

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**Viabilidad de las Cepas de *Lactobacillus casei shirota* y  
*Bifidobacterium lactis* en un Postre de Leche con Salsa  
de Cranberry**

Tesis presentada como parte de  
los requisitos para optar al grado  
de Licenciado en Ciencia de los  
Alimentos.

**Paula Andrea Cartes Tironi**

VALDIVIA – CHILE

2005

**PROFESOR PATROCINANTE**

Sr. Haroldo Magariños Hawkins

Técnico Lechero

Magíster en Ciencia y Tecnología de la Leche

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos \_\_\_\_\_

**PROFESOR INFORMANTE**

Sra. Marcia Costa Lobo

Ingeniero Civil Bioquímico, Diploma Ingeniería Industrial

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos \_\_\_\_\_

**PROFESOR INFORMANTE**

Sr. Fernando Figuerola Rivas

Ingeniero Agrónomo

M.S. Food Science

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos \_\_\_\_\_

## INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Definición de Probióticos	4
2.2	Características que deben cumplir los probióticos	5
2.3	Microorganismos utilizados como Probióticos	6
2.3.1	Mecanismo de acción de los microorganismos probióticos	6
2.3.2	Características generales del género <i>bifidobacterium</i>	7
2.3.3	Características generales del género <i>Lactobacillus</i>	9
2.3.4	Características generales de <i>Lactobacillus casei shirota</i>	10
2.4	Propiedades terapéuticas atribuidas a los probióticos	12
2.5	Consideraciones de la ingesta de microorganismos probióticos	16
2.6	Microorganismos probióticos en productos lácteos	17
2.7	Elaboración de productos lácteos no fermentados con la adición de probióticos	19
2.8	Propiedades generales del jugo de cranberry	22
2.8.1	Cranberry	22
2.8.2	Composición química de los frutos y jugo de cranberry	24
2.8.3	Efectos del jugo de cranberry sobre la inhibición de la <i>Escherichia coli</i>	26
2.8.4	Actividad anti-adherencia del jugo de cranberry sobre especies bacterianas no urinarias.	28
3	MATERIAL Y MÉTODO	31

3.1	Cepas utilizadas	31
3.2	Trabajo pre- experimental	31
3.3	Preparación y manejo de los cultivos madre	32
3.3.1	Cultivos madres	32
3.3.2	Medios de cultivo empleados para la enumeración de los microorganismos probióticos	34
3.3.3	Recuento de microorganismos probióticos	35
3.3.4	Expresión de resultados	35
3.4	Elaboración del postre	35
3.4.1	Distribución del postre de leche para los diferentes tiempos de almacenamiento	36
3.4.2	Elaboración de la salsa de Cranberry	40
3.5	Análisis químicos y microbiológicos	40
3.5.1	Determinación de pH del postre de leche y salsa de cranberry	40
3.5.2	Determinación del contenido de sólidos solubles en salsa de cranberry	40
3.5.3	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.5.4	Recuento de hongos y levaduras	40
3.5.5	Recuento de coliformes	40
3.6	Evaluación sensorial del postre	40
3.7	Diseño experimental	41
3.8	Análisis de datos	41
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
4.1	Tiempos de incubación	42
4.2	Recuentos de cultivos madres	43
4.3	Análisis químicos y microbiológicos	43
4.4	Efecto de la dilución de los cultivos madres en el postre de	

	leche	44
4.5	Viabilidad de <i>Lactobacillus casei shirota</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i> durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C	46
4.6	Sobrevivencia de la concentración microbiana en el postre de leche	48
4.7	Disminución global de la concentración microbiana en el postre de leche	49
4.8	Efecto de la composición química del postre de leche sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos	50
4.9	Evaluación sensorial	51
5.	CONCLUSIONES	53
6.	RESUMEN	55
	SUMMARY	56
7.	BIBLIOGRAFÍA	57
	ANEXOS	71

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro		Página
1	Microorganismos usados como probióticos	7
2	Composición química de los frutos cranberry	25
3	Composición de fruta y jugo de cranberry	26
4	Actividad bactericida del jugo concentrado de cranberry a 35 °C	30
5	Formulación del postre de leche	37
6	Indicadores microbiológicos del postre de leche	44
7	Recuento de los microorganismos probióticos durante el almacenamiento del postre a 5 °C	48
8	Sobrevivencia de los microorganismos probióticos en postre de leche durante su almacenamiento a 5° C	49
9	Disminución global de la concentración microbiana	49
10	Resultados de la evaluación sensorial del postre de leche	51

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales mecanismos de acción propuestos de los probióticos	8
2	Protocolo de elaboración queso fresco tipo Panela	22
3	Preparación del cultivo madre	33
4	Línea de flujo de postre de leche con probióticos	38
5	Esquema demostrativo del método utilizado	39
6	Esquema demostrativo de las diluciones	39
7	Evolución del pH en el tiempo para la mezcla de microorganismos probióticos en postre de leche	44
8	Disminución del número de microorganismos viables por efecto de la dilución de los cultivos madres en el postre de leche.	45
9	Viabilidad de <i>Lactobacillus casei shirota</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i> a 5 °C	47

## INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Productos probióticos comerciales a nivel mundial	72
2	Ficha de evaluación sensorial	75
3	Análisis estadístico del cultivo madre	76
4	Análisis estadístico de la viabilidad de los microorganismos probióticos	77

## 1. INTRODUCCIÓN

El estilo de vida es, entre otros, el responsable del aumento de determinadas enfermedades, sobre todo de las causadas por microorganismos. La falta de actividad física, el consumo de alimentos ricos en hidratos de carbono refinados y grasas, y el escaso aporte de fibra en la dieta son la base de muchas enfermedades en la actualidad.

La dieta consumida hace un millón de años por nuestros antecesores contenía un 50% menos de proteínas, un 75% menos de grasas saturadas y un 90% menos de sodio. El hombre del Paleolítico consumía entre 4 y 10 veces más fruta y fibra que el actual, lo que le aportaba 10 veces más vitaminas y antioxidantes.

Pero la más llamativa diferencia con nuestros ancestros es que en su dieta ingerían diariamente más de  $10^9$  bacterias beneficiosas para la salud, entre las que se encontraban distintas especies de *Lactobacillus*. Este aporte de microorganismos era debido a que estos alimentos, sobre todo vegetales, eran almacenados durante mucho tiempo produciendo fermentaciones, entre ellas la fermentación láctica. Algunos de estos alimentos se siguen consumiendo en la actualidad como el *ogi* (Africa), el *kenkey* (Ghana) y el pozol (México).

El consumo de alimentos vegetales fermentados en los países desarrollados está en franco receso, tan sólo en algunos países se consumen *sauerkraut* y salsa de soja, entre otros. En cambio, el consumo de productos lácteos fermentados va en aumento, siendo los países del este de Europa los mayores consumidores. Ilya Metchnikoff, en 1900, centró sus estudios en demostrar que el consumo de uno de estos alimentos, el yogur, era el responsable de la gran longevidad de los habitantes de Bulgaria.

Desde entonces ha crecido el interés por estos alimentos con microorganismos beneficiosos para la salud, y más concretamente por los productos lácticos fermentados. Al margen de su contenido nutricional, las leches fermentadas son consideradas alimentos sanos y funcionales llamados **alimentos probióticos** y como tales, albergan bacterias vivas en su interior que, ingeridas en cantidades adecuadas, aportan beneficios adicionales para la salud.

Los alimentos que contienen estos microorganismos se venden en muchos países, aunque su supervivencia en alimentos es dudosa, puesto que algunas de las especies son extremadamente sensibles a una serie de factores. También, los métodos para contar estos organismos todavía no han sido establecidos, lo que se considera un requisito esencial para determinar su supervivencia en los productos comerciales.

El jugo de cranberry ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento y prevención de las enfermedades del tracto urinario, siendo potente inhibidor de la adherencia de la bacteria *Escherichia coli* a las paredes de las células de la vejiga. De acuerdo a lo anterior, es posible que este producto tenga posibilidades de aplicación en microbiología, medicina, farmacología, alimentación humana, y como sanitizante industrial. No obstante los conocimientos que se tienen sobre los positivos efectos del jugo de cranberry en la inhibición de la bacteria *Escherichia coli* spp, no existen estudios específicos cuantitativos *in vitro* respecto del grado de sensibilidad de otros microorganismos al jugo de cranberry y por consiguiente su función como agente inhibidor o bactericida. Por lo tanto, parece importante determinar si el jugo de cranberry presenta un mayor espectro de actividad antibacterial.

La hipótesis planteada para esta investigación es la siguiente:

Si se inocula un postre de leche con cepas de Lc y BI, tanto el *Lactobacillus casei* como el *Bifidobacterium lactis* son capaces de sobrevivir en cantidades

superiores a  $10^7$  de su concentración inicial, tras el proceso de refrigeración a 5 °C, durante 7, 14 y 21 días.

Por lo anterior se pretende cumplir con los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Evaluar la viabilidad que tienen las cepas de *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* al ser inoculados en un postre de leche luego de ser refrigerados y almacenados por un período de hasta 21 días.

Objetivos específicos:

- Cuantificar las unidades formadoras de colonias (ufc) de *Lactobacillus casei shirota* como de *Bifidobacterium lactis* por gramo de postre (antes del proceso de almacenamiento).
- Cuantificar las unidades formadoras de colonias (ufc) de *Lactobacillus casei shirota* como de *bifidobacterium lactis* por gramo de postre durante 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 5°C.
- Evaluar organolépticamente el postre de leche con salsa de cranberry durante un periodo de almacenamiento de 21 días.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Definición de probióticos

El interés científico por las bacterias como agentes protectores frente a diferentes enfermedades surge de la observación de Metchnikoff, quien a principios del siglo XX marcó la longevidad y la buena salud de los campesinos búlgaros, los cuales consumían grandes cantidades de yogurt, esto suponía que el consumo de grandes cantidades de alimentos ricos en bacterias lácticas eliminaba las bacterias formadoras de toxinas, mientras que elevaba la proporción de bacterias lácticas y la flora intestinal, mejoraba la salud, incrementando las expectativas de vida (ALVAREZ- OLMOS y OBERHELMAN, 2001).

Desde entonces, y a lo largo de casi cien años de estudio, diversos autores se han esforzado en conocer las distintas funciones de los microorganismos beneficiosos para la salud que habitan el tracto digestivo y más concretamente de los productos lácteos fermentados (TRAPP *et al.*, 1993). Directamente relacionado con esto surge el término “probiótico” en el año 1965 LILLY y STILWELL (1965) lo utilizaron para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulaban el crecimiento de otro, en contra posición al término antibiótico, entendido como cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Sin embargo, el concepto, que parecía adecuado, no era totalmente correcto, ya que probióticos son todas las sustancias de carácter nutritivo y no sólo determinados microorganismos.

PARKER (1974), fue el primero en usar probióticos, de acuerdo con el sentido que hoy se conoce, es decir, organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio intestinal.

Por su parte, FULLER (1989) intentó mejorar la definición propuesta por el autor anterior y definió “probiótico” como cualquier suplemento alimenticio vivo que beneficia al huésped mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal. Desde entonces, la definición de probiótico ha evolucionado notablemente, de forma que hoy se define como microorganismos vivos, principalmente bacterias, usados en suplementos nutricionales, que tras ser ingeridos en cantidad suficiente, mejoran el equilibrio microbiano en el intestino de las personas o animales que los ingieren, provocando efectos beneficiosos sobre su salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales.

En forma similar, GIBSON y ROBERFROID (1995) definen probiótico como “un microorganismo vivo que tras ser ingerido en cantidad suficiente ejerce un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales”. Finalmente, e íntimamente relacionado con los anteriores, surge el concepto de alimento funcional. Un alimento es funcional si sus componentes (que pueden ser o no nutritivos) tienen un efecto sobre una o varias funciones del organismo provocando un efecto positivo sobre la salud (BELLISLE *et al.*, 1998).

## **2.2 Características que deben cumplir los probióticos**

En pocos años los probióticos han evolucionado desde productos pioneros, como *Lactobacillus acidophilus*, hasta la gran variedad que existe actualmente como varios tipos de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium bifidus*, *Streptococcus thermophilus* e incluso hongos y levaduras como *Aspergillus oryzae* y *Candida pintolopesli*. Muy interesante parece también la idea de añadir a los probióticos cepas no patógenas de *E.coli* que compitan con su homólogo patógeno (AMORES *et al.*, 2004).

La selección de una cepa como probiótico requiere que sus efectos fisiológicos beneficiosos sean demostrados, que la cepa sea de origen humano y segura

para su uso, que sea estable al ácido y la bilis y que se adhiera a las células de la mucosa intestinal, así como también excluya o reduzca la presencia de agentes patógenos y colabore en la formación de una flora normal y equilibrada (SALMINEN *et al.*, 1998).

Algunos criterios comunes empleados para aislar y definir un organismo probiótico, y otras cepas específicas, señalan que el género del microorganismo sea de origen humano, que presente adecuada estabilidad al ácido clorhídrico y a la bilis, que se adhiera a la mucosa intestinal, que colonice temporalmente el tracto gastrointestinal humano, que produzca componentes antimicrobianos y que sea seguro al usar en humanos (LEE *et al.*, 1999).

### **2.3 Microorganismos utilizados como probióticos**

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos, se encuentran las bacterias ácido lácticas, que agrupan una gran cantidad de géneros y especies (Vaughan *et al.*, 2002 citado por AMORES *et al.*, 2004). Las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, como se observa en el CUADRO 1. Según relatan KAILASAPATHY y RYBKA (1997) y O'SULLIVAN (2001) numerosos géneros de bacterias y de levaduras como *Sacharomyces boulardii*, son hoy en día comercializados como cultivos probióticos, siendo los géneros comúnmente usados *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. De acuerdo a SHAH (2001) se han identificado a 56 especies de lactobacilos y 29 especies de bifidobacterias, siendo los siguientes los principales microorganismos probióticos comercializados en el mundo: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus reuteri*, *bifidobacterium adolescentis*, *bifidobacterium longum*, *bifidobacterium breve*,

*bifidobacterium bifidum*, *bifidobacterium essensis*, *bifidobacterium lactis*, *bifidobacterium infantis*, *bifidobacterium laterosporus* y *bifidobacterium subtilis*.

**2.3.1 Mecanismo de acción de los microorganismos probióticos.** Se han realizado diversas pruebas con animales y estudios *in vitro*, que demuestran que las cepas probióticas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes enteropatógenos específicos, mediante distintos mecanismo de acción, que aún no han sido completamente esclarecidos (AMORES *et al.*, 2004).

Los mecanismos de acción más significativos son los que representan en la FIGURA 1.

**CUADRO 1. Microorganismos usados como probióticos.**

<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Entreococcus spp</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Otras especies</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. Bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetyllactis</i>				<i>Leuconostoc spp.</i>
<i>L. rhamnosus GG</i>	<i>B. breve</i>					
<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>					
<i>L. kefir</i>	<i>B. adolescentis</i>					
<i>L. brevis</i>						
<i>L. reuteri</i>						
<i>L. helveticus</i>						
<i>L. plantarum</i>						
<i>L. johnsonii</i>						
<i>L. salivarius</i>						

FUENTE: AMORES *et al.*, (2004).

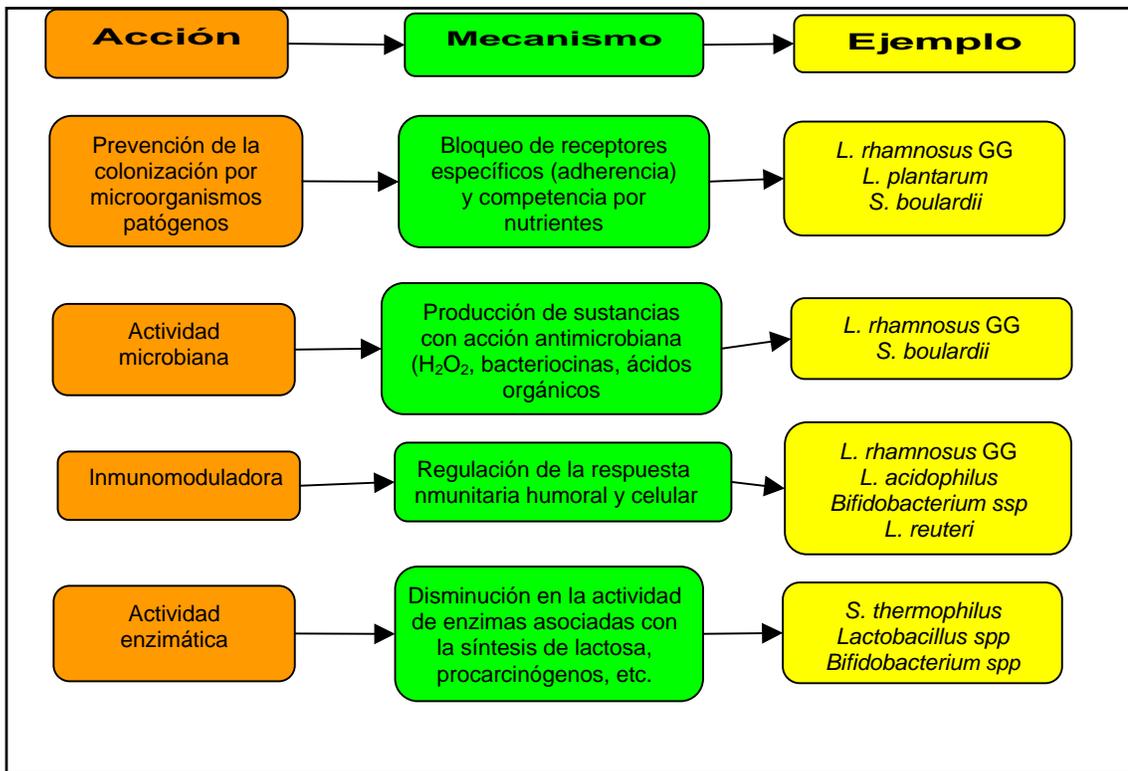
Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos, no sólo por los nutrientes, sino también por el espacio físico. Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de bloqueo específico del receptor, con lo que se produce una prevención de la colonización de los microorganismos patógenos, por inhibición competitiva en los lugares de adhesión. Estos mecanismos han sido estudiados

en un modelo que recurre al cultivo de células intestinales humanas (CHAUVIERE *et al.*, 1992).

Por otro lado, los probióticos producen numerosas sustancias anti-microbianas específicas, como las bacteriocinas, ácidos grasos volátiles de cadena corta, peróxido de hidrogeno y ácido láctico (*Bifido bacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*), por lo que se reduce el pH luminal; esto se considera el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas, como *E. coli*, *Streptococcus* y *Salmonella* (FONS *et al.*, 2000).

**2.3.2 Características generales del género *bifidobacterium*.** Las bifidobacterias son organismos Gram +, inmóviles, no esporulados, anaeróbicas y catalasa negativos. Según SCARDOVI (1986) pueden adoptar gran variedad de formas y longitudes que varían desde varillas curvadas hasta uniones de varillas con forma irregular; además, a menudo se encuentran en forma de Y (LAROIA y MARTIN, 1990). Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 37°C y 41°C y el pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 6,5 y 7,0 (SCARDOVI, 1986).

*Bifidobacterium lactis* se considera como una especie de *Lactobacillus* por producir acetaldehído, diacetilo, etanol y ácido láctico sin la generación de CO<sub>2</sub>, a partir del metabolismo de azúcares. Se descubrieron varias propiedades de este microorganismo, probándose que era incapaz de reproducirse en presencia de oxígeno. Por esta razón se clasificó en un género anaeróbico obligado llamado *Bifidobacterium*. Durante la producción de productos fermentados, las bifidobacterias pueden ser agregadas simultáneamente junto con los cultivos lácticos iniciadores (BARON *et al.*, 2000).



**FIGURA 1. Principales mecanismos de acción propuestos de los probióticos.**

FUENTE: Brook, 1999, Falk *et al.*, 1998, Fons *et al.*, 2000 citados por AMORES *et al.*, (2004).

La actividad proteolítica en leche de algunas cepas de bifidobacterias es débil, en cuanto a la producción de gas y sustancias aromáticas, KURMANN (1988) señala que algunas cepas de bifidobacterias utilizadas en la fabricación de leches fermentadas, tales como *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. adolescentis* pueden producir entre 27-39 ppm de acetaldehído en un rango de pH de 4,65 a 5,14, sujeto a la previa adición de treonina.

GOMES y MALCATA (1999) agregan que no crecen a pH menores de 4,5 - 5,0 ó mayores de 8,0 - 8,5. La sensibilidad de las bifidobacterias al oxígeno es variable, desde no muy sensibles hasta estrictamente anaeróbicas (KURMANN, 1988). A bajos pH las bifidobacterias mueren lentamente, pues estos

microorganismos, según manifiestan BLANCHETTE *et al.* (1996), no son ácido-tolerantes.

Sus principales productos metabólicos son los ácidos láctico y acético en proporción molar 3:2, respectivamente produciendo ácido láctico L (+) (SHAH, 2001 y MODLER *et al.*, 1990). Además, elaboran pequeñas cantidades de ácido fórmico, etanol, y ácido succínico, pero no producen CO<sub>2</sub> (excepto en la degradación de gluconato). La glucosa es metabolizada exclusivamente por la vía fructosa 6-fosfato (SCARDOVI, 1986).

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto intestinal humano a lo largo de todo el ciclo de vida, apareciendo pocos días después del nacimiento. Su proliferación en infantes es estimulada por las glicoproteínas, componentes de la κ- caseína del calostro humano, y en menor proporción, por la leche humana. Sin embargo, su cantidad comienza a decrecer con la edad del individuo, cuando se incrementa el número de otros microorganismos como Clostridios, Estreptococos y coliformes (HEKMAT y McMAHON, 1992). Eventualmente, en adultos puede llegar a ser el tercer género más abundante, después del género Bacteroides y Eubacterium (GOMES y MALCATA, 1999).

**2.3.3 Características generales del género *Lactobacillus*.** Son organismos Gram +, inmóviles, no esporulados, microaerófilos, mejorando su crecimiento en anaerobiosis o bajo reducidas presiones de oxígeno y entre 5 y 10 % de dióxido de carbono. Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 40 °C. Su tolerancia al ácido varía desde 0,3% hasta 1,9% de acidez titulable (GOMES y MALCATA, 1999). El pH óptimo para su crecimiento se ubica entre 5,5 y 6,2, pudiendo desarrollarse a pH menores de 5,0 (KANDLER y WEISS, 1986).

Según estos últimos autores, tal microorganismo presenta extremos redondeados, con dimensiones generalmente entre 0,6 - 0,9 por 1,5 - 6  $\mu\text{m}$  y se encuentran en forma individual o asociados en pares o en cadenas cortas. De acuerdo a SHAH (2001) produce una mezcla racémica de ácido láctico L (+) y D (-).

El género *Lactobacillus* está distribuido en varios nichos ecológicos a través del tracto gastrointestinal y genital y constituye una fracción importante de la microflora indígena del hombre. Su repartición es afectada por distintos factores medioambientales, entre los que se incluyen el pH, la disponibilidad de oxígeno, los niveles de sustratos específicos, la presencia de secreciones y las interacciones bacterianas. Estos microorganismos son raramente asociados con casos de infección gastrointestinal y extraintestinal, y las cepas empleadas tecnológicamente son consideradas como no patogénicas (GOMES y MALCATA, 1999).

**2.3.4 Características generales de *Lactobacillus casei shirota*.** Se ha comprobado que este microorganismo tiene influencia sobre un tipo de cáncer de vejiga, que es caracterizado por una alta incidencia y recurrencia en mujeres. El consumo de *Lactobacillus casei shirota* ha mostrado una reducción en este tipo de cáncer. El posible mecanismo de acción, es una reducción en la actividad mutagénica urinaria, aunque también puede jugar un rol, la modulación del sistema inmune según Hayatzu *et al.*, 1993; Aso *et al.*, 1995 y Ohashi, *et al.*, 2002, citado por OUWEHAND *et al.*, 2003. Por su parte, Aso *et al.*, 1995, Salminen *et al.*, 1998, Tanaka y Ohwaki, 1994 citado por FONDEN *et al.*, 2000, reportan efectos beneficiosos de *Lactobacillus casei shirota* sobre la prevención de disturbios intestinales, balance en la microflora intestinal, disminución de la actividad de enzimas fecales y efectos positivos sobre el cáncer femenino de vejiga.

Se han realizado estudios en los cuales se analizó la cantidad de LcS en la materia fecal de individuos que bebieron 125 ml de leche fermentada conteniendo  $10^{10}$  LcS vivas durante 3 días. La cantidad promedio encontrada fue aproximadamente de  $10^7$  bacterias vivas por gramo de heces, indicando que estas LcS sobrevivieron el tránsito a través del tracto gastrointestinal luego de la ingestión de la leche fermentada. (SPANHAAK *et al.*, 1998).

Un estudio efectuado en Holanda sobre 20 hombres sanos de 40 a 65 años de edad tratados con LcS, informa que esta cantidad de LcS ( $10^7$ ) en materia fecal se encontró asociada a un aumento significativo en el recuento de Bifidobacterias ( $P < 0,05$ ). También se observaron algunos cambios en los tipos de bacterias encontradas, como por ejemplo un número menor de Clostridium; sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el grupo control. No se observaron efectos del tratamiento en ninguno de los parámetros inmunológicos evaluados (incluyendo actividad de células NK, fagocitosis y producción de citokinas). Estos resultados sugieren que el consumo de leche fermentada con LcS es capaz de regular la composición y la actividad metabólica de la flora intestinal, pero que no influye en el sistema inmune de hombres con inmunocompetencia normal. (SPANHAAK *et al.*, 1998).

Sin embargo otra investigación sugiere que la administración oral de Lactobacillus casei Shirota (LcS) incrementa la inmunidad innata estimulando la actividad de las células NK producidas en el bazo. El mismo autor señala que la alimentación simultánea con probióticos y un antígeno puede suprimir la respuesta inmune celular y la producción de anticuerpos y puede proporcionar un tratamiento eficaz para atenuar las enfermedades autoinmunes. (MATSUZAKI, 1998).

Según un estudio hecho en Finlandia sobre glicoproteínas intestinales extraídas de la materia fecal humana, la adhesión de la *Salmonella typhimurium* es inhibida significativamente por el LcS. (TUOMOLA, 1999).

Un experimento desarrollado en Japón, consistió en alimentar ratones con un hidrato de carbono cancerígeno y observar las diferencias ocurridas entre los animales alimentados con LcS y el grupo control. La alimentación oral de ratones con LcS redujo la incidencia de tumores en forma significativa ( $P < 0,05$ ). El análisis histológico del bazo de los ratones tratados con hidratos de carbono carcinogénicos y alimentados con una dieta rica en LcS reveló que no se produjeron los desórdenes en el sistema inmune propios de una carcinogénesis, sino que se mantuvieron al mismo nivel que los ratones control que no fueron tratados con la sustancia cancerígena. Estos resultados sugieren que la alimentación de ratones con *Lactobacillus casei* strain Shirota inhibe la tumorigénesis inducida modulando la respuesta inmune desestabilizada por la carcinogénesis. (TAKAGI *et al.*, 1999).

Por otro lado, la administración intrapleurales de LcS en ratones que padecen tumores, inhibe el crecimiento de células tumorales en la cavidad torácica y prolonga significativamente el tiempo de supervivencia. Además induce la producción de citocinas en la cavidad torácica del ratón que inhiben el crecimiento tumoral. (MATSUZAKI, 1998).

Un estudio realizado en la Argentina concluye que el consumo diario de 160 ml de leche fermentada con LcS disminuye en un 16,7 % la colesterolemia en pacientes hipercolesterolémicos en 28 días. De la población estudiada, el 17 % sufrió leves efectos digestivos adversos siendo su período de recuperación no superior a 2 días. (FONDEN *et al.*, 2000).

## 2.4 Propiedades terapéuticas atribuidas a los probióticos

Al uso de probióticos se atribuyen numerosos efectos saludables, y son muchos los trabajos que demuestran los beneficios para la salud humana.

Diversos investigadores entre ellos SHAH *et al.*, (1992), han demostrado que la ingestión de probióticos de forma continuada, bien liofilizados o como yogur, han permitido reducir considerablemente la mala absorción de la lactosa, un problema que padece entre el 50 y el 70% de la población. Este efecto se debe al aporte de  $\beta$ -galactosidasa exógena proporcionada por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* del yogur. El tránsito intestinal aumenta permitiendo una mejor hidrólisis de la lactosa y la posterior adsorción de sus componentes. La acción de las bacterias lácticas sobre los componentes de la leche provoca una predigestión de muchos de ellos. Al mejorar la digestión de la lactosa, se mejora la digestibilidad de los productos lácteos y la absorción de calcio.

La microbiota intestinal ejerce un papel importante en el efecto barrera de la mucosa intestinal frente a infecciones. Sus mecanismos de acción son muy variados: modificar los niveles de adhesión celular, producir sustancias antimicrobianas o la estimulación de órganos linfoides asociados al tracto intestinal. El resultado es una estimulación del efecto barrera que puede prevenir la invasión de patógenos (LEE *et al.*, 1999; HUGHES y HOOVER, 1991).

En años recientes se ha hecho evidente que bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* existen en grandes cantidades en el intestino, no sólo de infantes, si no también de adultos humanos sanos, contribuyendo al bienestar fisiológico del individuo (BARON *et al.*, 2000; HELLER, 2001 y MARTH y STEELE, 1998).

El tracto gastrointestinal humano exhibe un amplio número de bacterias, presentes en el estómago, intestino delgado y colon. El recuento total de bacterias en los contenidos gástricos es usualmente bajo ( $10^3$  por gramo), con números reducidos debido al bajo pH luminal. En el intestino delgado el número de bacterias, es de aproximadamente  $10^4$  por mililitro hasta  $10^6$  -  $10^7$  en la región ileocecal Gorbach *et al.*, 1967 citado por (LEE *et al.*, 1999). El factor principal que limita el crecimiento en intestino delgado es el tránsito rápido de los contenidos, y también ciertas secreciones como la bilis. El intestino humano grueso es un ecosistema intensamente poblado por microorganismos, con recuentos aproximados de  $10^{11}$  -  $10^{12}$  por gramo. Hay cientos de diferentes especies de bacterias cultivables presentes en el intestino grueso, bajo circunstancias normales, la mayoría de las cuales son anaerobias estrictas. La composición es capaz de responder a variaciones anatómicas y fisicoquímicas que existen. El colon ascendente es caracterizado por una alta disponibilidad de sustrato y bajo pH. El colon descendente tiene una disponibilidad de sustrato más baja, el pH es aproximadamente neutro y las bacterias crecen lentamente (Havenaar y Huis, 1992 citado por LEE *et al.*, 1999).

Se ha observado que el colon humano es un área de intensa actividad metabólica que tiene un rol importante en la digestión, con muchas funciones atribuidas a la flora residente. Las funciones y disfunciones de la microflora intestinal humana ofrecen el lugar para el corregir el balance de la microflora intestinal humana con efectos sistemáticos beneficiosos para la salud del huésped (LEE y SALMINEN, 1995).

La producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas por parte de los probióticos ha mostrado tener un efecto positivo frente a las gastroenteritis producidas por cepas de *E. coli* y *Campylobacter* reduciendo las mismas considerablemente (JAKOBSEN *et al.*, 1999).

El Yakult es un producto lácteo fermentado japonés, que se estima se consume de forma diaria por un 10% de la población de este país. Este producto contiene cepas de *Lactobacillus casei shirota*, que han mostrado su eficacia frente a infecciones intestinales en niños, producidas por rotavirus y tienen efectos antitumorales en ratones. Estos efectos pueden ser debidos a las glicoproteínas secretadas por las propias bacterias (MATSUZAKI, 1998).

En un estudio se observó el efecto de la bebida probiótica “Yakult”, que contiene *Lactobacillus casei Shirota* (LcS), el que fue probado en 70 personas, con síntomas de severa constipación. El experimento fue realizado al azar en un periodo de 4 semanas. El estudio demostró que la ingestión de LcS mejoró la constipación, empezando la segunda semana del estudio. Al final de éste, el 89% de las personas reportaron mejoras en sus síntomas. Además, el bienestar general de los participantes fue mejor. Los resultados indicaron cambios en la flora microbiótica y el entorno del intestino. Los individuos de buena salud también deberían beneficiarse con estos efectos, producidos por la ingesta de Yakult.<sup>1</sup>

Otro aspecto interesante es la reducción de *candidiasis* y la restauración de la microbiota vaginal mediante la ingestión de probióticos. En la flora vaginal predominan los lactobacilos y más concretamente *L. acidophilus*. Los cambios hormonales ocurridos durante la menopausia producen cambios en la microbiota, facilitando las infecciones oportunistas por *Candida* y *E. coli*. La aplicación directa mediante cremas u óvulos ginecológicos de *Lactobacillus fermentum* B54 ha mostrado la restauración de la microbiota y la reducción del riesgo de infecciones oportunistas en mujeres menopáusicas. MOORE y MOORE, 1995 comprobó que la ingestión de 227 gramos de yogur diarios reducía significativamente el riesgo de estas infecciones frente al control. Los malos hábitos alimentarios inducen a la microbiota intestinal a producir

---

<sup>1</sup> [www.yakulteuropa.com](http://www.yakulteuropa.com)

sustancias con actividad carcinogénica, encontrándose recientemente que dietas suplementadas con *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* reducen el riesgo de contraer cáncer de colon.

En poblaciones urbanas donde existe una mayor incidencia de cáncer de colon muestran una mayor dominancia de bacterias del género *Bacteroides* dentro de su flora intestinal frente a poblaciones rurales donde el índice de esta enfermedad es muy bajo y predomina en su flora intestinal las bacterias lácticas (MOORE y MOORE, 1995) . La administración de suplementos dietéticos como las oligofruktosas o inulinas favorece el crecimiento de estos últimos microorganismos, resultando muy eficaces en la reducción del adenocarcinoma de colon.

Según O'SULLIVAN (1996), las bacterias Gram + y entre estas estreptococos, lactobacilos y bifidobacterias sobreviven luego de su paso a través del tracto gastrointestinal, llegando metabólicamente activos a implantarse en el colon.

Diversos investigadores y entre ellos OVERDAHL y ZOTTOLA (1991), KAILASAPATHY y RYBKA (1997) y O'SULLIVAN (2001) han demostrado que *L. acidophilus* y *Bifidobacterias* ejercen un efecto antagonista, mediante una colonización competitiva, hacia virus y microorganismos patógenos tales como *E. coli* enteropatogena, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus*, *Clostridium perfringens* y otro tipo de bacteroides.

## **2.5 Consideraciones de la ingesta de microorganismos probióticos**

La definición de alimentos probióticos enfatiza la necesidad que el producto alimenticio en cuestión contenga cantidades suficientes de microorganismos vivos; de este modo, los beneficios a la salud ya no están limitados tan sólo a las propiedades terapéuticas sino que también es fundamental que sean

ingeridos en cantidades elevadas para poder ejercer el efecto metabólico deseado (SALMINEN *et al.*, 1998).

En Japón fue desarrollado un estándar para leches fermentadas y bebidas de bacterias ácido lácticas, estipularon que un producto debe contener una cantidad de bacterias viables de  $1 \times 10^7$  bifidobacteria por g o mL para ser considerado un alimento probiótico (ISHIBASHI y SHIMAMUR, 1993). Sin embargo, las cantidades mínimas requeridas y el período óptimo de la administración de probióticos necesario para tener un efecto en la salud, sigue siendo una dosis terapéutica mínima confusa de  $1 \times 10^5$  ufc/g o mL. En todo caso, la dosis mínima requerida para un efecto probiótico puede depender del alimento, en la cual se ingiere el probiótico y probablemente del género probiótico usado (HAMILTON y FULLER, 1996 y LEE y SALMINEN, 1995 y SAXELIN *et al.*, 1993).

En general, la concentración mínima de microorganismos probióticos necesarios para provocar un resultado benéfico aún no está clara. Sin embargo, autores como BLANCHETTE *et al.* (1996), HEKMAT y McMAHON (1992), RYBKA y KAILASAPATHY (1995) y GÓMES y MALCATA (1999) señalan que un producto fermentado debería contener  $10^6$  Bifidobacterias por gramo de producto al momento de ser consumidos.

Para VINDEROLA *et al.* (2000) la ingesta diaria debe ser mayor a 100 gramos de producto que contengan  $10^6$  de bacterias viables, mientras que Kurmann y Rasic, citados por KAILASAPATHY y RYBKA (1997), sugieren que la ingesta semanal de estos productos debe ser de 300 a 400 gramos, además que es esencial que cualquier producto, vendido con pretensiones de ayuda a la salud, contenga un mínimo de  $10^6$  ufc/mL de bacterias probióticas en el producto en su fecha de vencimiento, sugiriendo como dosis terapéutica diaria  $10^8$  - $10^9$  células viables.

Por su parte LANKAPUTHRA *et al.* (1996), sugieren que para obtener algún efecto terapéutico, al momento del consumo del producto, éste debe contener un mínimo de  $10^5$  bacterias viables de *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus casei* por gramo de producto.

## **2.6 Microorganismos probióticos en productos lácteos**

GOMES y MALCATA (1999) sostienen que Japón produce y vende más de 50 diferentes productos lácteos que contienen células viables, señalando además, que una tendencia similar se observa en países desarrollados como Francia, Alemania y Suecia, donde los productos probióticos representan el 25% de todos los productos lácteos fermentados. Dichos autores estiman la existencia de aproximadamente 80 productos que contienen bifidobacterias en el mercado mundial, y más de 45 plantas lácteas en Europa que elaboran productos con *L. acidophilus* y con microorganismos del genero *Bifidobacterium*. En el ANEXO 1 se presentan algunos productos con probióticos comerciales a nivel mundial.

Varios factores han sido señalados como los responsables de la pérdida de viabilidad de los microorganismos probióticos en productos lácteos. Entre ellos se encuentran la acidez del producto, la acidificación producida durante la refrigeración, también conocida como post-acidificación, el nivel de oxígeno en el producto, el grado de permeabilidad del oxígeno a través del envase, la sensibilidad a sustancias antimicrobianas producidas por bacterias iniciadoras y la falta de nutrientes en la leche (SHAH, 2001).

En uno de sus artículos, HELLER (2001) señala que un aspecto importante en la elaboración de productos lácteos fermentados probióticos dice relación con la interacción que ocurre entre los microorganismos probióticos propiamente tales y los agentes del cultivo iniciador. Si bien poco se sabe sobre tal interacción, se ha logrado establecer efectos sinérgicos y antagónicos. En lo específico, se ha observado tales efectos en el yogurt adicionado de agentes probióticos. En

efecto, en este producto se ha demostrado que el contenido de células viables de bifidobacterias decrece en presencia de los cultivos iniciadores de aquel, posiblemente debido a sustancias inhibitorias elaboradas por *L. delbrueckii ssp bulgaricus* y *S. salivarius spp. thermophilus*, como ácido láctico y peróxido de hidrógeno, este último producido principalmente por *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus*. En este sentido, LANKAPUTHRA *et al.* (1996), RYBKA y KAILASAPATHY (1995) y HELLER (2001) han informado que durante la fabricación y almacenamiento del yogurt, el peróxido de hidrogeno parece ser la principal sustancia responsable de la reducción de la viabilidad de *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*

Asimismo, la intensidad de las interacciones entre los microorganismos probióticos, la matriz del alimento y los cultivos iniciadores empleados, depende en gran medida del instante en que sean agregados los organismos probióticos al producto, es decir, si estos están presentes durante la fermentación o si son adicionados después de tal proceso. En este ultimo caso, la interacción pudiese resultar mínima debido a que la adición puede ocurrir inmediatamente antes o aun después del enfriamiento a temperaturas menores a 8 ° C, momento en el cual la actividad metabólica de los organismos iniciadores y microorganismos probióticos es drásticamente reducida. Sin embargo, el almacenamiento por un largo periodo de tiempo pudiera producir pequeñas interacciones perceptibles que afectasen la viabilidad. Del mismo modo, interrupciones en la cadena de frío deben ser evitadas para mantener las interacciones al mínimo (HELLER, 2001).

El estado fisiológico de los microorganismos probióticos es de especial importancia cuando son agregados una vez que la fermentación esta terminada. Varias investigaciones muestran que las bacterias son mucho más susceptibles al estrés medioambiental en fase logarítmica de crecimiento que las bacterias en periodo estacionario (Kolter *et al.* citados por HELLER, 2001).

Por otro lado, la incorporación de microorganismos Probióticos en quesos parece ser una buena alternativa, para asegurar una adecuada sobrevivencia de los organismos hasta el consumo del producto, debido a su alto pH, a su matriz cerrada y a su elevado contenido de grasa, la cual puede proteger a dichos agentes microbianos (VINDEROLA *et al.*, 2000; GARDINER *et al.*, 1998).

En variedades de quesos como el Cheddar estos microorganismos son capaces de sobrevivir un período de maduración relativamente largo, de a lo menos 6 meses, y/o crecer en el producto durante tal etapa, siendo posible su elaboración sin efectuar modificaciones en la tecnología de fabricación tradicional (GARDINER *et al.*, 1998; DINAKAR y MISTRY, 1994).

Por su parte, BLANCHETTE *et al.* (1996) han comprobado una rápida disminución de la viabilidad de bifidobacterias en queso Cottage, sugiriendo que su pH y acidez titulable no son favorables para la sobrevivencia de tales organismos.

## **2.7 Elaboración de productos lácteos no fermentados con la adición de probióticos**

El protocolo de elaboración de queso tipo Panela se observa en la FIGURA 2. GONZÁLEZ, 2003 elaboró un queso fresco tipo Panela de forma convencional, usando renina microbiana; después de la operación de desuerado se separó en dos porciones y a una de ellas se le adicionó una mezcla de probióticos (*Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium adolescentis*), se prensó y almacenó por tres semanas. Se realizó recuento de probióticos viables y un análisis microbiológico que incluyó: coliformes fecales, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp, hongos y levaduras. Este estudio mostró que el contenido total de probióticos en los

quesos fue de  $1.3 \times 10^8$  y no se observó una reducción significativa en su contenido durante los 21 días que el producto permaneció en refrigeración a 4° C. Los quesos con probióticos no presentaron signos de alteración ni cambios en sus propiedades organolépticas en los 21 días de almacenamiento, mientras que en los quesos sin probióticos hubo evidentes signos de alteración alrededor del día 17; los cambios fueron en aroma y sabor, y para el día 20 se observaron coloraciones anormales en la superficie del queso.

VINDEROLA *et al.*, 2000 realizaron ensayos sobre la viabilidad de 5 cepas de *Bifidobacterium spp.* 2 cepas de *L. acidophilus* y *L. casei* en queso Fresco Argentino durante 60 días en almacenamiento refrigerado. Entre los principales resultados obtuvieron que no se presentó diferencias significativas en los tratamientos con *L. casei*, manteniendo un desarrollo de  $1 \times 10^7$  ufc/g; mientras que los ensayos con los otros dos géneros hubo una reducción de hasta 1 ciclo logarítmico; en los ensayos donde se utilizó una mezcla de *L. casei* con *B. bifidum* o *L. acidophilus* se mantuvo el resultado anterior; por que concluyeron que *L. casei* fue más adaptable al queso Fresco que los otros microorganismos. Numerosos investigadores han demostrado que el yogur es aceptado por individuos intolerantes a la lactosa Gilliland *et al.*, 1984; Kolars *et al.*, 1984, McDonough *et al.*, 1987, Savaiano *et al.*, 1984, Savaiano *et al.*, 1987 citados por LYN *et al.*, 1991. Esto es debido a la auto digestión de la lactosa en el intestino delgado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa microbiana, producida por los géneros *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* usados para fabricar el producto.

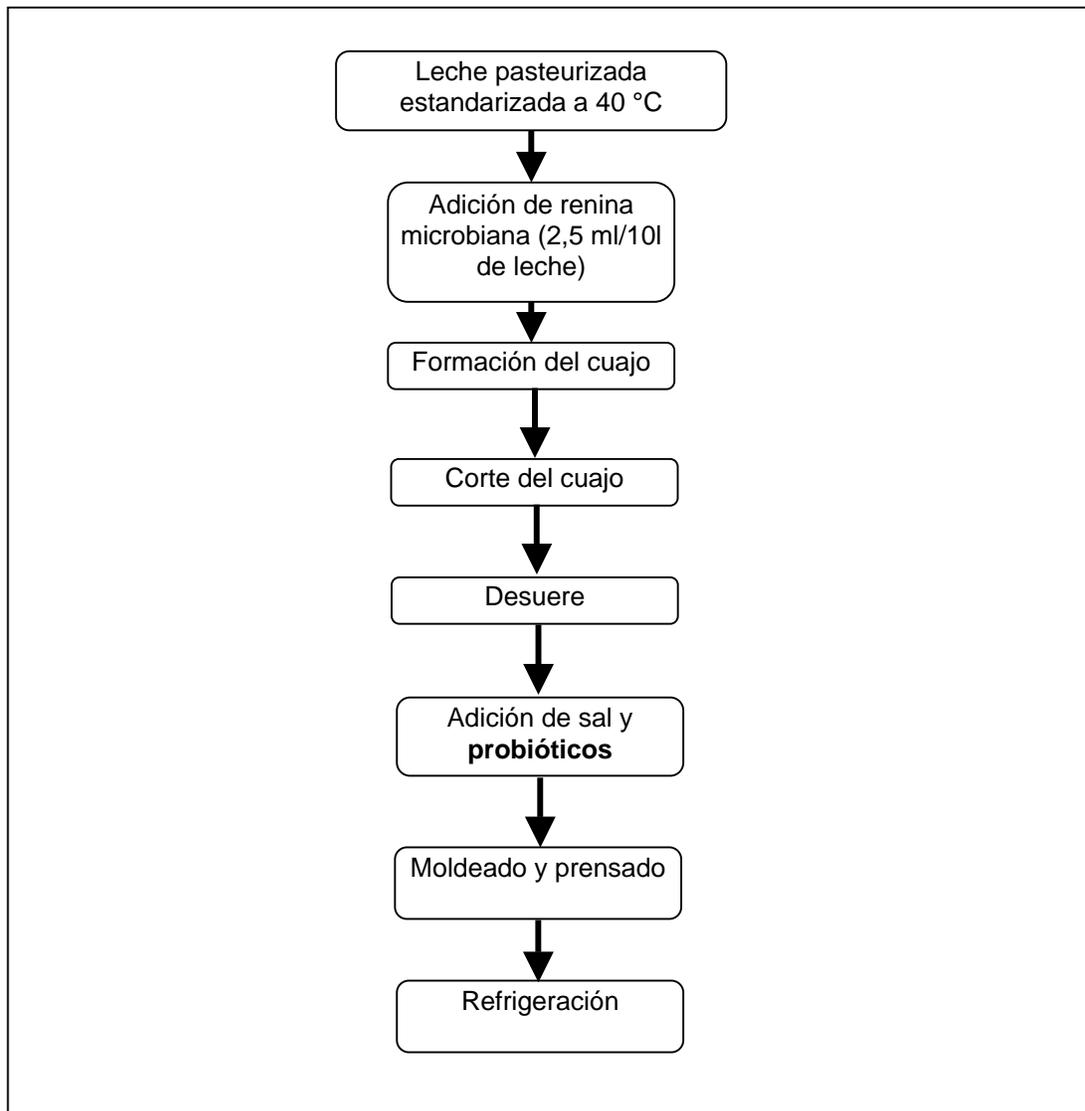
El estudio consistió en la elaboración de leche fluida con bacterias viables de *L. acidophilus*, esta bebida no fermentada fue refrigerada al momento de la inoculación del producto, de modo de prevenir el crecimiento del organismo. A diferencia del yogur, la leche con *L. acidophilus* no tuvo un gusto ácido o una textura viscosa. La utilización de la lactosa en los sujetos que consumían leche con *L. acidophilus* ha sido reportada por Kim y Gilliland, 1983 citado por LYN *et*

*al.*, 1991. Los productos lácteos no fermentados fueron preparados por la adición de  $10^7$  o  $10^8$  ufc/ml de microorganismos viables a leche fría de bajo contenido de grasa 2%, seguido de refrigeración inmediata. Los estudios de la estabilidad indicaron que las actividades de  $\beta$ -galactosidasa seguían siendo estables durante el almacenamiento por 2 semanas a temperaturas de refrigeración. La adición de microorganismos a la leche no cambió sustancialmente el sabor y todos los productos eran aceptables sensorialmente por los panelistas usados en esta investigación.

GONZÁLEZ, (2003) estudió bebidas lácteas, leches en polvo y suplementos con probióticos, de este concluyó que la sobrevivencia de los probióticos en las bebidas almacenadas a temperatura de refrigeración, mostraron una reducción de 0.3 a 1.5 unidades logarítmicas al mes de iniciado el estudio. La sobrevivencia de los probióticos en las leches en polvo analizadas no mostró disminución del contenido de probióticos de más de un ciclo logarítmico durante los primeros tres meses de almacenamiento. La sobrevivencia de los probióticos en suplementos fue menor y muy variable.

## **2.8 Propiedades generales del jugo de Cranberry**

**2.8.1 Cranberry.** Según señala BUZETA (1997) cranberry americano o cranberry de fruto grande (*Vaccinium macroparton* Ait) ha sido clasificado por los taxónomos dentro de la familia ericaceae y el género *Vaccinium*. Otra especie muy relacionada a la anterior que también crece en Norteamérica es el cranberry europeo denominado “mosberry” o “cranberry de fruta pequeña” (*Vaccinium oxycoccus* L). Existen además otras especies como el “lingonberry” (*Vaccinium vitis-idaea* L.) que crece en europa y el arandino o “Blueberry” (*Vaccinium corymbosum* L.) que es nativo de EE.UU.



**FIGURA 2. Protocolo de elaboración queso fresco tipo Panela.**

**FUENTE:** GONZÁLEZ, (2003).

El nombre cranberry es debido a que la flor al estado de botón conforma una estructura en el cual el pedicelo, cáliz y corola de asemejan al cuello, cabeza y pico de una grulla (ECK, 1990). De esta manera el nombre original de “cranberry”, (Crane = Grulla) quedó abreviado como cranberry. Dentro de las características del fruto, este corresponde a una baya de color rojo que cuando madura alcanza un diámetro de uno a dos centímetros con su interior hueco,

factor que le imprime facilidad para suspenderse en el agua y de esta manera cosecharse por flotación. El color de la fruta varia entre rosado muy pálido o amarillo hasta un rojo púrpura oscuro (BUZETA, 1997).

CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA, FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA (2002), señala que esta especie crece en forma silvestre en los Estados Unidos y fue encontrado por los colonizadores a través de todo el noreste y centro norte de ese país, descubriendo que los indios americanos consumían la fruta fresca y preparaban con ella una salsa dulce que la utilizaban como medicina para curar heridas y como tratamiento contra el envenenamiento. Por otra parte, ZUO *et al.* (2002), señalan que el cranberry es un prominente producto de la agricultura de Massachusetts, Wisconsin, Michigan, New Jersey, Oregón y Washington, debido a que el tamaño anual de la cosecha es aproximadamente de 227 mil toneladas, los cuales son procesados 5% en producto fresco, 35% como aderezos y concentrado ( varias aplicaciones) y un 60% en jugos para beber.

El cranberry se proyectó como un nuevo producto de exportación chilena, a partir de 1998, fecha en la cual entraron las primeras plantaciones comerciales. Su introducción fue realizada por Fundación Chile en 1989, año en que se iniciaron numerosos ensayos para conocer la adaptación de la especie y sus técnicas de propagación y producción. De esta manera, se generó una fuerte inversión a partir de 1993 en la IX y X Región, lográndose completar una superficie plantada superior a las 500 hectáreas para 1996 (BUZETA, 1997). Además señala que en la producción del cranberry el 80% se destina a jugo concentrado, 5% a consumo fresco y el resto a deshidratado, saborizantes, aromatizantes, ceras, etc. Los productos que resultan de su procesamiento son jugos concentrados, jaleas.

**2.8.2 Composición química de los frutos y jugo de cranberry.** Según relata, en forma general, BUZETA (1997) los frutos cranberry presentan bajas calorías, alto contenido de vitaminas, minerales y buen porcentaje de fibras. Adicionalmente, MILNER (2002) indica que contiene numerosos componentes bioactivos, incluyendo tocotrienoles, antocianinas, flavonas y proantocianidinas. Este último componente corresponde a un tanino condensado que ha demostrado exhibir una gran actividad de antiadhesión bacterina. (Foo *et al.* citado por HOWELL, 2002).

Por otro lado, BUZETA (1997), señala que el contenido de azúcares solubles que presenta el fruto es de gran importancia en su industrialización y comercialización, indicando además, que el contenido de azúcares aumenta continuamente hasta que éste logra su color característico, pudiendo variar entre un 5% y 10%. En el CUADRO 2 se muestra la composición química de los frutos de cranberry maduros.

Por su parte, KUZMINSKI (1996), indica que el jugo de cranberry de 7,5% Brix presenta una singular mezcla de ácidos orgánicos quínico, málico y cítrico, cuya proporción permanece constante y permite que generalmente sea usada para asegurar la autenticidad del jugo de cranberry.

**CUADRO 2.** Composición química de los frutos cranberry.

SUSTANCIA	PORCENTAJE
Humedad	88,0
Azúcares reductores	4,2
Acido cítrico	1,1
Acido málico	0,26
Acido quínico	0,5 – 1,0
Acido benzoico	0,065
Pectinas	1,2
Lípidos	0,4
Proteínas	0,2
Fibras	1,6
Cenizas	1,6
Vitaminas:	x 100 g. de fruta
Vitamina A	40 UI
Vitamina C	10,5 – 7,5 mg

**FUENTE:** BUZETA *et al.* (1997).

En el CUADRO 3 se muestra la composición analítica del jugo de cranberry natural. Por otro lado, ZUO *et al.* (2002), han cuantificado e identificado los componentes antioxidantes fenólicos y benzoicos del cranberry americano por la técnica de iones corriente totales (TIC), demostrando que el fruto tiene un alto contenido de ácidos benzoico y fenólico (5,7 g/kg de fruta fresca), siendo el ácido benzoico el más abundante (4,7 g/kg de fruta fresca), seguido por el ácido p- cumárico (0,25 g/kg fruta fresca) y sinápico (0,21g/kg de fruta fresca). Complementario a lo señalado, ZHENG y WANG (2003), han indicado que la actividad antioxidante de compuestos fenólicos en frutos como el blueberry, cranberry, chokeberry y lingonberry varía entre las distintas especies.

**CUADRO 3.** Composición de fruta y jugo de cranberry.

INGREDIENTE	FRUTA DE CRANBERRY	JUGO DE CRANBERRY
Agua (%)	86,5	92,9
Sólidos (%)	13,5	7,1
Carbohidratos totales (g)	12,7	6,8
Azúcares (g)	No Analizados	3,7
Fibra dietética (g)	1,2	0,1
Proteína (g)	0,4	<0,1
Grasa (%)	0,2	<0,1
<b>Minerales</b>		
Sodio (mg)	1	3,8
Potasio (mg)	71	85,2
Vitamina C (mg)	13,5	2
pH	NA	2,5

**FUENTE:** KUZMINSKI *et al.* (1996).

**2.8.3 Efectos del jugo de cranberry sobre la inhibición de la *Escherichia coli*.** Según los autores AVORN *et al.* (1994) y HAMILTON y MILLER (1994), LEE *et al.* (2000), KONTIOKARI *et al.* (2001). Los mayores beneficios a la salud atribuidos al consumo de jugo de cranberry es la prevención de las infecciones del tracto urinario, ya que este producto inhibe la adherencia de la bacteria *Escherichia coli* a las paredes de las células uroepiteliales evitando de esta manera la infección.

FLEET (1994), señala que para reducir las infecciones del tracto urinario utilizando jugo de cranberry como medio no farmacológico, éste debe ingerirse diluido a una concentración 1:10 (100 mL de concentrado en 1 litro de agua) en cantidades de 300 a 500 mL por día, durante 6 meses.

AVORN *et al.* (1994), demostraron que la ingestión de jugo de cranberry previene la bacteriuria en ancianos principalmente por la acción del ácido hipúrico, ya que el consumo de cranberry produce grandes cantidades de este

ácido que posteriormente es excretado en la orina. De acuerdo a los resultados, concluyeron que al consumir 350 g de cranberries se producen 4,7 g de ácido hipúrico (1.34% p/p), y que al ingerir aproximadamente 330 g de cranberries, 1,9 g del ácido (0,58% p/p) se excreta en la orina, indicando además, que el origen del ácido hipúrico es presumiblemente el ácido benzoico y el ácido quínico, los cuales tienen efecto bacteriostático para la *Escherichia coli* en concentraciones de 1 a 2 mg/mL, pero para lograr lo señalado anteriormente el pH de la orina debe reducirse hasta 5,5 para tener efecto inhibitorio sobre la bacteria.

Igualmente, HOWELL (2002), señala que el ácido quínico del cranberry es el precursor del ácido hipúrico el cual es un fuerte agente antibacterial. Para que este ácido realice el efecto bacteriostático sobre la *Escherichia coli*, el pH de la orina debe ser reducido a un mínimo de 5,0, a una concentración de 0,02 M, pero para alcanzar esos niveles, los humanos necesitarían ingerir por lo menos 1500 mL de jugo de cranberry por día diluido 1:10, lo cual es considerado una alta ingesta para una persona.

No obstante lo anterior, actualmente se señala que la acidificación de la orina no es el mayor factor responsable del efecto inhibitor del jugo de cranberry. Investigaciones señalan que taninos condensados del cranberry llamados "proantocianidinas" pueden inhibir la adherencia de la *Escherichia coli*, (MILNER, 2002). Las proantocianidinas del cranberry son compuestos polifenólicos que pueden influenciar varios procesos biológicos, incluyendo su alta capacidad antioxidante y propiedades anticancerígenas (ZHENG y WANG 2003). Por su parte, HOWELL *et al.* (1998), señalan que las proantocinidinas muestran otro tipo de actividades, tales como producción de enzimas cancer-protectivas e inhibición de radicales superóxidos. YAN *et al.*, (2002) sostienen que los compuestos fenólicos en los cranberries son un diverso grupo, que

incluyen antocianinas, flavonas, proantocianidinas y ácidos fenólicos de bajo y alto peso molecular.

Por otra parte, REID *et al.* (2001), en un estudio piloto con 15 pacientes con daños en la médula espinal, población altamente susceptible a las infecciones urinarias, determinó que el jugo de cranberry reduce significativamente el biofilm del uroepitelio disminuyendo la adhesión de bacterias Gram positivas y negativas sobre las células de la vejiga.

SOBOTA (1984), investigó la inhibición de la adherencia bacterial *in vitro* aislando cepas de *Escherichia coli* uropatógenas de 77 casos clínicos. En este estudio, el jugo de cranberry inhibió a la bacteria sobre un 75%, además de inhibir otras especies, incluyendo *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. El jugo también se suministró a ratas por un periodo de 14 días, detectándose en la orina recolectada inhibición en la adherencia de la *Escherichia coli* en un 80%. A su vez, la actividad de antiadherencia fue detectada en la orina humana, donde 15 de 22 pacientes mostraron inhibición de esta bacteria luego de 1 a 3 horas después de haber consumido una cantidad aproximada de 466,5 g de jugo.

BIERING *et al.* (2001), señalan que la población polimicrobiana uropatógena frecuentemente aislada de pacientes con lesiones a la medula espinal, y que es sometida a tratamientos con jugo de cranberry está compuesta generalmente por *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp. *Serratia* spp, *Providencia* spp, *Enterococcus* y *Staphylococcus*.

**2.8.4 Actividad anti-adherencia del jugo de cranberry sobre especies bacterianas no urinarias.** Diversos autores han señalado los efectos antimicrobianos del jugo de cranberry sobre la bacteria *Escherichia coli*; sin embargo, se ha estudiado también su actividad de antiadherencia sobre

bacterias no urinarias. Tal es el caso de la inhibición de la adherencia de bacterias bucales realizado por un material no dializable (MND) de alto peso molecular aislado del jugo de cranberry en concentraciones de 0,6 a 2,5 mg/mL.

Según BURGER *et al.* (2002), constituyentes de alto peso molecular (MND) del cranberry han sido encontrados para inhibir la adhesión específica de las especies de *Helicobacter pylori* que actúan sobre el mucus humano, las células de cultivo gástrico epitelial y los eritrocitos. Según lo señalado, las especies de *H. pylori* se diferenciaron en su afinidad al constituyente del jugo de cranberry, los resultados indicaron que el MND inhibió la adhesión in vivo de las bacterias espirales, pudiendo ser eventualmente útil en la prevención de úlceras estomacales causadas por esta bacteria.

Es así como LEE *et al.* (2000), demostraron la actividad bactericida del jugo concentrado de cranberry, verificando un amplio espectro antibacterial al utilizar un inóculo de  $10^4$  ufc/mL de cultivo colección tipo americano ATCC, utilizando *Klebsiella Pneumoniae* como indicador. Por su parte, HAFFAJJEE y SOCRANSKY (2000), señalan que la formación de la placa dental que provocan las caries involucra dos procesos, unión de la bacteria a la película de saliva que cubre el diente y posteriormente la coagregación de dos diferentes tipos de bacterias, generalmente de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*.

Asimismo, WEISS *et al.* (2002), pudieron concluir que se requieren bajas concentraciones de MND para inhibir la formación de tales coagregados, indicando que el MND actúa preferencialmente sobre pares de bacterias bucales en la cual una de ambos miembros es anaerobia Gram negativa. A su vez, estudios preliminares demostraron que el MND redujo el recuento de *Streptococcus mutans*, indicando que la actividad de antiadhesión del jugo de cranberry tiene gran efectividad al alterar la población microbiana subgingival,

controlando las enfermedades periodontales. La capacidad antiadherente del jugo de cranberry fue un potencial para cambiar la flora microbiana oral, resultando una mejor higiene oral.

En la actualidad existe preocupación por las bacterias que se hacen cada vez más resistentes a los fármacos y antibióticos. Una efectiva solución es el uso de agentes que interfieran con la habilidad de algunas bacterias a adherirse a los tejidos del huésped. Debido a que estos agentes antiadhesivos no son bactericidas, la propagación y diseminación de especies resistentes es mucho menos probable como ocurre como resultado a la exposición de agentes bactericidas tales como los antibióticos. Una vez desarrollados fármacos antiadhesivos, pueden servir como un nuevo medio para combatir las enfermedades infecciosas (AVORN *et al.*, 1994).

**CUADRO 4. Actividad bactericida del jugo concentrado de cranberry a 35 °C.**

Bacteria	Recuentos (ufc/mL)*			
	90 min. incubación		24 h de incubación	
	cultivo solo	cultivo con concentrado de cranberry	cultivo solo	cultivo con concentrado de cranberry
<i>Escherichia.coli</i>	7,7x10 <sup>3</sup>	8x10 <sup>2</sup>	3,7x10 <sup>8</sup>	0
<i>Staphylococcus.a</i>	5,9x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>2</sup>	9x10 <sup>7</sup>	0
<i>Pseudomona. a</i>	5,0x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	2,4x10 <sup>8</sup>	0
<i>Enterococcus.f</i>	4,8x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>3</sup>	4,1x10 <sup>8</sup>	7,5x10 <sup>2</sup>
<i>Klebiella.pneum.</i>	7,0x10 <sup>2</sup>	0	4,3x10 <sup>8</sup>	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2,7x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>2</sup>	1,9x10 <sup>8</sup>	0
<i>Salmonella. e</i>	3x10 <sup>2</sup>	3x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>8</sup>	2,3x10 <sup>1</sup>

\* Indica unidades formadoras de colonias; ATCC colección de cultivo tipo americano.

FUENTE: LEE *et al.* (2000).

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

El ensayo fue realizado en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile (UACH), ubicada en la ciudad de Valdivia.

#### 3.1 Cepas utilizadas

Los microorganismos utilizados corresponden a cultivos liofilizados del tipo DVS, de una mezcla de *Lactobacillus casei shirota*, elaborado por la empresa Vivolac y *Bifidobacterium lactis* Bb 12, elaborado por la empresa Chr. Hansen's Inc. Para la activación y obtención de los cultivos de ambas cepas de microorganismos se empleó leche en polvo descremada, de bajo tratamiento térmico, libre de inhibidores.

#### 3.2 Trabajo pre- experimental

Fue elegido en esta experiencia el agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) MRS adicionado de 0,05% de L-cisteína-HCl constituye un buen medio para enumerar bifidobacterias, para la enumeración de *B. lactis*, tomando en consideración que es uno de los medios más utilizado por los investigadores para el desarrollo de tal microorganismo.

Esto ya había sido señalado con anterioridad por LANKAPUTHRA *et al.* (1996), ROY *et al.* (1990), y GOBBETTI *et al.* (1998) quienes además consideran que dicho medio contiene todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de tales microorganismos.

El medio base MRS fue adicionado de L- cisteína-HCl, cloruro de litio y fundamentalmente de dicloxacilina. El antibiótico, al impedir el crecimiento de *L.*

*acidophilus*, permitió una efectiva diferenciación de los microorganismos involucrados en tal tratamiento. Este método coincide con otros empleados donde igualmente se utilizan antibióticos como medio de exclusión de algunas bacterias ácido lácticas. Es así como DINAKAR y MISTRY (1994) emplearon para tal fin una mezcla de antibióticos y otros constituyentes entre los que se incluyen el sulfato de neomicina, el sulfato de paromomicina, el ácido nalidíxico, además de cloruro de litio y L- cisteína-HCl, los cuales fueron agregados a agar MRS.

Para elegir el medio más adecuado de enumeración de *Lactobacillus casei* Shirota se utilizó un agar no selectivo (agar MRS). Este es uno de los medios que han sido señalados como adecuados para el crecimiento de dicho microorganismo (INTERNATION DAIRY FEDERATION, IDF/FIL, 1995).

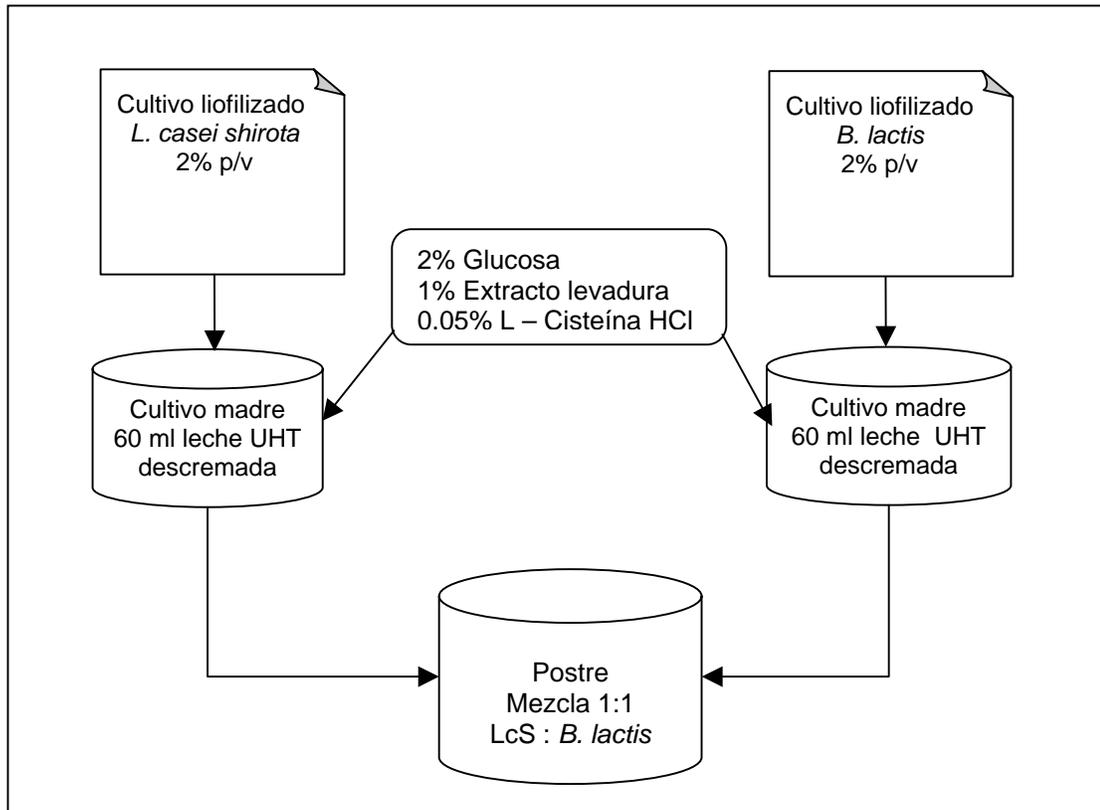
### **3.3 Preparación y manejo de los cultivos madre**

Dado que en la siguiente investigación se trabajó con pequeños volúmenes de materia prima, sería difícil la incorporación directa de los microorganismos utilizados. Por tal motivo, se determinó la preparación de los llamados cultivos madres, según la metodología que se explicará posteriormente.

**3.3.1 Cultivos madres.** Se prepararon cultivos al 4% de cada uno de los cultivos en leche en polvo descremada, de bajo tratamiento térmico. Para ello, una cantidad de 2 gramos de cada cultivo liofilizado fue agregado a dos matraces que contenían 60 mL de leche y fueron incubados aeróbicamente sin agitación a baño María a  $38 + 1$  °C para *Bifidobacterium lactis* y  $32+1$  °C para *Lactobacillus casei* Shirota, hasta lograr su coagulación. (Thelco Precision Scientific Co, Chicago) por tiempo variable hasta alcanzar un pH de 5,0. La pureza de los cultivos fue comprobada mediante tinción de Gram.

Para la facilitar la activación de los cultivos liofilizados, se adicionó a dicha leche y una cantidad de 0.05% de L- cisteína- HCl (Riedel de Haen AG, Hannover), con el fin de disminuir el potencial de oxido-reducción del medio y así estimular el crecimiento de los microorganismos; además de 2% de glucosa (Scharlau Chemie S.A., Barcelona) y 1% de extracto de levadura (Difco Laboratories Inc. Detroit), homologando lo realizado por LANKAPUTHRA *et al.*, 1996. En la FIGURA 3, se presenta un esquema de la preparación del cultivo madre.

Paralelamente, fue preparada agua peptonada empleada como medio de dilución. Para ello se disolvió 1 gramo de proteosa peptona (Difco Laboratories Inc., Detroit) por litro de agua destilada, ajustando su pH a 7,0 + 0,2 con NaOH 0,1N. El medio de dilución fue dispuesto en tubos de 9 ml, para finalmente ser esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 minutos



**FIGURA 3. Preparación del cultivo madre.**

Con el propósito de asegurar lecturas de placas con cantidades entre 25 y 250 ufc/ml, se procedió a diluir sucesivamente 1 mL de cada cultivo madre coagulado en tubos con 9 mL de agua peptonada. Finalmente las diluciones - 7, -8 y -9, fueron sembradas en superficie en agar MRS.

Las placas en duplicado fueron incubadas a  $38 \pm 1$  °C, durante 72 horas, para *Bifidobacterium lactis* bajo condiciones de anaerobiosis (sistema Gaspak, BBL, Cockeyville, Maryland), y  $32 \pm 1$  °C durante 48 horas, bajo condiciones de aerobiosis para *Lactobacillus casei*.

**3.3.2 Medios de cultivo empleados para la enumeración de los microorganismos probióticos.** La enumeración y evaluación de la viabilidad de microorganismos probióticos debe ser realizada en medios selectivos, bajo la condición de que su composición, temperatura, tiempo de incubación y atmósfera gaseosa estén específicamente ajustados para permitir el crecimiento de cada microorganismo, y de este modo obtener un recuento correcto. La elección de un medio de detección y enumeración dependerá de si el microorganismo se encuentra solo o mezclado con otros.

Para realizar el recuento, tanto de *Lactobacillus casei shirota* como de *Bifidobacterium lactis* Bb 12, se utilizó agar MRS (Difco laboratories Inc., Detroit). Si bien ambos microorganismos tienen la capacidad de crecer en este medio, se determinó sembrar paralelamente, la misma muestra, en un medio de cultivo modificado, pretendiendo lograr con esta técnica, la inhibición de uno de los organismos, específicamente de *Lactobacillus casei shirota*.

Con este fin y siguiendo las recomendaciones del fabricante del cultivo liofilizado<sup>2</sup>, se le adicionaron a un litro de medio base MRS los siguientes compuestos: 5 mL de una solución antibiótica, constituida por dicloxacilina (Sigma Chemical CO, USA) disuelta en agua destilada y preparada con una concentración de 0,01% (p/v). Además, se incorporó 10 mL de una solución de cloruro de litio (Merck AG, Darmstadt) preparada al 11,11% (p/p) para finalmente añadir 5 mL de una solución de L-cisteína-HCl preparada al 10% (p/v). Tanto la solución de dicloxacilina como la de cloruro de litio fueron esterilizadas empleando filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore® Corporation, USA). Por su parte, la solución de L-cisteína-HCl fue esterilizada en autoclave a 121° C por 15 minutos. De Stefano *et al.* (2000) citado por FERREIRA y FAVARO, (2004) y GRENOV y SHAH (1997). Todas estas operaciones fueron realizadas con anterioridad a la incorporación de tales soluciones al agar.

El antibiótico impide el crecimiento de *Lactobacillus casei Shirota*, permitiendo una efectiva diferenciación de los microorganismos involucrados en tal tratamiento. Este método coincide con otros empleados donde igualmente se utilizan antibióticos como medio de exclusión de algunas bacterias ácido lácticas. Es así como DINAKAR y MISTRY (1994) emplearon para tal fin una mezcla de antibióticos y otros constituyentes entre los que se incluyen el sulfato de neomicina, el sulfato de paromomicina, el ácido nalidíxico, además de cloruro de litio y L- cisteína-HCl, los cuales fueron agregados a agar MRS.

Bajo las condiciones antes señaladas, en el medio MRS modificado se desarrollaron exclusivamente las colonias de *B. lactis*.

---

<sup>2</sup> Christian Hansen's Laboratorium (1999 ). Hoja informativa. Guideline Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nu-trish cultures.

### **3.3.3 Recuento de microorganismos probióticos.** Frecuencia de muestreos.

La viabilidad de *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* fue determinada en las siguientes oportunidades:

A los cultivos madres, antes de ser adicionados al postre (para conocer la carga agregada al postre).

Inmediatamente después de inocular el cultivo madre y ser adicionado al postre (para conocer la carga inicial).

Durante el tiempo de almacenamiento del producto a 7, 14 y 21 días a 5 °C.

**3.3.4 Expresión de resultados.** La viabilidad de los microorganismos probióticos fue expresada como "porcentaje de sobrevivencia logarítmica". Este termino se refiere a la razón existente entre el valor logarítmico de los recuentos de los microorganismos después de ser sometidos a la refrigeración o al almacenamiento a 5 °C y su concentración inicial y multiplicada por 100.

### **3.4 Elaboración del postre**

La formulación del postre de leche consistió en 2.7 % de materia grasa (MG), 28% de sólidos totales (ST), 10,2 % de azúcar. Para lograr tal formulación, se utilizaron los siguientes ingredientes: leche fluida (3,2% MG), azúcar, sacarosa, dextrosa, almidón, carragenina , difosfato de sodio, sabor, color.

El almidón utilizado fue del tipo Snowflakes 6400, el cual tiene la propiedad de gelificar en frío. La carragenina utilizada fue del tipo carralact DDE 2434, la cual le otorga al producto una textura lisa, suave, cremosa y una consistencia media a alta. La preparación del postre de leche se detalla a continuación y en el CUADRO 5 se presenta a formulación del postre de leche.

- Mezclar los ingredientes secos (sacarosa, dextrosa, almidón, carragenina, difosfato de sodio, sabor, color) hasta conseguir una completa homogenización de ellos.
- En un estanque de preparación, mezclar la leche líquida con la leche en polvo descremada hasta disolver completamente.
- Agregar lentamente y con agitación la mezcla seca, sobre la leche fría hasta dispersar totalmente todos los ingredientes.
- Calentar la mezcla a 80 °C – 90 °C hasta disolver completamente.
- Homogenizar a 150 bar para adquirir una textura y firmeza adecuadas.
- Envasar y almacenar a 4°C- 6°C.

En la FIGURA 4 se presenta la línea de flujo de postre de leche con probióticos.

**3.4.1 Distribución del postre de leche para los diferentes tiempos de almacenamiento.** El postre obtenido fue distribuido en envases de polietileno, con 125 mL cada uno, representando éstos los diferentes tiempos de almacenamiento y diferentes repeticiones. En la FIGURA 5 se presenta un esquema de ejemplo de distribución. Luego las muestras se incuban en agar MRS, como se observa en la FIGURA 6.

**3.4.2 Elaboración de la salsa de Cranberry.** Premezclar 30 ml de jugo concentrado de cranberry con 0.5 gr de carragenina (Carrasol SI), agitar vigorosamente hasta su completa dispersión.

- Adicionar 10 ml de agua con agitación. Calentar la mezcla a 80 °C con agitación constante, por dos minutos o hasta la completa disolución de la carragenina.
- Enfriar con agitación hasta 20 °C.
- Envasar.

**OBSERVACION:** Carrasol SI, otorga consistencia y cuerpo a la salsa, mejora su suavidad y cremosidad del producto terminado.

### 3.5 Análisis químicos y microbiológicos

Al término de la elaboración, es decir el día cero, e igualmente luego de transcurridos 7, 14, y 21 días de almacenamiento, se realizaron los siguientes análisis: Todas las mediciones fueron realizadas en triplicado.

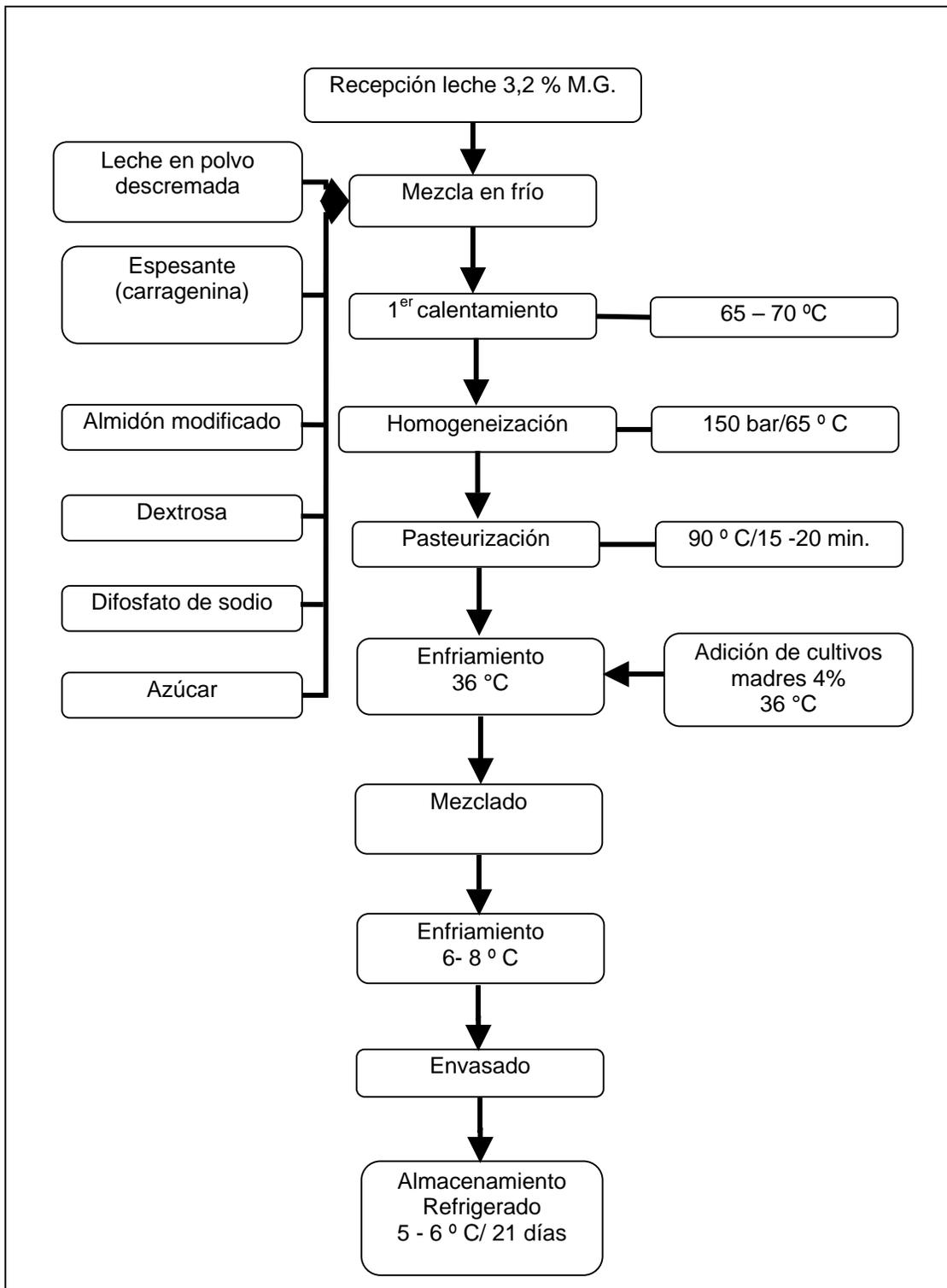
#### 3.5.1 Determinación de pH del postre de leche y salsa de cranberry.

Mediante método potenciométrico, utilizando un pH-metro Radiometer, Copenhagen.

**CUADRO 5. Formulación del postre de leche.**

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad (g)</b>	<b>Mezcla seca (%)</b>	<b>Producto final (%)</b>
<b>Leche en polvo descremada</b>	51.00	28.62	5.1
<b>Azúcar</b>	76.50	42.93	7.65
<b>Dextrosa</b>	25.50	14.31	2.55
<b>Almidón</b>	20.40	11.45	2.04
<b>Carragenina</b>	4.30	2.41	0.43
<b>Difosfato de sodio</b>	0.50	0.28	0.05
<b>Color amarillo huevo</b>	trazas	trazas	trazas
<b>Sabor vainilla</b>	trazas	trazas	trazas
<b>Total base seca</b>	178.20	100	17.82
<b>Leche líquida 3.2% MG</b>	821.80	-	82.18

**FUENTE:** Elaboración propia a partir de bibliografía.



**FIGURA 4. Línea de flujo de postre de leche con probióticos.**

FUENTE: Elaboración propia a partir de bibliografía.

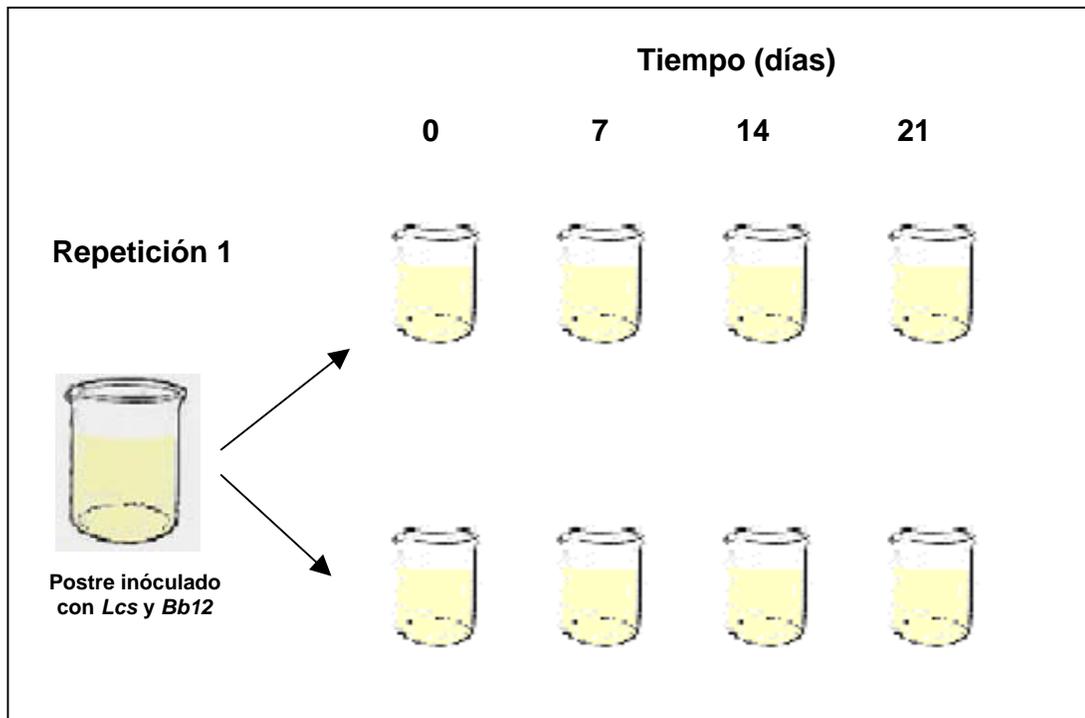


FIGURA 5. Esquema demostrativo del método utilizado.

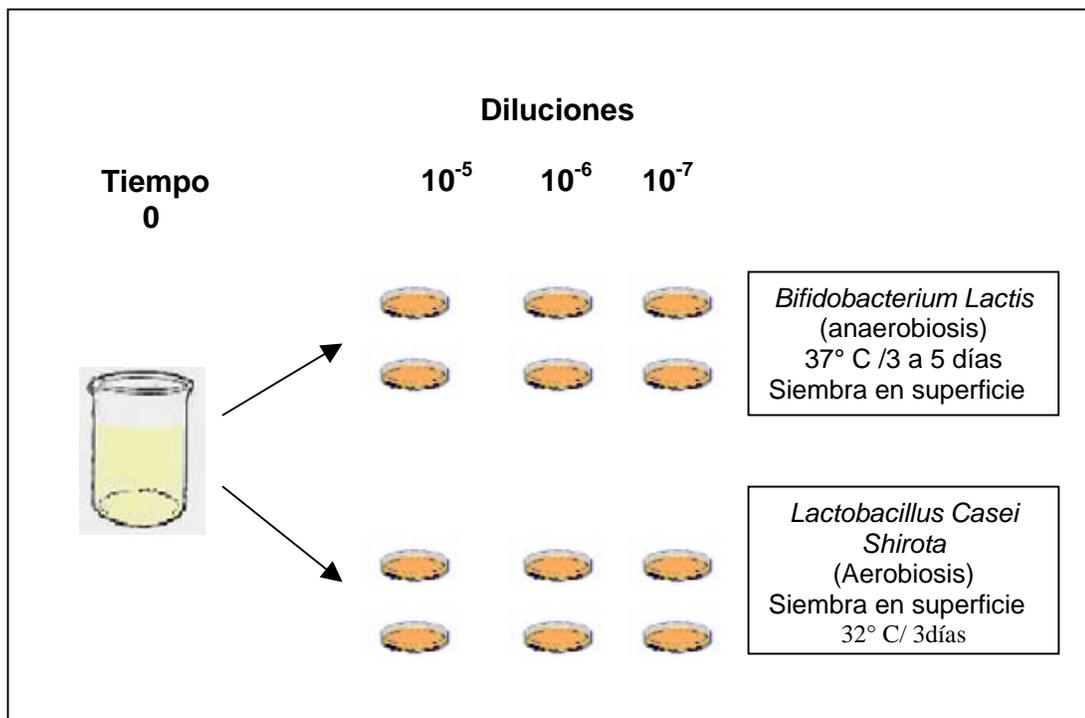


FIGURA 6. Esquema demostrativo de las diluciones.

**3.5.2 Determinación del contenido de sólidos solubles en salsa de cranberry.** Mediante refractometría utilizando un refractómetro de Abbé (Bellingham and Stanley RS330).

**3.5.3 Recuento de *Staphylococcus aureus*.** Método según NCh 2671. of 2002. Productos hidrobiológicos – Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva- Técnica de recuento en placa en agar Baird parker. (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, 2002).

**3.5.4 Recuento de hongos y levaduras.** Método según NCh 2734.of 2002. Productos hidrobiológicos –Determinación de hongos y levaduras-Técnica recuento en placa. (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, 2002).

**3.5.5 Recuento de coliformes.** Método según NCh 2735/2.of 2001. Productos hidrobiológicos –Determinación coliformes. Parte 2: Técnica recuento en placa. (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, 2001).

### **3.6 Evaluación sensorial del postre**

Un panel de 10 jueces fue constituido para la realización de la evaluación sensorial de las 4 muestras de postre de leche con probióticos y salsa de cranberry, la cual se encontraba en un envase adjunto y se mezcló al momento de evaluar. Se evaluó la aceptabilidad del producto en el tiempo.

Las muestras fueron presentadas al azar y en condiciones reales de consumo. La evaluación se realizó en triplicado, mientras que la planilla de evaluación de aceptabilidad se presenta en el ANEXO 2.

### **3.7 Diseño experimental**

Se empleó un diseño multifactorial categórico completamente aleatorizado,  $2^1 \times 4^1$ , con dos factores de estudio, el primero fue el microorganismo probiótico

utilizado, a dos niveles, que consistieron en *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis*; el segundo factor fue el tiempo de almacenamiento a 4 niveles (0, 7, 14 y 21 días). Resultando en total de 8 tratamientos, cada uno de los cuales fue realizado en triplicado, por lo que dio un total de 24 ensayos.

Para la evaluación sensorial se utilizó un diseño factorial simple, con un factor a 4 niveles, que correspondió al tiempo de almacenamiento.

### **3.8 Análisis de datos**

Se realizó análisis de varianza (ANDEVA) dentro de cada tiempo y para cada cepa utilizada, con el fin de comparar los tratamientos. Cuando hubo diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey al 95 % de confianza, además de métodos gráficos de representación de resultados.

## 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Tiempos de incubación

Dave y Shah citados por SHAH (2001) señalan que el *L. acidophilus* y las bifidobacterias crecen lentamente en leche debido a su falta de actividad proteolítica. Por su parte, DESJARDINS *et al.* (1990) señalan que una rápida tasa de crecimiento y de acidificación de la leche son características deseables en una cepa de bifidobacterias para ser usadas en la fabricación de leches fermentadas. Estas características pueden reducir costos debido a que requieren sólo un corto tiempo de incubación y de este modo decrecen las posibilidades de contaminación.

Cada una de las tres repeticiones realizadas requirió la preparación previa de cultivos madres de cada microorganismo involucrado. Los tiempos de incubación requeridos para que el cultivo madre alcance pH 5,0 resultaron para esta investigación, del orden de  $1,25 \pm 0,05$  y  $3,12 \pm 0,10$  horas para *L. casei shirota* y *B. lactis*, respectivamente. Con lo cual se pudo determinar que el *B. lactis* necesito 40% más de tiempo que el *L. casei shirota* para llegar al pH señalado. Es posible que esta diferencia en los tiempos de fermentación se deba a que los requerimientos nutricionales del Bifidobacterium son mayores que los del *L. casei shirota*, mientras que su tasa de acidificación es menor.

En particular, según GOMES y MALCATA (1999), las bifidobacterias tienden a exhibir un débil crecimiento y producción de ácido en la leche, la cual requiere invariablemente de largos tiempos de fermentación y condiciones de anaerobiosis, bajo potencial redox y a menudo de factores que promuevan su desarrollo. Por otro lado, y tal como fuese especificado, con el fin de mejorar el crecimiento y facilitar la activación de los cultivos liofilizados, se adicionó a la leche del cultivo madre, 1% de extracto de levadura, 2% de glucosa y

0,05% de L-cisteína -HCl. RAVULA y SHAH (1998) y DESJARDINS *et al.* (1990) señalan que el extracto de levadura podría estimular la producción de ácido en la leche inoculada con bifidobacterias y lactobacillus. A su vez, KURMANN (1988) indica que la adición de glucosa, en una tasa de 1-5%, junto con extracto de levadura podría acortar grandemente los tiempos de coagulación.

ALAIS (1985) por su parte, manifiesta que la glucosa favorece la iniciación del crecimiento de las bacterias lácticas en leche. Además, LARROIA y MARTIN (1991) indican que la cisteína es conocida por su bajo potencial redox, pudiendo ser agregada a medios de crecimiento para mejorar la viabilidad de bacterias anaeróbicas o microaerófilas como son *Bifidobacterium* y *L. casei shirota*, respectivamente.

#### **4.2 Recuentos de cultivos madres**

El recuento promedio de los cultivos madre de *L. casei shirota* y *B. lactis*, expresados como log (ufc/g), alcanzaron valores de  $9,17 \pm 0,012$  y  $9,54 \pm 0,029$ , respectivamente. Tales concentraciones de microorganismos constituyen la cantidad base contenida en el inóculo para la elaboración de postre.

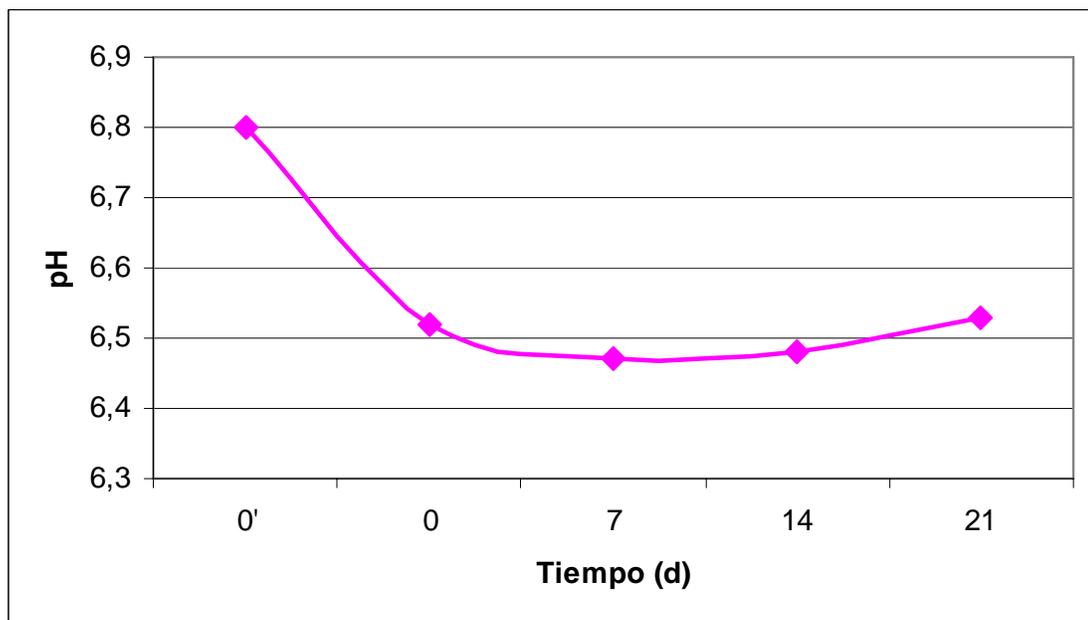
El análisis estadístico (ANDEVA) demostró que existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la concentración de microorganismos presentes en los cultivos madres, de esta manera, el microorganismo que obtuvo la mayor concentración en el cultivo madre fue *Bifidobacterium lactis*. ANEXO 3.

#### **4.3 Análisis químicos y microbiológicos**

Los valores de pH en la mezcla dieron como resultado una leve disminución de éste en el tiempo, como se observa en la FIGURA 7, el pH disminuyó de 6,8 a 6,52 desde el tiempo cero al final de la refrigeración, manteniéndose levemente constante en el tiempo. NIGHSWONGER *et al.* (1996) reportaron que los

valores de pH en yogur y mantequilla, disminuyeron tres décimas en un tiempo de almacenamiento de 28 días refrigerado. Estos valores concuerdan con la leve disminución del pH en el postre de leche, esto debido a la refrigeración de los productos, lo que hace que los microorganismos se encuentren viables, pero no activos.

Los indicadores microbiológicos dieron como resultado lo observado en la CUADRO 6, como se aprecia, esta formulación cumple con los parámetros sanitarios establecidos para los postres, según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (CHILE, 1998).



**FIGURA 7. Evolución del pH en el tiempo para la mezcla de microorganismos probióticos en el postre de leche \*.**

\* 0' representa el pH de la leche utilizada para la elaboración del postre.

**CUADRO 6. Indicadores microbiológicos del postre de leche.**

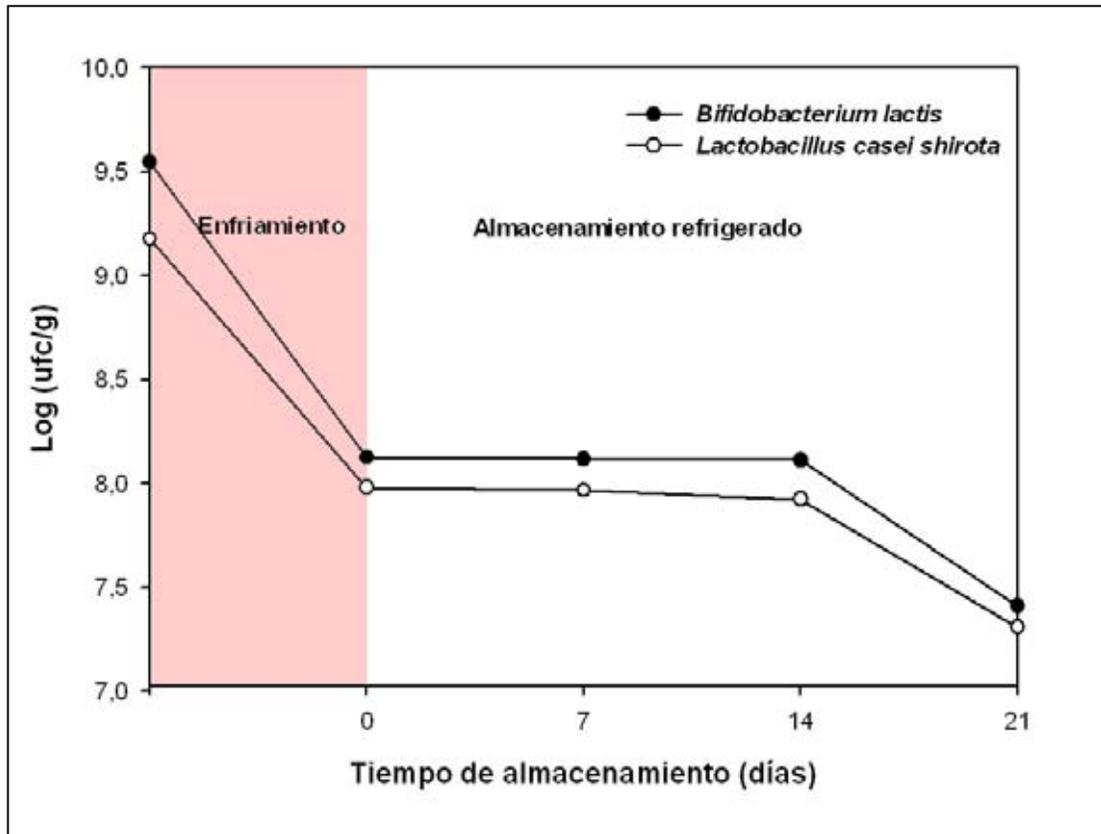
Tipo de prueba	Tiempo (días) (recuento ufc/g)			
	0	7	14	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10	< 10	< 10	< 10
Hongos y levaduras	< 10	< 10	< 10	< 10
Coliformes	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

#### 4.4 Efecto de la dilución de los cultivos madres en el postre de leche

Como se observa en la FIGURA 8, a consecuencia de la dilución de los cultivos madres a los diversos postres se comprobó una reducción de 1,2 ciclos logarítmicos en el caso del *Lactobacillus casei shirota*, lo que en términos porcentuales corresponde al 13% de disminución logarítmica respecto a su concentración inicial. Para el *Bifidobacterium lactis*, se comprobó una reducción de 1,42 ciclos logarítmicos, o una pérdida de 14,88% como consecuencia de la dilución.

FLORES, (2002) evaluó el efecto de la dilución de dos microorganismos probióticos en helados, el cual dio como resultado una reducción de 1,9 ciclos logarítmicos para *L. acidophilus*, lo que en términos porcentuales equivale a 20,7% de disminución logarítmica respecto a su concentración inicial. Para *B. lactis* comprobó una reducción de 2,1 ciclos logarítmicos que equivale a 21,6% de disminución logarítmica respecto a su concentración inicial.

Estos valores de pérdida de biomasa son mayores a los encontrados en esta investigación, debido a que en el trabajo propuesto por FLORES, (2002) se utilizó un proceso de congelación que causó un golpe térmico y consecuentemente un shock osmótico que afectan de manera inevitable la viabilidad de los microorganismos.



**FIGURA 8.** Disminución del número de microorganismos viables por efecto de la dilución de los cultivos madres en el postre de leche.

#### 4.5 Viabilidad de *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C

En la FIGURA 9 se muestra la variación del logaritmo de la concentración de microorganismos (ufc/g) y la desviación estándar, durante el almacenamiento del postre. Se observa que *Bifidobacterium lactis* tuvo una mayor concentración durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C, en comparación con *Lactobacillus casei shirota*. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para estos dos microorganismos en el tiempo, se comprobó que la viabilidad de las bacterias del género de *Bifidobacterium lactis* fue la menos afectada durante el periodo de

almacenamiento. Del mismo modo, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), durante el periodo de almacenamiento a 5°C, el postre al día 21 de almacenamiento, tuvo una disminución de la población microbiana de 1 ciclo logarítmico, para ambas cepas (ANEXO 4).

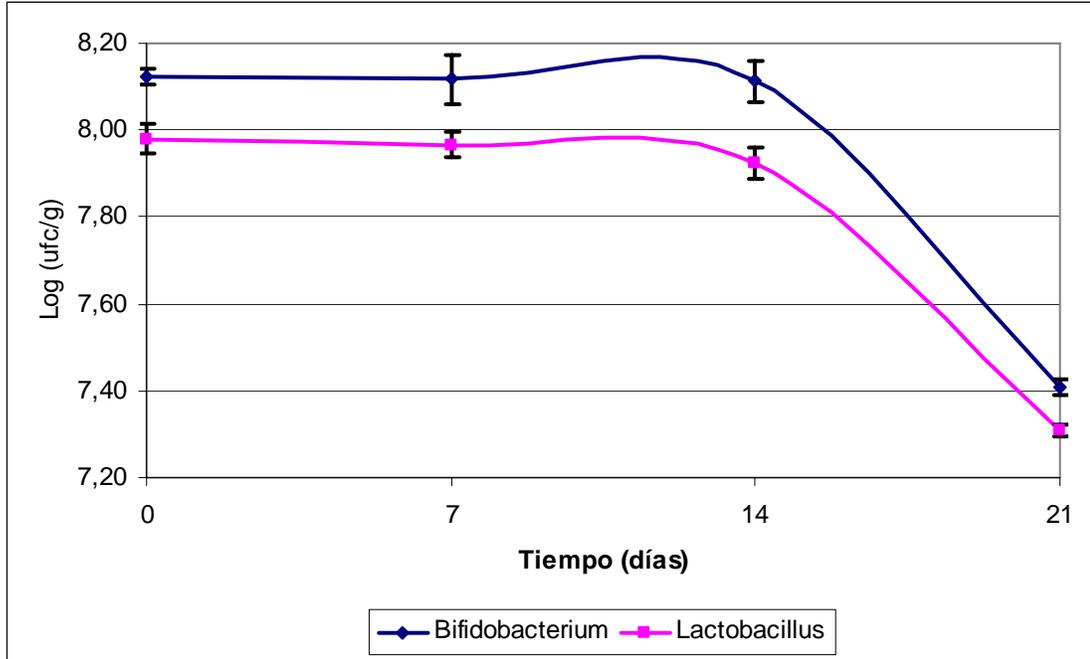
FERREIRA y FÁVARO (2004), evaluaron la viabilidad de *B. lactis* y *L. acidophilus*, libres e inmovilizados, en leche (pH 6,4) y en leche acidificada (pH 5,0, 4,4 y 3,8), almacenadas a temperaturas de refrigeración. Estos autores demostraron que *L. acidophilus* mostró buena viabilidad en leche y leche acidificada, considerando que los recuentos no variaron a pH 6,4.

Este resultado concuerda con lo propuesto por LAROIA y MARTIN, 1991 quienes reportaron que *L. acidophilus* sobrevivía en gran cantidad en un producto fermentado congelado, con los valores de pH entre 3,9 a 4,6.

Por su parte Gilliland y Speck, 1977 citados por FERREIRA y FÁVARO (2004), reportaron que *L. acidophilus* permaneció viable en leche acidificada. La supervivencia del *B. lactis* en leche acidificada fue considerada satisfactoria, puesto hubo una reducción de un ciclo logarítmico después de 21 días de almacenamiento a pH 5,0 y después de 7 a 14 días de almacenamiento a pH 4,4. Estos valores concuerdan con lo obtenido en esta investigación, puesto que para ambos microorganismos se observó una disminución de 1 ciclo logarítmico después de 21 días de almacenamiento del postre de leche a 5 °C.

*Lactobacillus casei shirota* sembrado en agar MRS presentó colonias de aproximadamente 2 a 2,5 mm de diámetro, blanquecinas, planas, opacas, con bordes irregulares y de consistencia cremosa. Estas características morfológicas coinciden con las especificadas por KANDLER y WEISS (1986) para este microorganismo. Las colonias de *B. lactis* Bb 12 desarrolladas en

agar MRS modificado se mostraron blanquecinas, de 1 a 1,5 mm de diámetro, convexas, brillantes, con bordes lisos y de consistencia cremosa.



**FIGURA 9. Viabilidad de *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* a 5 °C.**

En el CUADRO 7, se observa la evolución de las concentraciones de ambos microorganismos almacenados a 5 ° C, demostrándose, que *Bifidobacterium lactis* fue el más resistente y de mayor concentración en el postre.

**CUADRO 7. Recuento de los microorganismos probióticos durante el almacenamiento del postre a 5 °C.**

Cepa	Tiempo de almacenamiento (días)*				Promedio ± D. E.
	0	7	14	21	
Bb12	8,12 ± 0,018 a	8,11 ± 0,057 a	8,11 ± 0,048 a	7,40 ± 0,019 a	7,94 ± 0,332 a
L.cs	7,97 ± 0,034 b	7,96 ± 0,030 b	7,92 ± 0,036 b	7,30 ± 0,012 b	7,79 ± 0,295 b

\* Los resultados se presentan como promedio de tres repeticiones, media ± D.E.  
Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (95% confianza).

#### 4.6 Sobrevivencia de la concentración microbiana en el postre de leche

El CUADRO 8 integra los valores de viabilidad de los microorganismos luego del proceso de almacenamiento del postre de leche por 21 días a 5 °C. Se indica que el porcentaje de sobrevivencia de *Bifidobacterium lactis* fue de 91,13% y de *Lactobacillus casei shirota* fue de 91,59%.

En el caso específico de *Lactobacillus casei shirota* la sobrevivencia alcanzó un porcentaje de 91,59, equivalente a un recuento de  $2,05 \times 10^7$  ufc/g, levemente mayor a la sobrevivencia de *Bifidobacterium lactis* en el postre de leche durante todo el tiempo de almacenamiento.

VINDEROLA *et al.*, (2000), estudiaron la sobrevivencia de bacterias probióticas en queso fresco Argentino, reportando que especies de *Bifidobacterium* y *L. casei* presentaron sobrevivencias satisfactorias, considerando que después de 60 días de almacenamiento, la disminución de la cantidad de bacterias viables, fue menor a 1 ciclo logarítmico para *Bifidobacterium* y nula para *L. casei*. Estos resultados demuestran que *L. casei* fue más adaptable a la matriz del queso fresco. Similares resultados reportaron Stanton *et al.*, 1998 citado por VINDEROLA *et al.*, (2000), los cuales observaron que *L. paracasei* presentó una sobrevivencia satisfactoria durante el largo periodo de maduración del queso Cheddar.

Estos resultados son similares a los encontrados en esta investigación, en la cual *Lactobacillus casei shirota* tuvo un leve, aunque mayor porcentaje de sobrevivencia, comparado con *Bifidobacterium lactis*. No obstante, la concentración de bacterias viables fue mayor para *Bifidobacterium lactis*.

**CUADRO 8. Supervivencia de los microorganismos probióticos en postre de leche durante su almacenamiento a 5° C.**

Microorganismo	Tiempo de almacenamiento (días)				% Supervivencia logarítmica
	0	7	14	21	
<i>Bifidobacterium lactis</i>	8,12	8,11	8,11	7,40	91,13
<i>Lactobacillus casei shirota</i>	7,97	7,96	7,92	7,30	91,59

#### 4.7 Disminución global de la concentración microbiana en el postre de leche

El CUADRO 9 integra las pérdidas de viabilidad de los microorganismos luego del proceso de dilución y almacenamiento del postre. En éste se observa que el proceso de dilución causó mayores pérdidas de viabilidad para *Bifidobacterium lactis*, comparado con *L. casei shirota*. En cambio las pérdidas por almacenamiento fueron similares, aunque levemente mayor para *Bifidobacterium lactis* con un porcentaje de pérdida de 8,87 % de bacterias vivas. No obstante, el porcentaje de supervivencia fue levemente mayor para *L. casei shirota*.

**CUADRO 9. Disminución global de la concentración microbiana.**

Microorganismos	Pérdida por dilución %	Pérdida por almacenamiento %	Supervivencia logarítmica %
<i>Bifidobacterium lactis</i>	14,88	8,87	91,13
<i>Lactobacillus casei shirota</i>	13	8,41	91,59

En un estudio realizado por NIGHSWONGER *et al.* (1996) en el cual se adicionó *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en mantequilla y yogur,

inoculado en un nivel aproximado de  $1 \times 10^7$  ufc/mL, dio lugar a una cantidad de células viables superior  $1 \times 10^6$  ufc/mL después de 28 días de almacenamiento entre 5 y 7 °C, lo que equivale a la reducción de 1 ciclo logarítmico, para estos microorganismos, esto indica que los productos fermentados son portadores significativos del género *Lactobacillus*. Además estos valores, son similares a los entregados en esta investigación, en la cual se aprecia una reducción de 1 ciclo logarítmico, a los 21 días de almacenamiento refrigerado del postre de leche.

#### **4.8 Efecto de la composición química del postre de leche sobre la viabilidad de los microorganismos probióticos**

La composición química del postre de leche consistió en 2,7 % de materia grasa (MG), 28% de sólidos totales (ST), 10,2 % de azúcar. BIROLLO *et al.*, (2000), demostraron que la viabilidad de las bacterias ácido lácticas en yogur, se relacionan con las características químicas del producto, además de su temperatura de almacenamiento. Estos autores observaron que una elevada concentración de azúcares, en tipos de yogur, afectó la viabilidad de bacterias del género *Lactobacillus*, tomando en cuenta, que ésta se vio disminuida en yogur elaborado con dulce de leche, lo que resultó en un factor inhibitorio de parte de la concentración de azúcar sobre los microorganismos. Además esta investigación demostró que yogur entero, almacenado a 12 °C, tuvo los menores recuentos de bacterias viables, no obstante al disminuir la temperatura de almacenamiento a 6 °C, este aumento su vida útil al doble.

Los resultados de la investigación propuesta por BIROLLO *et al.*,(2000), confirman lo obtenido en esta investigación, en la cual se demuestra una menor viabilidad durante el almacenamiento para *L. casei shirota* causado por el contenido de azúcar que contenía el postre de leche. Canganella *et al.* en 1992 citado BIROLLO *et al.* ( 2000) estudió yogures italianos mantenidos a 4 °C durante 60 días de almacenamiento, en este caso la alta presión osmótica

producida por la adición de endulzantes y gelatinas parecieron causar la baja viabilidad de especies de *Lactobacillus*.

#### 4.9 Evaluación sensorial

La prueba de aceptación sensorial de la formulación empleada para el postre de leche con salsa de cranberry de pH 2,7 y 55 °Brix, se realizó utilizando una escala hedónica, donde el valor máximo fue de 7 puntos “me gusta extremadamente” y el valor mínimo de 1 punto “me disgusta extremadamente”. Esta prueba se realizó con 10 jueces consumidores, en triplicado. El resultado de este análisis se observa en el CUADRO 10.

Los jueces encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), en el postre durante el tiempo de almacenamiento, así este fue mayormente aceptado hasta el día 14, con puntajes cercanos al máximo “me gusta extremadamente” y el menor puntaje lo obtuvo al final del periodo de almacenamiento a 5 °C, con un puntaje que correspondió a “No me gusta ni me disgusta”.

**CUADRO 10. Resultados de la evaluación sensorial del postre de leche.**

	Tratamientos*			
	T0	T7	T14	T21
<b>Puntaje Jueces</b>	6,897 ± 0,025 a	6,870 ± 0,036 a	6,577 ± 0,006 b	4,507 ± 0,025 c

\* Promedio ± D.E de las evaluaciones de 10 jueces en triplicado

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Estos resultados demuestran que la vida útil del producto, medida mediante jueces entrenados, concuerda con lo obtenido en el análisis microbiológico, en el cual el postre de leche al día 21, pierde sus características de alimento funcional, por la disminución de la cantidad de microorganismos vivos, debido a que se encuentra en el límite permitido por la Asociación Japonesa de Leches

Fermentadas y Bebidas con Bacterias Ácido Lácticas los que han estipulado una cantidad mayor a  $10^7$  bifidobacterias viables por gramo o mililitro de producto (GARDINER *et al.*, 1999).

HERNANDEZ y JARAMILLO (2004), evaluaron la aceptabilidad de helados de sabor a fresa con probióticos, a diferentes concentraciones, presentando buena aceptación por parte de los jueces, resultando las puntuaciones entre “me gusta mucho” y “me gusta”. Estos puntajes concuerdan con lo encontrado en esta investigación por la buena aceptación obtenida para los postres de leche con salsa de cranberry.

## 5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de la presente investigación se pueden extraer las siguientes conclusiones:

La inoculación de *Lactobacillus casei shirota* a una mezcla de postre de 2,7% de materia grasa, permitió que el 91,13% de su concentración logarítmica original permanezca viable después de ser sometida al proceso de refrigeración por un periodo de almacenamiento de 21 días a 5° C. La concentración final lograda fue de  $1,99 \times 10^7$  ufc/g de postre.

En el postre de leche de igual composición, la concentración logarítmica de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 disminuyó 8,87 % respecto a su nivel inicial, luego de ser sometida a idénticas condiciones, subsistiendo  $1,99 \times 10^6$  ufc/g de postre al término del periodo estudiado.

En el producto en el cual ambos microorganismos se encontraron involucrados, se pudo observar que tras la dilución se produjo una reducción de 1,2 ciclos logarítmicos para *L. casei shirota* y de 1,42 ciclos logarítmicos para *B. lactis*; en cuanto al almacenamiento, *L. casei shirota* mostró menor viabilidad y mayor sobrevivencia en el postre, *B. lactis* resultó mayor viabilidad y menor sobrevivencia.

La mayor disminución de viabilidad de los probióticos fue comprobada a los 21 días de almacenamiento refrigerado, desde la flora inicial en el postre de leche. La concentración microbiana durante el almacenamiento a 5°C, luego de 21 días, demostró ser significativa entre los microorganismos.

El análisis sensorial demostró una buena aceptabilidad, por parte de los jueces, considerando al postre de leche con salsa de cranberry, un producto novedoso y atractivo para consumidores conscientes de una alimentación saludable; confirmando además la vida útil del postre de leche, siendo aceptable hasta el día 14.

Los niveles de microorganismos sobrevivientes indican que el postre de leche representa una buena fuente de *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

## 6. RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la viabilidad y capacidad de supervivencia de dos microorganismos probióticos, *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium Lactis*, en un postre de leche. Para tal objetivo se formuló un postre con una mezcla de ambos en proporción 1:1. El inóculo para cada uno de los microorganismos probióticos fue de 2 % , siendo finalmente los productos almacenados a 5 °C durante 21 días. Para el recuento e identificación de las cepas utilizadas, el postre de leche fue sembrado en agar MRS para el recuento de *Lactobacillus casei shirota* y en agar MRS que además contenía L-cisteína-HCl, cloruro de litio y dicloxacilina, lo cual permitió la enumeración selectiva de *Bifidobacterium Lactis*. En este estudio ambos microorganismos fueron inoculados simultáneamente, determinándose la supervivencia para ambos. En el caso del *Bifidobacterium Lactis* Bb 12 mostró una concentración final de  $2,51 \times 10^7$  ufc/g al término de los 21 días de estudio, con una disminución logarítmica del 8,41%. *Lactobacillus casei shirota* mostró una concentración final de  $1,99 \times 10^7$  ufc/g al final del mismo periodo, cantidad que representa el 91,59% de sobrevivencia logarítmica. El análisis estadístico demostró que existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los recuentos de ambos microorganismos y el tiempo de almacenamiento, siendo el microorganismo más viable *B. lactis* y el tiempo 21 resultó con una disminución significativa de 1 ciclo logarítmico. Resultando la caducidad del producto al día 14 de almacenamiento, debido a la pérdida de la concentración terapéutica mínima recomendada para microorganismos probióticos. En la evaluación sensorial los jueces encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los postres, durante el tiempo de almacenamiento, confirmándose la vida útil del producto de 14 días. Por último, el postre de leche con salsa de cranberry se considera un producto nutracéutico, por su valor nutritivo y por el efecto farmacológico sobre el organismo.

## 6. SUMMARY

This work had the objective of evaluating the viability and survival capacity of two microorganisms probiotics, *Lactobacillus casei shirota* and *Bifidobacterium Lactis*, in a milk dessert. For this objective one dessert was formulated with a mix of both micro-organisms in a proportion of 1:1. The inoculums for each one were 2%, with the products ultimately being stored at 5° C for 21 days. For the recount and identification of the strains used, the milk dessert was cultivated in MRS agar for the *Lactobacillus casei shirota* and in MRS agar that also contained L-cisteína – HCl, cloruro de litio and dicloxacilina, which permitted the selective numbering of the *Bifidobacterium Lactis*. In this study both micro-organisms were inoculated conjointly and the logarithmic survival was calculated for both organisms. In the case of the *Bifidobacterium Lactis* Bb 12 a final concentration was  $2,51 \times 10^7$  ufc/g after the 21 day study, with a logarithmic decrease of 8.41%. *Lactobacillus casei shirota* showed a final concentration of  $1,99 \times 10^7$  ufc/g at the end of the same period, which represents 91.59% of the logarithmic survival. The statistical analysis done showed that significant differences existed ( $p < 0.05$ ) between the recounts of both microorganisms and the time of storage. The micro organism *B. lactis* was the most viable and the period of 21 days resulted in a significant decrease of 1 logarithmic cycle. This resulted in the spoilage of the product on the 14<sup>th</sup> day of storage, due to the loss of the minimum therapeutic concentration recommended for probiotic microorganisms. In the sensory evaluation the judges found significant differences ( $p < 0.05$ ) in the desserts during the time of storage which confirmed the 14 day shelf life. In the sensory evaluation the judges found significant differences ( $p < 0.05$ ) in the desserts during the time of storage which confirmed the 14 day shelf life. Lastly, the dessert of milk with cranberry sauce is considered a product nutracéutico, for its nutritious value and for the pharmacological effect on the organism.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ALAIS, C. 1985. Ciencia de la leche. 2a Ed. Reverte S.A. 873 p.

ALVAREZ- OLMOS, M. I. y OBERHELMAN, R. A. 2001. Probiotics agents and infectious diseases: A Modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infect Diseases*. 32: 1567- 1576.

AMORES, R., CALVO, A., MAESTRE, J. R. y MARTINEZ- HERNANDEZ D. 2004. Probióticos. Revisión. *Rev. Esp. Quimioterap*. 17: 131-139.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (APHA) 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Robert T. Marshall, Editor. 16th ed. Washington. 546 p.

AVORN, J., MONAME, M., GURWITZ, J. H., GLYNN, R. J., CHOODNOVSKIY, I. y LIPSITZ. 1994. Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *The Journal of the American Medical Association*. 271:751-754.

BARON M., ROY D., VUILLEMARD J. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. *Lait* 80: 465–478.

BELLISLE, F., DIPLOCK, A. y HORNSTRA, G. 1998. Functional food science in Europe. *British Journal Nutrition*. 80:3-4.

BIERING, S., BAGI, P., y HOIBY, N. 2001. Urinary tract infections in patients with spinal cord lesions: treatment and prevention. *Drugs*. 61:1275-1287.

- BIROLLO, G., REINHEIMER, J. y VINDEROLA, C. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International* 33: 799-805.
- BLANCHETTE, L, ROY, Q., BELANGER, G. y GAUTHIER, S. 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 79: 8-15.
- BROOKE, I. 1999. Bacterial interference. *Critical Review Microbiology*. 25:155-172.
- BURGER, O., OFEK, I., TABAK, M., WEISS, E., SHARON, N., y NEEMAN, I. 2002. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits helicobacter pylori adhesion to human gastric mucus. *Fems Immunology Med Microbiol*. 29: 295-301.
- BUZETA, A. 1997. Chile: Berries para el 2000. Departamento Agroindustrial Fundación Chile. Pp. 15-19.
- CHAUVIÈRE, G., COCONNIER, M., KERNEIS, S., DARFERUILLE-MICHAUD, A., JOLY, B. y SERVIN, A. 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat killed *Lactobacillus*. *FEMS microbiology letter*. 70: 213-217.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. NCh 2671. of 2002. Productos hidrobiológicos – Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva- Técnica de recuento en placa en agar Baird parker.

CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. NCh 2734.of 2002. Productos hidrobiológicos –Determinación de hongos y levaduras- Técnica recuento en placa.

CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. NCh 2735/2.of 2001. Productos hidrobiológicos –Determinación coliformes. Parte 2: Técnica recuento en placa.

CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA, FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA, (FIA). 2002. Estrategia de Innovación Agraria para Producción de Berries. Santiago de Chile. 19 p.

CHILE. MINISTERIO DE SALUD. Nuevo Reglamento Sanitario de los alimentos. 1998. Editora Jurídica Manuel Montt S.A. 87 p.

DESJARDINS, M., DENIS, R. y GOULET, J. 1990. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *Journal of Dairy Science*. 73:299-307.

DINAKAR, P., y MISTRY, V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 77: 2854-2864.

FALK, P., HOOPER, L., MIDTVEDT, T. y GORDON, J. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem. *Microbiology Molecular Biology Review*. 62: 1157-1170.

FLEET, J. 1994. New support for a folk remedy: Cranberry juice reduces bacteriuria and pyuria in elderly women. *Nutrition Reviews*. 52(5):168-170.

- FLORES, M. 2002. Viabilidad de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*) en helados de leche. Tesis de ingeniería en alimentos. Facultad de ciencias agrarias. Universidad austral de Chile. Valdivia. 73 pág.
- FERREIRA, C. y FAVARO, C. 2004. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:151-156.
- FONDEN, R., MOGENSEN, G., TANAKA, R. y SALMINEN S. 2000. Effect of culture- containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health. *Bulletin IDF-FIL*. 352:5-30.
- FONS, M., GOMEZ, A. y KARJALAINEN, T. 2000. Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. *Microbiology Ecology Health*. 2: 240-246
- FULLER, R. 1989. Probiotics in man animals. *Journal Applied Bacteriology*. 66: 365-378
- GARDINER, G., ROSS, R.P., COLLINS, J.K., FITZGERALD, G. y STANTON, C. 1998. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 2192-2199.
- GARDINER, G., STANTON, C, LYNCH, P. B., COLLINS, J.K. y FITZGERALD, G. 1999. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*. 82: 1379-1387.

- GIBSON, G. y ROBERFROID M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *Journal Nutrition*. 125: 1401-1412.
- GRENOV, B. y SHAH, N. P. 1997. Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: a review. *Michwissenschaft*. 52: 72- 76.
- GOBBETTI, M., CORSETTI, A,-, SMACCHI, E, ZOCCHETTI, A. y DE ANGELIS, M. 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacterias. *Journal of Dairy Science*. 81: 37-47.
- GOMES, A. y MALCATA, X. 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science*. 81 :1492-1507.
- GOMES, A. y MALCATA, X. 1999. Bifidobacterium spp. And Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Foods & Technology* 10: 139-157.
- GONZALEZ, B. 2003. Simposium Alimentación del Siglo XXI “Alimentos Funcionales y Transgenicos”. Universidad Autónoma de Nueva León.
- HAFFAJJEE, A., y SOCRANSKY, S. 2000. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Microbiology and Immunology of Periodontal Diseases*. 201-223p.
- HAMILTON, M. y FULLER, R. 1996. Probiotics panacea or nostrum. *BNF Nutr Bull*. 21:199–208.

- HAMILTON y MILLER. 1994. Reduction of bacteriuria and pyuria using cranberry juice. *The Journal of the American Medical Association*. 8: 24-3.
- HELLER, K.J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Nutrition*. 73: 374-379.
- HEKMAT, S. y McMAHON, D. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*. 75: 1415-1422.
- HERNÁNDEZ, A. y JARAMILLO, P. 2004. Comportamiento de los indicadores físicoquímicos en leche fermentada y viabilidad de los microorganismos probióticos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 14: 7-10.
- HOERR, R. A. y BOSTWICK, E. 2000. Bioactive protein and probiotic bacteria: modulation of nutritional health. *Nutrition*. 16:711-713.
- HOWELL, A. 2002. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Critical reviews in food science and nutrition*. 42(suppl.):273-278.
- HOWELL, A., N,VORSA , MADEROSIAN,A., y FOO,L. 1998. Inhibition of the adherence of p-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. *N.Engl.J.Med*. 339(15):1085-1086.

- HUGHES, D. B. y HOOVER, D. G. 1991. Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technology*. 45: 74-83.
- INTERNATION DAIRY FEDERATION. IDF/ FIL. 1995. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. *Bulletin* 306: 23-33.
- ISHIBASHI, N. y SHIMAMUR, S. 1993. Bifidobacteria: research and Development in Japan. *Food Technology*. 47:126–35.
- JAKOBSEN, C., ROSENFELDT, V., HAYFORD, A., MOLLER, P. MICHAELSEN, K., PAERREGAARD, A., SANDSTRÖM, B., TVEDE M. y JAJOBSEN, M. 1999. .Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro technique and evaluation of the colonization ability of five selected strains in Humans. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 4949-4956.
- KAILASAPATHY, K. y RYBKA, S. 1997. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp their therapeutic potential and survival in yogurt. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 52: 28-35.
- KANDLER, O. y WEISS, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 2. Williams and wilkins Publications. Baltimore. Pp. 1209-1234.
- KONTIOKARI,T., SUNDQVIST,K., NUUTINEN, M., PKKA, T. ,KOSKELA,M. y UARI, M. 2001. Randomized trial of cranberry lingonberry juice and lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *Br. Med.J.* 322 :1571-1573.

- KURMANN, J. A. 1988. Starters for fermented milks. Bulletin FIL/IDF 227: 41-55.
- KUZMINSKI, L.N. 1996. Cranberry juice and Urinary Tract Infections: Is There a Beneficial Relationship?. Nutrition Reviews, 54:87-90
- LANKAPUTHRA, W., SHAH, N. y BRITZ, M. 1996. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. Milchwissenschaft. 51: 65-69
- LAROIA, S. y MARTIN, J. 1991. Effect of pH on survival of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus in frozen fermented dairy desserts. Cultured Dairy Products Journal. 26: 13-21.
- LAROIA, S. y MARTIN, J. H. 1990. Bifidobacteria as posible dietary adjuncts in cultured dairy products: a review. Cultured Dairy Products of Journal. 25: 18-22.
- LEE, Y., NOMOTO, K., SALMINEN, S. y GORBACH, S. 1999. Handbook of probiotic. John Wiley & sons, Inc. New York, USA.211 p.
- LEE, L., OWENS, J., THRUUPP, L., y CESARIO, T. 2000. Does cranberry juice have antibacterial activity. The Journal of the American Medical Association. 13: 1691.
- LEE, Y. y SALMINEN, S. 1995. The coming of age of probiotics. Trends in Food Science and Technology. 6:241–245.
- LILLY, D. y STILWELL, R. H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147: 747- 748.

- LYN M., SAVAIANO D. y HARLANDER S. 1991. Influence of Nonfermented Dairy Products Containing Bacterial Starter Cultures on Lactose Maldigestion in Humans. *Journal of Dairy Science*. 74: 87-95
- MARSHALL. R. 1998. Ice cream and frozen yogurt. En: *Applied Dairy Microbiology*. Marth, E. H. y Steele J. L, Editores. Marcel Dekker, Inc., Wisconsin, USA. Pp 81-108.
- MARTH E. H. y STEELE J.L. 1998. *Applied Dairy microbiology*. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. pág. 200-210.
- MATSUZAKI, T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology*. 41:133-140.
- MCFARLAND, L. 1999. Biotherapeutic agents for *Clostridium difficile*-associated disease, p. 159-193. In G. W. Elmer, L. MaFarland, and C Surawicz (ed.). *Biotherapeutic agents and infectious diseases*. Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- MILNER, J. A. 2002. Foods and health promotion: The case for cranberry. *Critical reviews in food science and nutrition*. 42(suppl):265-266.
- MODLER, H., MCKELLER, R. y YAGUCHI, M. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute in Food Science and Technology Journal*. 23: 29-41.
- MOORE, W. y MOORE, L. 1995. Intestinal floraso populations that have a high risk of colon cancer. *Applied Environmental Microbiology*. 61: 3202-3207.

- NIGHSWONDER, B., BRASHEARS, M. AND GILLILAND, S. 1996. Viability of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 79: 212- 219.
- OFEK, I., HASY, DL., y SHARON, N. 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *Fems Immunology and Medical Microbiology*. 38 (3): 181-191.
- OKAWA, T., NIIBE, H., ARAI, T., SEKIBA, K., NODA, K., TAKEUCHI, S., HASHIMOTO, S., y OGAWA, N. 1993. Effect of LC9018 combined with radiation therapy on carcinoma of the uterine cervix. *Cancer*. 72: 1949-1954
- O'SULLIVAN, D.J. 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 49:1751-1760.
- O'SULLIVAN, D.J. 1996. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora and overview. *Bulletin FIL/IDF* 313: 23-30.
- OUWEHAND, A. C., BIANCHI SALVADORI B., FONDEN R., MOGENSEN G. y SALMINEN S. 2003. Health effects of probiotics and culture- containing dairy products in humans. *Bulletin IDF FIL*. 380: 4-19.
- OVERDAHL, B. y ZOTTOLA, E. 1991. Relationship between bile tolerance and the presence of a ruthenium red staining layer on strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*. 74: 1196-1200.
- PARKER, R. B. 1974. Probiotics: the others half of the antibiotics story. *An Nutrition Health*. 29: 4-8.

- RAVULA, R. R., y SHAH, N. P. 1998. Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 53: 175-179.
- REID, G., HSIEHL, J., POTTER, P., MIGHTON, J., LAM, D., WARREN, D. y STEPHENSON, J. 2001. Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells. *Spinal Cord*. 39:26-30.
- RYBKA, S. y KAILASAPATHY K. 1995. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 50: 51-57.
- ROY, D., DUSSAULT, F. y WARD, P. 1990. Growth requirements of *Bifidobacterium* strains in milk. *Milchwissenschaft*, 45: 500-502.
- SAXELIN, M., AHOKAS, M. y SALMINEN, S. 1993. Dose response on the faecal colonisation of *Lactobacillus* strain GG administered in two different formulations. *Microb Ecol Health Dis*. 6:119–122.
- SALMINEN, S., BOULEY, C. y BOUTRON- RUAULT, M.C. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal Nutrition*. 80 (suppl): 147-171.
- SCARDOVI, V. 1986. Genus *Bifidobacterium*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 2. Williams and Wilkins Publications. Baltimore. Pp. 1418-1434.

- SHAH, N. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*. 55: 46- 53.
- SHAH, N., FEDORAK., R. y JELEN, P. 1992. Food consistency effects of quarg in lactose mala absorption. *International Dairy Journal*. 2: 257-269.
- SOBOTA, A. 1984. Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: Potential use for the treatment of urinary tract infections. *The journal of Urology*. 131:1013-1016.
- SPANHAAK, S., HAVENAAR, R. Y SCHAAF SMA, G. 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal Clinical Nutrition* 12: 899-907.
- TAKAGI, A., MATSUZAKI, T., SATO, M., NOMOTO, K., MOROTOMI, M. y YOKOKURA T. 1999. Inhibitory effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice. *Med Microbiology Immunol*. 188:111-116.
- TRAPP, C., CHANG,C., HALPERN, G., KEEN, C. y GERSCHIM, M. 1993. The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults. *International Journal Immunotherapy*. 9: 53-64.
- TUOMOLA, E., OUWEHAND, A. y SALMINEN, S. 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol Med Microbiology* . 2: 137-42
- VINDEROLA, C, PROSELLO, W., GHIBERTO, D. y REINHEIMER, J. 2000. Viability of probiotic ( *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and

*Lactobacillus casei* ) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 83: 1905-1911.

ZHENG, W. y WANG, S.Y. 2003. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 502-509.

WEISS, E, BURGER,O.,SHARON,N, TABAK,M, NEEMAN, I., y OFEK,I. 2002. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular- weight constituent of cranberry juice. *Critical reviews in food science and nutrition*. 42(suppl.): 279-284.

YAN, X.,MURPHY, B., HAMMOND, G., VINSON, J., y NETO,C. 2002. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 5844-5849.

Yuki, N., Watanabe, K., Mike, A., Tagami, Y., Tanaka, R., Ohwaki M. y Morotomi M. 1999. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *International Journal Food Microbiology*. 48:51-7.

ZUO, Y., WANG, C y ZHAN, J. 2002. Separation, Characterization, and Quantitation of Benzoic and Phenolic Antioxidants in American Cranberry Fruit by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3789-3794.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

## Productos probióticos comerciales a nivel mundial

Producto	Compañía	Microorganismo	Beneficios	Categoría del producto	País
Yakult 65 y Yakult 80 Ace	Yakult Honsha	<i>L. casei shirota</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal en humanos, disminuye a diarrea provocada por rotavirus	Bebida láctea fermentada	Japón
Sofuhl y Joie	Yakult Honsha	<i>L. casei shirota</i> y <i>S. thermophilus</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal en humanos, disminuye a diarrea provocada por rotavirus	Leche fermentada	Japón
Yakult	Yakult	<i>L. casei shirota</i>	Normaliza el balance de la flora intestinal en humanos, disminuye a diarrea provocada por rotavirus	Bebida láctea fermentada	Taiwan Brasil Hong-Kong Tailandia Corea Filipinas Singapur México Indonesia Australia Argentina Holanda Bélgica USA Alemania

**(Continuación ANEXO 1)**

Chamyto	Nestlé	<i>L. johnsonii</i> <i>L. helveticus</i>	Efectos antidiarreicos potenciales, Disminución de actividades enzimáticas fecales, Estimulación de defensas inmunes, Entre otras.	Bebida láctea fermentada	Brasil, Argentina y Chile
Yoplait	National	<i>L. acidophilus</i>	Reduce la diarrea asociada a antibióticos, disminuye la intolerancia a la lactosa	Leche fermentada	Singapur
Lc1	Nestlé	<i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. johnsonii</i>	Estimula el sistema inmune	Leche fermentada o cápsulas	Francia Bélgica España Suiza Portugal Italia USA Reino Unido Alemania
Actimel	Danone	<i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. casei imuntass</i>	Mejora la resistencia a microorganismo patógenos	Leche fermentada	Holanda Bélgica
BioLa	Tine	<i>B. lactis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. GG</i>	Balance de la microflora intestinal	Yogurt o leche fermentada	Noruega

**FUENTE: LEE et al. (1999).**

**ANEXO 2**  
**FICHA DE EVALUACIÓN SENSORIAL**

Nombre:

Fecha:

**Instrucciones.**

Sírvase evaluar las siguientes muestras de postre de leche, marcando con una X aquel lugar que con mayor exactitud interpreta la magnitud de agrado o desagrado que le produce la muestra.

**ACEPTABILIDAD**

Puntajes	Categorías	Muestras		
7	Me gusta extremadamente			
6	Me gusta mucho			
5	Me gusta levemente			
4	No me gusta ni me disgusta			
3	Me disgusta levemente			
2	Me disgusta mucho			
1	Me disgusta extremadamente			

**COMENTARIOS**

**ANEXO 3**  
**Análisis estadístico cultivo madre**

**Tabla ANOVA para el recuento del cultivo madre**

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6,E18	1	6,E18	600,00	0,0000
Intra grupos	4,E16	4	1,E16		
Total (Corr.)	6,04E18	5			

**Test de comparación múltiple para el cultivo madre**

Método: HSD de Tukey, 95% de confianza

Microorganismo	Recuento	Media	Grupos Homogéneos
Lcs	3	1,5E9	X
Bb12	3	3,5E9	X

#### ANEXO 4

##### Análisis estadístico de la viabilidad de los microorganismos probióticos

Fuente	SC	GL	CM	Cociente-F	P-Valor
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Cepa	0,1285	1	0,1285	102,01	0,0000
B: Tiempo	2,0759	3	0,6919	549,16	0,0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,0058	3	0,0019	1,54	0,2417
RESIDUOS	0,0201	16	0,0012		
<b>TOTAL (corr.)</b>					
	2,23	23			

##### Test de comparación múltiple según microorganismos

Método: HSD de Tukey, 95% de confianza

Cepa	Recuento	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
Lcs	12	7,7943	0,0102	X
Bb12	12	7,9406	0,0102	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Bb12 - Lcs	*0,1463	0,0307

\* indica una diferencia significativa.

##### Test de comparación múltiple según tiempo de almacenamiento

**(Continuación ANEXO 4).**

Método: HSD de Tukey, 95% de confianza

Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
21	6	7,3585	0,0151	X
14	6	8,0177	0,0151	X
7	6	8,0415	0,0151	X
0	6	8,0522	0,0151	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0 - 7	0,0107	0,0447002
0 - 14	0,0345	0,0447002
0 - 21	*0,6936	0,0447002
7 - 14	0,0238	0,0447002
7 - 21	*0,6829	0,0447002
14 - 21	*0,6591	0,0447002

\* indica una diferencia significativa.