. Además, su consumo es especialmente alto entre los adolescentes: un estudio realizado en 53 países de ingresos bajos y medios en jóvenes de 12 a 15 años reveló que el consumo medio de gaseosas fue de 1,39 veces al día, con las frecuencias más elevadas registradas en América Latina **(Yang et al., 2017).** Este patrón de consumo contrasta con la creciente evidencia científica que vincula el consumo excesivo de azúcares añadidos con mayores riesgos de obesidad, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares **(Tahmassebi & Bani, 2020)**. Este escenario de alta demanda, pero creciente preocupación por la salud ha creado una ventana de oportunidad para el desarrollo de "sodas saludables", formuladas con menor contenido de azúcares, ingredientes funcionales (como probióticos) y bases de frutas naturales.

#### 1.1.4.2. Estudios sobre la incorporación de probióticos en gaseosas

Como se mencionó anteriormente, la incorporación de probióticos en bebidas carbonatadas platea retos tecnológicos debido a la combinación de pH bajo y presencia de $CO_2$. Diversos estudios han evaluado la estabilidad de probióticos en sodas comerciales utilizando microencapsulación como estrategia de protección. **Tan et al. (2023)** encapsularon *Lacticaseibacillus rhamnosus GG, Bifidobacterium longum* y *Escherichia coli* Nissle 1917 en esferas de alginato y los expusieron a refrescos carbonatados (Coca – cola, 7 – Up) y cervezas; la encapsulación mejoró significativamente la supervivencia de los probióticos tanto durante el almacenamiento en refrigeración y temperatura ambiente como bajo condiciones gástricas simuladas. Resultados similares se han reportado en estudios recientes que evaluaron la estabilidad de probióticos microencapsulados en sodas y bebidas espumosas, confirmando que las matrices carbonatadas, sin protección, son altamente hostiles para la mayoría de las bacterias lácticas **(Thinkohkaew et al., 2025).**

Estas tecnologías, sin embargo, incrementan los costos de producción. Por ende, resulta fundamental evaluar la estabilidad de cepas probióticas intrínsicamente resistentes, como las bacterias formadoras de esporas, en comparación con las cepas tradicionales, con el fin de

desarrollar formulaciones viables que no dependan exclusivamente de sistemas de protección. Además, la evidencia que vincula a las bebidas azucaradas con mayor riesgo de obesidad y diabetes motiva la reformulación de estos productos: sodas que conserven la experiencia sensorial de las sodas, pero basados en matrices de fruta natural, con menor carga de azúcares libres y valor funcional añadido.

### 1.1.5. *Ananas comosus* (piña): características generales y aceptación sensorial

La piña (*Ananas comosus*) es una fruta tropical ampliamente consumida y valorada por su sabor dulce – ácido, su aroma intenso y su color amarillo brillante, características que la convierten en una materia prima sensorialmente atractiva para el desarrollo de bebidas refrescantes y funcionales **(Spence, 2023)**. Desde el punto de vista composicional, la pulpa y el zumo de piña representan contenidos de sólidos solubles que suelen situarse en torno a 12 – 19 ° Brix, formados principalmente por sacarosa, glucosa y fructosa, junto con ácidos orgánicos (sobre todo cítrico y málico), vitamina C y minerales como potasio y magnesio **(Ali et al., 2020; Lasekan & Khalifa, 2018)**. En cuanto a su composición fisicoquímica, esta varía según el estado de madurez. A medida que la piña madura, se observa un incremento en los sólidos solubles totales y en el contenido de azúcares, mientras que disminuyen la acidez titulable disminuye, el contenido de vitamina C y la firmeza de la pulpa. Estos cambios modifican directamente el perfil sensorial del fruto, resultando en un sabor más dulce y menos ácido, junto con una textura más blanda **( Kamol et al., 2014).**

Además de su aporte energético y vitamínico, la piña contiene compuestos bioactivos, entre ellos polifenoles (ácido clorogénico, gálico y ferúlico) y carotenoides, que contribuyen a su capacidad antioxidante y refuerzan su imagen de alimento saludable **(Ali et al., 2020)**. Desde la perspectiva tecnológica, el alto rendimiento en jugo de la piña (aproximadamente del 71.09 %) favorece su aprovechamiento industrial en la producción de bebidas y néctares **(Somnath et al., 2018)**. En términos sensoriales, la piña es calificada con altas valoraciones en atributos clave como el color, aroma y sabor, aspectos que sustentan su amplia aceptación en el mercado **(Deivasigamani et al., 2021)**. Gracias a este conjunto de atributos, *Ananas comosus* se considera una matriz adecuada para bebidas carbonatadas, capaz de combinar la sensación refrescante y efervescente de una soda con el atractivo natural de una fruta rica en nutrientes y compuestos bioactivos.

### 1.1.6. *Weizmannia coagulans*: características y ventajas en la industria alimentaria

*Weizmannia coagulans* (antes *Bacillus coagulans*) es una bacteria Gram positiva, formadora de endosporas y productora de ácido láctico, considerada actualmente como un probiótico de nueva generación **(Zhang et al., 2024).** Estudios taxonómicos recientes basados en genómica llevaron a su reclasificación dentro del género *Weizmannia*, separándola del amplio grupo de *Bacillus* sensu lato **(Wang et al., 2022)**. Morfológicamente se presenta como bacilos capaces de formar esporas altamente resistentes (ver **Anexo 1**); metabólicamente, se comporta como una bacteria láctica esporulada, con producción predominante de ácido láctico a partir de carbohidratos fermentables **(Huang et al., 2024)**. La temperatura óptima de crecimiento suele situarse entre 35 y 50 °C, con buena tolerancia a pH moderadamente ácido (5.5 – 6.5), y sus esporas resisten condiciones más extremas de acidez, calor, y desecación que las bacterias lácticas tradicionales **(Payne et al., 2024)**. En condiciones de refrigeración o temperatura ambiente las esporas no germinan, pero permanecen en estado de reposo conservando su viabilidad durante prolongados periodos de almacenamiento **(Payne et al., 2025).**

Una característica fundamental de *W. coagulans* es su extraordinaria estabilidad en forma de espora durante el procesamiento y el almacenamiento de alimentos. Ensayos de estabilidad han demostrado que cepas comerciales como *B. coagulans* MTCC 5856 mantienen altos recuentos viables tras procesos como secado por aspersión, horneado moderado y almacenamiento a temperatura ambiente, con pérdidas de viabilidad inferiores al 1 – 2 log en varios **meses (Majeed et al., 2016).** Las características de esta bacteria permiten incorporarla como probiótico en matrices en las que *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* difícilmente sobrevivirían, como productos horneados, snacks extruidos y bebidas ácidas o carbonatadas **(Payne et al., 2025).** Desde el punto de vista de seguridad, *W. coagulans* ha sido evaluada como segura para el consumo humano y algunas cepas gozan del estatus GRAS, lo que respalda su uso en diversas categorías de alimentos y suplementos **(Fijan et al., 2023).**

En cuanto a sus propiedades probióticas, *W. coagulans* puede contribuir a equilibrar la microbiota intestinal, mejorar la digestibilidad y ejercer efectos inmunomoduladores. **Cao et al. (2020)** y **Wu et al. (2024)** recopilan estudios clínicos y preclínicos donde la administración de esporas de *W. coagulans* redujo síntomas gastrointestinales funcionales, mejoró parámetros inflamatorios y favoreció la producción de ácidos grasos de cadena corta en el colon. Su principal ventaja tecnológica frente a otros probióticos radica en que estas funciones pueden mantenerse aun cuando el producto se almacena a temperatura ambiente, sin necesidad de cadena de frío estricta **(Wang et al., 2022).**

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general

Evaluar la estabilidad de *Weizmannia coagulans* en una bebida carbonatada de *Ananas comosus* (piña) para la obtención de una bebida probiótica.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Formular diferentes composiciones de bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* con adición de *Weizmannia coagulans*, utilizando frutos en distintos estados de maduración y niveles de carbonatación.
- Determinar el efecto del estado de maduración de la fruta y del nivel de carbonatación sobre la estabilidad microbiológica de *Weizmannia coagulans* en las formulaciones durante el almacenamiento.
- Analizar los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos de las formulaciones para la determinación de su calidad y aceptabilidad como bebida probiótica.

# CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

## 2.1. Materiales

El presente trabajo de titulación se desarrolló en los Laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato, cuyas instalaciones contaron con los recursos y equipos necesarios para su ejecución. Adicionalmente, se trabajó en coordinación con la empresa ambateña JOMER, dedicada a la elaboración de licores y bebidas, en cuyas instalaciones se realizó la formulación y carbonatación de las bebidas experimentales.

### 2.1.1. Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cuenta colonias
- Incubadora
- Microondas
- Microscopio óptico
- Plancha de agitación
- Potenciómetro
- Refractómetro
- Refrigerador
- Vórtex

### 2.1.2. Equipos de producción

- Inyector de $CO_2$ contra presión
- Extractor de jugo

### 2.1.3. Reactivos

- Aceite de inmersión
- Agar Glucosa Extracto – Levadura (GYE)
- Agar MacConkey
- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Agar recuento en placa (PCA)
- Agua destilada

- Agua peptonada
- Alcohol acetona
- Cristal – violeta
- Etanol al 70%
- Etanol al 90 %
- Fenolftaleína
- Hidróxido de Sodio 0.1 N (NaOH)
- Lugol
- Safranina
- Verde malaquita 5%

### 2.1.4. Material fungible

- Asa de siembra
- Asa Drigalski
- Botellas de plástico (460 mL)
- Cinta adhesiva
- Parafilm
- Pipetas Pasteur
- Placas Petri de plástico
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Puntas de micropipetas (100 – 1000 µL)
- Rotulador permanente negro
- Tubos Falcon (15 mL)

### 2.1.5. Material adicional

- Botellas Boeco (500 mL)
- Bureta (10 mL)
- Gradilla de tubos Falcon
- Matraces Erlenmeyer (250 mL)
- Mechero de alcohol
- Micropipeta (100 – 1000 µL)
- Piseta
- Probeta (10 mL; 250 mL; 1000 mL)

- Rejilla
- Soporte universal
- Varilla de agitación
- Vasos de precipitación (250 mL; 1000 mL)
- Termómetro
- Olla
- Baldes de acero inoxidable

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Formulación de bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* con adición de *Weizmannia coagulans* en función del estado de madurez de la fruta y del nivel de carbonatación

#### 2.2.1.1. Selección de materia prima, extracción y tratamiento térmico del jugo de piña

Se seleccionaron piñas (*Ananas comosus*) en tres estados de madurez: verde, semi – maduro y maduro empleando criterios físicos y fisicoquímicos. La madurez se clasificó principalmente por el color de la cáscara como se observa en la **Figura 2**, el contenido de sólidos solubles (°Brix), pH y acidez titulable, dado que el avance de la maduración en piña se asocia a incremento de °Brix, disminución de la acidez y cambio de la cáscara de verde a amarillo – naranja **(INEN, 2016; Rashima et al., 2021)**.

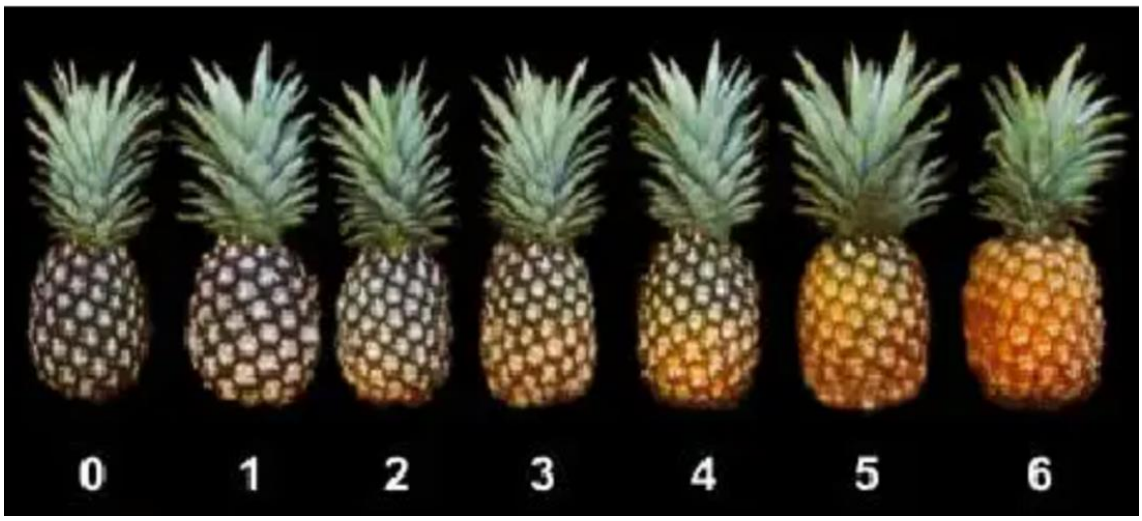



**Figura 2**. Estados de maduración de *Ananas comosus* (piña) según el color de la cáscara.

**Nota:** Imagen adaptada de la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1836 – 2: 2016 "Frutas frescas. Piña. Requisitos", la cual adopta la escala de grados de color (0–6) propuesta originalmente por la Norma Técnica Colombiana 729 – 1 "Frutas frescas. Piña. Especificaciones". En dicha

escala, los grados 0 – 1 describen frutos bien desarrollados con cáscara predominantemente verde; los grados 2 – 4 corresponden a frutos en transición, con aparición y aumento progresivo de tonos amarillos desde la base hacia la zona media y la corona; y los grados 5 – 6 representan frutos con color amarillo intenso y visos anaranjados, hasta alcanzar una coloración prácticamente anaranjada en toda la superficie del fruto. En este estudio, los grados 0–1 se agruparon como estado verde, 2–4 como semi–maduro y 5–6 como maduro **(INEN, 2016; ICONTEC, 2006)**.

Las piñas se adquirieron en el Mercado Mayorista de Ambato, en la sección "Frutas de la Costa", y se seleccionaron descartando frutos con daños mecánicos o signos de deterioro. Posteriormente, se lavaron con agua potable y se pelaron de manera higiénica. El jugo se extrajo por prensado utilizando un extractor de jugo de tipo centrífugo.

El jugo de piña se sometió a una pasteurización térmica a 95 °C durante 3 minutos (se realizó a pequeña escala en una olla de acero inoxidable controlando la temperatura con un termómetro de alcohol) con el objetivo de reducir la carga microbiana y enzimas alterantes, preservando al mismo tiempo compuestos sensoriales y bioactivos de la fruta, de acuerdo con las condiciones habitualmente empleadas en jugos de frutas **(Zia et al., 2024)**. Inmediatamente después del tratamiento térmico, el jugo se enfrió rápidamente mediante inmersión del contenedor en un baño de agua con hielo hasta alcanzar aproximadamente 10 °C y luego se almacenó en refrigeración a 4 ± 1 °C hasta su utilización.

Esta etapa del proceso se llevó a cabo en colaboración con la empresa JOMER, dedicada a la elaboración de bebidas y licores, que proporcionó el apoyo tecnológico para el manejo y almacenamiento del jugo.

#### 2.2.1.2. Inoculación de *Weizmannia coagulans*

El probiótico utilizado fue *Weizmannia coagulans* en forma de polvo liofilizado de uso comercial para alimentos, suministrado por la empresa JOMER. La documentación que demuestra que el probiótico adquirido es seguro para consumo humano puede ser visualizada en el **Anexo 6**.

El polvo se rehidrató previamente en agua estéril a 20 ± 2 °C, preparando una suspensión madre a razón de 1 g en 100 mL de agua estéril siguiendo la relación masa/volumen utilizada por **Ormaza et al. (2024)**, con agitación manual hasta obtener una mezcla homogénea.

La suspensión probiótica se añadió al jugo de piña pasteurizado y previamente enfriado (4 ± 1 °C) calculando el volumen de inóculo de manera que, considerando la dilución posterior con agua carbonatada (30 % jugo y 70 % agua), la concentración objetivo en el producto final fuese de $5\times10^7$ UFC/mL (7,7 log UFC/mL). Este nivel se encuentra dentro del rango mínimo sugerido ($\geq10^6$ UFC/mL) **(Condurso et al., 2025)**.

La inoculación se realizó a baja temperatura (4 °C) y bajo agitación suave y continua de cada lote de jugo con el fin de asegurar la homogeneidad y, al mismo tiempo, minimizar el estrés térmico y evitar una germinación activa de las esporas antes del almacenamiento.

#### 2.2.1.3. Carbonatación, envasado y almacenamiento

El proceso de carbonatación descrito a continuación correspondió al procedimiento implementado en la planta de bebidas de la empresa JOMER, basado en el protocolo descrito por **Zapata (1966)**. La bebida mezclada (jugo de piña ya integrado con el probiótico, 30 %, y agua, 70 %) fue enfriada en un banco de hielo hasta aproximadamente 4 °C. El gas $CO_2$ proveniente de cilindros pasó por el regulador; el manómetro de servicio se ajustó a la presión de línea requerida (12 psi para alcanzar 2,5 vol. $CO_2$ y 18 psi para 3,0 vol. $CO_2$ a 40 °F). La bebida fría ingresó al carbocooler (tanque mezclador), donde se inyectó el $CO_2$ y se aplicó una recirculación con agitación suave para favorecer el contacto gas – líquido.

Posteriormente, la bebida ya gasificada se envasó en una máquina de llenado por presión negativa en botellas plásticas de 460 mL de grado alimentario aptas para bebidas carbonatadas. Las botellas llenas fueron cerradas de inmediato, etiquetadas según el tratamiento y conservadas en refrigeración (4 °C) para permitir la estabilización de la carbonatación antes de las mediciones.

La combinación de los tres estados de madurez de la fruta (A: verde, B: semi – madura, C: madura) y los dos niveles de carbonatación (X: 2,5 vol. $CO_2$ y Y: 3,0 vol. $CO_2$) dio lugar a seis tratamientos: AX, AY, BX, BY, CX y CY. Se obtuvieron 48 botellas de 460 mL, correspondientes a dos réplicas por tratamiento, elaboradas en lotes separados para cada tratamiento. Cada botella se destinó a un tiempo de muestreo específico y se abrió una sola vez, con el fin de evitar aperturas repetidas que pudieran producir pérdida de $CO_2$ o incrementar el riesgo de contaminación.

Adicionalmente, se elaboraron 5 botellas extra por tratamiento (30 botellas en total) destinadas exclusivamente a la evaluación sensorial. El proceso de fabricación y formulación de las bebidas carbonatadas probióticas de piña puede visualizarse en el **Anexo 2**.

### 2.2.2. Determinación del efecto del estado de madurez y del nivel de carbonatación sobre la estabilidad de *Weizmannia coagulans* en las formulaciones durante el almacenamiento

#### 2.2.2.1. Diseño experimental y variable de respuesta

Se empleó un diseño factorial mixto con dos factores entre tratamientos y un factor intra – sujetos con medidas repetidas en el tiempo. El factor A correspondió al estado de madurez de la piña (A: verde, B: semi–madura y C: madura) y el factor B al nivel de carbonatación (X: 2,5 vol. $CO_2$ y Y: 3,0 vol. $CO_2$), generando seis combinaciones de tratamiento (AX, AY, BX, BY, CX y CY). Los datos se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas, empleado cuando se desea comparar las medias de tres o más condiciones o puntos temporales y las mismas unidades experimentales son evaluadas en cada una de esas condiciones **(Muhammad, 2023)**.Se consideraron como factores entre tratamientos al "estado de madurez" y al "nivel de carbonatación", y como factor intra – sujetos al "semanas de almacenamiento", lo que permitió evaluar los efectos principales y sus interacciones sobre la evolución de la población probiótica. El procesamiento estadístico se realizó con el software JAMOVI (versión 2.6.44) y la representación gráfica de los resultados en Microsoft Excel.

La variable de respuesta fue la estabilidad del probiótico *W. coagulans*, expresada como log UFC/mL en la bebida. Para cada combinación de tratamiento se efectuaron muestreos semanales durante dos meses de almacenamiento refrigerado, registrándose los recuentos de viabilidad en cada tiempo de evaluación.

#### 2.2.2.2. Determinación de la estabilidad de *Weizmannia coagulans*

Para determinar la estabilidad de *W. coagulans* en las bebidas carbonatadas se efectuaron recuentos microbiológicos periódicos cada semana durante los dos meses de almacenamiento (ver **Anexo 5**). Antes de cada muestreo, las botellas se agitaron suavemente por inversión manual, con el fin de homogenizar la distribución celular.

Para cada muestra se tomó asépticamente 1 mL de bebida y se realizaron diluciones seriadas decimales en agua peptonada estéril al 0,1 % (p/v), utilizando 1 mL de muestra en 9 mL de diluyente hasta, en este caso, la dilución $10^{-4}$ de acuerdo con los procedimientos estándar para el recuento de microorganismos **(Ogodo et al., 2020)**.

Luego, se sembraron 0,1 mL de la dilución $10^{-4}$ por duplicado para cada réplica de cada tratamiento en placas Petri, empleando la técnica de siembra en superficie con asa de Drigalski **(Ogodo et al., 2020)**. Las placas contenían agar GYE (Glucose Yeast Extract , en español, Glucosa – Extracto Levadura), medio que ha sido utilizado para el recuento selectivo de *W.*

*coagulans* en bebidas, dado que la combinación de glucosa y extracto de levadura favorece la recuperación de las esporas germinadas y de las células vegetativas. Las placas se incubaron en aerobiosis a 40 ± 1 °C durante 48 h, siguiendo condiciones similares a las empleadas en jugos y yogures enriquecidos con *B. coagulans* GBI-30, 6086 **(Almada et al., 2021)**.

Tras la incubación se procedió al recuento de colonias en placa. La dilución $10^{-4}$ se mantuvo dentro del rango contable de 30 – 300 colonias por placa durante todo el periodo de estudio, por lo que únicamente se utilizó dicha dilución para el recuento. La fórmula utilizada para calcular la concentración de *W. coagulans* en la bebida fue:

$$N° \; de \; colonias \; (UFC/mL) = \frac{Recuento \; de \; colonias \; (UFC) \; en \; una \; placa \; de \; agar}{Dilución \; * Volumen \; sembrado}$$

Posteriormente, los valores obtenidos a través de esta fórmula se transformaron a log UFC/mL aplicando el logaritmo base 10. Para ello, se utilizó la fórmula LOG10 de Excel.

### 2.2.3. Análisis de parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos de las formulaciones para determinar su calidad y aceptabilidad como bebida probiótica

#### 2.2.3.1. Evaluación fisicoquímica de las formulaciones

Paralelamente al seguimiento de la viabilidad probiótica, se evaluaron parámetros fisicoquímicos clave de las bebidas: pH, sólidos solubles (°Brix) y acidez titulable, con el fin de monitorear la estabilidad del sistema y descartar cambios asociados a fermentación u otras reacciones de deterioro durante el almacenamiento como se realizó en el estudio de .

El pH y el contenido de sólidos solubles (°Brix) se determinaron mediante un potenciómetro de sobremesa y un refractómetro manual, respectivamente. La acidez titulable se determinó tomando como referencia la metodología descrita por **Chua y Leong (2020)**, con modificaciones en el volumen de dilución: se diluyeron 5 mL de en 45 mL de agua destilada (relación 1:10) y la mezcla se tituló con NaOH 0,1 N hasta alcanzar el punto final (viraje persistente de fenolftaleína). La acidez se expresó como porcentaje de ácido cítrico, principal ácido orgánico de la piña. El cálculo se realizó mediante la ecuación:

$$\% \; Acidez \; (\acute{a}cido \; c\acute{i}trico) = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times PE_{cítrico} \times 100}{V_{muestra}}$$

Donde $V_{NaOH}$ es el volumen (mL) de NaOH 0,1 N empleado, $N_{NaOH}$ su normalidad, $PE_{cítrico} = 0{,}064$g/meq (punto de equivalencia) y $V_{\text{muestra}} = 5$mL (volumen de muestra de la bebida). La

evolución de pH, °Brix y acidez permitió verificar la estabilidad de las bebidas y contrastar con lo reportado para jugos de frutas tratados térmicamente y almacenados en refrigeración.

#### 2.2.3.2. Análisis microbiológico e inocuidad

La inocuidad microbiológica de las bebidas se evaluó al inicio (semana 0) y al final del almacenamiento (semana 8). Se analizaron los siguientes grupos: aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos y levaduras:

- **Aerobios mesófilos**: Se empleó la técnica de vertido en placa (pour plate) en Plate Count Agar (PCA). Se inoculó 0.1 mL de muestra en placas estériles y se adicionó PCA fundido ( a 45 °C), homogeneizando antes de la solidificación. Las placas se incubaron a 30 ± 1 °C durante 72 h **(INEN, 2006)**.
- **Coliformes totales**: Se utilizó agar MacConkey, medio selectivo–diferencial para bacilos Gram negativos fermentadores de lactosa. Se sembraron 0,1 mL de la bebida por aspersión en superficie y se incubó a 35 – 37 °C durante 48 h; las colonias típicas (rosadas y/o rojas con precipitado de sales biliares) se consideraron coliformes **(Gawai et al., 2022)**.
- **Mohos y levaduras**: Se sembraron 0,1 mL en agar papa dextrosa (PDA) mediante siembra en superficie. Las placas se incubaron a 25 ± 1 °C durante 5 días **(INEN, 2013).**

Los resultados se compararon con los criterios microbiológicos establecidos para jugos y bebidas de fruta en la NTE INEN 2337, con el objetivo de confirmar que la formulación probiótica cumplió parámetros de inocuidad durante toda la vida útil propuesta **(INEN, 2008)**.

#### 2.2.3.3. Evaluación de las características organolépticas a través de catación

La evaluación sensorial se diseñó tomando como referencia la metodología descrita por **Zhi et al. (2016)**, con las adaptaciones necesarias al producto desarrollado en este estudio. Se realizó con el producto fresco refrigerado, con el fin de determinar la aceptabilidad de las seis formulaciones como bebida probiótica gasificada. Se conformó un panel de 30 catadores no entrenados, pertenecientes a población adulta joven (18–30 años), acorde con el segmento de consumidores objetivo.

Se utilizó una escala hedónica de 5 puntos (1 = “me disgusta mucho”, 2 = “me disgusta”, 3 = “ni me gusta ni me disgusta”, 4 = “me gusta” y 5 = “me gusta mucho”) para evaluar cinco atributos: color, aroma, sabor, textura y aceptabilidad global.

Las muestras se sirvieron en vasos plásticos transparentes de pequeño volumen (30 mL) a 10 °C. Cada formulación se identificó mediante un código alfanumérico de cuatro caracteres para evitar que los catadores asociaran las muestras con un tratamiento específico: FD58 (AX), XH79 (BX), MB33 (CX), ZS41 (AY), NG52 (BY) y LY06 (CY). El uso de códigos aleatorios de tres o cuatro dígitos se recomienda para minimizar sesgos en pruebas de aceptación.

Las muestras se presentaron y entre muestras se ofreció agua a temperatura ambiente para el enjuague bucal. La hoja de evaluación incluyó, además de la escala hedónica para cada atributo, un espacio de observaciones abiertas, donde los catadores pudieron anotar comentarios cualitativos sobre el producto. El proceso de catación puede visualizarse en el **Anexo 3**.

Dado que las puntuaciones de la escala hedónica corresponden a una variable ordinal, los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para comparar las seis formulaciones.

# CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1. Análisis y discusión de resultados

### 3.1.1. Formulación de las diferentes composiciones de bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* con adición de *Weizmannia coagulans*, utilizando frutos en distintos estados de maduración y niveles de carbonatación.

En primer lugar, las piñas se clasificaron visualmente en tres estados de madurez (verde, semi – madura y madura) de acuerdo con la coloración de la cáscara que se visualiza en la **Figura 3**. Posteriormente, con base en su caracterización fisicoquímica, se conformaron tres lotes de jugo con propiedades diferenciadas de °Brix, pH y acidez (ver **Tabla 1**).



**Figura 3.** Clasificación de piñas según su estado de maduración en base al color de su cáscara.

**Nota:** Para la clasificación de los estados de madurez de la piña se tomaron como referencia las imágenes reportadas en la NTE INEN 1836:2016, así como los criterios establecidos en la NTC 729-1. Con base en ello, los frutos se clasificaron en verde, semi – maduro y maduro.

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos del jugo de piña según el estado de maduración.

| Estado de Maduración | pH | °Brix | Acidez titulable (% ácido cítrico) |
|---|---|---|---|
| Verde | 10 | 3,5 | 0,70 |
| Semi – madura | 12 | 3,9 | 0,65 |
| Madura | 14 | 4,5 | 0,47 |

**Nota:** Estos parámetros permitieron confirmar la clasificación de las piñas según su estado de maduración.

A partir de estos lotes de jugo, inoculados previamente con *Weizmannia coagulans,* se formularon seis bebidas carbonatadas, correspondientes a la combinación de los tres estados de madurez con dos niveles de carbonatación. En todos los tratamientos se empleó una misma base de formulación, constituida por 30 % de jugo de piña inoculado con probiótico y 70 % de agua carbonatada, propuesta por la empresa JOMER con el fin de obtener un perfil sensorial similar al de bebidas comerciales, pero incorporando el probiótico *Weizmannia coagulans*. La variación entre formulaciones se debió exclusivamente al estado de madurez de la fruta y al nivel de gas.

Los parámetros fisicoquímicos de las bebidas se diferenciaron de los del jugo de piña en estado puro debido a la adición de agua carbonatada, como se observa en la **Tabla 2**, donde se presentan los valores iniciales de estos parámetros y concentración de *W. coagulans*.

**Tabla 2.** Parámetros físicos y concentración de *Weizmannia coagulans* iniciales.

| Tratamiento | pH | °Brix | % ácido cítrico | *Weizmannia coagulans* |
|---|---|---|---|---|
| AX | 3,60 | 3 | 0,12 | 7,7 log UFC/mL |
| AY | 3,57 | 2,9 | 0,13 | 7,7 log UFC/mL |
| BX | 3,85 | 3,37 | 0,12 | 7,7 log UFC/mL |
| BY | 3,81 | 3,43 | 0,12 | 7,7 log UFC/mL |
| CX | 4,04 | 4 | 0,10 | 7,7 log UFC/mL |
| CY | 3,99 | 4,27 | 0,11 | 7,7 log UFC/mL |

**Nota:** La tabla presenta los valores iniciales de los parámetros fisicoquímicos y concentración inicial de *Weizmannia coagulans*. Durante el periodo de almacenamiento, estos parámetros se monitorearon para detectar posibles variaciones, que se detallan más adelante; en esta sección se presentan únicamente los valores iniciales, correspondientes a las condiciones de partida de las bebidas.

En total se obtuvieron 78 botellas individuales de bebida: 48 se destinaron al diseño experimental de estabilidad y viabilidad (dos botellas por tratamiento y semana, durante ocho semanas de almacenamiento refrigerado) y 30 botellas adicionales se reservaron para la evaluación sensorial de aceptación por parte de consumidores jóvenes. Se observan las bebidas envasadas en la **Figura 4**.

**Figura 4.** Bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* inoculadas con *Weizmannia coagulans* almacenadas en refrigeración (4 °C).



**Nota:** Las botellas con tapa verde, tapa amarilla y tapa roja representan los estados de maduración A (verde), B (semi – maduro) y (maduro) C respectivamente. Los niveles de carbonatación se identifican en la etiqueta de identificación: X (2,5 vol. $CO_2$) y Y (3,0 vol. $CO_2$).

La formulación con 30 % de jugo de piña y 70 % de agua carbonatada se definió para mantener un contenido de fruta superior al 10 % de jugo que suele emplearse en bebidas carbonatadas a base de frutas, donde el dulzor y el °Brix se ajustan principalmente mediante jarabes azucarados **(Verma, 2018)**. Al no utilizar azúcar ni jarabe en este estudio, se trabajó con 30 % de jugo para asegurar el aporte de sabor y sólidos solubles desde la propia fruta. Además, se decidió no incorporar conservantes químicos y basar la estabilidad en la combinación de pasteurización y refrigeración como principales barreras frente al crecimiento microbiano ya que estos dos métodos físicos inhiben o destruyen microorganismos y prolongan la vida útil de los alimentos **(Talib et al., 2024)**. Esta estrategia tecnológica se alinea con la tendencia actual de formulaciones de "etiqueta limpia", que buscan reducir el uso de benzoato y sorbato en bebidas de frutas ante la preocupación por los aditivos sintéticos y sus efectos negativos en la salud **(Alderees et al., 2021; Piper & Piper, 2017).**

### 3.1.2. Efecto del estado de maduración de la fruta y del nivel de carbonatación sobre la estabilidad microbiológica de *Weizmannia coagulans* en las formulaciones durante el almacenamiento

Con el fin de evaluar el efecto conjunto del estado de maduración de la piña (A: verde, B: semi – madura, C: madura) y del nivel de carbonatación (X: 2,5 vol. $CO_2$, 3,0 vol. $CO_2$) sobre la estabilidad microbiológica de *Weizmannia coagulans***,** se realizó un ANOVA de medidas repetidas. El modelo incluyó como factor dentro de los sujetos el tiempo de almacenamiento (Semana) y sus interacciones con Gas y Madurez (ver **Tabla 3**), y como factores entre sujetos los efectos principales de Gas, Madurez y su interacción (ver **Tabla 4**)**.** Cabe mencionar que los resultados estadísticos se complementan con las gráficas de interacción Semana × Gas (ver **Figura 7**), Semana × Madurez (**Figura 9**), los promedios globales por Gas y por Madurez (ver **Figuras 6 y 8**, respectivamente) y la curva general de la viabilidad del probiótico en cada tratamiento (ver **Figura 5**).

#### 3.1.2.1. Comportamiento general de la estabilidad de *Weizmannia coagulans* durante el almacenamiento

El ANOVA de medidas repetidas dentro de los sujetos (ver **Tabla 3**) evidenció que el factor **Semana** (tiempo de almacenamiento) tiene un efecto significativo sobre la viabilidad del probiótico, lo que indica que el tiempo de almacenamiento sí produjo cambios en el recuento de *W. coagulans* ($p < 0,001$). No obstante, estos cambios no comprometieron la funcionalidad del producto, ya que los recuentos se mantuvieron en todo momento por encima de 6 log UFC/mL ($10^6$ UFC/mL). Este valor se considera la concentración mínima funcional para productos probióticos, debido a que asegura la ingesta diaria de una cantidad suficiente de células viables que puedan ejercer un efecto beneficioso tras llegar al intestino **(Condurso et al., 2025)**. En este contexto, los tratamientos AY, BX y CX se mantuvieron por encima de 7 log UFC/mL al final del estudio, mientras que AX, BY y CY se ubicaron ligeramente por debajo de ese valor, aunque siempre por encima de 6,8 log UFC/mL, por lo que todas las formulaciones cumplieron con la concentración mínima de probiótico considerada necesaria para que el producto tenga un efecto funcional.

**Tabla 3.** Análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas para la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) en bebidas carbonatadas de *Ananas comosus*. Efecto dentro de los sujetos.

| | **Suma de cuadrados** | **Grados de libertad** | **Media cuadrática** | **F** | **p** |
|---|---|---|---|---|---|
| Semana | 0,9052 | 7 | 0,12931 | 28,02 | **< 0, 001** |
| Semana × Gas | 0,0882 | 7 | 0,01261 | 2,73 | **0,020** |
| Semana × Madurez | 0,1041 | 14 | 0,00744 | 1,61 | 0,116 |
| Semana × Gas × Madurez | 0,1488 | 14 | 0,01063 | 2,30 | **0,019** |
| Residual | 0,1938 | 42 | 0,00462 | | |

**Nota:** El ANOVA de mediciones repetidas (efecto dentro de los sujetos) evalúa la influencia del factor Semana y sus interacciones sobre la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) durante el periodo de almacenamiento. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Los valores resaltados en negrita corresponden a efectos que presentaron influencia significativa sobre la variable de respuesta.

La **Figura 5** confirma visualmente el efecto del factor Semana identificado en el ANOVA de mediciones repetidas. En ella se observa la evolución de la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) en las seis combinaciones de tratamiento (AX, AY, BX, BY, CX y CY) durante ocho semanas de almacenamiento refrigerado (4 °C). Todas las formulaciones partieron de recuentos iniciales de 7,7 log UFC/mL y experimentaron una reducción significativa entre la semana 0 y la semana 1. Posteriormente, la disminución continuó, aunque en menor medida, hasta alrededor de la semana 3. A partir de este punto, las curvas se estabilizaron en torno a 6,8 – 7,2 log UFC/mL, con pequeñas oscilaciones posteriores.

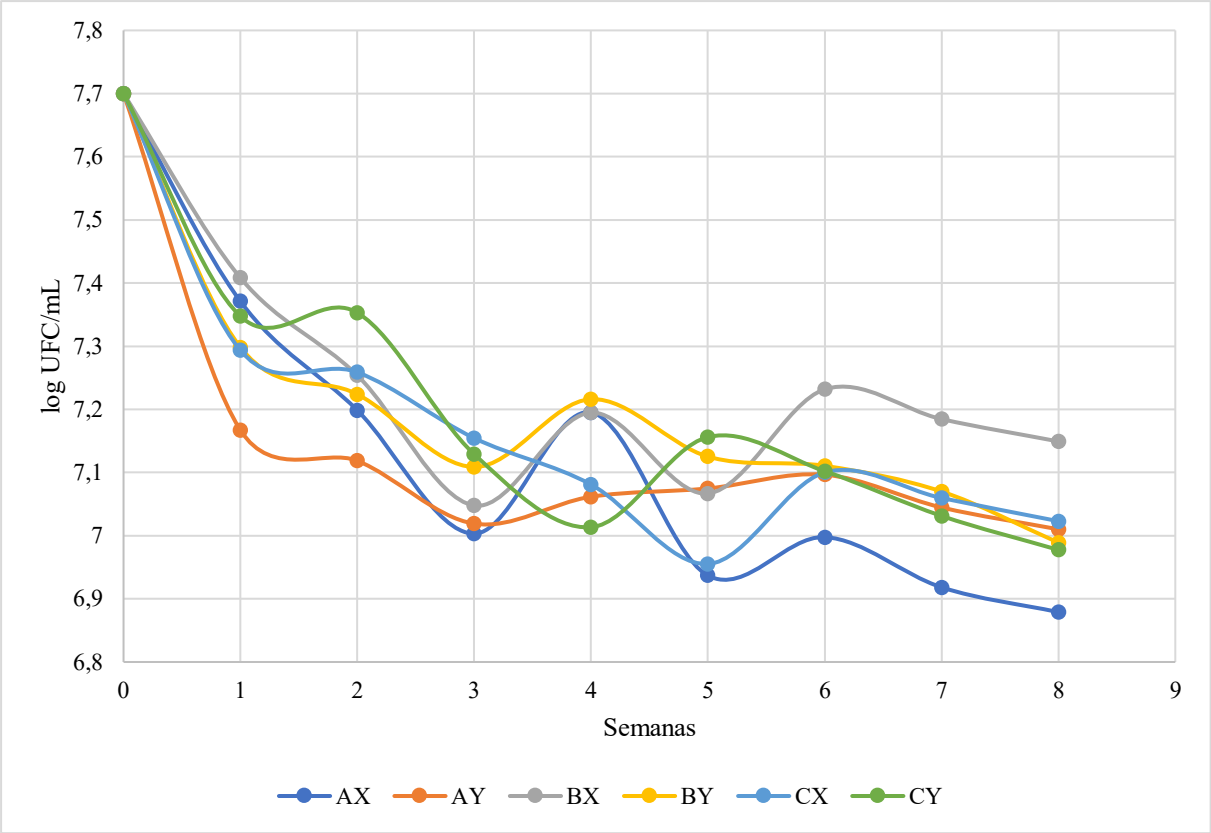



**Figura 5.** Viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) en bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* durante ocho semanas (dos meses) de almacenamiento refrigerado.

**Nota:** Cada punto representa el promedio de las réplicas por tratamiento y semana.

Desde el punto de vista microbiológico, el patrón observado en la **Figura 5**, caracterizado por un descenso inicial seguido de una fase de estabilidad, es congruente con lo reportado para probióticos en matrices vegetales ácidas: tras la inoculación, las células se enfrentan a un fuerte estrés por pH, ácidos orgánicos y baja temperatura, lo que provoca la muerte de la fracción más sensible; posteriormente, la población remanente se estabiliza en un nivel en el que predominan células o esporas más tolerantes al medio (**Spinasse et al., 2023**). En el caso de *Weizmannia coagulans,* su capacidad de formar esporas explica la alta estabilidad observada: las esporas de *Weizmannia* presentan una resistencia muy superior a procesos tecnológicos y condiciones adversas de almacenamiento en comparación con bacterias lácticas no esporuladas, lo que ha motivado su uso creciente como probióticos en distintos alimentos **(Fijan et al., 2023).**

Otro aspecto importante que se visualiza en la **Figura 5** es la presencia de pequeñas oscilaciones en las curvas (0,1 – 0,2 log) entre las semanas 3 y 8, sin una tendencia clara de aumento o disminución. Estas variaciones se interpretan, en primer lugar, como resultado de la variabilidad inherente al método de recuento en placa. **Weitzel et al. (2021)** menciona que los

procedimientos basados en cultivo presentan coeficientes de variación del orden de 15 – 30% y que, en normas internacionales y directrices nacionales, se establecen diferencias críticas entre dos recuentos en un rango de 0,2 – 0,5 $\log_{10}$ como límite mínimo para considerar que existe una discrepancia real entre resultados con un 95% de confianza. Por lo tanto, las oscilaciones de 0,1 – 0,2 log observadas en las bebidas se sitúan por debajo o en el extremo inferior de ese umbral, por lo que son compatibles con la variabilidad analítica del ensayo y no necesariamente reflejan cambios reales en la población de *W. coagulans.*

En segundo lugar, estas fluctuaciones también pueden relacionarse con el comportamiento propio de una población mixta de esporas y células vegetativas. Las esporas de *Weizmannia coagulans* son altamente resistentes, pero pueden germinar de forma parcial durante el almacenamiento; así mismo, algunas células vegetativas pueden perder viabilidad o no formar colonias, generando pequeñas fluctuaciones alrededor de un nivel globalmente estable **(Payne et al., 2024).**

Por esta razón, para evaluar la estabilidad durante el almacenamiento es más representativo considerar la semana 1 como punto de referencia (una vez superada la fase de adaptación inicial) y analizar los cambios hasta la semana 8. Visualmente, entre la semana 1 y la 8 la mayoría de los tratamientos muestran variaciones adicionales inferiores a 0,6 – 0,8 log, manteniendo recuentos en el rango funcional. Este comportamiento es coherente con la alta estabilidad descrita para *Weizmannia coagulans* en alimentos funcionales, donde se ha reportado que sus esporas toleran bien las condiciones de procesamiento y almacenamiento, conservando una proporción elevada de viabilidad a lo largo de la vida útil del producto **(Majeed et al., 2016).**

### 3.1.2.2. Efecto del nivel de carbonatación (Gas)

El factor Gas se estudió a dos niveles: X (2,5 vol. $CO_2$) y Y (3,0 vol. $CO_2$). El ANOVA entre sujetos (ver **Tabla 4**) mostró que el nivel de carbonatación no tuvo un efecto principal significativo sobre la viabilidad promedio de *W. coagulans* ( $p = 0,764$). Esta ausencia de diferencias relevantes se refleja en la **Figura 3**, donde los promedios globales de log UFC/mL para X e Y prácticamente se superponen.

**Tabla 4.** Análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas, efecto entre sujetos.

| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Gas | 0,00057 | 1 | 0,00057 | 0,0985 | 0,764 |
| Madurez | 0,1594 | 2 | 0,07971 | 13,7700 | **0,006** |
| Gas × Madurez | 0,0243 | 2 | 0,01217 | 2,1022 | 0,203 |
| Residual | 0,0347 | 6 | 0,00579 | | |

**Nota:** El ANOVA de mediciones repetidas (efecto entre los sujetos) evalúa la influencia de los factores principales Gas, Madurez y su interacción sobre la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) durante el periodo de almacenamiento. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Los valores resaltados en negrita corresponden a efectos que presentaron influencia significativa sobre la variable de respuesta.

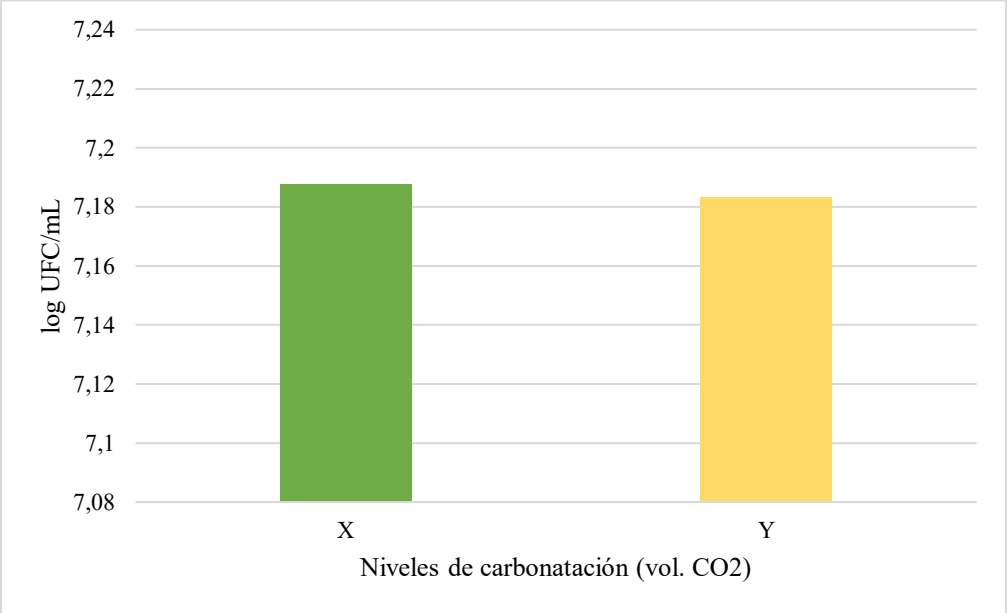



**Figura 6.** Promedio global de la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) según el nivel de carbonatación.

**Nota:** X: 2,5 vol. $CO_2$; Y: 3,0 vol. $CO_2$. Los valores representan el promedio calculado sobre todas las semanas de almacenamiento y los tres estados de madurez de la piña.

Sin embargo, el ANOVA dentro de los sujetos indicó una interacción significativa Semana × Gas ($p = 0,020$; **Tabla 3**). En la **Figura 7** se aprecia que ambos niveles de gas siguen un patrón temporal similar (descenso inicial y posterior estabilización), pero con pequeñas divergencias en determinadas semanas. En algunos puntos las bebidas con 2,5 vol. $CO_2$ (X) presentan valores

ligeramente superiores, mientras que en otros la diferencia se atenúa o se invierte. Las diferencias máximas rondan 0,1 log, es decir, del mismo orden que la variación esperable del método de recuento (**Weitzel et al., 2021**).

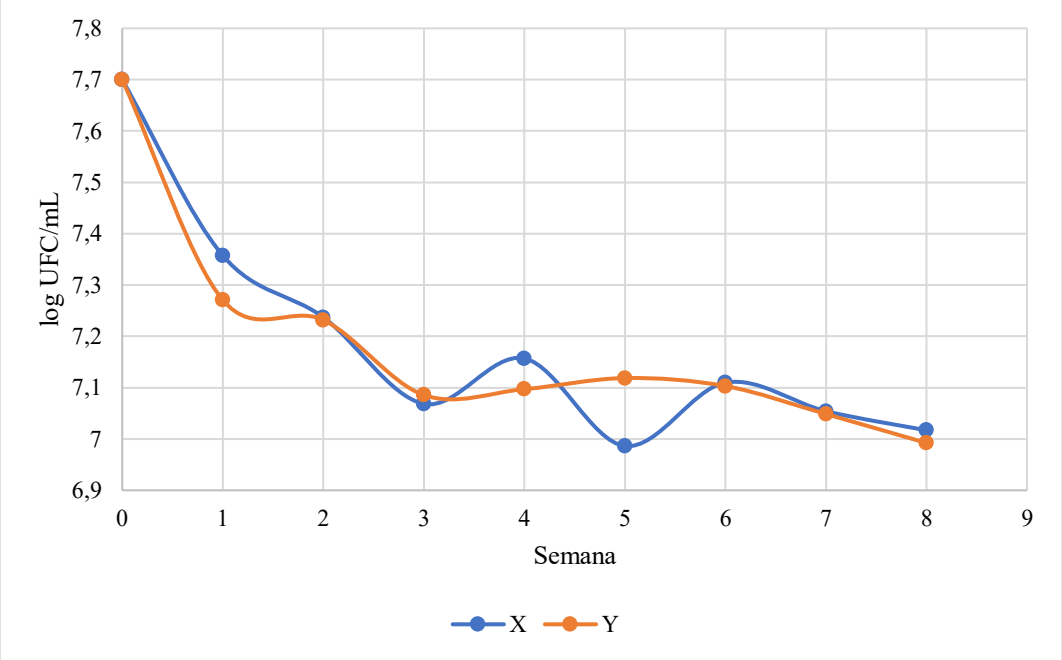



**Figura 7.** Interacción Semana × Gas para la estabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) durante el almacenamiento.

**Nota:** X: 2,5 vol. $CO_2$; Y: 3,0 vol. $CO_2$.

Desde el punto de vista tecnológico, estos resultados sugieren que en el rango estudiado (2,5 vol. $CO_2$ - 3,0 vol. $CO_2$) la carbonatación modula de forma tenue el patrón temporal de la viabilidad, pero no compromete la estabilidad global del probiótico. Estudios previos en bebidas lácteas carbonatadas han indicado que niveles moderados de $CO_2$ no reducen significativamente la supervivencia de probióticos, siempre que el pH de la matriz no se vea fuertemente acidificado (**Newbold & Koppel et al., 2018; Silva et al., 2018**). En este estudio, las mediciones fisicoquímicas (**Tabla 3**) mostraron que el pH, °Brix y acidez titulable fueron prácticamente iguales entre pares X – Y, lo que indica que el incremento de 0,5 vol. $CO_2$ no generó un estrés ácido adicional relevante para *W. coagulans*.

En consecuencia, la elección entre 2,5 vol. $CO_2$ y 3,0 vol. $CO_2$ puede basarse principalmente en criterios sensoriales sin sacrificar la viabilidad probiótica, lo que otorga flexibilidad al formulador.

### 3.1.2.3. Efecto del estado de madurez de la piña

En cuanto al estado de madurez de la fruta, el ANOVA entre sujetos mostró un efecto principal significativo de Madurez ($p = 0,006$). La **Figura 8** resume este comportamiento: los tratamientos elaborados con piña semi – madura (B) presentan el promedio global de log UFC/mL más alto, seguidos por las formulaciones con piña madura (C) y, finalmente, por las preparadas con piña verde (A).

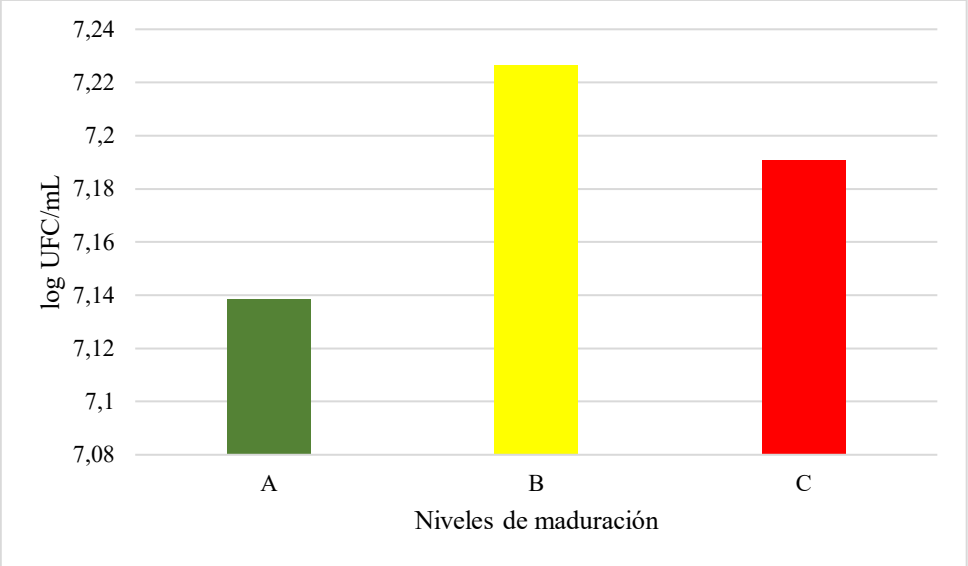



**Figura 8.** Promedio global de la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) según el estado de madurez de la piña.

**Nota:** A (verde), B ( semi – madura) y C (madura). Los valores representan el promedio calculado sobre todas las semanas de almacenamiento y los dos niveles de gasificación.

Estos resultados son consistentes con la matriz fisicoquímica de las bebidas (ver **Tabla 5**). Las formulaciones A (AX, AY), elaboradas con piña verde, presentaron pH más bajo, menor contenido de sólidos solubles y la acidez titulable más elevada. Las formulaciones B (BX, BY), obtenidas a partir de piña semi – madura, mostraron valores intermedios de pH, °Brix y acidez. Por su parte, las formulaciones C (CX, CY), elaboradas con piña madura, alcanzaron el pH más alto, los mayores valores de °Brix y la menor acidez titulable.

**Tabla 5.** Promedio global de pH, sólidos solubles y acidez titulable de las bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* según el tratamiento durante el almacenamiento.

| Tratamiento | pH | °Brix | % ácido cítrico |
|---|---|---|---|
| AX | 3,61 ± 0,01 | 2,9 ± 0,09 | 0,13 ± 0,002 |
| AY | 3,59 ± 0,01 | 2,92 ± 0,07 | 0,13 ± 0,003 |
| BX | 3,89 ± 0,03 | 3,39 ± 0,07 | 0,12 ± 0,002 |
| BY | 3,85 ± 0,03 | 3,39 ± 0,06 | 0,12 ± 0,002 |
| CX | 4,06 ± 0,02 | 4,20 ± 0,15 | 0,11 ± 0,003 |
| CY | 4,20 ± 0,15 | 4,26 ± 0,10 | 0,11 ± 0,003 |

**Nota:** Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de las mediciones realizadas entre la semana 0 y la semana 8 de almacenamiento refrigerado (4 °C). Dado que no se observaron variaciones significativas ($p > 0,05$) en pH, sólidos solubles ni acidez titulable a lo largo del tiempo, estos promedios se consideran representativos de las condiciones fisicoquímicas a las que estuvo expuesto *Weizmannia coagulans* durante todo el periodo de estudio.

Esto se debe a que, a medida que la piña madura, el pH aumenta, los sólidos solubles (principalmente azúcares) incrementan y la acidez titulable disminuye, modificando la relación azúcar – ácido del fruto (**Rashima et al., 2021**). Bajo este contexto, la piña semi – madura (B) podría ofrecer un equilibrio más favorable para la supervivencia de *W. coagulans*. En cambio, en las bebidas elaboradas con piña verde (A), el pH más bajo y la mayor acidez podrían aumentan el estrés ácido sobre la células vegetativas emergidas a partir de las esporas; se ha demostrado que la supervivencia de probióticos en jugos se reduce significativamente cuando el pH se aproxima a 3,0 – 3,2, debido a la combinación de ácidos orgánicos y baja capacidad tampón de la matriz (**Spinasse et al., 2023**).

En las formulaciones con piña madura C, aunque el pH es más alto y se esperaría una mayor supervivencia de *Weizmannia coagulans*, el incremento de °Brix implica una mayor presión osmótica y un entorno más concentrado de azúcares y otros solutos. Ambientes de alta osmolaridad pueden inducir estrés osmótico en bacterias lácticas y probióticos reduciendo su capacidad de mantener la homeostasis y, en algunos casos, su viabilidad a largo plazo (**Bisson**

**et al., 2023**). Además, la maduración modifica el perfil de compuestos fenólicos y metabolitos secundarios de la fruta; algunos estudios en jugos de frutas señalan que ciertos fenoles y ácidos orgánicos pueden ejercer efectos antimicrobianos subletales sobre probióticos, influyendo en su supervivencia en productos listos para el consumo (**Perricone et al., 2015**).

Por lo tanto, el resultado final es que las bebidas B (semi – maduras) logran el mejor balance: un medio menos ácido que A, pero sin la combinación de alta osmolaridad y posible mayor carga de compuestos fenólicos de C, lo que se refleja en su viabilidad superior.

Por último, la interacción Gas × Madurez no fue significativa (p = 0,203) (**Tabla 2**). Tal como se observa en la **Figura 6**, los tres estados de madurez comparten el mismo patrón general descrito previamente: una disminución inicial seguida de una fase de relativa estabilidad, sin cambios drásticos en la pendiente de las curvas. Esto coincide con los resultados del ANOVA, donde la interacción Semana × Madurez no resultó significativa (p = 0,116), por lo que la influencia del estado de madurez se refleja principalmente en las diferencias de nivel promedio entre tratamientos, más que en un comportamiento temporal diferenciado.

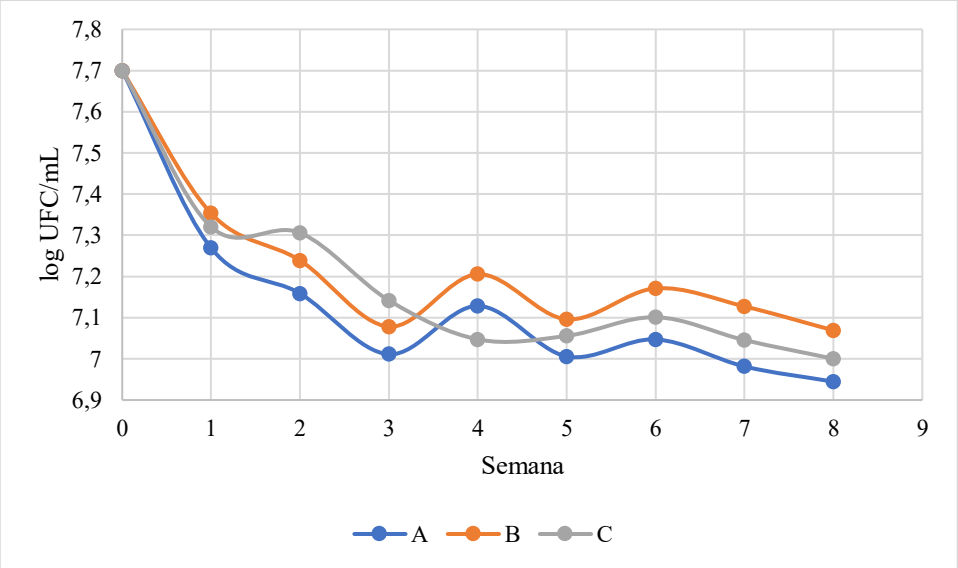



**Figura 9.** Interacción Semana × Madurez para la viabilidad de *Weizmannia coagulans* (log UFC/mL) durante el almacenamiento.

**Nota:** A: piña verde; B: piña semi – madura; C: piña madura. Cada punto representa el promedio de las réplicas por tratamiento y semana.

Aunque la interacción Semana × Madurez no fue significativa, el modelo sí detecto una interacción triple Semana × Gas × Madurez (p = 0,019; **Tabla 3**). La **Figura 5** integra esta interacción y muestra que todas las formulaciones siguen el mismo patrón general (descenso

inicial y posterior estabilización), pero con ligeras diferencias en el nivel de viabilidad alcanzado al final del almacenamiento según la combinación específica de madurez y gas.

En síntesis, los resultados indican que el estado de madurez de la piña es el factor con mayor impacto sobre la viabilidad de *Weizmannia coagulans*, siendo la semi – madurez (B) la condición más favorable. El nivel de carbonatación (2,5 vs 3,0 vol. $CO_2$) no modificó de forma significativa la viabilidad promedio, por lo que la elección de gas puede basarse en criterios sensoriales. Por lo tanto, tanto la formulación BX como la BY pueden ser consideradas como la alternativa óptima para el desarrollo de la bebida probiótica. No obstante, la elección final depende del consumidor. Independientemente de cuál de las formulaciones mantiene mejor la viabilidad del probiótico, todas cumplen con los requisitos establecidos y será elegida aquella formulación que resulte más atractiva al paladar. Los promedios por tratamiento y semana del recuento de *Weizmannia coagulans* se presentan en el **Anexo 7.**

### 3.1.3. Análisis de los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos de las formulaciones para la determinación de su calidad y aceptabilidad como bebida probiótica

#### 3.1.3.1. Parámetros fisicoquímicos

Se analizaron el pH, los sólidos solubles (°Brix) y la acidez titulable a lo largo del almacenamiento con el fin de monitorear la estabilidad fisicoquímica de la bebida y descartar posibles procesos fermentativos no deseados.

En la **Figura 10** se presentó la evolución del pH de las seis formulaciones durante las ocho semanas de almacenamiento a 4 °C. Los valores iniciales oscilaron entre 3,6 en las bebidas elaboradas con piña verde (AX, AY) y 4,0 – 4,1 en las formuladas con piña madura (CX, CY). A lo largo del almacenamiento, todas las combinaciones mostraron únicamente ligeros incrementos ( $\leq$ 0,1 – 0,2 unidades de pH), sin descensos significativos ni cambios de tendencia. Por lo tanto, se considera que este parámetro se mantuvo estable durante el almacenamiento.

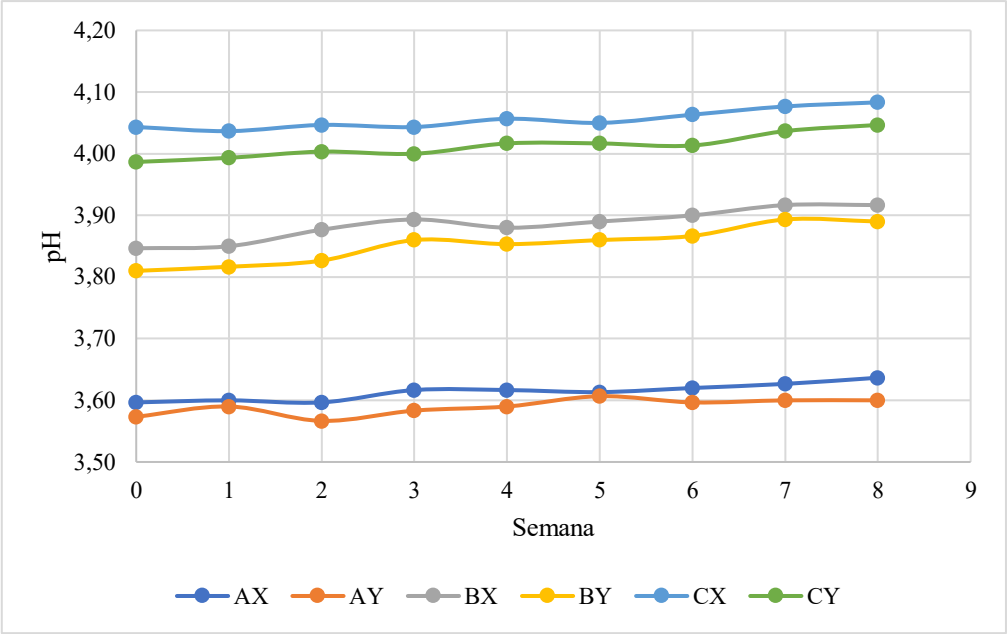



**Figura 10.** Evaluación semanal de pH de cada tratamiento durante el almacenamiento.

La **Figura 11** representa la evolución de los sólidos solubles (°Brix) durante el almacenamiento. Inicialmente, las bebidas con piña verde y semi – madura presentaron valores alrededor de 2,8 – 3,5 °Brix, mientras que las formulaciones con piña madura registraron sólidos solubles superiores ( 4,0 – 4,4 °Brix), acordes con el mayor contenido de azúcares de la fruta madura. Durante las ocho semanas, los °Brix de cada tratamiento sólo mostraron pequeñas oscilaciones (± 0,2 – 0,3 °Brix) sin una tendencia clara de aumento o disminución, por lo que el contenido de azúcares fermentables se consideró prácticamente constante en todas las formulaciones.

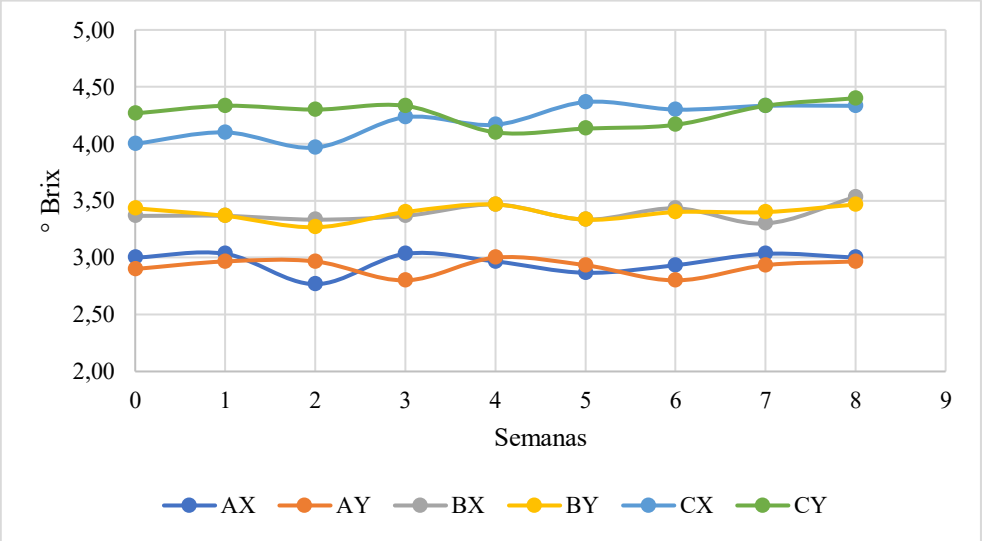



**Figura 11.** Evaluación semanal de sólidos solubles (°Brix) de cada tratamiento durante el almacenamiento.

En la **Figura 12** se mostró la acidez titulable, expresada cómo % ácido cítrico. Los valores iniciales se situaron aproximadamente entre 0,10 y 0,13 % ácido cítrico, con ligeras diferencias entre tratamientos según el estado de madurez de la piña. A lo largo del almacenamiento se observaron oscilaciones pequeñas ( 0,01 – 0,02 % ácido cítrico) sin incrementos progresivos ni patrones de acidificación sostenida. De este modo, la acidez titulable se mantuvo estable en el tiempo.

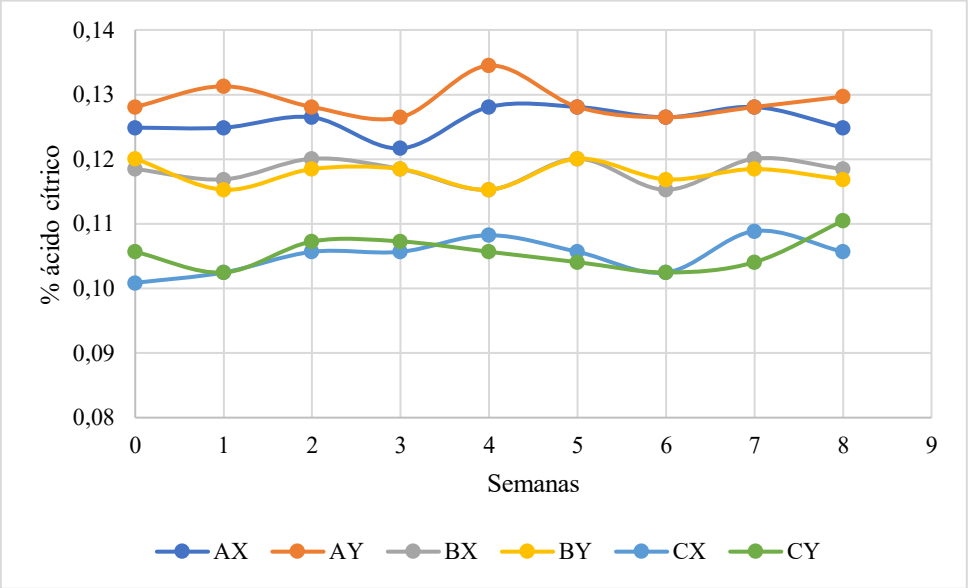



**Figura 12.** Evaluación semanal de la acidez titulable de cada tratamiento durante el almacenamiento.

La estabilidad observada en el pH, los °Brix y la acidez titulable de las seis formulaciones durante las ocho semanas de almacenamiento refrigerado (4 °C) indica que la bebida se comportó como un sistema químicamente estable. La ausencia de variaciones significativas en estos parámetros sugiere que no se produjo fermentación activa, ni por *Weizmannia coagulans* ni por otros microorganismos como levaduras, lo que a su vez evidencia la eficacia combinada del tratamiento de pasteurización y de la conservación en refrigeración.

Comportamientos similares se han descrito en bebidas frutales no fermentadas. **Liao et al. (2023)** reportaron que parámetros como pH, sólidos solubles y acidez se mantuvieron estables en un jugo de piña con *Weizmannia coagulans* almacenado en refrigeración, mientras que en jugo de manzana suplementado con *W. coagulans* no se observaron cambios significativos en el pH, con variaciones comparables a las del presente estudio (**Majeed et al., 2016**). En conjunto, estos resultados respaldan que, bajo condiciones de baja temperatura, pH ácido y presencia de $CO_2$, los parámetros fisicoquímicos de las bebidas de fruta se tuvieron variaciones

mínimas, lo que descarta una fermentación activa del probiótico durante la vida útil evaluada. Los promedios por tratamiento y semana del análisis fisicoquímico se presentan en el **Anexo 7**.

### 3.1.3.2. Parámetros microbiológicos

En cuanto al análisis microbiológico, no se observó crecimiento en ninguna de las placas analizadas de coliformes totales y aerobios mesófilos, tanto en la semana 0 como en la semana 8, en todos los tratamientos. En el caso de mohos y levaduras, tampoco se registró crecimiento en la mayoría de los tratamientos; únicamente se detectaron colonias aisladas en las formulaciones elaboradas con piña semi – madura (BX, BY) en la semana 8. Estos valores corresponden a recuentos muy bajos ( $\leq 3$ UFC/mL), sin indicios de proliferación microbiana sostenida. En relación con la **NTE INEN 2337:2008** para jugos y bebidas de frutas pasteurizados, los recuentos de aerobios mesófilos, mohos y levaduras se mantuvieron por debajo de los valores máximos permitidos durante todo el periodo de almacenamiento ( $< 10$ UFC/mL) **(INEN, 2008)**. Los coliformes se evaluaron mediante un método indicativo distinto al de referencia, por lo que los resultados se consideran orientativos, aunque la ausencia de crecimiento sugiere condiciones higiénicas adecuadas. Las placas correspondientes a este análisis se muestran en el **Anexo 4.**

Esta estabilidad microbiológica se puede atribuir principalmente a dos factores clave: el tratamiento térmico de pasteurización y el almacenamiento en refrigeración (4 °C). Ambos procedimientos reducen eficazmente la carga microbiana inicial y suprimen el crecimiento de microorganismos patógenos o que alterantes que podrían comprometer la calidad e inocuidad del producto **(Dippong et al., 2025).** Además de estos dos factores, también influyó en los resultados la adecuada manipulación de la materia prima, el agua y los insumos, así como la correcta higiene de los equipos, las etapas de elaboración y el envasado **(Chandimali et al., 2025).**

La ausencia de coliformes totales y aerobios mesófilos en las muestras sugiere buenas prácticas higiénicas y de proceso, ya que los coliformes se consideran indicadores clásicos de contaminación fecal o fallas de higiene, mientras que los aerobios mesófilos permiten estimar la carga microbiana global y la exposición del alimento a condiciones favorables de crecimiento **(Freitas et al., 2009; Martin et al., 2016)**. Con respecto a mohos y levaduras, estos microorganismos suponen riesgos si no se controlan adecuadamente: los mohos pueden generar micotoxinas, mientras que las levaduras pueden alterar los parámetros fisicoquímicos de las frutas y sus derivados mediante fermentación **(Xu et al., 2020)**. Por lo tanto, los resultados

obtenidos, respaldan que las bebidas elaboradas mantienen condiciones adecuadas de inocuidad.

### 3.1.3.3. Catación: evaluación de características organolépticas

La evaluación sensorial se realizó con un panel de consumidores jóvenes (18 – 30 años) mediante una escala hedónica de 5 puntos (1 = "me disgusta mucho", 5 = "me gusta mucho"), adecuada para medir preferencia y aceptación en bebidas funcionales. Las muestras se codificaron con valores alfanuméricos: FD58 (AX), ZS41 (AY), XH79 (BX), NG52 (BY), MB33 (CX) y LY06 (CY).

Debido a que las valoraciones se registraron en una escala hedónica de cinco puntos (variable ordinal), se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, adecuada para comparar más de dos tratamientos sin asumir normalidad en los datos y basada en los rangos de las puntuaciones sensoriales. Los resultados de la **Tabla 6** muestran diferencias significativas entre formulaciones para color, olor, sabor y aceptabilidad global ( $p < 0,001$ en todos los casos), mientras que la textura no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,236$). Esto indica que el estado de madurez y el nivel de gasificación sí modifican la percepción visual y sensorial de la bebida, pero no generan cambios marcados en la sensación de textura o cuerpo.

**Tabla 6.** Prueba de Kruskal – Wallis (ANOVA no paramétrico de un factor) para las características organolépticas de las bebidas probióticas de piña.

| | **Chi - cuadrado** | **Grados de libertad** | **p** |
|---|---|---|---|
| Color | 40,84 | 5 | **< 0,001** |
| Olor | 22,63 | 5 | **< 0,001** |
| Sabor | 41,67 | 5 | **< 0,001** |
| Textura | 6,80 | 5 | 0,236 |
| Aceptabilidad | 29,45 | 5 | **< 0,001** |

**Nota:** Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$. Los valores resaltados en negrita corresponden a aquellas variables que presentaron diferencias significativas entre tratamientos.

- **Color**

En la **Figura 13** se observa que todas las formulaciones obtuvieron puntuaciones medias superiores a 3 ("ni me gusta ni me disgusta"), lo que indica que, en general, el color de las bebidas fue aceptado por el panel. Sin embargo, de acuerdo con la prueba de Kruskal – Wallis (**Tabla 6**), existieron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0{,}001$). Las formulaciones elaboradas con piña madura, CX (MB33) y CY (LY06), alcanzaron las mayores puntuaciones (4,23) situándose en el rango de "me gusta". En un segundo nivel se ubicaron las formulaciones con piña semi – madura BX (XH79) y BY (NG52) con valores alrededor de 3,5 – 3,7, mientras que AX (FD58) y AY (ZS41), elaboradas con piña verde, presentaron los valores más bajos (3,2 – 3,4), pero manteniéndose en el rango "ni me gusta ni me disgusta". En conjunto, la gráfica muestra una preferencia creciente por el color a medida que aumenta el grado de madurez de la fruta utilizada en la formulación.

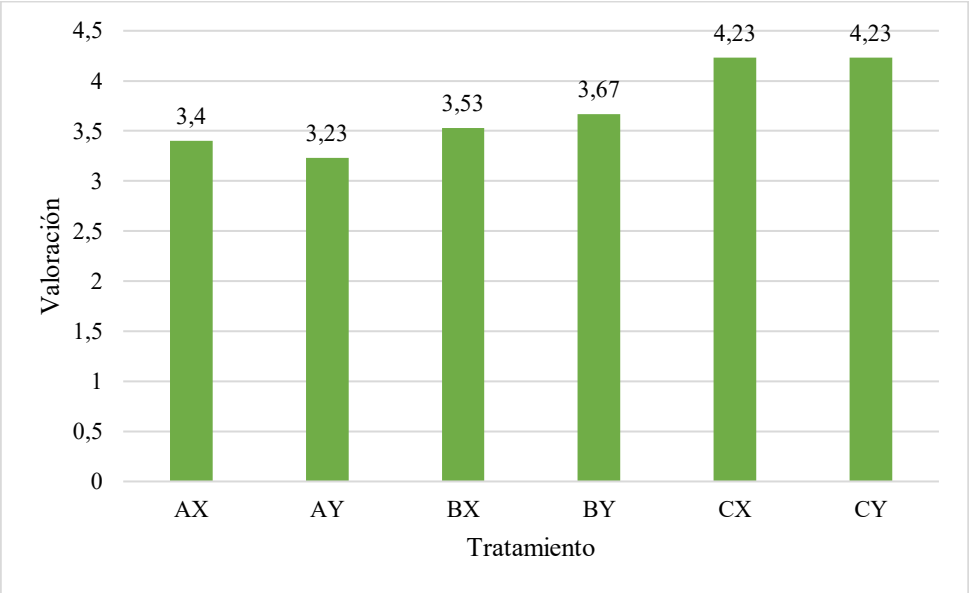



**Figura 13.** Puntuación media del color para cada tratamiento.

- **Olor**

La **Figura 14** confirma también diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0{,}001$; **Tabla 6**). CY (LY06) obtuvo la mayor puntuación media (4,10), seguida de CX (MB33), con valores cercanos a 4,0, lo que indica que el aroma de las bebidas con piña madura fue el más apreciado por los catadores. Las formulaciones BY (NG52) y AY (ZS41) se situaron en un rango intermedio (3,5–3,7), mientras que AX (FD58) y BX (XH79) presentaron las valoraciones más bajas (3,4). Aunque todas las bebidas fueron percibidas con un olor aceptable, la tendencia

general muestra que el panel percibió un aroma más intenso y agradable en las formulaciones elaboradas con fruta de mayor madurez, especialmente en CY.

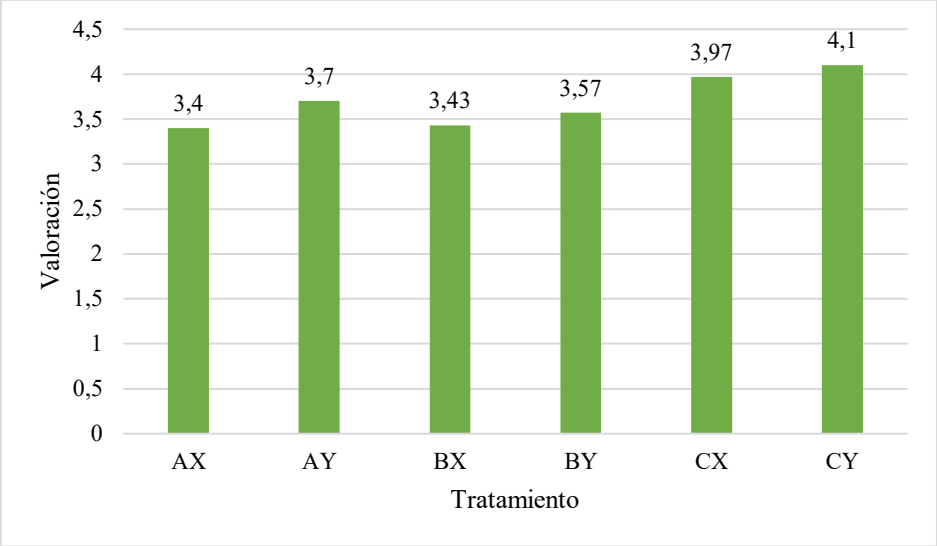



**Figura 14.** Puntuación media del olor para cada tratamiento.

- **Sabor**

En la **Figura 15** se aprecia el mayor grado de discriminación entre tratamientos, coherente con el valor de chi – cuadrado ($\chi^2$) más elevado observado en la prueba de Kruskal – Wallis ($\chi^2$ = 41,67; $p < 0,001$; **Tabla 6**). La formulación CY (LY06) alcanzó la puntuación media más alta (4,0) seguida por CX (MB33) (3,9), ambas dentro del rango de "me gusta". BY (NG52) se ubicó en un nivel intermedio (3,5), mientras que AY (ZS41) se aproximó al punto neutro (3,2). Las formulaciones AX (FD58) y BX (XH79) obtuvieron las puntuaciones más bajas (2,87), reflejando que el sabor de las bebidas con piña verde fue percibido como menos agradable por el panel. De manera general, la gráfica sugiere un aumento progresivo de la aceptación del sabor desde los tratamientos con piña verde hacia los elaborados con piña madura.

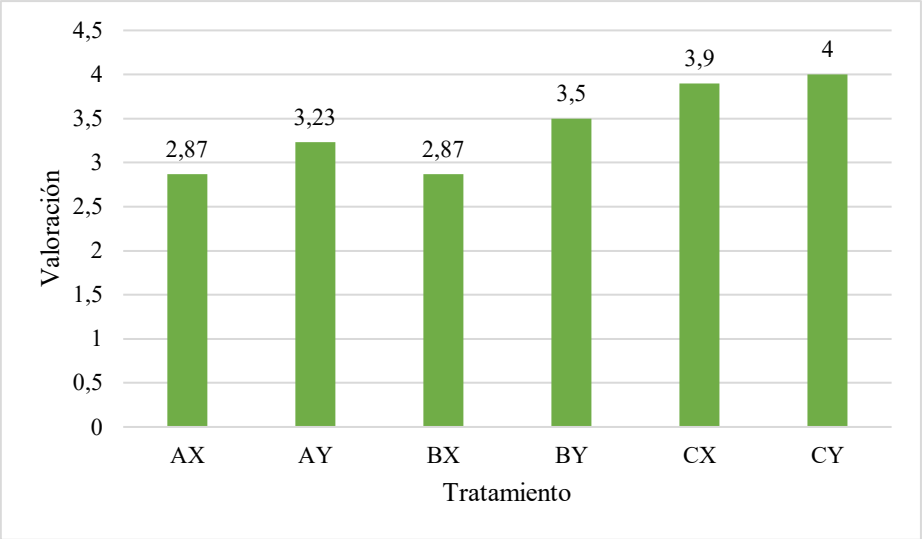



**Figura 15.** Puntuación media del sabor para cada tratamiento.

- **Textura**

En la **Figura 16** se observa que las valoraciones se concentraron en un rango relativamente estrecho (3,4–3,8), y que la prueba de Kruskal–Wallis no detectó diferencias significativas entre tratamientos (p = 0,236; **Tabla 6**). No obstante, CY (LY06) y BY (NG52) muestran medias ligeramente superiores (3,8–3,83), seguidas de CX (MB33), AX (FD58) y BX (XH79) que presentaron los valores más bajos (3,63 – 3,4). En términos prácticos, la textura de todas las bebidas fue valorada entre "ni me gusta ni me disgusta" y "me gusta", lo que indica que el grado de madurez de la piña y el nivel de $CO_2$ no alteraron de forma relevante la sensación de cuerpo o consistencia en boca.

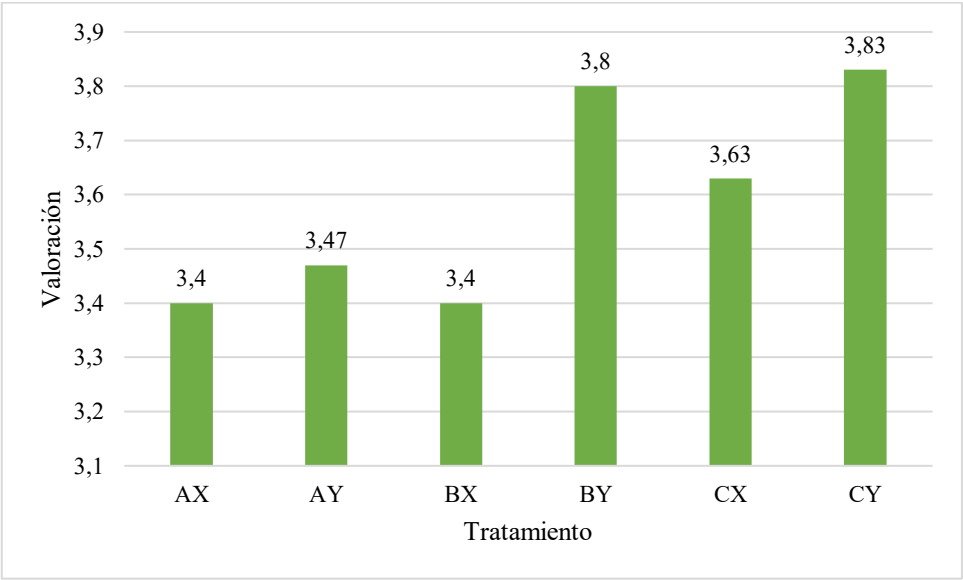



**Figura 16.** Puntuación media de la textura para cada tratamiento.

- **Aceptabilidad global**

La **Figura 17** integra la valoración general del producto. Los resultados muestran, nuevamente, diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,001$; **Tabla 6**). CY (LY06) alcanzó la mayor puntuación media de aceptabilidad (3,97), seguida de CX (MB33) (3,8); ambas se sitúan claramente en el rango de "me gusta". BY (NG52) ocupó una posición intermedia (3,5), mientras que AY (ZS41) y BX (XH79) se situaron alrededor de 3,4 y 3,03, respectivamente. AX (FD58) obtuvo la aceptabilidad más baja (3,1), aunque todavía cercana al punto neutro. En conjunto, la aceptabilidad global refleja el patrón observado en sabor y color: mayor preferencia por las formulaciones con piña madura, seguida de las elaboradas con piña semi – madura, y menor aceptación de las bebidas formuladas con fruta verde.

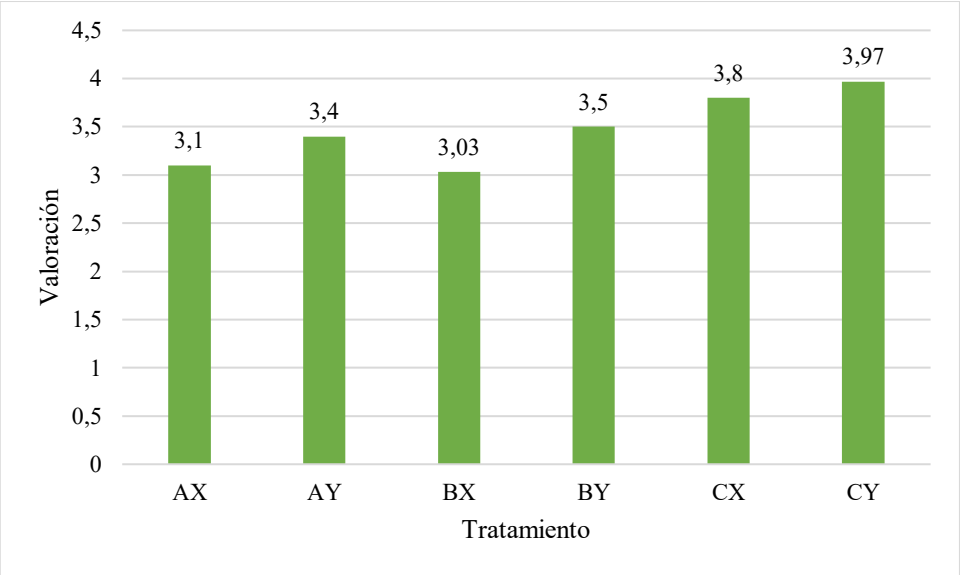



**Figura 17.** Puntuación media de la aceptación global para cada tratamiento.

En conjunto, todas las bebidas obtuvieron puntuaciones medias ≥ 3 en color, sabor, textura y aceptabilidad global, lo que indica una aceptación general del concepto de bebida probiótica de piña, aunque con claras diferencias entre tratamientos. Interpretando estas medias bajo el criterio anterior, todas las formulaciones resultan aceptables; sin embargo, sólo las elaboradas con piña madura (CX, CY) se sitúan de forma consistente en el rango de "me gusta", lo que sugiere un mayor potencial de éxito sensorial y comercial en el público joven.

El patrón de preferencia observado en color y olor, que aumenta progresivamente desde los tratamientos con piña verde (AX, AY) hasta aquellos con piña madura (CX, CY), coincide con lo reportado para la para piña fresca y sus derivados. Esto se debe a que el avance de la madurez incrementa los sólidos solubles y la relación sólidos solubles -acidez, mientras el color de la

pulpa se vuelve más intensamente amarillo, atributos fuertemente asociados con la aceptación del consumidor en cultivares de piña **(Viana et al., 2020).** Además, la mayor madurez se asocia con mayor acumulación de azúcares y compuestos volátiles frutales, lo que se traduce en perfiles de aroma más intensos y agradables para el consumidor **(de Freitas et al., 2024)**. Esto explica que CX y, sobre todo, CY alcancen las máximas puntuaciones en olor.

El sabor fue el atributo que tuvo mayor diferencia entre tratamientos ($\chi^2$ más alto), y la aceptabilidad global reprodujo prácticamente el mismo orden de preferencia. Esto confirma que el equilibrio entre dulzor y acidez es la principal característica que define el agrado en productos de piña. En frutos de piña, la maduración incrementa el contenido de azúcares y la relación sólidos solubles – acidez titulable, y los frutos cosechados en estados de madurez más avanzados presentan mayores niveles de aceptación y son percibidos con una dulzura y acidez "ideales" por los consumidores **(Ali et al., 2022).** La tendencia observada, menor agrado del sabor en piña verde (AX, BX), valores intermedios con piña semi – madura (BY) y máximos con piña madura (CX, CY), es coherente con la evolución esperada de la calidad organoléptica de la fruta.

En contraste, la textura no mostró diferencias significativas y las medias se concentraron en un rango estrecho (3,4–3,8). Esta homogeneidad es lógica dado que todas las formulaciones comparten una matriz líquida base muy similar y sólo varían en el estado de madurez de la pulpa y un rango moderado de $CO_2$. En tales condiciones, las diferencias en la percepción de cuerpo o textura suelen ser sutiles. Esto se sustenta en estudios que indican que la carbonatación modula sobre todo sensaciones trigeminales (hormigueo, "bite") y la interacción saliva – bebida, con un impacto limitado en la percepción de cuerpo cuando la viscosidad y composición de base son semejantes **(Vlădescu et al., 2021)**. Además, en bebidas de frutas carbonatadas se ha observado que la aceptación del consumidor se explica principalmente por el sabor, mientras que variaciones moderadas en la intensidad de carbonatación sólo afectan la preferencia cuando la bebida se percibe "demasiado plana" o "excesivamente gasificada" **(Barker et al., 2021)**. Este comportamiento respalda que el panel haya discriminado con claridad color, olor, sabor y aceptabilidad, pero no la textura.

En síntesis, los resultados muestran que, aunque todas las bebidas probióticas de piña evaluadas son sensorialmente aceptables, las formulaciones con piña madura (especialmente CY) integran mejor color, aroma y sabor y, en consecuencia, alcanzan la mayor aceptabilidad global. No obstante, varios panelistas comentaron de forma reiterada que, aunque las bebidas elaboradas

con piña madura (CX, CY) fueron las de sabor más agradable, percibieron que “falta un poco de dulzor” o una mayor intensidad de sabor a piña, lo que sugiere un margen de mejora en la concentración de jugo o en el perfil de dulzor de la formulación.

# CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1. Conclusiones

Se formularon seis bebidas probióticas a partir de una base de 30 % de jugo de piña pasteurizado, inoculado posteriormente con *Weizmannia coagulans*, y 70 % de agua carbonatada, combinando tres estados de madurez (verde, semi – maduro y maduro) con dos niveles de gasificación (2,5 y 3,0 vol. de $CO_2$). Las características iniciales de pH, °Brix y acidez permitieron diferenciar de manera clara los estados de madurez, con mayor contenido de sólidos solubles y menor acidez en las piñas más maduras, lo que se reflejó en el perfil sensorial de las bebidas. La elección de un 30 % de jugo permitió conservar un contenido de fruta superior al mínimo habitual en bebidas carbonatadas a base de jugos, asegurando color, aroma y sabor propios de la piña sin recurrir a jarabes azucarados.

En cuanto a la estabilidad de *Weizmannia coagulans* en las bebidas carbonatadas de *Ananas comosus*, se observó que el probiótico mantuvo recuentos superiores a 6,8 log UFC/mL durante las ocho semanas de almacenamiento refrigerado (4 °C) en todas las formulaciones, superando el umbral mínimo de 6 log UFC/mL considerado necesario para ejercer efectos probióticos. La cinética de supervivencia se caracterizó por una disminución inicial entre la semana 0 y la 1, seguida de una fase de estabilización con oscilaciones poco marcadas, lo que sugiere un proceso de adaptación de la población microbiana y una posible alternancia entre formas vegetativas y esporuladas sin comprometer su funcionalidad. En conjunto, se verificó que la matriz de jugo de piña carbonatado, sin azúcar añadida ni conservantes químicos, constituye un vehículo adecuado para mantener la viabilidad de *W. coagulans* en condiciones de refrigeración.

Además, se determinó que el estado de madurez de la piña tuvo un efecto mayormente significativo sobre la viabilidad de *W. coagulans* que el nivel de carbonatación en el rango estudiado. Las formulaciones elaboradas con piña semi – madura mantuvieron, en promedio, los recuentos más altos de probiótico a lo largo del tiempo, lo que indica que el equilibrio entre acidez, azúcares y otros componentes propios de este estado de maduración genera un entorno favorable para la estabilidad del microorganismo. Las bebidas con piña madura presentaron una viabilidad ligeramente menor, aunque siempre dentro del rango funcional, mientras que las formuladas con piña verde registraron los valores más bajos, coherentes con un medio más ácido. En cuanto al nivel de gasificación, las diferencias entre 2,5 y 3,0 vol. de $CO_2$ no se tradujeron en variaciones relevantes en los recuentos, lo que indica que, bajo las condiciones

de pH, acidez y temperatura de este estudio, la carbonatación no fue un factor limitante para la supervivencia de *W. coagulans*.

Desde el punto de vista fisicoquímico, el pH, los sólidos solubles (°Brix) y la acidez titulable se mantuvieron prácticamente constantes durante las ocho semanas de almacenamiento refrigerado. La ausencia de cambios notorios en estos parámetros indica que no se produjo una fermentación activa de los azúcares presentes en el jugo y que la bebida se comportó como un sistema químicamente estable, aspecto clave para garantizar una vida útil predecible y evitar alteraciones indeseables en sabor o gasificación.

En el ámbito microbiológico, las bebidas cumplieron en todo momento con los límites establecidos para recuento de mesófilos aerobios, mohos, levaduras y coliformes totales y fecales en jugos y bebidas de frutas pasteurizadas. No se evidenció el crecimiento de microorganismos indicadores de contaminación ni de microorganismos alterantes, lo que confirma que la combinación de pasteurización y refrigeración constituyó una barrera eficaz frente al deterioro de las bebidas.

En términos sensoriales, todas las formulaciones alcanzaron puntuaciones iguales o superiores a 3 en la escala hedónica de 5 puntos, lo que refleja un nivel de aceptación global neutro y, en muchos casos, positivo. Las bebidas elaboradas con piña madura, especialmente aquellas con mayor nivel de carbonatación, fueron consistentemente mejor valoradas en color, aroma, sabor y aceptabilidad global, asociándose su preferencia al color más intenso, mayor dulzor percibido y notas aromáticas más típicas de la piña madura. No obstante, una observación recurrente de los catadores fue la percepción de “falta de dulzor” o de intensidad de sabor a piña, incluso en las formulaciones mejor evaluadas, lo que señala una oportunidad para optimizar el perfil sensorial sin comprometer la propuesta de bebida con etiqueta limpia y bajo contenido de azúcar.

En conjunto, los resultados permiten concluir que es técnica y microbiológicamente viable el desarrollo de una bebida probiótica carbonatada a base de jugo de piña con *Weizmannia coagulans*, capaz de mantener niveles funcionales del probiótico y de conservar su estabilidad fisicoquímica y microbiológica durante al menos ocho semanas de almacenamiento en refrigeración. La formulación propuesta integra atributos de salud (probiótico, menor contenido de azúcares añadidos, ausencia de conservantes químicos) con características sensoriales aceptables para consumidores jóvenes, lo que la posiciona como una alternativa diferenciada frente a las bebidas gaseosas convencionales y alineada con la tendencia hacia bebidas

funcionales y “más naturales”, evidenciando el potencial de *W. coagulans* como probiótico de nueva generación en matrices carbonatadas de frutas.

### 4.2. Recomendaciones

- Se recomienda ajustar el perfil sensorial de la bebida, especialmente en términos de dulzor e intensidad de sabor de piña, considerando el comentario recurrente de los catadores. Esto podría abordarse mediante un incremento moderado del porcentaje de jugo o la incorporación de edulcorantes bajos en calorías con la finalidad de mejorar la palatabilidad sin aumentar significativamente la carga calórica ni modificar la estabilidad del probiótico.
- También, a pesar de que las formulaciones realizadas con piña semi – madura contaron con los mayores recuentos de *Weizmannia coagulans*, se sugiere desarrollar la bebida carbonatada con piña madura ya que alcanza una mejor aceptación sensorial y mantiene la concentración de probiótico por encima del mínimo requerido durante toda la vida útil del producto.
- Se propone analizar la viabilidad de escalar la producción a nivel industrial en colaboración con la empresa JOMER, considerando formatos de envase (vidrio, PET para bebidas carbonatadas, latas) que protejan la carbonatación y la viabilidad del probiótico. Será necesario validar la estabilidad de *W. coagulans* durante operaciones de llenado, cierre, distribución y almacenamiento en condiciones reales de mercado, así como estimar costos de producción y fijar un precio competitivo que mantenga el valor agregado del carácter funcional del producto.
- Finalmente, se sugiere explorar variantes de la bebida que combinen piña con otras frutas tropicales. Esto podría aumentar la diversidad de la oferta, aprovechar la misma plataforma tecnológica de *Weizmannia coagulans* y consolidar una familia de bebidas probióticas carbonatadas orientadas a consumidores que buscan alternativas más saludables a las gaseosas tradicionales.

## BIBLIOGRAFÍA


Abdul Manan, M. (2025). Progress in probiotic science: Prospects of functional probiotic-based foods and beverages. *International Journal of Food Science*, *2025*(1), 5567567. https://doi.org/10.1155/IJFO/5567567

Ahn, S. I., Kim, M. S., Park, D. G., Han, B. K., & Kim, Y. J. (2023). Effects of probiotics administration on lactose intolerance in adulthood: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, *106*(7), 4489–4501. https://doi.org/10.3168/JDS.2022-22762

Alderees, F., Akter, S., Mereddy, R., & Sultanbawa, Y. (2021). Antimicrobial activity of nanoencapsulated essential oils of *Tasmannia lanceolata*, *Backhousia citriodora* and *Syzygium anisatum* against weak-acid resistant *Zygosaccharomyces bailii* in clear apple juice. *Beverages*, *7*(3), 67. https://doi.org/10.3390/beverages7030067

Ali, M. M., Hashim, N., Aziz, S. A., & Lasekan, O. (2022). Shelf life prediction and kinetics of quality changes in pineapple (*Ananas comosus*) varieties at different storage temperatures. *Horticulturae*, *8*(11), 992. https://doi.org/10.3390/horticulturae8110992

Almada, C., Almada, C., Cabral, L., Barros de Medeiros, V., Roquetto, A., Santos, V., Fontes, M., Gonçalves, A., dos Santos, A., Lollo, P., Magnani, M., & Sant'Ana, A. (2021). Orange juice and yogurt carrying probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30 6086: Impact of intake on Wistar male rats health parameters and gut bacterial diversity. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 623951. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623951

Alves, A. T. S., Spadoti, L. M., Zacarchenco, P. B., & Trento, F. K. H. S. (2018). Probiotic functional carbonated whey beverages: Development and quality evaluation. *Beverages*, *4*(3), 49. https://doi.org/10.3390/beverages4030049

Azeredo, D. R. P., Alvarenga, V., Sant'Ana, A. S., & Sabaa Srur, A. U. O. (2016). An overview of microorganisms and factors contributing for the microbial stability of carbonated soft drinks. *Food Research International*, *82*, 136–144. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.024

Barker, S., Moss, R., & McSweeney, M. B. (2021). Carbonated emotions: Consumers' sensory perception and emotional response to carbonated and still fruit juices. *Food Research International*, *147*, 110534. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110534

Bisson, G., Maifreni, M., Innocente, N., & Marino, M. (2023). Application of pre-adaptation strategies to improve the growth of probiotic lactobacilli under food-relevant stressful conditions. *Food & Function*, *14*(4), 2128–2137. https://doi.org/10.1039/D2FO03215E

Budimac, T., Pezo, L., Šovljanski, O., Cvetković, D., Cvanić, T., Vučetić, A., & Ranitović, A. (2025). An optimal probiotic carrier: Multiple steps toward selection and application in kombucha. *Fermentation*, *11*(5), 256. https://doi.org/10.3390/fermentation11050256

Cao, J., Yu, Z., Liu, W., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103643. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103643

Chandimali, N., Bae, J., Hwang, J. Y., Bak, S. G., Cheong, S. H., & Lee, S. J. (2025). Integrated hygiene control strategies in food manufacturing: Technologies, regulations, and socioeconomic impacts. *Journal of Food Protection*, *88*(7), 100547. https://doi.org/10.1016/j.jfp.2025.100547

Chang, Y. H., Jeong, C. H., Cheng, W. N., Choi, Y., Shin, D. M., Lee, S., & Han, S. G. (2021). Quality characteristics of yogurts fermented with short-chain fatty acid-producing probiotics and their effects on mucin production and probiotic adhesion onto human colon epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, *104*(7), 7415–7425. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19820

Chong, A. Q., Lau, S. W., Chin, N. L., Talib, R. A., & Basha, R. K. (2023). Fermented beverage benefits: A comprehensive review and comparison of kombucha and kefir microbiome. *Microorganisms*, *11*(5), 1344. https://doi.org/10.3390/microorganisms11051344

Chua, L. S., & Leong, C. Y. (2020). Effects of microwave heating on quality attributes of pineapple juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(10), e14786. https://doi.org/10.1111/jfpp.14786

Cohen, G., Sela, D. A., & Nolden, A. A. (2023). Sucrose concentration and fermentation temperature impact the sensory characteristics and liking of kombucha. *Foods*, *12*(16), 3116. https://doi.org/10.3390/foods12163116

Condurso, C., Merlino, M., Miller, A., Di Rosa, A. R., Accetta, F., Leonardi, M., Cicero, N., & Gervasi, T. (2025). Developing novel plant-based probiotic beverages: A study on

viability and physicochemical and sensory stability. *Foods*, *14*(12), 2148. https://doi.org/10.3390/foods14122148

Cristofori, F., Dargenio, V. N., Dargenio, C., Miniello, V. L., Barone, M., & Francavilla, R. (2021). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: A door to the body. *Frontiers in Immunology*, *12*, 578386. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386

de Freitas, A. P., Krause, W., Arantes, D. S. O., Silva, D. C., Santos, E. A., & da Silva Campos, R. A. (2024). Agronomic performance and fruit sensory and quality analyses of pineapple cultivars. *Comunicata Scientiae*, *15*, e4193. https://doi.org/10.14295/cs.v15.4193

Deivasigamani, A., Vellaichamy, C., & Ganesan, C. (2021). Development and sensory evaluation of pineapple juice with peel. *AIP Conference Proceedings*, *2387*(1), 1000100. https://doi.org/10.1063/5.0068574

Dippong, T., Pop, F., Voşgan, Z., & Mihali, C. (2025). Quality of fruit juices in terms of physico-chemical, microbiological, thermal and antioxidant properties, evaluation of stability during storage. *Frontiers in Food Science and Technology*, *5*, 1656271. https://doi.org/10.3389/frfst.2025.1656271

FAO/WHO. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/8b1233c6-f928-4ff0-85e1-78b2e27c6e4e/content

Fijan, S., Fijan, T., & Connil, N. (2023). Overview of probiotic strains of *Weizmannia coagulans*, previously known as *Bacillus coagulans*, as food supplements and their use in human health. *Applied Microbiology*, *3*(3), 935–947. https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3030064

Fiocco, D., Longo, A., Arena, M. P., Russo, P., Spano, G., & Capozzi, V. (2020). How probiotics face food stress: They get by with a little help. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(9), 1552–1580. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1580673

Freitas, R., Nero, L. A., & Carvalho, A. F. (2009). Technical note: Enumeration of mesophilic aerobes in milk: Evaluation of standard official protocols and Petrifilm aerobic count plates. *Journal of Dairy Science*, *92*(7), 3069–3073. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1705

Gawai, K., Prajapati, J., & Tagalpallewar, G. (2025). Comparison study and evaluation of selective enrichment broth for coliforms with commercial broth media. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, *44*(5), 822–826. https://doi.org/10.18805/ajdfr.dr-1912

Goodman, C., Keating, G., Georgousopoulou, E., Hespe, C., & Levett, K. (2021). Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, *11*(8), e043054. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-043054

Grand View Research. (2022). *Latin America yogurt and probiotic drink market size & outlook, 2030*. https://www.grandviewresearch.com/horizon/outlook/yogurt-and-probiotic-drink-market/latin-america

Grand View Research. (2024). *Probiotic food & beverages - Probiotics market outlook*. https://www.grandviewresearch.com/horizon/statistics/probiotics-market/form/probiotic-food-beverages/global

Gul, S., & Durante-Mangoni, E. (2024). Unraveling the puzzle: Health benefits of probiotics—A comprehensive review. *Journal of Clinical Medicine*, *13*(5), 1436. https://doi.org/10.3390/jcm13051436

Hidalgo-Fuentes, B., de Jesús-José, E., Cabrera-Hidalgo, A. J., Sandoval-Castilla, O., Espinosa-Solares, T., González-Reza, R. M., Zambrano-Zaragoza, M. L., Liceaga, A. M., & Aguilar-Toalá, J. E. (2024). Plant-based fermented beverages: Nutritional composition, sensory properties, and health benefits. *Foods*, *13*(6), 844. https://doi.org/10.3390/foods13060844

Huang, J., Lai, P., Xiang, L., Lin, B., Li, W., Yu, W., & Wang, Q. (2024). Influences of *Weizmannia coagulans* PR06 fermentation on texture, cooking quality and starch digestibility of oolong tea-fortified rice noodles. *Foods*, *13*(17), 2673. https://doi.org/10.3390/foods13172673

INEN. (2006). NTE INEN 1529-5:2006. Microbiología de alimentos. Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en placa. Instituto Ecuatoriano de Normalización.

INEN. (2008). NTE INEN 2337:2008. Jugos y bebidas de fruta. Requisitos microbiológicos. Instituto Ecuatoriano de Normalización.

INEN. (2013). NTE INEN 1529-10:2013. Microbiología de alimentos. Recuento de mohos y levaduras. Instituto Ecuatoriano de Normalización.

INEN. (2016). INEN 1836-2:2016. Frutas frescas. Piña. Requisitos. Instituto Ecuatoriano de Normalización.

Jang, H. J., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2024). Overview of dairy-based products with probiotics: Fermented or non-fermented milk drink. *Food Science of Animal Resources*, *44*(2), 255. https://doi.org/10.5851/kosfa.2023.e83

Ji, J., Jin, W., Liu, S. J., Jiao, Z., & Li, X. (2023). Probiotics, prebiotics, and postbiotics in health and disease. *MedComm*, *4*(6), e420. https://doi.org/10.1002/mco2.420

Khatun, R., & Bhattacharya, M. (2024). Probiotics drinks: Balancing the benefits with possible side-effects. *International Journal of Biotech Trends and Technology*, *14*(2), 6–14. https://doi.org/10.14445/22490183/ijbtt-v14i2p102

Kopacz, K., & Phadtare, S. (2022). Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Healthcare*, *10*(8), 1450. https://doi.org/10.3390/healthcare10081450

Lacerda, D. C., Trindade da Costa, P. C., Paulino do Nascimento, L. C., & de Brito Alves, J. L. (2022). Probiotics for gastrointestinal health and disease treatment. En *Probiotics for human nutrition in health and disease* (pp. 431–448). https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89908-6.00022-4

Larosa, C. P., Balthazar, C. F., Guimarães, J. T., Rocha, R. S., Silva, R., Pimentel, T. C., Granato, D., Duarte, M. C. K. H., Silva, M. C., Freitas, M. Q., Cruz, A. G., & Esmerino, E. A. (2021). Sheep milk kefir sweetened with different sugars: Sensory acceptance and consumer emotion profiling. *Journal of Dairy Science*, *104*(1), 295–300. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18702

Lasekan, O., & Hussein, F. K. (2018). Classification of different pineapple varieties grown in Malaysia based on volatile fingerprinting and sensory analysis. *Chemistry Central Journal*, *12*(1), 140. https://doi.org/10.1186/s13065-018-0505-3

Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., & Korma, S. A. (2023). Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1216674. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674

Lei, G., Khan, A., Budryn, G., & Grzelczyk, J. (2025). Probiotic products from laboratory to commercialization. *Trends in Food Science & Technology*, *155*, 104807. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104807

Liao, C. W., Hung, M. C., Wang, C. Y., & Chen, B. Y. (2023). Effects of high-pressure processing and thermal processing on different beverages containing *Bacillus coagulans* spores. *LWT*, *183*, 114887. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114887

Mackowiak, P. A. (2013). Recycling Metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in Public Health*, *1*, 52. https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052

Maia, M. S., Domingos, M. M., & José, J. F. B. S. (2023). Viability of probiotic microorganisms and the effect of their addition to fruit and vegetable juices. *Microorganisms*, *11*(5), 1335. https://doi.org/10.3390/microorganisms11051335

Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., & Ali, F. (2016). Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*(4), 894–901. https://doi.org/10.1111/ijfs.13044

Martin, N. H., Trmcic, A., Hsieh, T. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1549. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549

Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells*, *12*(1), 184. https://doi.org/10.3390/cells12010184

Mohd Ali, M., Hashim, N., Abd Aziz, S., & Lasekan, O. (2020). Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. *Food Research International*, *137*, 109675. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109675

Mordor Intelligence. (2025). *Tamaño del mercado de bebidas no alcohólicas, crecimiento y análisis de la industria | 2030*. https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/non-alcoholic-beverage-market

Muhammad, L. (2023). Guidelines for repeated measures statistical analysis approaches with basic science research considerations. *Journal of Clinical Investigation*, *133*(11), e171058. https://doi.org/10.1172/jci171058

Nadeem, R., Imran, A., Wei, C. R., Naz, S., Waheed, W., Akram, M. A., Ahmed, A., Tahir, S., Islam, F., & Kinki, A. B. (2024). A review on the potential impact of probiotics and prebiotics in enhancing health benefits. *Cogent Food and Agriculture*, *10*(1), 2409831. https://doi.org/10.1080/23311932.2024.2409831

Newbold, D., & Koppel, K. (2018). Carbonated dairy beverages: Challenges and opportunities. *Beverages*, *4*(3), 66. https://doi.org/10.3390/beverages4030066

Ogodo, A. C., Agwaranze, D. I., Daji, M., & Aso, R. E. (2022). Microbial techniques and methods: Basic techniques and microscopy. En *Analytical techniques in biosciences: From basics to applications* (pp. 201–220). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00003-8

Ormaza, A., Rodriguez, S., & Díaz, F. (2024). Evaluation of *Lactobacillus coagulans* in the design of coffee-based probiotic beverages by using different preparation methods. *Coffee Science*, *19*, e192178. https://doi.org/10.25186/.v19i.2178

Payne, J., Bellmer, D., Jadeja, R., Holt, B., Holcomb, B., & Spring, S. (2025). Storage temperature effects on *Bacillus* spores and *Lactobacillus acidophilus* viability. *International Journal of Food Science*, *2025*(1), 3966944. https://doi.org/10.1155/ijfo/3966944

Payne, J., Bellmer, D., Jadeja, R., & Muriana, P. (2024). The potential of *Bacillus* species as probiotics in the food industry: A review. *Foods*, *13*(15), 2444. https://doi.org/10.3390/foods13152444

Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages*, *1*(2), 95–103. https://doi.org/10.3390/beverages1020095

Piper, J. D., & Piper, P. W. (2017). Benzoate and sorbate salts: A systematic review of the potential hazards of these invaluable preservatives and the expanding spectrum of clinical uses for sodium benzoate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(5), 868–880. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12284

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, *10*, S49–S66. https://doi.org/10.1093/advances/nmy063

Rahman, M. S., Das Emon, D., Toma, M. A., Nupur, A. H., Karmoker, P., Iqbal, A., Aziz, M. G., & Alim, M. A. (2023). Recent advances in probiotication of fruit and vegetable juices. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, *10*(3), 522. https://doi.org/10.5455/javar.2023.j706

Rashima, S., Maizura, M., Hafzan, W. N., & Hazzeman, H. (2019). Physicochemical properties and sensory acceptability of pineapples of different varieties and stages of maturity. *Food Research*, *3*(5), 491–500. https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(5).060

Rodrigues, E., Silva, J., Manfrinato, B., Balthazar, C. F., Xavier-Santos, D., Bezerril, F. F., Magnani, M., & Sant'Ana, A. S. (2024). What are the main obstacles to turning foods healthier through probiotics incorporation? A review of functionalization of foods by probiotics and bioactive metabolites. *Food Research International*, *176*, 113785. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113785

Sarita, B., Samadhan, D., Hassan, M. Z., & Kovaleva, E. G. (2024). A comprehensive review of probiotics and human health-current prospective and applications. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1487641. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1487641

Savalkar, S., Babar, K., & Bornare, D. (2018). Development of lab scale pineapple fruit juicer. *International Journal of Agricultural Engineering*, *11*(2), 320–323. https://doi.org/10.15740/has/ijae/11.2/320-323

Sbehat, M., Mauriello, G., & Altamimi, M. (2022). Microencapsulation of probiotics for food functionalization: An update on literature reviews. *Microorganisms*, *10*(10), 1948. https://doi.org/10.3390/microorganisms10101948

Siti Rashima, R., Azhar, M. E., & Maizura, M. (2021). Influence of post-harvest physiology on sensory perception, physical properties, and chemical compositions of Moris pineapples (*Ananas comosus* L.). *Journal of Food Science*, *86*(9), 4159–4171. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15877

Spence, C. (2023). Are pineapples really delicious? The history of the pineapple's taste/flavour and the role of varietal and terroir. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *31*, 100682. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100682

Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts—Characteristics and food application. *Foods*, *10*(6), 1306. https://doi.org/10.3390/foods10061306

Sun, Y., Guo, S., Wu, T., Zhang, J., Kwok, L. Y., Sun, Z., Zhang, H., & Wang, J. (2023). Untargeted mass spectrometry-based metabolomics approach unveils biochemical changes in compound probiotic fermented milk during fermentation. *NPJ Science of Food*, *7*(1), 21. https://doi.org/10.1038/s41538-023-00197-z

Tahmassebi, J. F., & BaniHani, A. (2020). Impact of soft drinks to health and economy: A critical review. *European Archives of Paediatric Dentistry*, *21*(1), 109–117. https://doi.org/10.1007/s40368-019-00458-0

Talib, A., Samad, A., Hossain, M. J., Muazzam, A., Anwar, B., Atique, R., Hwang, Y.-H., & Joo, S.-T. (2024). Modern trends and techniques for food preservation. *Food and Life*, *2024*(1), 19–32. https://doi.org/10.5851/fl.2024.e6

Tan, L. L., Ang, K. L., & Loo, S. C. J. (2023). Alginate encapsulation improves probiotics survival in carbonated sodas and beers. *PLOS ONE*, *18*(3), e0283745. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283745

Thinkohkaew, K., Jonjaroen, V., Niamsiri, N., Panya, A., Suppavorasatit, I., & Potiyaraj, P. (2025). Viability assessment of microencapsulated probiotics in carbonated soft drinks during storage and simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Future Foods*. https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2025.01.009

Valero-Cases, E., Cerdá-Bernad, D., Pastor, J. J., & Frutos, M. J. (2020). Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. *Nutrients*, *12*(6), 1666. https://doi.org/10.3390/nu12061666

Verma, S. (2018). Fruit based carbonated soft drinks for nutritional security and value chain development – A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(11), 3084–3095. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.711.354

Viana, E. S., Sasaki, F. F. C., Reis, R. C., Junghans, D. T., Guedes, I. S. A., & Souza, E. G. (2020). Quality of fusariosis-resistant pineapple FRF 632, harvested at different maturity stages. *Revista Caatinga*, *33*(2), 541–549. https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n226rc

Vlădescu, S. C., Bozorgi, S., Hu, S., Baier, S. K., Myant, C., Carpenter, G., & Reddyhoff, T. (2021). Effects of beverage carbonation on lubrication mechanisms and mouthfeel. *Journal of Colloid and Interface Science*, *586*, 142–151. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.10.079

Wang, L., Wang, J., Du, L., Fang, X., & Liao, Z. (2022). Application of *Weizmannia coagulans* in the medical and livestock industry. *Annals of Microbiology*, *72*(1), 30. https://doi.org/10.1186/s13213-022-01687-3

Weitzel, M. L. J., Vegge, C. S., Pane, M., Goldman, V. S., Koshy, B., Porsby, C. H., Burguière, P., & Schoeni, J. L. (2021). Improving and comparing probiotic plate count methods by analytical procedure lifecycle management. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 693066. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693066

Wu, Y., Bai, Z., Jin, Y., Zhu, H., Dong, Y., Gu, S., & Jin, Y. (2024). A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study to evaluate the efficacy and safety of *Weizmannia coagulans* BC99 in the treatment of chronic constipation in adults. *Frontiers in Nutrition*, *11*, 1395083. https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1395083

Xu, L., Chen, P., Liu, T., Ren, D., Dong, N., Cui, W., He, P., Bi, Y., Lv, N., & Ntakatsane, M. (2020). A novel sensitive visual count card for detection of hygiene bio-indicator—molds and yeasts in contaminated food. *LWT*, *117*, 108687. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108687

Yang, L., Bovet, P., Liu, Y., Zhao, M., Ma, C., Liang, Y., & Xi, B. (2017). Consumption of carbonated soft drinks among young adolescents aged 12 to 15 years in 53 low- and middle-income countries. *American Journal of Public Health*, *107*(7), 1095. https://doi.org/10.2105/ajph.2017.303762

Yang, Z., Zhou, Y., Han, Z., He, K., Zhang, Y., Wu, D., & Chen, H. (2024). The effects of probiotics supplementation on *Helicobacter pylori* standard treatment: An umbrella review of systematic reviews with meta-analyses. *Scientific Reports*, *14*(1), 10069. https://doi.org/10.1038/s41598-024-59399-4

Zapata. (1966). Manual Práctico de bebidas para la industria de refrescos. All Americas Publishers Service, Inc.

Zhang, S., Li, P., Lee, S., Wang, Y., Tan, C., & Shang, N. (2024). *Weizmannia coagulans*: An ideal probiotic for gut health. *Food Science and Human Wellness*, *13*(1), 16–26. https://doi.org/10.26599/fshw.2022.9250002

Zhi, R., Zhao, L., & Shi, J. (2016). Improving the sensory quality of flavored liquid milk by engaging sensory analysis and consumer preference. *Journal of Dairy Science*, *99*, 5305–5317. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10612

Zia, H., Slatnar, A., Košmerl, T., & Korošec, M. (2024). A review study on the effects of thermal and non-thermal processing techniques on the sensory properties of fruit juices and beverages. *Frontiers in Food Science and Technology*, *4*, 1405384. https://doi.org/10.3389/frfst.2024.1405384

Žvirdauskienė, R., Jonikė, V., Bašinskienė, L., & Čižeikienė, D. (2025). Fruit and vegetable juices as functional carriers for probiotic delivery: Microbiological, nutritional, and sensory perspectives. *Microorganisms*, *13*(6), 1272. https://doi.org/10.3390/microorganisms13061272

## ANEXOS

### Anexo 1. *Weizmannia coagulans* morfología

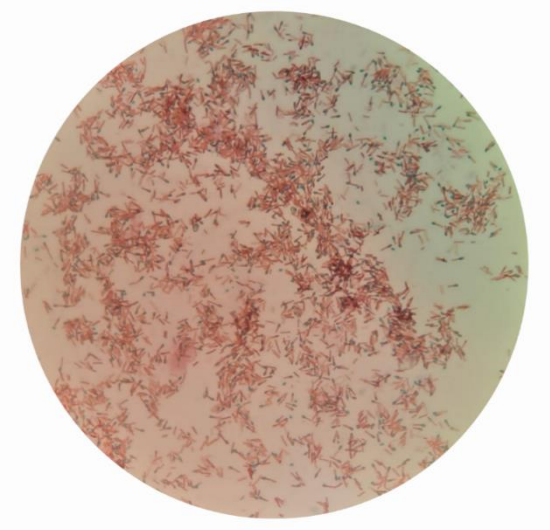


**Figura 18.** Morfología de *Weizmannia coagulans* a través del microscopio.

**Nota:** Se realizó una tinción de Schaeffer y Fulton con la finalidad de teñir esporas. La parte vegetativa del microorganismo se tiñó de rojo debido a la safranina mientras que las esporas se tiñeron de verde gracias al verde malaquita.

**Anexo 2.** Proceso de fabricación y formulación de las bebidas carbonatadas probióticas.



**Figura 19.** Pelado de la piña.



**Figura 20.** Cortado de la piña en trozos.



**Figura 21.** Extracción de jugo de piña.



**Figura 22.** Pasteurización del jugo de piña.



**Figura 23.** Adición de *Weizmannia coagulans* al jugo pasteurizado.



**Figura 24.** Llenado de la bebida carbonatada.

## Anexo 3. Catación de la bebida carbonatada probiótica de piña



**Figura 25.** Bebidas carbonatadas de *Ananas comosus* con adición de *Weizmannia coagulans* para catación.



**Figura 26.** Organización de la catación: colocación de los vasos codificados con las bebidas, limpiador de paladar (agua simple) y la hoja de catación en las mesas de catadores.



**Figura 27.** Catadores probando cada uno de los tratamientos de las bebidas realizadas.

## Anexo 4. Placas Petri del análisis microbiológico

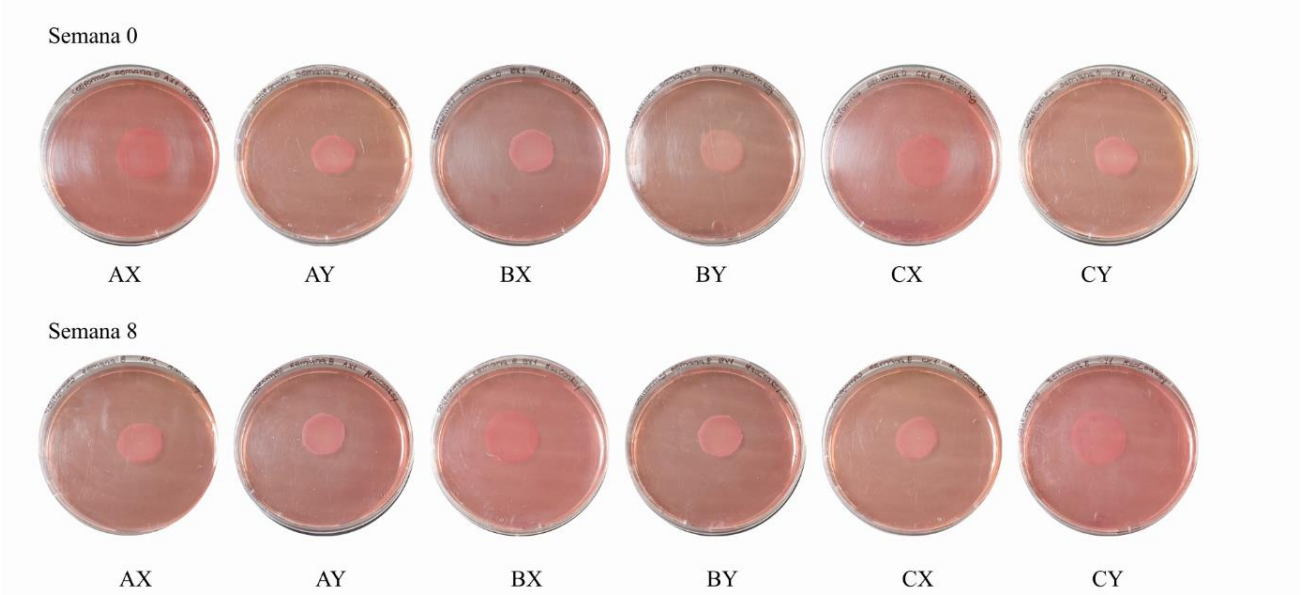



**Figura 28.** Placas de coliformes totales en agar MacConkey.

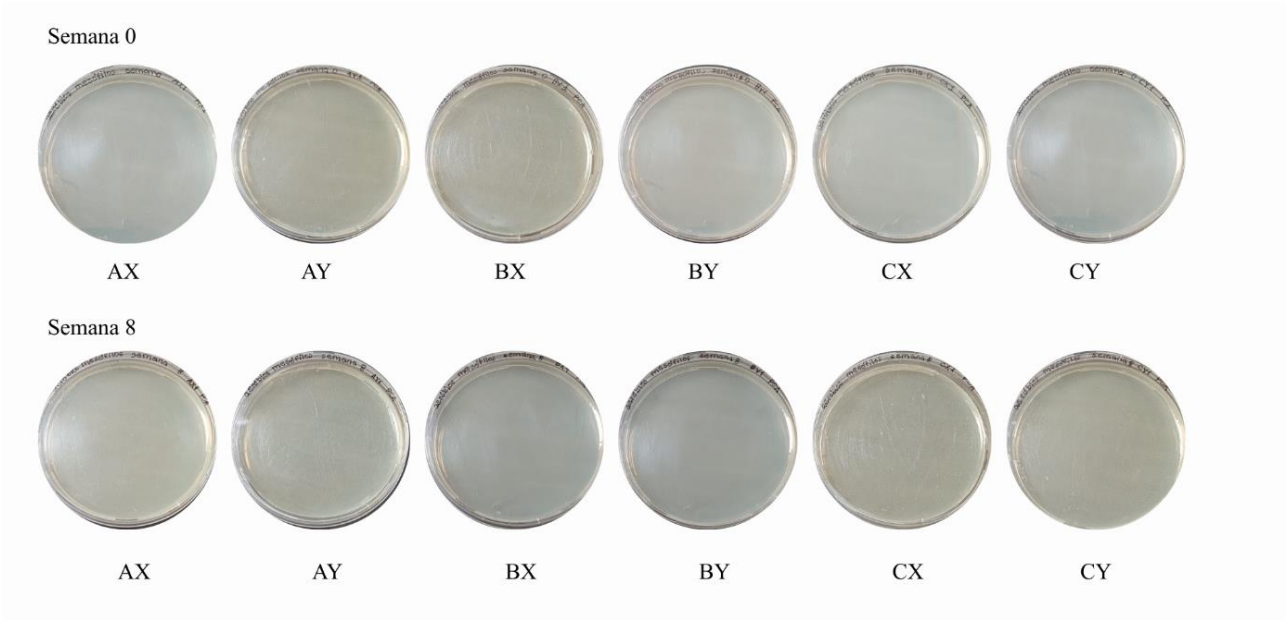



**Figura 29.** Placas de aerobios mesófilos en PCA.

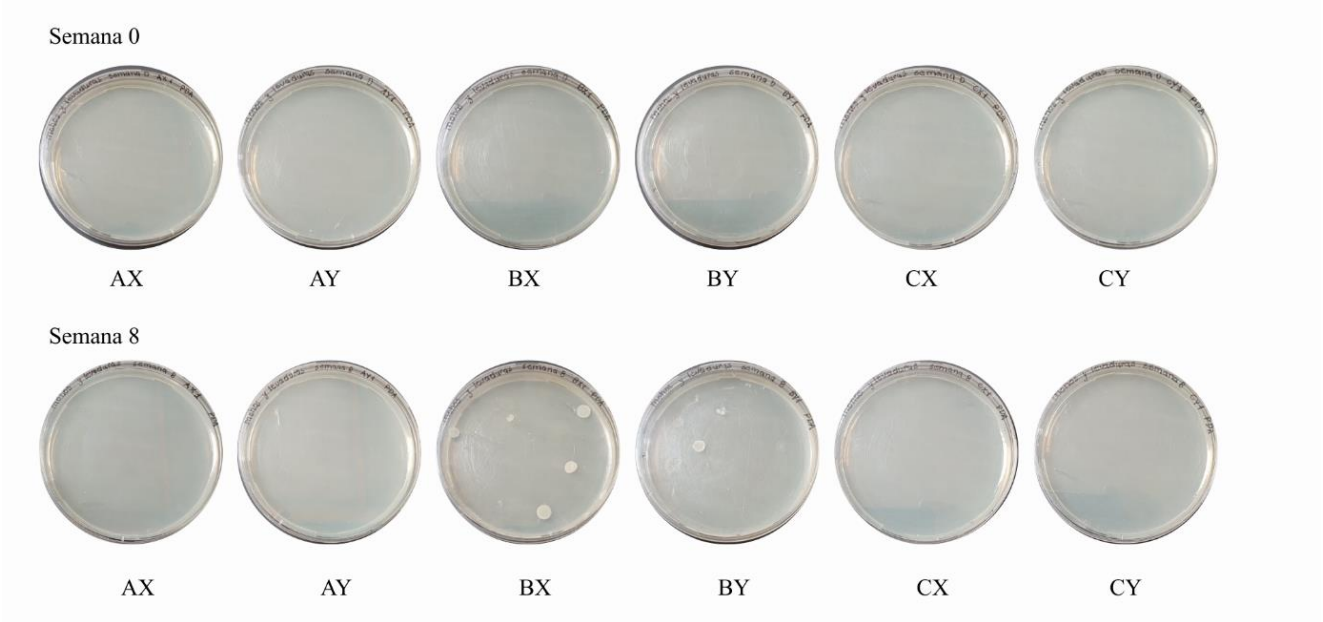



**Figura 30.** Placas de mohos y levaduras en PDA.

**Anexo 5. *Weizmannia coagulans* en agar Glucosa Extracto – Levadura**

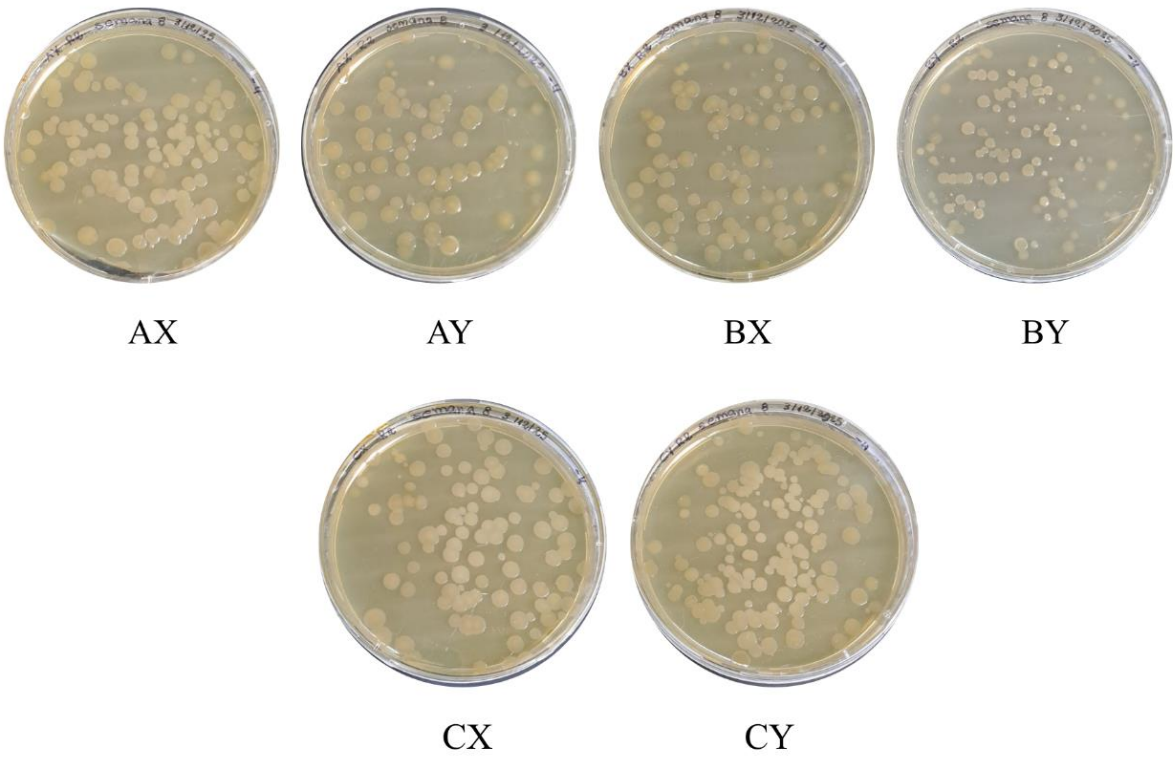



**Figura 31.** *Weizmmania coagulans* en agar Glucosa Extracto – Levadura.

**Nota:** Se incluye la semana 8 como referencia del comportamiento del microorganismo al final del almacenamiento, manteniéndose por encima de $10^6$ UFC/mL (6 log UFC/mL) en la dilución $10^{-4}$.

**Anexo 6. Documentación de seguridad y certificación de *Weizmannia coagulans***

## Certification of Analysis

| | | | |
|---|---|---|---|
| Name of product | Freeze-dried lactic acid bacteria powder<br>Bacillus Coagulans | | |
| Lot No. | 20250527 | Expiry date | 2027.05.26 |
| Product Date | 2025.05.27 | Inspection date | 2025.05.27 |
| Quantity | 100kg | Spec of package | 1kg/bag |
| According to | Q/WKHS0003S | Report date | 2025.05.29 |
| Storage Condition | Storage at normal temperature , preserve in well-closed, light-resistant, and protect from moisture. | | |

| Test Item | SPECIFICATION | Test Result |
|---|---|---|
| Appearance | Possesses the color characteristic of this product | Complies |
| Loss On Drying | ≤5.0% | 4.1% |
| The total number of live bacteria | $\geq 1.0\times10^{11}$CFU/g | $1.14\times10^{11}$CFU/g |
| Fineness of pulverization | 100%pass the 0.6mm sieve, >90% pass the 0.4mm sieve | Complies |
| Note | Strain: Bacillus Coagulans | |
| Test Conclusion | Complies | |

**Figura 32.** Certificado de análisis (CoA) del polvo liofilizado de *Bacillus coagulans* (*Weizmannia coagulans*) utilizado en el estudio.

# Product Specification

| Name of product | Freeze-dried lactic acid bacteria powder<br>Weizmannia coagulans | |
|---|---|---|
| According to | Q/WKHS 0003S | |
| Shelf life | 2 years. | |
| Storage | Storage at normal temperature , preserve in well-closed, light-resistant, and protect from moisture. | |
| Production process | Sterilization of raw/auxiliary materials——Cooling——Inoculation——Fermentation——Centrifugation——Coating & Inactivation)——Freeze-drying——Grinding——Blending——Packaging. | |
| Item | SPECIFICATION | Test Method |
| Appearance | White or pale yellow, powdery, odorless. | Organoleptic |
| Auxiliary materials | Maltodextrin | GB/T 20884 |
| Net content | 1kg/bag | JJF 1170 |
| Loss On Drying | ≤5% | USP |
| The total number of live bacteria | ≥1.0×$10^{11}$CFU/g | Q/WKHS 0003S |
| Residual Solvents | Pass | USP |
| Heavy metal | Heavy Metalss/(mg/kg)≤1<br><br><br>Mercury(Hg)/(mg/kg)≤0.1 | GB 5009 |
| E.coli | Negative | USP |
| Salmonella/25g | Negative | USP |

**Figura 33.** Especificación del producto (ficha técnica) del polvo liofilizado de *Weizmannia coagulans* empleado en el estudio.



FDA | FOOD FACILITY REGISTRATION

FFR | Fiscal Year 2024-2026

This certifies that:

**WECARE BIOENGINEERING CO.,LTD**
**No.1507XINGLU RD,ZHOUCUN,ZIBO,Shandong**

is registered with the U.S. Food and Drug Administration pursuant to section 305 of the United States Public Health Security and Bioterrorism Preparedness and Response Act of 2002, P.L.

107-188, such registration having been verified as currently effective on the date hereof by STS Testing (Shenzhen) Technology Co., Ltd.

**U. S. FDA Registration No.: 13583828434**
**D-U-N-S Number: 715913959**

*This* certificate *affirms that the above stated facility is registered with the* U.S. Food *and Drug Administration pursuant to section 305 of the U.S. Public Health* Security and *Bioterrorism Preparedness* and *Response Act of 2002, P.L. 107-188, such* registration *having been* verified as effective *by STS* as of the date *hereof, and STS will confirm* that *such registration* remains effective *upon* request *and presentation of this* certificate *until the expiration of one year from the date* hereof, *unless terminated after* issuance *of this certificate. STS makes no other* presentations *or warranties, nor* does this certificate *make any representations or* warranties to any *person or entity other than the named certificate holder, for whose sole* benefit *it is issued. STS assume no liability to any person or entity in connection with the foregoing. The* U.S. Food *and Drug Administration does not issue a certificate of registration, nor does the* U.S. Food and *Drug Administration* recognize *a certificate of registration. STS is not affiliated with the U.S.* Food *and Drug Administration.*

Jack
Chief engineer
Issued:November 19, 2024

*Web: www.sts-cnas.com* *Tel:1-888-info-fda(1-888-463-6332)* *E-mail:stsvip@yeah.net*

**Figura 34.** Registro de instalación alimentaria del proveedor WECARE BIOENGINEERING CO., LTD. ante la U.S. FDA (Food Facility Registration, FFR).

## Anexo 7. Tablas de promedios semanales por tratamiento: recuento *de Weizmannia coagulans*, pH, °Brix y acidez titulable de la bebida

**Tabla 7.** Promedio semanal del recuento de *Weizmannia coagulans* (UFC/mL) por tratamiento de bebida.

| Semana | Tratamientos | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **AX (log UFC/mL)** | **AY (log UFC/mL)** | **BX (log UFC/mL)** | **BY (log UFC/mL)** | **CX (log UFC/mL)** | **CY (log UFC/mL)** |
| 0 | 7,7 | 7,7 | 7,7 | 7,7 | 7,7 | 7,7 |
| 1 | 7,37 | 7,17 | 7,41 | 7,30 | 7,29 | 7,35 |
| 2 | 7,20 | 7,12 | 7,25 | 7,22 | 7,26 | 7,35 |
| 3 | 7,00 | 7,02 | 7,05 | 7,11 | 7,15 | 7,13 |
| 4 | 7,20 | 7,06 | 7,19 | 7,22 | 7,08 | 7,01 |
| 5 | 6,94 | 7,07 | 7,07 | 7,13 | 6,96 | 7,16 |
| 6 | 7,00 | 7,10 | 7,23 | 7,11 | 7,10 | 7,10 |
| 7 | 6,92 | 7,04 | 7,18 | 7,07 | 7,06 | 7,03 |
| 8 | 6,88 | 7,01 | 7,15 | 6,99 | 7,02 | 6,98 |
| 0 | 7,7 | 7,7 | | 0 | 7,7 | 7,7 |

**Tabla 8.** Promedio semanal del pH por tratamiento de bebida.

| Semana | Tratamientos | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | AX | AY | BX | BY | CX | CY |
| 0 | 3,60 | 3,57 | 3,85 | 3,81 | 4,04 | 3,99 |
| 1 | 3,60 | 3,59 | 3,85 | 3,82 | 4,04 | 3,99 |
| 2 | 3,60 | 3,57 | 3,88 | 3,83 | 4,05 | 4,00 |
| 3 | 3,62 | 3,58 | 3,89 | 3,86 | 4,04 | 4,00 |
| 4 | 3,62 | 3,59 | 3,88 | 3,85 | 4,06 | 4,02 |
| 5 | 3,61 | 3,61 | 3,89 | 3,86 | 4,05 | 4,02 |
| 6 | 3,62 | 3,60 | 3,90 | 3,87 | 4,06 | 4,01 |
| 7 | 3,63 | 3,60 | 3,92 | 3,89 | 4,08 | 4,04 |
| 8 | 3,64 | 3,60 | 3,92 | 3,89 | 4,08 | 4,05 |

**Tabla 9.** Promedio semanal de los °Brix por tratamiento de bebida.

| | **Tratamientos** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Semana | AX | AY | BX | BY | CX | CY |
| 0 | 3,00 | 2,90 | 3,37 | 3,43 | 4,00 | 4,27 |
| 1 | 3,03 | 2,97 | 3,37 | 3,37 | 4,10 | 4,33 |
| 2 | 2,77 | 2,97 | 3,33 | 3,27 | 3,97 | 4,30 |
| 3 | 3,03 | 2,80 | 3,37 | 3,40 | 4,23 | 4,33 |
| 4 | 2,97 | 3,00 | 3,47 | 3,47 | 4,17 | 4,10 |
| 5 | 2,87 | 2,93 | 3,33 | 3,33 | 4,37 | 4,13 |
| 6 | 2,93 | 2,80 | 3,43 | 3,40 | 4,30 | 4,17 |
| 7 | 3,03 | 2,93 | 3,30 | 3,40 | 4,33 | 4,33 |
| 8 | 3,00 | 2,97 | 3,53 | 3,47 | 4,33 | 4,40 |

**Tabla 10.** Promedio semanal de la acidez por tratamiento de bebida.

| | **Tratamiento** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Semana | AX (% ácido cítrico) | AY (% ácido cítrico) | BX (% ácido cítrico) | BY (% ácido cítrico) | CX (% ácido cítrico) | CY (% ácido cítrico) |
| 0 | 0,12 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,10 | 0,11 |
| 1 | 0,12 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,10 | 0,10 |
| 2 | 0,13 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,11 |
| 3 | 0,12 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,11 |
| 4 | 0,13 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,11 |
| 5 | 0,13 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,10 |
| 6 | 0,13 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,10 | 0,10 |
| 7 | 0,13 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,10 |
| 8 | 0,12 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,11 |