

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

Elaboración de Quesillo de Leche de Soya (*Glycine max*) con Adición de Bacterias Probióticas (*Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* Bb12)

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

Jenny Andrea Cocio Olmos

VALDIVIA – CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE

Sr. Haroldo Magariños Hawkins

Técnico Lechero

Magíster en Ciencia y Tecnología de la Leche

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Ciencia Agrarias

PROFESOR INFORMANTE

Sr. Fernando E. Figuerola Rivas

Ingeniero Agrónomo, M. S. Food Science

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Ciencia Agrarias

PROFESOR INFORMANTE

Sra. Marcia Costa Lobo

Ingeniero Civil Bioquímico, Diploma Ingeniería Industrial

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Ciencia Agrarias

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su apoyo y comprensión, por darme lo mejor de cada uno de ellos y acompañarme en este largo camino de aprendizaje, en donde no tan solo conseguí las herramientas para mi desarrollo profesional, sino tan bien aquellas que utilizare en mi vida personal.

A mis compañeras y amigas de toda la universidad quienes con su comprensión y cariño me entregaron lo más lindo, su amistad.

A mis profesores que siempre entregaron lo mejor de si en cada una de sus clases, especialmente a los profesores Haroldo Magaríños y Femando Figuerola.

*A mis padres Bernarda
y Patricio*

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Soya	3
2.1.1	Características generales	3
2.1.2	Nutrientes contenidos en el poroto de soya	4
2.1.3	Producción de soya en el ámbito mundial	7
2.2	Leche de soya	9
2.3	Tofú (quesillo de soya)	12
2.3.1	Composición proximal del quesillo de soya	14
2.3.2	Adición de agente coagulante en la elaboración del quesillo de leche de soya	14
2.3.3	Adición de microorganismos probióticos como bacterias beneficiosas para el organismo humano	16
2.3.3.1	Bacterias probióticas	17
2.3.3.2	Características generales de las bacterias probióticas	18
2.3.3.3	Acción y efectos de las bacterias probióticas en el organismo	19
2.3.3.4	<i>Lactobacillus</i> , características del género	21
2.3.3.5	<i>Lactobacillus casei shirota</i>	22
2.3.3.6	<i>Bifidobacterium</i> , características del género	22
2.3.3.7	<i>Bifidobacterium lactis</i>	23
3	MATERIAL Y MÉTODO	25
3.1	Lugar de trabajo	25
3.2	Cepas utilizadas	25

3.3	Activación de las cepas	25
3.4	Elaboración del quesillo de soya	26
3.4.1	Preparación de medios de cultivo y de dilución para la enumeración de los microorganismos probióticos	29
3.4.2	Muestreo y siembra de quesillo de leche de soya	30
3.4.3	Frecuencia de muestreo	32
3.4.4	Recuento de bacterias probióticas	32
3.5	Análisis microbiológicos y químicos	33
3.5.1	Determinación de pH del quesillo de soya	33
3.5.2	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.5.3	Recuento de hongos y levaduras	33
3.5.4	Recuento de coliformes	33
3.6	Evaluación sensorial del quesillo	33
3.7	Diseño experimental	34
3.8	Análisis estadístico de datos	34
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
4.1	Viabilidad de <i>Lactobacillus casei shirota</i> , <i>bifidobacterium lactis</i> y mezcla de ambos, durante el almacenamiento refrigerado a 5°C	35
4.1.1	Evolución de las concentraciones de de <i>Lactobacillus casei shirota</i> , <i>bifidobacterium lactis</i> y mezcla de ambos en quesillo de soya, durante el almacenamiento refrigerado a 5°C	38
4.1.2	Comportamiento de bacterias probióticas solas y en mezcla de ambos en quesillo de soya almacenado a 5°C	43
4.2	Análisis microbiológicos	45
4.3	Análisis químicos	46
4.4	Evaluación sensorial del quesillo de soya con probióticos.	47

5	CONCLUSIONES	50
6	RESUMEN - SUMMARY	51
7	BIBLIOGRAFÍA	53
	ANEXOS	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición aminoacídica del poroto de soya	6
2	Principales vitaminas presentes en poroto de soya	7
3	Minerales presentes en poroto de soya	7
4	Composición proximal de poroto de soya	7
5	Comparación de la producción cereal en el mundo (toneladas)	8
6	Países exportadores de soya	9
7	Composición de leche de soya (con una relación de soya : agua de 1: 5) y leche de vaca (g/100g)	12
8	Composición proximal de quesillo de leche de soya	14
9	Ejemplos de bacterias utilizadas como probióticas	18
10	Viabilidad de <i>Lactobacillus casei shirota</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y la mezcla durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C	36
11	Indicadores microbiológicos en quesillo de soya	45
12	Resultados entregados por el panel sensorial	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama de flujo de elaboración de quesillo de leche de soya	28
2	Esquema de siembra para <i>L. casei shirota</i> , <i>B. lactis</i> y mezcla	31
3	Esquema de siembra para recuento de <i>S. aureos</i> , coliformes, mohos y levaduras	32
4	Cinética de crecimiento de los microorganismos probióticos en quesillo de soya, almacenado a 5°C	36
5	Evolución de la concentración de <i>Lactobacillus casei shirota</i> en quesillo de soya almacenado a 5°C	38
6	Evolución de la concentración de <i>Bifidobacterium lactis</i> en el quesillo de soya almacenado a 5°C	39
7	Viabilidad de <i>B. infantis</i> en queso cheddar almacenado a 4°C	40
8	Evolución de la mezcla de microorganismos probióticos en el quesillo de soya almacenado a 5°C	41
9	Concentración celular de <i>L. paracasei subsp. paracasei</i> NTU101 y <i>B. longum</i> BCRC11847 en mezcla de leche de vaca y leche de soya, inoculadas en relación 1:1	42
10	Evolución del comportamiento de <i>L. casei shirota</i> sólo y en mezcla	43
11	Evolución del comportamiento de <i>B. lactis</i> sólo y en mezcla	45
12	Evolución del pH en el tiempo de almacenamiento por acción de microorganismos probióticos en quesillo de soya	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Ficha de evaluación sensorial	62
2	Análisis de Varianza para concentración de microorganismos probióticos	63
3	Análisis de varianza para tiempo 0 y 1 entre microorganismos	64
4	Recuento de microorganismos probióticos durante el almacenamiento de quesillo de soya a 5°C (log ufc/g)	66
5	Análisis de Varianza para concentración de <i>Lactobacillus casei shirota</i> solo y en mezcla por tiempo	68
6	Análisis de Varianza para concentración de <i>Bifidobacterium lactis</i> solo y en mezcla tiempo	70
7	Test Friedman	73

1. INTRODUCCIÓN

Alimentos elaborados a partir de soya, como “leche y quesillo de soya” han sido tradicionalmente consumidos en los países del este asiático, tales como China, Corea y Japón. La leche de soya ha llegado a ser popular como una bebida en el lejano oriente y está gradualmente expandiéndose al mundo occidental.

Los porotos de soya son una excelente fuente de proteína de alta calidad que tiene muchos usos como alimento de consumo humano. En Asia, por ejemplo, los porotos de soya han sido consumidos por siglos, aunque se utiliza la soya para hacer harina y fracciones similares.

En la actualidad la utilización de la soya para la elaboración de diversos productos se ha convertido en una alternativa saludable para el consumo de este tipo de leguminosa, ya que aporta ciertos aminoácidos esenciales que el organismo no es capaz de sintetizar por si solo.

Entre los productos que se elaboran sobre la base de la leche de soya se encuentra el quesillo de leche de soya, producto que contiene una alta concentración de proteína, las cuales se hacen coagular principalmente con sales tales como el Sulfato o el Cloruro de calcio.

Por otro lado, el consumo de alimentos saludables incluye además, aquellos que contienen bacterias probióticas, células viables que en cierta cantidad ejercen muchos beneficios para el organismo. En la actualidad existen muchos productos con incorporación de probióticos en el mercado, como algunas bebidas lácteas y yogurt, en general.

HIPOTESIS

Tanto el *Lactobacillus casei shirota* como el *Bifidobacterium lactis* son bacterias probióticas capaces de sobrevivir en quesillo de leche de soya a temperatura de almacenamiento de 5°C por un espacio de tiempo de 10 días, tanto juntas como por separado.

En relación con la hipótesis señalada se plantean los siguientes objetivos.

Objetivo general

Determinar la viabilidad de bacterias probióticas en quesillo de leche de soya, juntos y por separados, almacenado a una temperatura de refrigeración de 5°C por un espacio de tiempo de 10 días.

Objetivos específicos

- Comparar la viabilidad de *Lactobacillus casei shirota* y de *Bifidobacterium lactis* al ser inoculados en quesillo de leche de soya, juntos y por separados, almacenados a 5°C durante 10 días.
- Determinar cual de las cepas en estudio presenta mejor comportamiento, en cuanto a sobrevivencia, tanto juntas como por separadas en el quesillo, durante el período del experimento.
- Evaluar la aceptabilidad del quesillo de soya probiótico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soya

La soya (*Glycine max*) pertenece a las leguminosas y por su elevado contenido de aceite se incluye, junto con el cártamo, el algodón, el girasol, la aceituna y el cacahuete, en las oleaginosas. En muchos países occidentales, esta semilla se utiliza para la extracción de aceite y el residuo o pasta, rico en proteína, se emplea para la alimentación animal; por otra parte en el Oriente, la soya es fundamental en la dieta de un gran sector de la población. Debido a sus propiedades nutritivas, principalmente por su proteína, en los últimos años ha habido un gran desarrollo científico y tecnológico para su aprovechamiento integral (BADUI, 1999).

Puede ser preparada tanto como poroto, germinada (brotes) y en una variedad increíble de subproductos: leche de soya, tofu, salsa de soya, lecitina de soya y confitería. El quesillo de soya, llamado tofu es un alimento muy liviano y recomendable (IESN, 2001).

Desafortunadamente los productos de soya no son bien aceptados por el sabor y gusto astringente. La sensación de astringencia de la leche de soya y del quesillo de soya es causada principalmente por las isoflavonas que contiene los porotos de soya, siendo esta mas intensa cuando se incrementa la concentración de las isoflavonas (MAHFUZ *et al.*, 2004).

Por otro lado, las isoflavonas de la soya se manifiestan para prevenir el avance de la arterosclerosis a través de múltiples interacciones, incluyendo el descenso

de lípidos en el plasma y lipoproteínas, aumentando la vasodilatación, y disminuyendo la activación de las plaquetas de la sangre y las células vasculares del músculo liso (Anderson *et al.* 1999, citado por HUANG *et al.*, 2003).

WANG y MURPHY (1994), concluyeron que la variedad de la soya, el método de procesamiento, y la adición de otros componentes afectan la retención y distribución de las isoflavonas en los alimentos de soya. Naturalmente se encuentran isoflavonas en porotos de soya existiendo principalmente en su forma conjugada, por ejemplo, glucosido, malonil glucosido o acetil glucosido.

2.1.1 Características generales. En forma general, la soya está anatómicamente constituida por tres fracciones principales: la cascarilla, que representa 8% del peso total de la semilla, el hipocotilo (2%) y el cotiledón (90%); en este último, se localiza el aceite en unos pequeños compartimentos, llamados esferosomas, de 0,2 a 0,3 μm y que a su vez están dispersos entre los cuerpos proteínicos denominados aleuronas de mayor tamaño (2 a 20 μm) integrados por aproximadamente 98% de proteínas y algo de lípidos y de ácido fítico (BADUI, 1999).

Snyder y Know (1987), citados por LIM *et al.* (1990), manifiestan que las semillas que tienen un tamaño largo y uniforme, color claro, piel delgada poseen un alto contenido de proteína por lo tanto son preferidas para la elaboración de la leche de soya y de tofu.

La soya es una excelente fuente de proteína de alta calidad que tiene muchos usos como alimento de consumo humano (Liu, 1997, citado por CHUMCHUERE *et al.*, 2000). En Asia, por ejemplo, la soya ha sido consumida por siglos, aunque se utiliza para hacer harina y fracciones similares (LUSAS y RIAZ, 1995).

Además contiene más proteínas que la carne y el pescado y tres veces más que el huevo. Sus semillas tienen alto contenido en fibra, un bajo índice calórico, no contienen colesterol y prácticamente tampoco grasas saturadas. La grasa presente es rica en lecitina, un fosfolípido vital para las membranas celulares, el cerebro y el sistema nervioso (IESN, 2001).

2.1.2 Nutrientes contenidos en el poroto de soya. Según el Instituto de Estudios Salud Natural de Chile (2001), el poroto de soya proporciona proteínas de alto valor biológico y aminoácidos esenciales: fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano y valina. También posee una buena proporción de otros cuatro aminoácidos denominados esenciales, tales como, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, prolina, serina entre otros (CUADRO 1).

CUADRO 1. Composición aminoacídica del poroto de soya.

AMINOÁCIDO	(% aa /100g de proteínas)
Ácido Glutámico	18,53
Ácido aspártico	13,95
Arginina	10,95
Leucina	8,13
Treonina	6,88
Prolina	5,61
Valina	5,08
Lisina	5,05
Isoleucina	4,77
Fenilalanina	4,21
Serina	4,19
Glicina	3,52
Alanina	2,84
Tirosina	1,68
Histidina	1,16
Triptofano	1,01
Metionina	0,92

FUENTE: Instituto de Estudios Salud Natural de Chile (IESN) (2001).

La soya además es rica en vitaminas, especialmente del complejo B: vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), ácido fólico. Además posee vitaminas liposolubles como las vitaminas A, E y K (CUADRO 2). También posee minerales como calcio, fósforo, hierro, magnesio y potasio (CUADRO 3).

En el CUADRO 4 se observa la composición proximal del poroto de soya, en donde su componente principal son los carbohidratos (35%), seguido de un 30% de proteínas y teniendo en menor proporción cenizas y fibras, con 5 y 0,5% respectivamente.

CUADRO 2. Principales vitaminas presentes en poroto de soya.

Vitaminas	Presente en 100g de poroto de soya
Vitamina A	1.500 UI
Vitamina D	400 UI
Vitamina E	2 UI
Vitamina C	20,0 mg
Vitamina B12	0,9 mg
Vitamina B2	0,8 mg
Vitamina B1	0,5 mg
Ácido fólico	100 mcg

FUENTE: Instituto de Estudios Salud Natural de Chile (IESN) (2001).

CUADRO 3. Minerales presentes en poroto de soya.

Minerales	Presente en 100g de poroto de soya
Calcio	400,0 mg
Fósforo	200,0 mg
Hierro	5,0 mg
Yodo	0,1 mg

FUENTE: Instituto de Estudios Salud Natural de Chile (IESN) (2001).

CUADRO 4. Composición proximal de poroto de soya.

Componentes	Presente en 100g de poroto de soya
Carbohidratos	35,5
Proteína	30,0
Aceites	26,0
Cenizas	5,0
Humedad	3,0
Fibras	0,5

FUENTE: Instituto de Estudios Salud Natural de Chile (IESN) (2001).

2.1.3 Producción de soya en el ámbito mundial. Según ODEPA (2005), hoy en día se cultiva alrededor de 66 millones de hectáreas en todo el mundo y en el último año la producción mundial llegó a alrededor de 225,5 millones de toneladas (CUADRO 5). Esta producción procede principalmente de 5 países: Estados Unidos (35,7%), le siguen Brasil (27,9%), Argentina (17,6%), China (8,4%) e India (2,8%).

CUADRO 5. Comparación de la producción de granos comestibles en el mundo (M toneladas)

País	Maíz	Trigo	Arroz	Soya	Cebada	Avena	Maravilla
EEUU	272.331	58.481	-	80.690	-	1.816	1.579
China	125.000	93.000	125.400	19.000	-	-	1.920
India	13.600	74.000	85.800	6.300	-	-	1.739
Brasil	44.450	-	-	63.000	-	-	-
Rusia	-	43.000	-	-	18.540	5.510	4.500
Canadá	-	25.510	-	-	12.550	4.050	-
Argentina	17.300	14.700	-	39.750	-	-	3.549
Total							
Mundial	665.921	615.592	402.776	225.471	144.392	26.670	26.516

FUENTE: Elaboración propia resumida a partir de ODEPA (2005).

El volumen de exportaciones mundiales del poroto de soya representa una base de aproximadamente 7.390 millones de dólares, de los cuales el 90,82% corresponde a Estados Unidos como se señala en el CUADRO 6. Estas exportaciones colocadas en el mercado sólo corresponden a la materia prima, el poroto de soya da origen a otros segmentos en el mercado de la industrialización: aceites y lecitina (US\$ 4.000 millones), harina de soya (US\$

5.600 millones), derivados de soya (leche de soya, tofu, salsa de soya, germinados, proteínas de soya, etc.) (ODEPA, 2005).

La estimación anual de consumo per cápita de soya en varios países orientales se presenta mayormente en Taiwán y quizás del mundo con 13,3 kg. El consumo anual per cápita en China es de aproximadamente 6,9 kg siendo el país más bajo dentro de este bloque ya que Japón consume 9,3 kg y Corea 7,8 kg (ODEPA 2005).

CUADRO 6. Países exportadores de soya.

País	Participación mundial (%)
Estado Unidos	90,82
Perú	5,95
Holanda	1,45
Francia	0,82
Alemania	0,60
Canadá	0,36

FUENTE: Elaboración propia resumida a partir de ODEPA con información del servicio nacional de aduanas correspondiente al año 2004.

2.2 Leche de soya

La leche de soya es rica en aminoácidos esenciales y vitaminas. Es un alimento concentrado en proteínas, recomendable para el metabolismo celular. Dada su concentración se recomienda en muy pocas cantidades o porciones algo diluidas a los niños, salvo para reemplazar la leche de vaca por prescripción médica (IESN, 2001).

Hoy en día existe un porcentaje alto de la población adulta en África (72%), América (19% en personas de raza blanca y 72% de raza negra) y Asia (60%)

que producen menos cantidad de β - galactosidasa (lactasa) intestinal que los europeos, consecuentemente, se produce una mala absorción de la lactosa (azúcar de la leche) por esta población. Los síntomas de la mala absorción de la lactosa son diarreas, formación de gases intestinales y retortijones, con ello se postula a que la leche de soya puede ayudar a resolver estos problemas, debido a que no contiene lactosa, siendo a su vez una excelente fuente de proteínas de alta calidad (FENNEMA, 2000).

Paredes *et al.*, 1990 y Champagne *et al.*, 1991, citados por MEJIAS (1998), señalan que la leche de soya se obtiene tradicionalmente remojando el grano de soya con agua a temperatura no menor de 80°C por un periodo mayor a 30 minutos, luego se realiza la molienda, y se filtra la mezcla para remover las partes sólidas de la leche. Por su parte KWOK *et al.* (1995), señalan que los procedimientos convencionales para la elaboración de leche de soya incluyen un calentamiento de la leche fresca preparada y agitada en un recipiente abierto por 30 min. Esto destruye en parte los factores antinutricionales y mejora el sabor. Esta esterilización comercial de bebidas de soya en latas de estaño o en botellas de vidrio, se realiza en forma continua en un esterilizador hidrostático para lograr la esterilidad comercial.

Existen actualmente dos métodos populares para preparar leche de soya, el método tradicional propuesto por Shurtleff y Aoyogi en 1979 y el método “pulverización en caliente” propuesto por Wilkens en 1967. El método tradicional el cual involucra el remojo de la semilla y luego la molienda en frío para producir leche de soya con un sabor astringente el cual lo prefieren las personas de oriente. En comparación con el método de molienda en caliente el cual involucra el remojo y posterior molienda en caliente de las semillas produciendo leche de soya con un reducido sabor astringente, el cual no es preferido por las personas occidentales (KAO *et al.*, 2003).

La soya es una excelente fuente de enzima lipoxigenasa la cual en presencia de agua y oxígeno cataliza la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados formando hidroperóxidos conjugados, que posteriormente se descomponen para formar más de 40 componentes, responsables del sabor afrijolado "Beany flavor". Las enzimas se pueden inactivar con calor, fermentación y tratamiento ácido (Paredes *et al.*, 1990 y Champagne *et al.*, 1991, citados por MEJIAS, 1998).

KWOK *et al.* (2002), concluyeron que para producir una leche de soya comercialmente estéril con una satisfactoria inactivación de esporas bacterianas y una degradación mínima de la calidad sensorial (color y sabor altamente aceptables) y nutricional (retención de tiaminas entre un 90 y 93%), es necesario una combinación de temperatura y tiempo de 143 °C /60 s.

Nutricionalmente LIM *et al.* (1990), indican que las proteínas de la leche de soya varían entre 47,93 a 54,40% y que el pH de la leche se encuentra entre 6,42 a 6,55. Por otro lado, la mayor concentración de proteínas se localiza en la nata de la leche de soya, encontrándose en 100 g de producto seco 47g de proteínas, siendo por esto ampliamente utilizada como sustituto cárnico (YONGQIANG *et al.*, 2005).

SUN y BREENE (1991), señalan que debido a que la leche de soya es baja en calcio y amino ácidos sulfurados en comparación a la leche de vaca, se postula que al utilizar la leche de soya como un sustituto tradicional de la leche de vaca es necesaria una fortificación de la misma con calcio, vitaminas y minerales, es por esto que YACIZI *et al.*, (1997) proponen la fortificación con calcio de la leche de soya, con un límite máximo de 38 mg/g de proteína.

CUADRO 7. Composición de leche de soya (con una relación de soya: agua de 1:5) y leche de vaca (g/100g).

Composición	Leche de soya	Leche de vaca
Agua	92,0	86,6
Proteínas	4,0	3,6
Materia grasa	1,5	4,1
Azúcares	2,0	5,0
Cenizas	0,5	0,7

FUENTE: LUN (1996) y FÉNNEMA (1993), reportados por MEJIAS (1998).

2.3 Tofu (quesillo de soya)

El Tofu es uno de los alimentos más populares en la dieta tradicional oriental y es un producto altamente proteico (KAO *et al.*, 2003). En EE.UU y Canadá, la producción de tofu ha crecido debido a un aumento de inmigrantes asiáticos y aceptados por la población en general. Ambos países exportan semillas de soya al oriente para elaborar quesillo (SUN y BREENE, 1991).

Alrededor del 90% de la proteína de soya es consumida en forma de tofu. Sin embargo, a causa de un alto contenido de humedad (90-94%), el quesillo de soya es propenso a desecharse, siendo por ello generalmente preparado y consumido diariamente (CHUMCHUERE *et al.*, 2000).

LIM *et al.* (1990), indican que el tofu es generalmente elaborado desde un filtrado extrayendo agua de todas las semillas de soya llamado leche de soya. La cuajada es obtenida por coagulación de leche de soya caliente con un coagulante, seguido de un moldeo y presión para remover el suero. Además, la textura del tofu debe ser coherente (cohesiva), suave y firme pero no dura y elástico (como la goma).

Por su parte CAI y CHANG (1999), señalan que el queso de soja es un producto altamente nutricional y es preparado tradicionalmente por coagulación de leche de soja caliente con un coagulante, seguido de un moldeado y prensado a una textura deseada. La elaboración de este producto es una compleja interacción de muchos factores. Estos factores incluyen características intrínsecas de la soja (composición química) y condiciones de procesamientos (elaboración).

Cuando la leche de soja está altamente concentrada o densa se coagulará fuertemente produciendo un tofu suave. Si presenta una baja densidad la coagulación no es tan fuerte. La cantidad correcta de coagulante y la proporción adecuada son factores importantes y necesarios para obtener un buen cuajo. (YONGQIANG *et al.*, 2005).

Skurray *et al.* (1980) y Wang *et al.* (1983), citados por LIM *et al.* (1990), sugieren que la variedad de la semilla de soja utilizadas puede afectar la calidad del tofu y esto es considerado debido a las diferencias en el contenido de proteínas. Estos autores estudiaron el efecto que tenían sobre el rendimiento del queso de soja cinco variedades de semillas de USA y Japón sembradas bajo similares condiciones de medio ambiente. Según los resultados obtenidos, ellos concluyeron que el tofu preparado desde las diferentes variedades de semillas mostró diferencias significativas en el rendimiento natural. Sin embargo, informaron que no había correlación significativa entre el contenido de proteína de la semilla de soja y el rendimiento del tofu.

Por otro lado Murphy *et al.*(1997), citados por CAI y CHANG (1999), demostraron que no existía correlaciones entre el contenido de proteína y el rendimiento, reportando que el contenido de proteína de la soja se correlaciona negativamente con la dureza y la fracturabilidad del queso de leche de soja.

CAI y CHANG (1999), señalan que dentro de las proteínas globulinas que contiene la soya se encuentran Glicinin y β - Conglicinin que constituyen alrededor del 58 al 78% de las proteínas extraíbles y el 22,4% al 32,8% del total de los sólidos del poroto de soya.

2.3.1 Composición proximal quesillo de soya. Según los estudios realizados por LIM *et al* (1990), en donde compara los rendimientos del quesillo de soya elaborados con diferentes semillas, encontraron que la menor variación se produjo en el porcentaje de cenizas y la mayor en el % de grasas (CUADRO 8).

CUADRO 8. Composición proximal de quesillo de leche de soya.

Componente	Cantidad porcentual (%)
Proteínas	46,03 a 52,50
Grasa	16,69 a 23,54
Cenizas	11,18 a 12,43
Carbohidratos	16,47 a 20,05

FUENTE: Elaboración propia resumida a partir de LIM *et al.* (1990).

2.3.2 Adición de agente coagulante en la elaboración del quesillo de leche de soya. Los efectos de la concentración de sulfato de calcio en leche de soya sobre la estructura del quesillo de soya y la constitución de proteína en el suero juegan un rol muy importante. Los coagulantes utilizados en la elaboración de quesillo de leche de soya son clasificados dentro de dos grupos, uno es coagulante de actividad lenta como es CaSO_4 (Sulfato de calcio) y GDL (Glucono-delta-lactone), y los otros son los coagulantes de rápida actividad, tales como MgCl_2 (Cloruro de magnesio) y CaCl_2 (Cloruro de calcio) (LIU y CHANG, 2003).

KAO *et al.* (2003), señalan que la solidez del quesillo elaborada con un 0,4% $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, presenta una estructura más uniforme y continuo, obteniendo el máximo rendimiento, solidez y recuperación de proteínas, y la mejor capacidad de retención de agua. Generalmente el cloruro de calcio y el cloruro de magnesio resultan en un cuajo más duro y frágil que el cuajo a partir del sulfato de calcio o magnesio. Esto sugiere que los aniones tienen un efecto más fuerte en cuanto a capacidad de retención de agua que los cationes.

Por otro lado SUN y BREENE (1991), indican que el coagulante más elegido entre los elaboradores del tofu es el sulfato de calcio, por la firmeza apropiada que le entrega al tofu, también se puede utilizar la Gluconodelta lactona (GDL) para hacer un tofu suave, pero no es apropiado para la firmeza. Ambos autores que realizaron experimentos con distintas concentraciones de calcio, concluyendo que en una concentración de 0,02 N se obtiene un óptimo en rendimiento y firmeza.

Existen métodos para la determinación óptima de la concentración de coagulantes tales como la luz de transmitancia (%T) del suero, volumen de suero y rendimiento del producto son medidos después de completada la coagulación. La transparencia del método (la precisión) también requiere que el suero este libre de partículas coaguladas para la reproducibilidad (SUN y BREENE, 1991).

Tanto el tipo de coagulante, como la concentración de este afectan la naturaleza del producto. La cantidad de coagulante adicionado en la elaboración del quesillo es uno de los puntos críticos de control, y determina crucialmente la textura del producto, sabor y rendimiento (LIM *et al.*, 1990).

Shurtleff y Aoyogi (1979), citados por MOIZUDDIN *et al.* (1999), indicaron que una buena coagulación de la leche de soya ocurre cuando la cuajada se ha

separado y ha llegado a estar por fuera de los bordes de la vasija donde se produce la coagulación.

2.3.3 Adición de microorganismos probióticos como bacterias beneficiosas para el organismo humano. En años recientes los alimentos han vivido importantes repuntes en el número de investigaciones encaminadas a mejorar la nutrición humana, y uno de sus efectos más notables es el volumen cada vez mayor de nuevos alimentos y complementos disponibles en el mercado.

Generalmente estos alimentos se agrupan en cuatro categorías, dependiendo de la acción que generan:

Funcionales: Son preparaciones que, debido a las sustancias que contienen, generan efectos positivos en la salud mas allá de sus efectos nutricionales. Como ejemplo se puede citar la carne de pescado, que contiene ácidos grasos omega-3, los cuales estimulan las defensas de la mucosa intestinal y reducen padecimientos del sistema circulatorio (SALMINEM *et al.*, 1998).

Dentro de los alimentos funcionales están los alimentos probióticos, los cuales son modificado por la adición de bacterias probióticas, estos alimentos son generalmente productos fermentados (MOLIN, 2001).

Probióticos: Se considera alimento probiótico aquel que contiene bacterias vivas que permanecen activas en el intestino, que no causan enfermedades y ejercen importantes efectos fisiológicos ya que al ser ingeridos en cantidades suficientes, tienen efecto muy beneficioso, contribuyendo al equilibrio de la flora intestinal y a potenciar el sistema inmunológico (SCHREZENMEIR *et al.*, 2001 y COLLINS *et al.*, 1999).

Prebióticos: Son fibras o ingredientes no digeribles que estimulan la actividad de bacterias benéficas ya existentes en el intestino grueso, de modo que aunque no son aprovechados por el ser humano le ayudan indirectamente. Entre ellos están todos los productos elaborados con harinas integrales. Esta selectividad fue demostrada para *bifidobacteria*, la cual puede ser promovida por la ingestión de sustancias tales como fructooligosacáridos e inulina (SCHREZENMEIR *et al.*, 2001 y COLLINS *et al.*, 1999).

AKALM *et al.* (2004), concuerdan con lo mencionado anteriormente, demostrando que la viabilidad de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium animalis* en yogurt almacenado a 4°C, con 2% de fructooligosacáridos es más alta que el control sin este prebiótico.

Simbióticos: Se obtienen de la combinación de alimentos probióticos y prebióticos (SCHREZENMEIR *et al.*, 2001 y COLLINS *et al.*, 1999).

2.3.3.1 Bacterias probióticas. Por definición, son un grupo de microorganismos que logran sobrevivir al paso por el tubo digestivo y que tienen efectos benéficos para la salud del ser humano. Entre ellas, las más utilizadas y mejor estudiadas son *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* (VANDERHOOF, 2001).

Para GIBSON y ROBERFROID (1995), bacterias probióticas se definen como “microorganismos vivos que tras ser ingerido en cantidad suficiente ejercen un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales”.

Las bacterias probióticas, usadas comúnmente son del género: ***Lactobacillus***, ***Bifidobacterium*** y ***Saccharomyces***, particularmente, las especies *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. Longum*, *B. Breve*, *B. Bifidum* y *S.*

Cerevisiae boulardii (BOURLIOUX *et al.*, 2003). A continuación se presentan en el CUADRO 9 bacterias probióticas de acuerdo a su género.

CUADRO 9. Ejemplos de bacterias utilizadas como probióticas.

Bacterias probióticas (género)		
<i>Lactobacillus</i>	Gram – positivo cocos	<i>Bifidobacterias</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. casei</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>B. animalis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>S. diaacetylactis</i>	<i>B. infantis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. curvatus</i>		<i>B. thermophilus</i>
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. plantarum</i>		

FUENTE: COLLINS y GIBSON (1999).

2.3.3.2 Características generales de las bacterias probióticas. Una característica de los microorganismos considerados probióticos es que son bacterias aisladas del tracto intestinal de un individuo saludable e introducido nuevamente en el intestino, generalmente por algún tipo de vehículo alimenticio (Spanhaak *et al.*, 1998 citados por AMORES *et al.*, 2004).

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).

Según COLLINS y GIBSON (1999), una bacteria para ser considerada como probióticas debe:

- Poder digerirse en la alimentación.
- Estar presentes en células vivas, preferentemente en cantidades importantes antes de la ingestión.
- Ser estable y viable durante toda la vida útil del producto.
- Ser beneficiosa para la salud del huésped.

2.3.3.3 Acción y efectos de las bacterias probióticas en el organismo. Los principales mecanismos de acción de las bacterias probióticas incluyen la inhibición competitiva para la adhesión de bacterias, síntesis de compuestos que inhiben los patógenos y la estimulación de la respuesta inmune a través de la mejora de la barrera intestinal, es decir, mejorando la permeabilidad y estimulando la respuesta intestinal. Otros efectos que se han atribuido se relacionan con disminución de la inflamación intestinal y de las reacciones de hipersensibilidad (ISOLAURI *et al.*, 2001).

Los nutrientes están presentes en cantidades limitadas en el intestino, al ser consumidos por las bacterias beneficiosas (bacterias probióticas) entonces disminuyen la probabilidad de desarrollo y crecimiento de agentes patógenos, limitando así su proliferación. También pueden llegar a producir una disminución en la concentración de lactosa en la leche fermentada por la actividad de la lactasa bacteriana durante la fermentación (Famuralo *et al.*, 1999 citado por AMORES *et al.*, 2004).

Según SCHREZENMEIR y De VRESE (2001), los efectos saludables atribuidos al uso de probióticos son numerosos, y entre ellos se puede mencionar:

- Disminución de la frecuencia y duración de la diarrea asociada al uso de antibióticos, infección por rotavirus y quimioterapias.

- Estimulación de la inmunidad humoral y celular.
- Disminución de metabolitos desfavorables como amonio y enzimas procancerígenas en el colon.
- Reducción de infecciones por *Helicobacter pylori*.
- Reducción de síntomas alérgicos.
- Alivio de constipación y del síndrome de colon irritable.
- Efectos beneficiosos en el metabolismo mineral.
- Prevención de cáncer y reducción de lípidos plasmáticos.

Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos no solo 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 obstrucción estérica o de bloqueo específico del receptor, con lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión (Chauviere *et al.*, 1992 citado por AMORES *et al.*, 2004).

Los probióticos son usualmente utilizados en el tratamiento y prevención de algunos desordenes inflamatorios en el tracto intestinal. Las especies utilizadas son el *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum*, estas fueron probadas en ratas para tratar una enterocolitis inducida en ellas (Mao *et al.*, 1996 citado por VANDERHOOF, 2001).

Para que los probióticos actúen en la flora intestinal es necesario una ingesta mayor o igual a 10^7 cel/g (Morean *et al.* y Cebra, citados por BOURLIOUX *et al.*, 2003). Por otro lado VINDEROLA *et al.* (2000), señala que la ingesta diaria debe ser mayor a 100 gramos de producto que contengan 10^6 cel/g de bacterias 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.

Por otro lado, los probióticos producen numerosas sustancias antimicrobianas específicas, como las bacteriocinas, ácidos grasos volátiles de cadena corta, peróxido de hidrógeno y ácido láctico (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*), por lo que se reduce el pH luminal; éste es considerado el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas como la E. Coli, Streptococcus y Salmonella (Fonds *et al.*, 2000 citado por AMORES *et al.*, 2004).

2.3.3.4 *Lactobacillus*, característica del género. Según FRAZIER (1972) los *lactobacillus* son bacilo microaerófilos, Gram positivo y catalasa negativos, estos organismos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. GOMES y MALCATA (1999), señalan que son microorganismos inmóviles, no esporulados, 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.

La clasificación de los lactobacilos se ha basado en la fuente de donde se aislaron y de los productos que se obtienen de la fermentación. Estos se dividen en dos grupos:

- ***Lactobacillus* homofermentativos**, los cuales dan lugar a ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. Este grupo está integrado por *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus bulgaricus*, entre otros.
- ***Lactobacillus* heterofermentativos**, estos producen además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y otros productos volátiles. Morfológicamente, algunos bacilos son bastones delgados y largos; otros algo

parecidos al colibacilos, pero, por el contrario de este, todos son gram positivos, casi todos son inmóviles, pero se han señalado excepciones (ALAIS, 1985).

2.3.3.5 *Lactobacillus casei shirota*. En el año 1930 el doctor Minori Shirota aisló, a partir del intestino humano *lactobacilos*, y después de varias investigaciones y selecciones logro fortalecerlos, haciéndolos resistentes a los jugos gástricos y biliares. Siendo este un bacilo que puede sobrevivir en el tracto digestivo e inhibir el crecimiento de bacterias nocivas¹. Son bacilos cortos en cadenas cortas o largas con bordes enteros, gram positivas, su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y la máxima varía entre 37 y 40°C, en algunos casos se desarrolla hasta los 45°C, y su mínima de sobrevivencia puede llegar hasta los 10°C (ALAIS, 1985).

2.3.3.6 *Bifidobacterium*, características del género. Tissier describe por primera vez en 1900 las *bifidobacterias*, son aisladas del intestino de recién nacidos. Son bacterias gram positivas, catalasa negativo, no forman esporas, son estrictamente anaeróbicas. Su temperatura óptima de crecimiento es entre 37°C y 41°C (alcanzando una mínima de entre 25°C a 28°C y una máxima que fluctúa entre los 43°C a 45°C) y su pH óptimo esta entre los 6,5 -7,0 (límite inferior entre 4,5-5,0 y un límite superior 8,0-8,5). Degrada exclusivamente la glucosa y produce ácido acético y ácido láctico en una proporción de 3:2 respectivamente (Scardovi 1986, citado por ROY, 2001).

CASTILLO (2005), señala que estos microorganismos son de forma de bastón delgado con extremos algo más ahusados y generalmente bifurcados; cuando está recién aislado presenta con frecuencia engrosamientos terminales. Los bacilos, que jamás se presentan en cadenas, a lo sumo en parejas, son bastantes delgados y miden 2 – 8 µ de largo. Las colonias, que son pequeñas,

¹ www.yakuleurope.com

son sobre todos colonias S ligeramente irregulares. Se ha obtenido en mayor cantidad de las heces de lactantes alimentados con leche materna.

Mitsuoka (2000), citado por ROY (2001), reporta *bifidobacterium* constituye alrededor de un 5-10% del total de la flora que coloniza el intestino en niños y adultos, estas se encuentran en mayor proporción en niños y va disminuyendo con la edad, debido principalmente a los cambios en los hábitos alimentarios.

Entre los principales beneficios atribuidos a las *bifidobacterias*, esta la inhibición de bacterias patógenas, disminución de riesgos de cáncer al colon, aumento de la absorción de calcio y de la síntesis de vitaminas. (Mitsuoka, 1990; Gibson y Roberfroid, 1995; Kailasapathy y Rybka, 1997; Tannock, 1999, citados por AKALM *et al*, 2004)

En cuanto a los medios para el crecimiento óptimos para el *Bifidobacterium* Gómez *et al.* (1998), citado por FLORES (2003), indican a la leche como medio óptimo, por que contiene todos los nutrientes esenciales para el desarrollo de este microorganismo probiótico, aunque no siempre aquellos existen en formas aceptables o en concentraciones óptimas. En efecto, estos autores agregan que varios aminoácidos son estimulantes y esenciales para el crecimiento de *bifidobacterias* como son arginina, ácido glutámico, isoleucina, leucina, triptófano, tirosina, cisteína y valina, están presentes en cantidades insuficientes o en estado péptido de bajo peso molecular. Por consiguiente, la disponibilidad de nitrógeno limita el crecimiento.

2.3.3.7 *Bifidumbacterium lactis*. BARON *et al.* (2000), señala que este microorganismo produce ácido, principalmente láctico, a partir de muchos azúcares y se considera como una especie de *Lactobacillus* por producir además acetaldehído, diacetilo y etanol sin la generación de CO₂. 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 estricto llamado *Bifidobacterium*.

Este cultivo termófilo, se aplica principalmente en la elaboración de productos lácteos (fermentados o dulces). Tiene una sensibilidad salina al 2,5% NaCl de un 50% de inhibición y con un 3,0% de un 100% inhibición (HANSEN, 2005).

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Lugar de trabajo

El experimento se realizó en la planta piloto y en los laboratorios de microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), ambas son dependencias de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile (UACH), ubicada en la ciudad de Valdivia.

3.2 Cepas utilizadas

Los microorganismos utilizados correspondieron a cultivos liofilizados del tipo DVS, de *Lactobacillus casei shirota*, producido por la empresa Vivolac y *Bifidobacterium lactis* Bb 12, producido por la empresa Chr. Hansen's Inc.

3.3 Activación de las cepas

El proceso de elaboración del quesillo de leche de soya parte primeramente con la activación de las cepas, para ello se realizó la reconstitución de la leche de soya con agua previamente hervida; una vez diluida se trató térmicamente a 143°C por 60 s (esto se realizó el día anterior a la incorporación de las cepas), posteriormente fue separada en 4 frascos con 20 ml de leche de soya cada uno. Finalmente fue almacenada a 5°C.

Se activó cada una de los microorganismos adicionando 0,1 g de cultivo liofilizado en 20 ml de leche de soya previamente esterilizada. Para facilitar la activación de los cultivos liofilizados, se adicionó a dicha leche una cantidad de

0.5% de L- cisteína- HCl (Riedel de Haen AG, Hannover), es decir, se agregó 0,1 ml, esto con el fin de disminuir el potencial de oxido-reducción del medio y así estimular el crecimiento de los microorganismos; además de 0,5% de glucosa (0,1 ml) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona), y 0,25% de extracto de levadura (0,05 ml) (Difco Laboratories Inc. Detroit).

Finalmente, las cepas fueron incubadas a su correspondiente temperatura, *L. casei shirota* a $32^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y *B. lactis* a $38^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$; ambas cepas tardaron alrededor de 16 h en activarse.

3.4 Elaboración quesillo de soya

Las muestras de quesillo de leche de soya que fueron motivo de estudio son 3, las cuales contenían:

- a) *L. casei shirota* al 2%
 - b) *B. lactis* al 2%
 - c) *L. casei shirota* 2% y *B. lactis* al 2%
- **Reconstitución de la leche de soya:** para el experimento se prepararon 3 muestras de 1000 ml cada una de leche de soya reconstituida (120 g de leche de soya en polvo, reconstituida en 1000 ml de agua) al 12% de sólidos totales.
 - **Pasteurización:** tratamiento térmico aplicado para disminuir la carga microbiana inicial, 70°C / 20 min.
 - **Almacenamiento:** la leche reconstituida fue almacenada a 5°C por 24 h, con el fin de obtener mayor homogeneidad en la leche.

- **Calentamiento en baño termoregurable:** la leche se colocó en un baño de agua hasta que alcanzó 35°C.
- **Agregado de cultivos probióticos:** una vez activadas las cepas estas fueron inoculadas en la de leche de soya.
- **Agregado de sal coagulante:** se agregó 3,45 g de la sal coagulante (representa el 0,3% del total de los componentes), previamente diluida en 10 ml de agua destilada. La sal utilizada fue cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- **Incubación:** la leche fue incubada a 35°C por un espacio de tiempo de 90 minutos.
- **Desuerado:** después de que ocurre la coagulación de las proteínas de la leche de soya se realizó el desuere, esto se hizo pasando la leche coagulada por un cedazo, luego se colocó un peso para facilitar el desuerado, lo cual tardó 2 horas a una temperatura regulada de alrededor de 20 – 25° C
- **Envasado:** el producto fue finalmente moldeado en un envase de plástico.
- El producto una vez envasado se almacenó a 5°C.
- Durante los siguientes 10 días después de elaborado fueron analizadas para determinar la viabilidad de cada una de las cepas, tanto juntas como separadas.

El procedimiento antes descrito fue repetido en tres oportunidades.

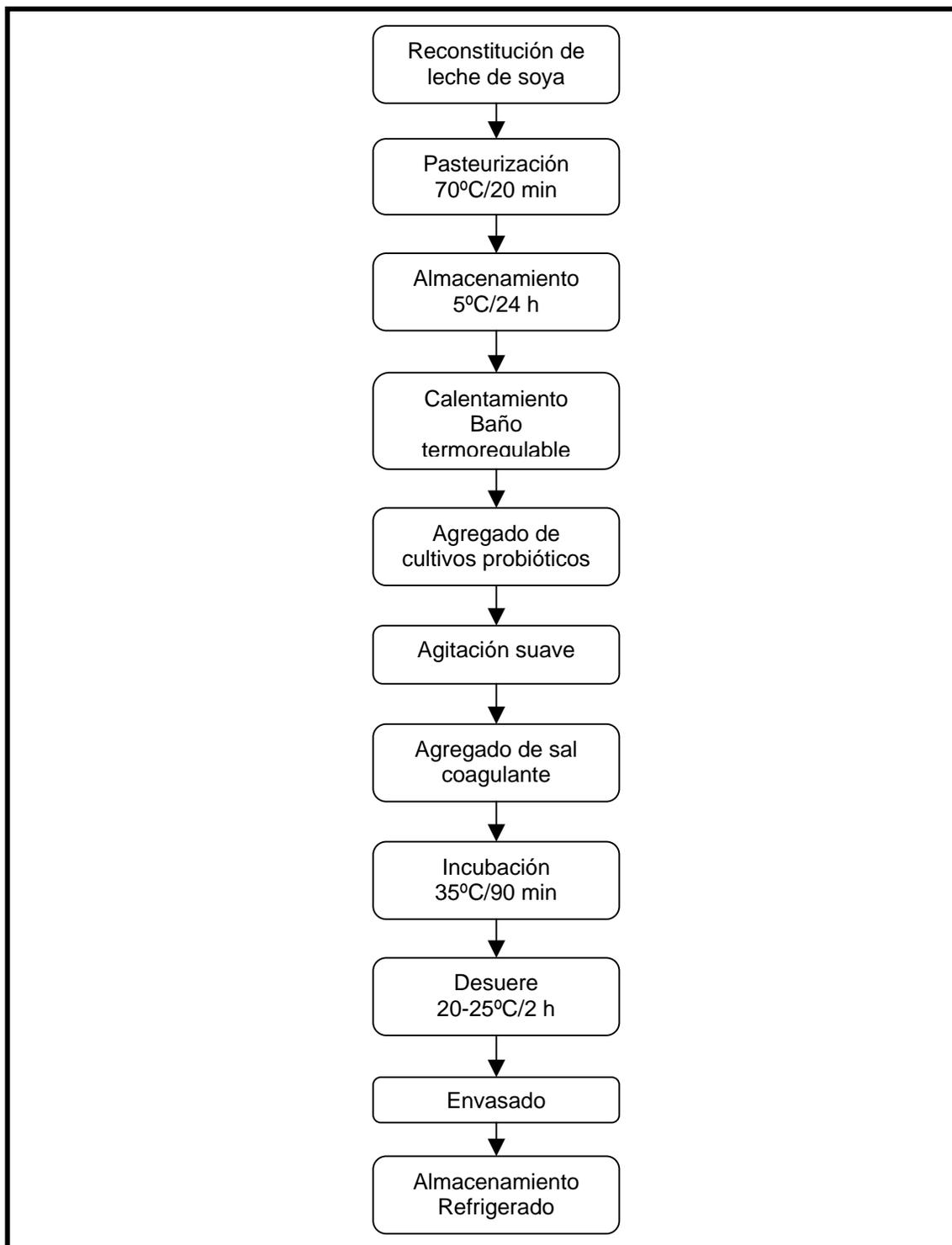


FIGURA 1. Diagrama de flujo de elaboración de queso de leche de soja.

3.4.1 Preparación de los medio de cultivo y de la dilución para el recuento de los microorganismos probióticos. Para el recuento de *Lactobacillus casei shirota* se utilizó un agar no selectivo, agar De Man, Rogosa y Sharpe (agar MRS). Este es uno de los medios que han sido señalados como adecuados para el crecimiento de dicho microorganismo (IDF/FIL, 1995).

Para *Bifidobacterium lactis* se utilizó el mismo medio que para *Lactobacillus casei shirota*. El agar MRS (Difco laboratories Inc., Detroit), se preparó disolviendo 70,3 g del polvo en suspensión en un litro de agua destilada, en frascos de vidrios de 500 ml, que una vez agitados y disuelto por completo el polvo en suspensión, fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Se utilizó agua peptonada 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 y en frascos de 90 ml, para finalmente ser esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Paralelamente para evaluar la higiene en la elaboración del producto, se preparó:

- Agar bilis rojo neutro cristal violeta para el recuento de Coliformes en placa. Se mezclaron 39,5 g en 1000 ml de agua destilada, se disolvió en horno microondas, luego se enfrió en baño de agua a 45°C antes de verter en las placas (siembra en profundidad).
- Agar Baird Parker para el recuento de *S. aureus*. Se usó un medio base que contenía 58 g en 950 ml de agua destilada, el cual se disolvió en microondas y se autoclavó por 15 minutos a 121°C. Una vez esterilizado, al medio base

se agregó una solución de yema de huevo al 50% y una solución de telurito de potasio ($K_2 TeO_3$) al 1%. (siembra en superficie)

- Agar papa dextrosa para el recuento de mohos y levaduras. Se mezclaron 39 g en 1000 ml de agua destilada y se disolvió en el microondas. Luego se esterilizó el medio en autoclave por 15 minutos a $121^\circ C$, se dejó enfriar en baño de agua para agregar ácido tártrico al 10% estéril obteniendo un pH de 3,5. (siembra en profundidad)

3.4.2 Muestreo y siembra de quesillo de leche de soya. Las siembras de las muestras de quesillo de leche de soya con bacterias probióticas se realizó en agar MRS, en donde se hicieron diluciones de hasta 10^{-6} , en siembra en superficie.

Para la realización de las siembras se comenzó con la toma de las muestras realizando una primera dilución, esta se hizo pesando en una bolsa “stomacher” 11 g de muestra y diluyéndola en 90 ml de agua peptonada y se agitó por 30 segundos a velocidad normal.

A partir de esta preparación se fue transfiriendo 1 ml a cada tubo que contenía 9 ml de agua peptonada, de esta manera se logro obtener las diluciones hasta llegar a la 10^{-5} . De las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} se tomaron 0,1 ml para la siembra en agar MRS y obtener así las siembras 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} respectivamente, sembrando la placa 10^{-6} en duplicado. (FIGURA 2)

Las placas de *Bifidobacterium lactis* fueron incubadas a $39 \pm 1^\circ C$, durante 72 horas, bajo condiciones de anaerobiosis (sistema Gaspak, BBL, Cockeyville, Maryland), y las placas de *Lactobacillus casei shirota* a $32 \pm 1^\circ C$ durante 72 horas, bajo condiciones de aerobiosis.

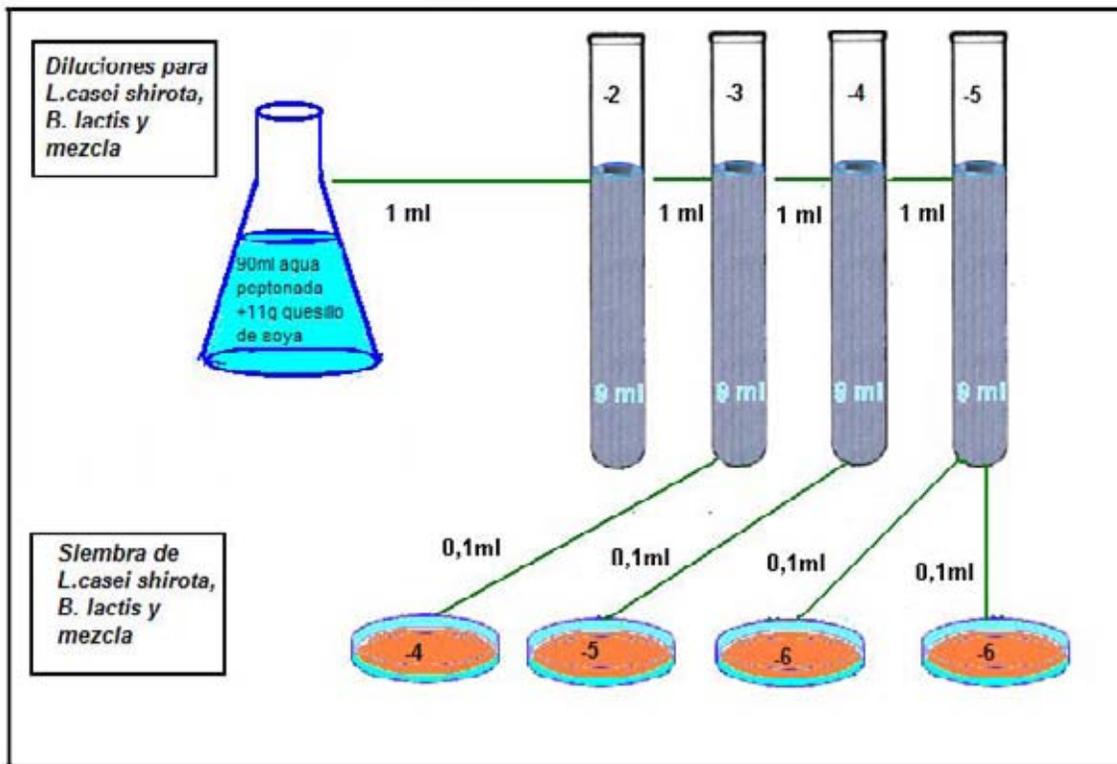


FIGURA 2. Esquema de siembra para *L. casei shirota*, *B. lactis* y mezcla.

Se tomó 0,1 ml de las diluciones 10^{-1} para sembrar en superficie y posteriormente fueron incubadas a 32°C por 48 h en agar baird parker para determinar la presencia o ausencia de *S. aureus*.

Se tomó 1 ml de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} para sembrar en profundidad en agar bilis rojo neutro cristal violeta para el recuento de coliformes, las placas se incubaron a 32°C por 48 h.

Para el recuento de mohos y levaduras se utilizaron las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , sembrando de la misma forma que se hizo para el recuento de coliformes, pero incubándola a 25°C por 5 días (FIGURA 3).

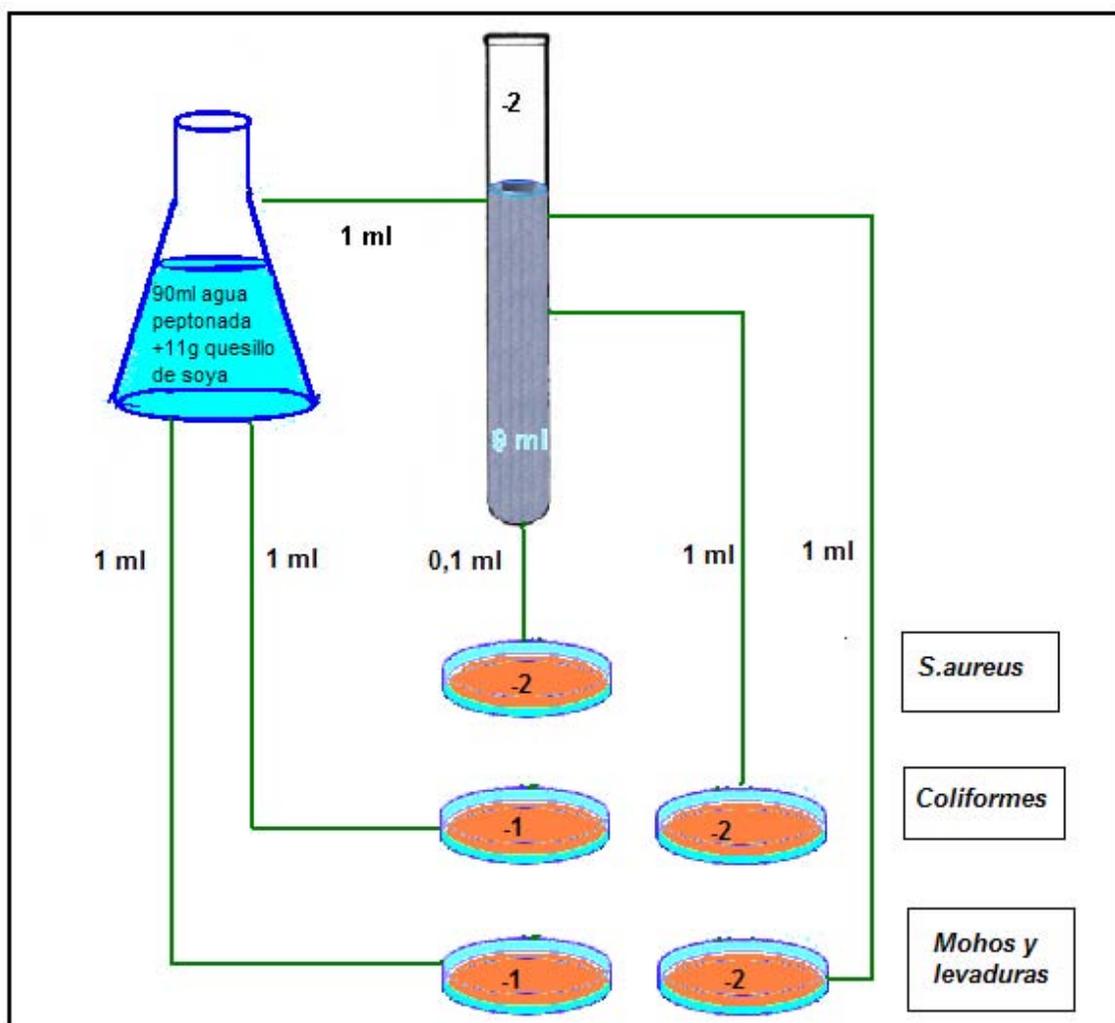


FIGURA 3. Esquema de siembra para recuento de *S.aureus*, coliformes, mohos y levaduras.

3.4.3 Frecuencia de muestreo. La frecuencia de muestreo fue de todos los días hasta el día 3, de ahí en adelante el muestreo se hizo en el día 6, 8 y 10 en el cual se realizó la siembra del queso de leche de soja en agar MRS.

3.4.4 Recuentos de bacterias probióticas. El recuento de las bacterias se realizó una vez incubadas, el *L. casei shirota* se incubó a 32°C por 3 días y el *B. lactis* fue a 39°C por 3 días.

La calidad higiénica se midió realizando recuentos de *Staphylococcus aureus* a 36°C por 48 h, de bacterias coliformes a 32°C por 48 h y mohos y levaduras a 25°C por 5 días.

3.5 Análisis químicos y microbiológicos

Al término del proceso de elaboración, se realizaron los siguientes análisis:

3.5.1 Determinación de pH del queso de soya. Mediante método potenciométrico, utilizando un pH-metro Radiometer, Copenhagen.

3.5.2 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.

3.5.3 Recuento de hongos y levaduras. Método según NCh 2734.of 2002. Productos hidrobiológicos –Determinación de hongos y levaduras-Técnica recuento en placa.

3.5.4 Recuento de coliformes. Método según NCh 2735/2.of 2001. Productos hidrobiológicos –Determinación coliformes. Parte 2: Técnica recuento en placa.

Todas las mediciones fueron realizadas en triplicado.

3.6 Evaluación sensorial del queso

Un panel de 8 jueces semientrenados fue constituido para la realización de la evaluación sensorial de las 3 muestras de queso de soya con probióticos. Se determinó la aceptabilidad del producto al segundo día de almacenamiento.

Las muestras fueron presentadas al azar, la evaluación se realizó en triplicado. La planilla de evaluación de aceptabilidad se presenta en el ANEXO 1.

En la presentación del panel, se colocaron 3 muestras de quesillo de soya en forma de cubos de un centímetro (10 g cada cubo), estos fueron presentados en platos blancos, etiquetados con 2 dígitos aleatorios.

3.7 Diseño experimental

Se empleó un diseño multifactorial categórico completamente aleatorizado, $3^1 \times 7^1$, siendo los dos factores los microorganismos probióticos utilizados, a tres niveles, que consistieron en *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* Bb12 puros y en la mezcla de ambos; el segundo factor fue el tiempo de almacenamiento a 7 niveles (0, 1, 2, 3, 6, 8 y 10 días), resultando un total de 21 tratamientos, cada uno de los cuales fue realizado en triplicado.

Para la evaluación sensorial se utilizó un diseño factorial simple, con un factor a 3 niveles, que correspondió a los dos microorganismos probióticos utilizados y su mezcla.

3.8 Análisis estadístico 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 comparación múltiple de Tukey al 95 % de confianza y se aplicó test de t-student para comparación de medias, además de métodos gráficos de representación de resultados. Para la evaluación sensorial, se realizó el test de Friedman. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics 5.1 plus.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Viabilidad de *Lactobacillus casei shirota*, *Bifidobacterium lactis* y mezcla de ambos durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C

En la FIGURA 4 se muestra la variación del logaritmo de la concentración de microorganismos probióticos (ufc/g) durante el almacenamiento del quesillo de soya. Se observa que el *Lactobacillus casei shirota* tuvo una mayor concentración durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C, en comparación con *Bifidobacterium lactis* y la mezcla de ambas bacterias probióticas.

El análisis estadístico por tiempo, arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de microorganismos, en el tiempo 0 y tiempo 1 (ANEXO 3), sin embargo durante el resto de los tiempos no se observaron cambios significativos en la cantidad de células viables para *L. casei shirota*, *B. lactis* y la mezcla de ambos probióticos (CUADRO 10).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), entre la concentración (log ufc/g) de las cepas de *L. casei shirota*, *B. lactis* y la mezcla, durante el periodo de almacenamiento a 5°C (ANEXO 2).

Se observó además, que no hubo una disminución significativa de la población microbiana en el tiempo de almacenamiento (ANEXO 4). No se encontró una influencia significativa de la interacción de ambos factores sobre la viabilidad de los microorganismos ($p > 0,05$) (ANEXO 2).

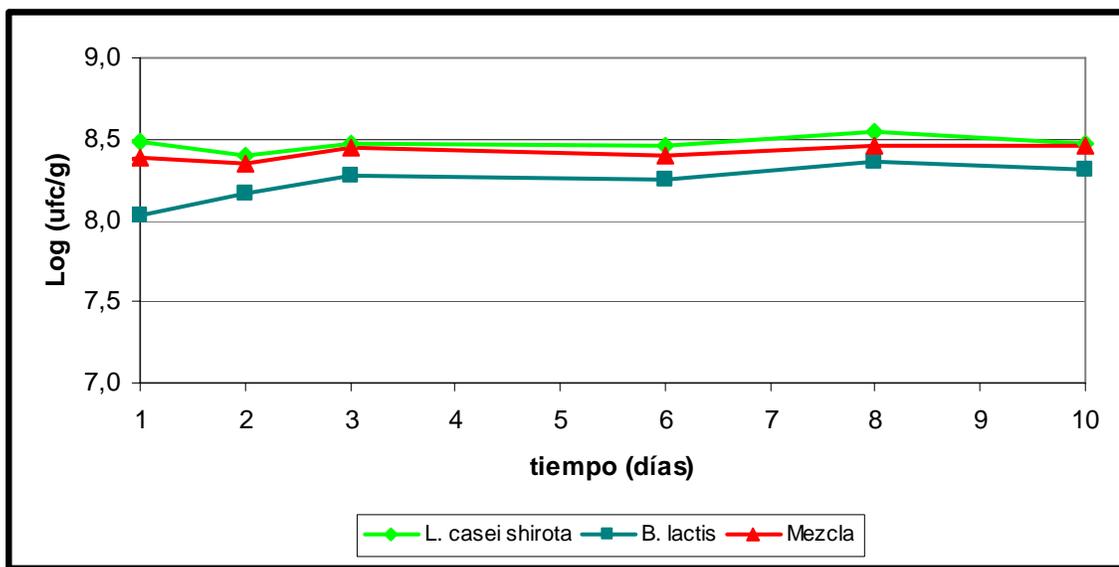


FIGURA 4. Cinética de crecimiento de los microorganismos probióticos en queso de soja, almacenado a 5 °C.

CUADRO 10. Viabilidad de *Lactobacillus casei shirota*, *Bifidobacterium lactis* y la mezcla durante el almacenamiento refrigerado a 5 °C.

M.O.	Tiempo de almacenamiento (días)						
	0	1	2	3	6	8	10
<i>L. casei shirota</i>	8,55±0,05a	8,49±0,02a	8,40±0,09a	8,47±0,15a	8,46±0,09a	8,55±0,08a	8,47±0,06a
<i>B. lactis</i> .	8,02±0,17b	8,03±0,14b	8,17±0,13a	8,28±0,09a	8,25±0,12a	8,36±0,15a	8,31±0,12a
<i>L. casei shirota – B. lactis</i>	8,28±0,07ab	8,39±0,12a	8,35±0,11a	8,44±0,09a	8,40±0,19a	8,45±0,06a	8,46±0,08a

* Letras diferentes entre filas indican diferencia significativa al 95% de confianza.

LIN *et al.* (2004), evaluaron la viabilidad de *Bifidobacterium longum*. y *Lactobacillus paracasei*, libres e inmovilizados en diferentes concentraciones, en una mezcla de leche (25%) y leche de soja (75%), almacenadas a 4°C por 14 días. Estos autores demostraron que *L. paracasei* obtuvo una mayor viabilidad que *B. longum* en la mezcla de las leches.

Estos resultados concuerdan con lo propuesto por GARRO *et al.* (1999), quienes reportaron que *Lactobacillus casei*, sobrevivía en mayor cantidad que y *Bifidobacterium longum*, en leche fermentada de soya, almacenada a 4°C por 28 días, según estos autores *Lactobacillus casei* presentó un incremento gradual, aumentando en 2 ciclos logarítmicos, en cambio *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus fermentum* se mantuvieron en el tiempo moderadamente (menor a 1 ciclo logarítmico).

Asimismo CHAMPAGNE *et al.* (1991), comprobó que el *Lactobacillus plantarum* se desarrolla en el tofu desde una concentración inicial de $6,3 \times 10^7$ ufc/g hasta $7,9 \times 10^8$ ufc/g, añadiendo que *L. plantarum* utiliza la estaquiosa, rafinosa y sucrosa de la soya como sustrato.

Estos resultados coinciden con lo obtenido en la presente investigación, puesto que ambos microorganismos se mantuvieron en el tiempo moderadamente, después de 10 días de almacenamiento del quesillo de leche de soya a 5 °C, siendo más optima la sobrevivencia de *L. casei shirota* que el de *B. lactis*.

Por otro lado, BADUI (1999), señala que la soya contiene oligosacaridos tales como estaquinosa (3,8%), rafinosa (1,1%) y sacarosa (4,5%), lo que indica que representan una fuente de nutrientes para las bacterias probióticas. Por su parte Gómez *et al.* (1998), citado por FLORES (2003), señalan que los aminoácidos son estimulantes para el crecimiento de *bifidobacterias*, ya que representan una excelente fuente de nitrógeno. En particular el IESN (2001) indica, que la leche de soya es un alimento con elevadas concentraciones de aminoácidos esenciales, principalmente de ácido glutámico con 18,53 g/100 g, ácido aspártico 13,95 g/100 g, arginina 10,95 g/100 g, leucina con 8,13 g/100 g, valina 5,08 g/100 g e isoleucina 4,77 g/100 g, lo que queda demostrado por la

sobrevivencia y el leve crecimiento de la población de las bacterias probióticas en el queso de soja durante 10 días a 5°C.

4.1.1 Evolución de las concentraciones de *Lactobacillus casei shirota*, *B. lactis* y mezcla de ambos en queso de soja almacenado a 5°C. En la FIGURA 5 se observa el comportamiento de *L. casei shirota* en el periodo de almacenamiento refrigerado, esta figura muestra una leve disminución de la concentración de este microorganismo en el tiempo, alcanzando al tiempo 0 una cantidad promedio de células de vivas de $3,58 \times 10^8$ ufc/g y al termino del periodo $2,98 \times 10^8$ ufc/g. Morfológicamente estas colonias se presentaron, en la placa de agar MRS, con un diámetro aproximado de 2 a 2,5 mm, de color blanquecinas, planas, opacas, con bordes irregulares y de consistencia cremosa.

La prueba de t-student, indico que no hubo una disminución significativa en las medias de *L. casei shirota*, entre el tiempo 0 y el tiempo 10 ($p > 0,05$), esto demuestra que el queso de soja es buena fuente de crecimiento de este microorganismo.

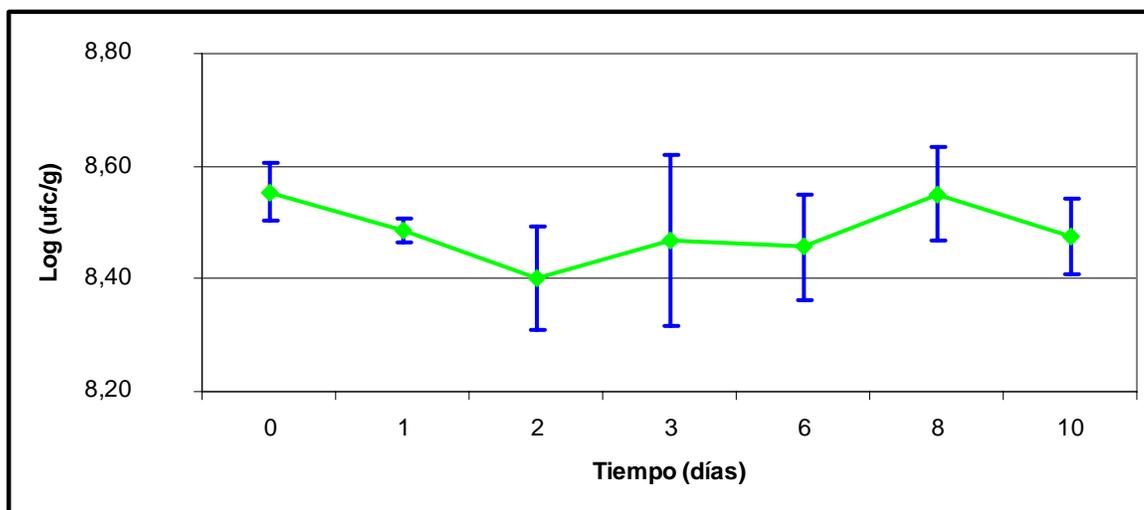


FIGURA 5. Evolución de la concentración de *Lactobacillus casei shirota* en queso de soja almacenado a 5 °C.

En la FIGURA 6 se observa el comportamiento de *B. lactis* en el periodo de almacenamiento refrigerado, esta figura muestra un leve aumento de la concentración de este microorganismo en el tiempo, alcanzando al tiempo 0 una cantidad promedio de células de vivas de $1,09 \times 10^8$ ufc/g y al termino del periodo $2,14 \times 10^8$ ufc/g. Morfológicamente estas colonias se presentaron, en la placa de agar MRS, con un diámetro aproximado de de 2 a 3 mm de diámetro, convexas, brillantes, con bordes lisos y de consistencia cremosa.

La prueba de t-student, señalo que no hubo un cambio significativo en las medias de *B. lactis* entre el tiempo 0 y el tiempo 10 ($p > 0,05$), esto demuestra que el queso de soja también es buena fuente de crecimiento para *B. lactis*.

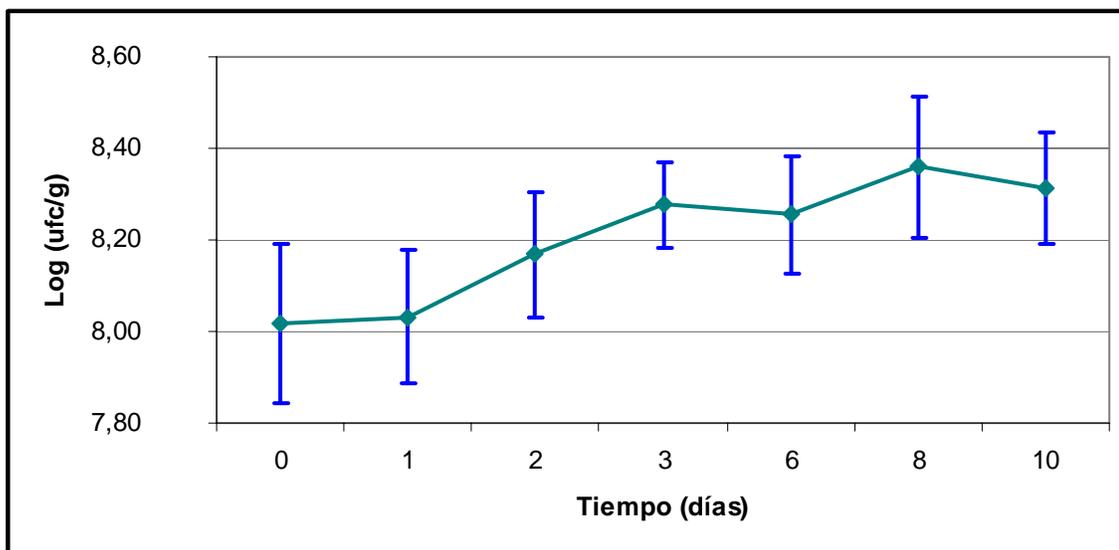


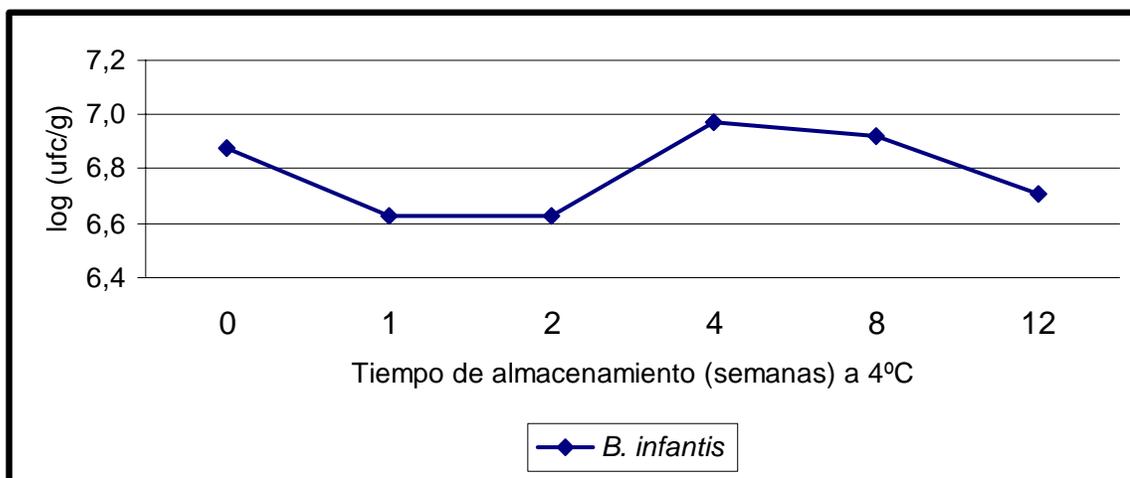
FIGURA 6. Evolución de la concentración de *Bifidobacterium lactis* en el queso de soja almacenado a 5 °C.

DAIGLE *et al.* (1999), observaron el comportamiento de *Bifidobacterium infantis* en queso cheddar con la adición de crema, almacenado a 4°C por 12 semanas con una concentración inicial de $7,5 \times 10^6$ ufc/g. Los resultados indicaron que al ser inoculado *B. infantis* en queso cheddar, presentó una excelente viabilidad durante el almacenamiento (FIGURA 7), alcanzando su crecimiento máximo durante la semana 4, es decir, al mes de la elaboración del producto, con una

concentración de $9,3 \times 10^6$ ufc/g, y llegando finalmente en el día 84 (semana 12) a tener una concentración de *B. infantis* de $5,1 \times 10^6$ ufc/g.

Similares resultados reportaron CHOU y HOU (2000), los cuales estudiaron la sobrevivencia de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium longum* en leche de soya sola y fermentada a dos niveles de temperaturas (5°C y 25°C), en el cual se concluyó que *B. infantis* era capaz de sobrevivir mejor a 5°C que a 25°C, es decir, esta bacteria a temperatura de refrigeración mantiene su crecimiento con una leve disminución (menos de un ciclo logarítmico), en cambio, a 25°C su población presenta una reducción en un ciclo logarítmico.

Estos valores concuerdan con lo obtenido en esta investigación, puesto que para *B. lactis* se observó un leve aumento, menos de un ciclo logarítmico después de 10 días de almacenamiento del quesillo de soya a 5 °C.



Elaboración propia a partir de datos entregados por DAIGLE *et al.* (1999).

FIGURA 7. Viabilidad de *Bifidobacterium infantis* en queso cheddar almacenado a 4°C.

La cinética presentada por *Bifidobacterium infantis* en queso cheddar es similar a la cinética presentada por *Bifidobacterium lactis* en la presente investigación, en donde el crecimiento en el tiempo no es constante, logrando así mantenerse en el tiempo.

La FIGURA 8 muestra el crecimiento de ambos microorganismos en la mezcla, se observa que el desarrollo de *L. casei shirota* en la mezcla fue mayor al de *B. lactis*. LIN *et al.* (2004), demostraron que el número de células viables de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* NTU101 y *Bifidobacterium longum* BCRC11847 en bebidas de soya fermentadas fue de $1,2 \times 10^9$ ufc/ml y $6,3 \times 10^8$ ufc/ml, respectivamente, después de 14 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración, en la FIGURA 9, queda claramente establecido que el comportamiento de ambas bacterias estudiadas por LIN *et al.*, (2004). Similar comportamiento se comprobó en la presente investigación.

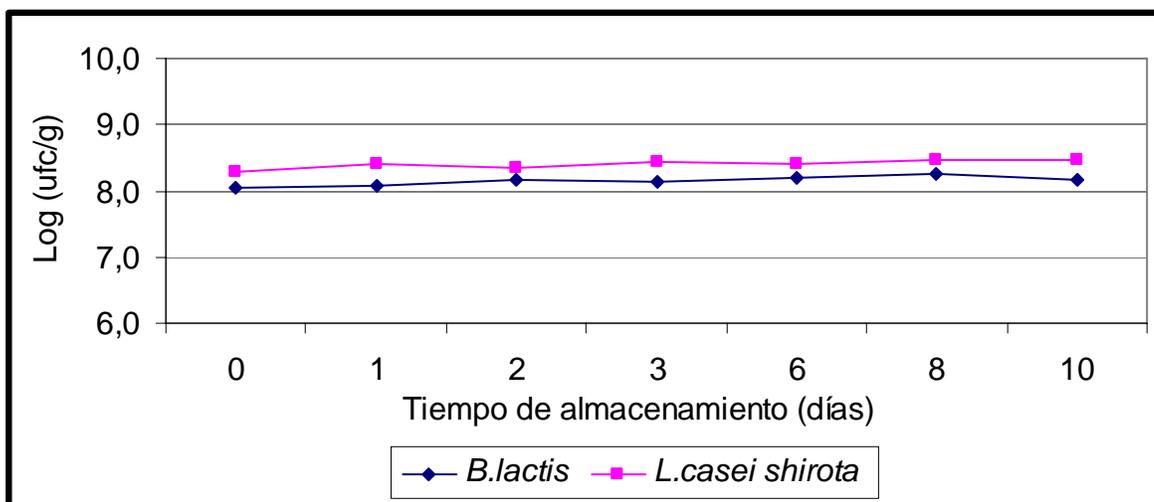


FIGURA 8. Evolución de la mezcla de microorganismos probióticos en el quesillo de soya almacenado a 5 °C.

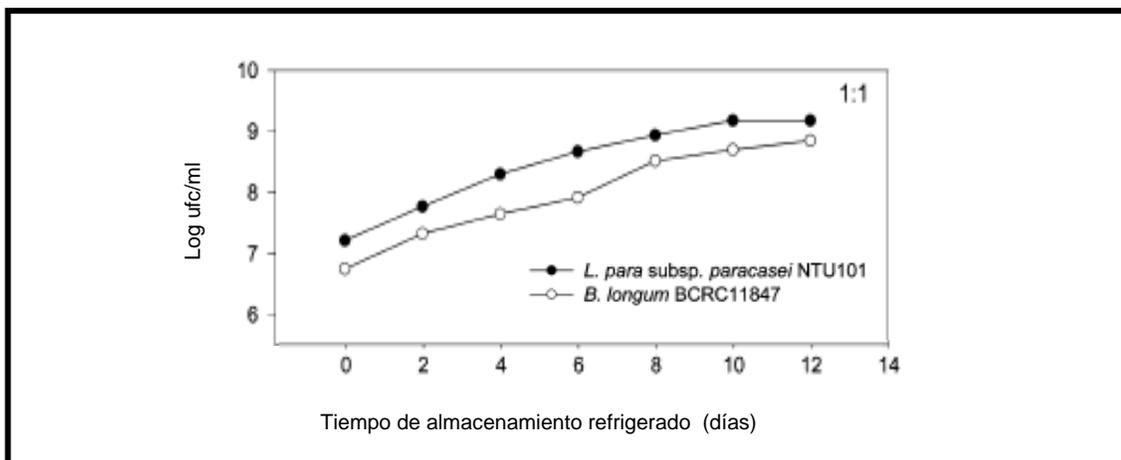


FIGURA 9. Concentración celular de *L. paracasei subsp. paracasei* NTU101 y *B. longum* BCRC11847 en mezcla de leche de vaca y leche de soya, inoculadas en relación 1:1.

FUENTE: LYN *et al.* (2004).

VINDEROLA *et al.* (2000), estudiaron la sobrevivencia de bacterias probióticas en queso fresco Argentino, reportando que especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus 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 al producto.

Estos resultados son similares a los encontrados en esta investigación, en la cual *Lactobacillus casei shirota* tuvo una nula disminución, en contraste con *Bifidobacterium lactis* el cual presentó un leve aumento, menor a un ciclo logarítmico. No obstante, la concentración de bacterias viables se mantuvo constante para ambos microorganismos.

4.1.2 Comportamiento de bacterias probióticas solas y en mezcla durante el almacenamiento a 5°C. La FIGURA 10 presenta el comportamiento de *L. casei shirota* sólo y en la mezcla, observándose que fue menor el crecimiento de éste microorganismo solo, comparado con el producto mezclado con *B. lactis*, sin embargo, la cantidad de células vivas fue mayor en *L. casei shirota*. El análisis estadístico por tiempo, arrojó que existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el inóculo solo y en mezcla, sólo al inicio del periodo de almacenamiento, no obstante durante el resto de los tiempos no hubo diferencias en la concentración del inóculo solo y en mezcla (ANEXO 5); sin embargo se observa igual cinética de crecimiento. Por otro lado, en la FIGURA 11, se presenta el comportamiento de *B. lactis* solo y en mezcla, observándose que el desarrollo al inicio fue igual hasta el tiempo 2, pero luego se ve un leve aumento en el crecimiento de *B. lactis* en mezcla. El análisis estadístico por tiempo arrojó que existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el inóculo solo y en mezcla sólo en el tiempo 3, sin embargo durante el resto del almacenamiento no se encontraron diferencias en la concentración del microorganismo probiótico (ANEXO 6).

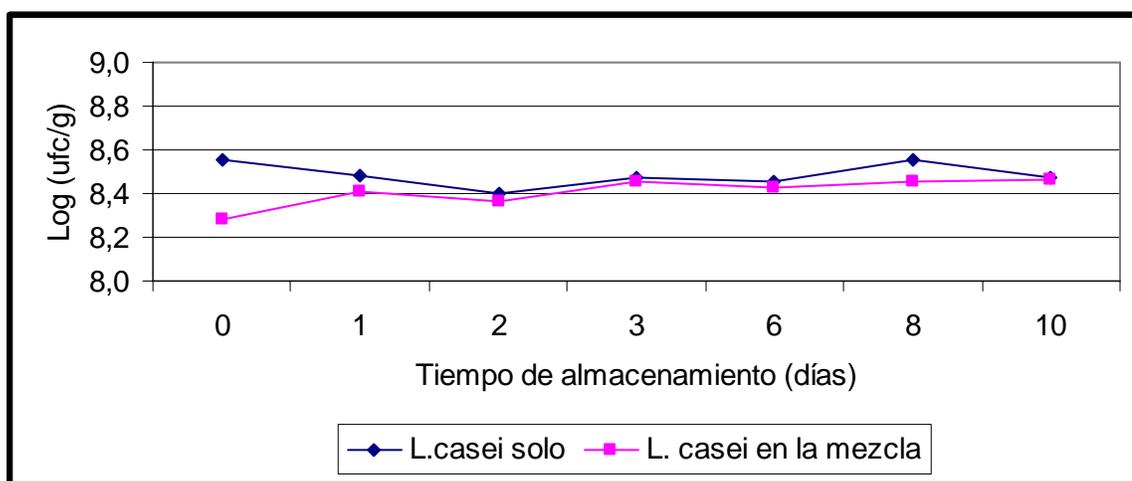


FIGURA 10. Evolución del comportamiento de *L. casei shirota* sólo y en mezcla.

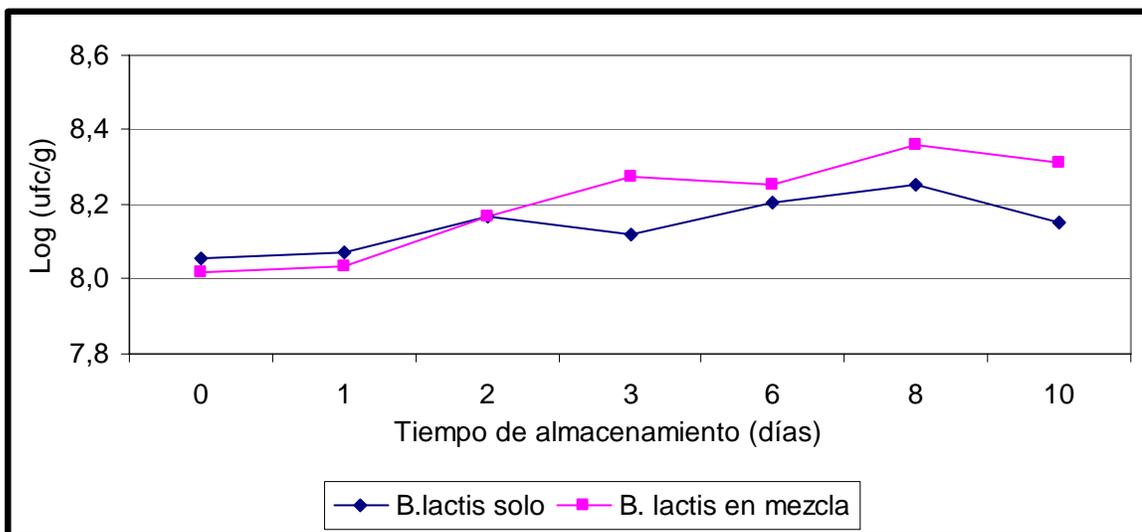


FIGURA 11. Evolución del comportamiento de *B. lactis* sólo y en mezcla.

Si bien, *L. casei shirota* crece mejor sólo que en mezcla, la disminución que sufre en el tiempo, no es significativa; sin embargo *B. lactis*, en mezcla crece levemente, en comparación a *B. lactis* sólo, pero aun así, el número de células viables sigue siendo mayor en *L. casei shirota*, considerando que al final del tiempo de almacenamiento, se obtuvo una concentración de $2,9 \times 10^8$ ufc/g para *L. casei shirota* sólo y $2,8 \times 10^8$ ufc/g en mezcla, en comparación a *B. lactis* que tuvo una concentración de $1,4 \times 10^8$ ufc/g sólo y en mezcla $2,5 \times 10^8$ ufc/g.

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con lo propuesto por THARMARAJ y SHAH (2004), estos autores estudiaron el comportamiento de diferentes mezclas de microorganismos probióticos en una base de queso, almacenada durante 10 semanas a temperatura de refrigeración. Las cepas estudiadas fueron *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei subs. paracasei*, *Bifidobacterium animalis*, las cuales fueron mezcladas entre si y con *Lactobacillus rhamnosus*, *P. freudenreichii*. Según los resultados obtenidos, estos autores concluyeron *L. paracasei subs. paracasei*, se desarrolló más solo que en conjunto con otras cepas, aumentando su población en un ciclo logarítmico, su concentración al tiempo

cero fue de $2,5 \times 10^7$ ufc/g y al tiempo diez alcanzo una sobrevivencia de $3,1 \times 10^8$ ufc/g de células viables, en conjunto mantuvo su desarrollo, llegando en combinación con *B. animalis* a $6,3 \times 10^7$ ufc/g, la misma concentración obtuvo con *B. animalis* más *L. acidophilus*. Por otra parte, *B. animalis*, obtuvo mayor concentración de células viables al ser mezclado con *L. rhamnosus* y *P. freudenreichii* ($1,0 \times 10^6$ ufc/g), seguido de la mezcla con *L. paracasei* subs.*paracasei* ($6,3 \times 10^5$ ufc/g) y el menor desarrollo lo logra solo en el queso ($1,0 \times 10^5$ ufc/g). *L. acidophilus* solo en el producto obtuvo la menor concentración ($6,3 \times 10^5$ ufc/g), y con la mezcla de varios microorganismos alcanzo una concentración similar de $2,5 \times 10^6$ ufc/g. Estos autores concluyen que la reducción de todas las poblaciones probióticas ocurre durante los periodos más altos de actividad metabólica, los cuales son los primeros seis días de almacenamiento del producto.

4.2 Análisis microbiológicos

Los indicadores microbiológicos dieron como resultado lo señalado en el CUADRO 11, como se aprecia, este producto cumple con los parámetros sanitarios establecidos para los quesillos, según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (CHILE, 1998).

CUADRO 11. Indicadores microbiológicos en quesillo de soya.

Análisis microbiológico	Día cero, 3 repeticiones (recuento ufc/g)		
	1º	2º	3º
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10	< 10	< 10
Hongos y levaduras	< 10	< 10	< 10
Coliformes	Negativo	Negativo	Negativo

4.3 Análisis químicos

Los valores de pH en el quesillos de soya, decayeron en todo los casos, presentando *L. casei shirota* y la mezcla una similitud en su disminución. En la FIGURA 12 se observa, a *L. casei shirota* con una baja de pH de 5,28 a 5,02 desde el tiempo cero al final de la refrigeración, manteniéndose levemente constante en el tiempo, la mezcla sufrió una disminución de 5,15 a 5,03. En *B. lactis*, el pH descendió desde 5,80 a 5,22.

GARRO *et al.* (1999), observó que durante el almacenamiento de leche de soya a 4°C por un tiempo de 28 días, en presencia de *L. casei* y *B. longum*, el pH decreció hasta 4,50 y 4,98 respectivamente al final del tiempo de almacenamiento. Esta investigación concuerda con el presente estudio, señalando que *L. casei* disminuyó más que *B. longum* en leche de soya, al igual que *L. casei shirota* con *B. lactis* en quesillo de soya.

CHUO y HOU (2000), señalaron que de acuerdo a su estudio sobre el crecimiento de *B. infantis* y *B. longum* en leche de soya, el pH disminuyó durante las 48h de incubación a 37°C, el pH inicial para ambos casos fue de 6,50. En el caso de *B. infantis* este pH decreció a las 24 h y 48 h a 6,33 y 4,63 respectivamente. En cambio *B. longum* presento una leve disminución en ambos tiempos, en el primero llego a 6,13 y al final de la incubación a 6,10.

Por otro lado, estos mismos autores evaluaron además del crecimiento, la sobrevivencia de estas bacterias probióticas en leche de soya fermentada por un espacio de tiempo de 10 días a 5°C y a 25°C, demostrando que en ambos casos existía una leve disminución del pH. *B. infantis* a 5°C presentó una disminución de pH de 4,90 en el tiempo 0 a 4,85 en el tiempo 10 y a 25°C el pH decayó de 4,90 a 4,78. Por su parte *B. longum* a 5°C presento una baja de pH de 6,38 a 6,36 y a 25°C su cambio fue de 6,38 a 6,32.

De acuerdo a lo señalado anteriormente se puede afirmar que *B. lactis* y *L. casei shirota*, presentan similitud con las investigaciones descritas antes, aunque no coincidan exactamente los resultados.

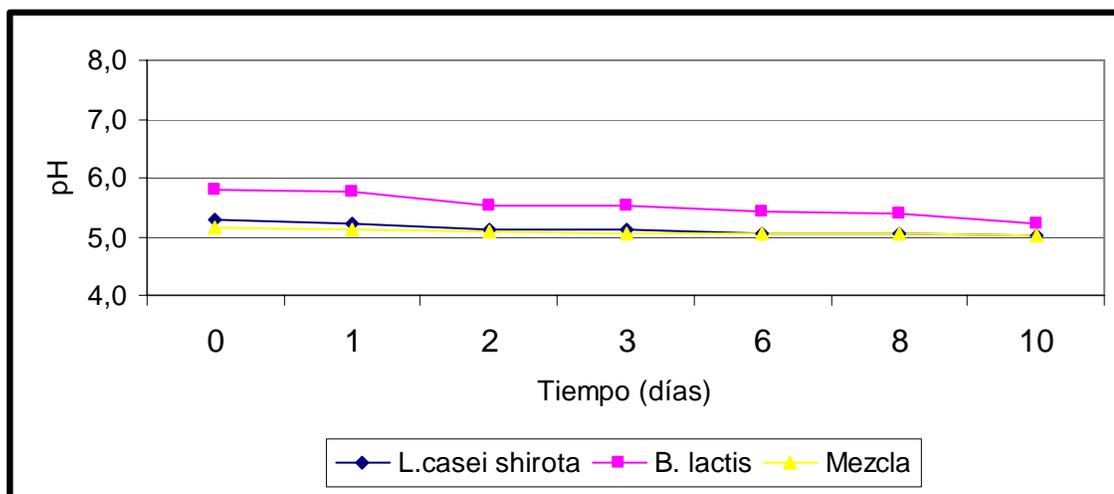


FIGURA 12. Evolución del pH en el tiempo de almacenamiento por acción de microorganismos probióticos en quesillo de soya.

THARMARAJ y SHAH (2004), en sus estudios realizados sobre la viabilidad de varias bacterias probióticas en una base de queso almacenado a temperatura de refrigeración por 10 días, informan que *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* presenta una disminución leve de pH en comparación a *Bifidobacterium animalis*, ambos parten al tiempo cero con un pH de 6,4, pero al final del periodo de almacenamiento alcanzan un pH de 6,2 y 5,5 respectivamente, lo que demuestra que el descenso de pH es mayor en *B. animalis* que el de *L. paracasei*, al igual que en la presente investigación.

4.4 Evaluación sensorial del quesillo de soya con probióticos

En el CUADRO 12 se observa los resultados entregados por el panel sensorial, en el atributo aceptabilidad.

CUADRO 12. Resultados entregados por el panel sensorial.

Microorganismo	Puntaje*
<i>Lactobacillus casei shirota</i>	5 ± 1,3a
<i>Bifidobacterium lactis</i>	4 ± 0,6b
<i>L. casei shirota</i> y <i>B. lactis</i>	5 ± 1,1a

* Promedio de tres repeticiones

El análisis estadístico demostró que existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntajes entregados para ambos microorganismos y la mezcla; siendo el puntaje menor entregado para *Bifidobacterium lactis* (ANEXO 7).

TORREZ-PENARANDA *et al.* (1998), realizaron un panel de evaluación sensorial en quesillo y leche de soya con y sin lipoxigenasa, para comparar aromas, sabores, texturas, entre otros parámetros. Los panelistas entrenados consistían en 3 grupos de 32 para leche de soya y 29 para tofu, los cuales eran chinos, japoneses y americanos. Estos autores concluyeron que las diferencias culturales pueden influir en las respuestas de aceptación o de rechazo en los productos a base de soya, con o sin lipoxigenasa, sin embargo a pesar de esto, el quesillo y la leche de soya con y sin lipoxigenasa presentaron una buena aceptación por parte de los jueces, concordando con lo encontrado en esta investigación por la aceptación obtenida para los quesillo de leche de soya.

KIM y HAN (2002), evaluaron mediante un panel sensorial las características físico- químicas y la microestructura del tofu, influenciada por la alta viscosidad del coagulante. Estos autores señalan que el tofu empleado en el panel fue refrigerado previamente a 4°C por 30 min, y cortados en 3x4x1cm, todas las muestras fueron servidas en placas petri, utilizando 3 dígitos aleatorios para la identificación. Se entreno a 10 panelistas estudiantes de U.S.A. Los atributos evaluados fueron aroma, textura, apariencia y calidad general. Ellos concluyeron que no existieron diferencias significativas entre el control y el tofu

con diferentes concentraciones del coagulante, aceptando el producto, al igual que los resultados entregados por el panel semientrenado de la presente investigación en donde el promedio de nota varió entre, me gusta levemente (5,0) y no me gusta ni me disgusta (4,0).

5. CONCLUSIONES

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

Lactobacillus casei shirota tuvo una mayor concentración durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C, en comparación con *Bifidobacterium lactis* y a la mezcla de ambas bacterias probióticas.

Estadísticamente no existen diferencias significativas entre las cepas juntas y por separadas, lo que nos lleva a concluir que cualquiera de las tres opciones es válida para el producto.

La viabilidad de las cepas separadas o mezcladas, en el tiempo se mantiene constante, en el caso de *Lactobacillus casei shirota* su disminución durante el periodo de almacenamiento es nula y el desarrollo de *bifidobacterium lactis* es menor a un ciclo logarítmico.

El análisis sensorial demostró aceptabilidad, por parte de los jueces, para los tres tratamientos aplicados en el quesillo de soya.

Las bacterias probióticas son capaces de sobrevivir tanto juntas como por separadas en el quesillo, demostrándose que por su concentración en el tiempo, *Lactobacillus casei shirota* es el microorganismo probiótico que mejor se mantiene en el producto, por otra parte es el que logra una mayor aceptabilidad por parte de los jueces tanto solo como mezclado.

6. RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la viabilidad de dos bacterias probióticas, *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis*, en quesillo de leche de soya, tanto juntas como por separadas. Para el cumplimiento de dicho objetivo, se formularon 3 tratamientos diferentes. En el tratamiento 1 se inoculó *Lactobacillus casei shirota*, el tratamiento 2 con *Bifidobacterium lactis*, y el tratamiento 3 con la mezcla de ambas bacterias probióticas. La mezcla de ambos microorganismos fue de 1:1. El inóculo para cada uno de las formulaciones fue de 2%. Los productos se almacenaron a 5°C por 10 días. Para el recuento e identificación de las cepas utilizadas, el quesillo de leche de soya fue sembrado en agar MRS. El quesillo de soya, con *Lactobacillus casei shirota* presentó una concentración final de $2,98 \times 10^8$ ufc/g, con *Bifidobacterium lactis* alcanzó una concentración de $1,4 \times 10^8$ ufc/g y en la mezcla de ambos, se obtuvo $2,8 \times 10^8$ ufc/g y $2,5 \times 10^8$ ufc/g respectivamente. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) para los microorganismos y la mezcla de ambos en el tiempo, del mismo modo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), durante el periodo de almacenamiento a 5°C. Para *L. casei shirota* el análisis estadístico arrojó que existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el inóculo solo y en mezcla, al inicio del periodo de almacenamiento, no obstante al tiempo 10 no hubo diferencias entre la concentración solo y en mezcla. Para *B. lactis* el análisis estadístico arrojó que no existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el inóculo solo y en mezcla al inicio del periodo de almacenamiento, sin embargo al tiempo 3 hubo diferencias entre las concentración durante su desarrollo solo y en mezcla. A pesar de lo señalado anteriormente, se observa igual cinética de crecimiento, para ambos microorganismos, tanto juntos como por separado.

SUMMARY

This research had as the objective of determining the viability of two probiotic bacteria, *Lactobacillus casei shirota* and *Bifidobacterium lactis* in soy bean cheese, acting together or separate. To accomplish the objective a statistical design considering three treatments was carried out. In treatment 1 *Lactobacillus casei shirota* was inoculated; in treatment 2, *Bifidobacterium lactis*, was inoculated and in treatment 3, a mixture of them was inoculated. Mixture of microorganisms was 1:1 and the doses for all inoculations were 2%. Products were stored at 5 °C for 10 days. For counting and identification of microorganisms, the soy bean cheese was seeded on MRS agar. Soy bean cheese with *Lactobacillus casei shirota* presented a final concentration of 2.98×10^8 ufc/g; with *Bifidobacterium lactis*, concentration was 1.4×10^8 ufc/g; and when a mixture was used, concentration was 2.8×10^8 ufc/g. Statistical analysis showed significant differences ($p < 0.05$) for microorganisms alone and mixture, for time. In the same way, no statistical significant differences were found for storing period at 5 °C. For *L. casei shirota* statistical analysis showed statistical significant differences ($p < 0.05$) between pure microorganism and mixture at the beginning of storing period, however, at time 10 no significant differences were found between pure microorganism and in mixture. For *B. lactis*, statistical analysis showed no significant differences ($p < 0.05$) between pure microorganism and mixture at the beginning of storing period, however, at time 3, significant differences were found between pure microorganism and mixture. Despite those differences shown, a similar growth kinetics was observed for both microorganisms, pure or mixed.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AKALM, A., FENDERYA, S. y AKBULUT, N. 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated Storage. *International Journal of Food Science and Technology*. 39: 613–621.
- ALAIS, C. 1985. *Ciencia de la Leche: Principio de técnica lechera*. Editorial Continental. España. 873 pág.
- AMORES, R., CALVO, A., MAESTRE, J.R. y MARTINEZ – HERNANDEZ, D. 2004. Probióticos. *Revisión Española de Quimioterapia*. 67 (2): 131 –139.
- BADUI, S. 1999. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 648 pág.
- BARON, M., DENIS, R. y VUILLEMARD, J. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. *L`Lait* 80: 465–478.
- BOURLIOUX, P., KOLETZKO, B., GAURNER, F. y BRAESCO, V. 2003. The intestine and its microflora are partner for the protection of the host: report on the donone symposium “the intelligent intestine”. *American Journal Clinical Nutrition*. 78 (4): 675 – 683.

- CAI, T. D. y CHANG, K. C. 1999. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (2): 720-727.
- CASTILLO, J. 2005. Lactobacilos. Disponible en: <http://www.monografias.com/Trabajos15/Lactobacilos/Lactobacilos.html> (Leído 10/11/05).
- COLLINS, D. y GIBSON, G. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal Clinical Nutrition*. 69 (5): 1052 – 1057.
- CHAMPAGNE, C., AUROUZE, B. y GOULET, G. 1991. Inhibition of undesirable gas production in tofu. *Journal of Food Science*. 56 (6): 1600- 1603.
- CHILE. Ministerio de salud. 1998. Nuevo Reglamento Sanitario de los Alimentos. Ediciones publiley. Santiago, Chile. 207 pág.
- CHOU, C. y HOU, J. 2000. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *International Journal of Food Microbiology*. 56: 113 – 121.
- CHUMCHUERE, S., MACDOUGALL, D.B. y ROBINSON, R.K. 2000 Production and properties of a semi-hard cheese made from soya milk. *International Journal of Food Science and Technology*. 35 (6): 577-581.
- DAIGLE, A., ROY, D., BELANGER, G. y VUILLEMARD, J. C. 1999. Production of probiotic chesse (cheddar-like chesse) using enriched cream fermented by bifidobacterium infantis. *Journal Dairy Science*. 82 (6): 1081 – 1091.

- FENNEMA, O. 2000. Química de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 1258 pág.
- FLORES, M. 2003. Viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* La 5 y *Bifidobacterium lactis* Bb 12) en helados de leche. Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 82 pág.
- FRASIER, W. C. 1972. Microbiología de los alimentos. 2° edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 512 pág.
- GARRO, M., VALDEZ, G., OLIVER, G. y De GIORI, G. 1999. Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk. *Journal of Food Protection*. 62 (7): 808 – 810.
- GIBSON, G. y ROBERFROID, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125 (6): 1401-1412.
- 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.
- HANSEN, C. 2005. Información de cultivos DVS liofilizados y congelado.
- HUANG, T., FU, H. y HO, C. 2003. Comparative studies on some quality attributes of firm tofu sterilized with tradicional and autoclaving methods. *Journal of Food Chemistry*. 51 (1): 254-259.

- IDF/ FIL. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1995. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Boletín 306: 23-33.
- INSTITUTO DE ESTUDIOS SALUD NATURAL DE CHILE. (IESN) 2001. Soya. Disponible en <http://www.geocities.com/iesnchile>. (Leído 25/08/05).
- ISOLAURI, E., SUTAS, Y. y KANKAANPAA, P. 2001. Probiotics: Effects on immunity. *American Journal Clinical of Nutrition*. 73 (2): 444-450.
- KAO, F., SUN, N. y LEE, M. 2003. Effect of calcium sulfate concentration in soymilk on the microstructure of firm tofu and the protein constitutions in tofu whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (21): 6211-6216.
- KIM, M. y HAN, J. 2002. Evaluation of physico-chemical characteristics and microstructure of tofu containing high viscosity chitosan. *International Journal of Food Science and Technology*. 37: 277-283.
- KWOK, K., LIANG, H. y NIRANJAN, K. 2002. Optimizing conditions for thermal processes of soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (17): 4834-4838.
- KWOK, K. y NIRANJAN, K. 1995. Effect of thermal processing on soymilk. *International Journal of Food Science and Technology*. 30 : 263 -295.
- 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

- LEE, Y., NOMOTO, K., SALMINEN, S. y GORBACH, S. 1999. Handbook of probiotic. John Wiley & sons, Inc. New York, USA. 211 p.
- LIM, B., DEMAN, J., y BUZZELL, M. 1990. Yield and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics. Calcium sulfate coagulant. Journal of Food Science. 56 (4): 1088-1092.
- LIN, F.M., CHIU, C. y PAN, T. 2004. Fermentation of a milk–soymilk and Lycium chinensemiller mixture using a new isolate of Lactobacillus paracaseisubsp. Paracasei NTU101 and Bifidobacterium longum. Journal Industrial Microbiololy Biotechnology. 31: 559–564
- LIU, Z. S. y CHANG, K.C. 2003. Development of a rapid titration method for predicting optimal coagulant concentration for filled tofu. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51 (18): 5214 – 5221.
- LUSAS, K. y RIAZ, M. 1995. Soy protein product: processing and U.S.A. Journal of Nutrition. 80 (2) : 151-156.
- MAHFUZ, A., TSUKAMOTO, C., KUDOU, S. y ONO, T. 2004. Changes of astringent sensation of soy milk during tofu curd formation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 (23): 7070 – 7074.
- MEJIAS, J. 1998. Características físicas y aromas de un alimento tipo yogurt, sin lactosa, elaborado sobre la leche de soya. Tesis Universidad de Chile (magister en ciencias agropecuaria). Editorial Santiago, Chile. 50 pág.
- MOIZUDDIN, S., JOHNSON, L.D. y WILSON, L.A. 1999. Rapid method for determining optimum coagulant concentration in tofu manufacture. Journal of Food Science. 64 (4): 684-687.

- MOLIN, G. 2001. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. American Journal Clinical Nutrition. 73(supl): 380-385
- NCh 2671 of 2002. Productos hidrobiológicos – Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva- Técnica de recuento en placa en agar Baird parker.
- NCh 2735/2 of 2001. Productos hidrobiológicos –Determinación coliformes. Parte 2: Técnica recuento en placa.
- NCh 2734 of 2002. Productos hidrobiológicos –Determinación de hongos y levaduras-Técnica recuento en placa.
- OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS (ODEPA) 2005. Comercio exterior silvoagropecuario. Volúmenes y valores de comercio producto - país. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/>. (Leído 26/08/05).
- ROY, D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. International Journal of food microbiology. 69: 167-182.
- SALMINEN, S., DEIGHTON, MA., BENNO, Y. y GORBACH, SL. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. American Journal Clinical Nutrition. 67(supl): 211-253
- SCHREZENMEIR, J. y De VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. Journal Clinical of Nutrition. 73 (2): 361-364.

- SUN, N. y BREENE, W. 1991. Calcium sulfate concentration influence on yield quality of tofu from five soybeans varieties. *Journal of Food Science*. 56 (6): 1604-1607.
- THARMARAJ, N. y SHAH, N. 2004. Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* and *propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14: 1055-1066.
- TORREZ-PERARANDA, A.V., REITMEIER, C. A., WILSON, L. A., FEHR, R. W. y NARVEL, J. M. 1998. Sensory characteristics of soymilk and tofu from lipoxigenasa-free and normal soybeans. *Journal of Food Science* 63 (6): 1804-1807.
- VANDERHOOF, J. 2001. Probiotics: future directions. *Journal Clinical of Nutrition*. 73 (6): 1152-1154.
- VINDEROLA, C., PROSELLO, W., GIBERTO, 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 (9): 1905-1911.
- WANG, H. y MURPHY, P. A. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42 (5): 1666 – 1673.
- YACIZI, F., ALVAREZ, V., MANGINO, M. y HANSEN, P. 1997. Formulation and processing of a heat stable calcium fortified soy milk. *Journal of Food Science* 62 (3): 535-538.

YONGQIANG, C., SHIMIZU, N. y KIMURA, T. 2005. The viscoelastic properties os soybean curd (tofu) as affected by soymilk concentration and type of coagulant. *International Journal of Food Science and Technology*. 40: 385 – 390.

ANEXOS

ANEXO 1

Ficha de evaluación sensorial

Producto: quesillo de leche de soya

Nombre:

Fecha:

Instrucciones

A continuación se presentan 3 muestras de quesillo de leche de soya, marque con una X el grado de aceptación que cada uno le entrega.

Puntajes	Categorías	Muestras		
		AZ	XC	YU
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			

Observaciones

ANEXO 2

Análisis de Varianza para concentración de microorganismos probióticos

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	p-Valor
Efectos principales					
A: Microorganismo	197515,0	2	98757,3	28,54	0,0000
B: Tiempo	46022,4	6	7670,4	2,22	0,0601
INTERACCIÓN					
AB	46395,1	12	3866,26	1,12	0,3722
Residuo	145313,0	42	3459,83		
TOTAL (Corr.)	435245,0	62			

Contraste Múltiple de Rangos para concentración según microorganismo

Método: 95% HSD de Tukey

Mo	Recuento	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
<i>B. lactis</i>	21	171,571	12,8356	X
<i>Mezcla</i>	21	257,095	12,8356	X
<i>L. casei</i>	21	307,19	12,8356	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
<i>B. lactis</i> - <i>L. casei</i>	*-135,619	44,1072
<i>B. Lactis</i> – <i>Mezcla</i>	*-85,5238	44,1072
<i>L. casei</i> - <i>Mezcla</i>	*50,0952	44,1072

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 3

Análisis de varianza para tiempo 0 y 1 entre microorganismos

Tabla ANOVA para tiempo 0 según microorganismos

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	9,63936E16	2	4,81968E16	33,14	0,0006
Intra grupos	8,726E15	6	1,45433E15		
Total (Corr.)	1,0512E17	8			

Contraste Múltiple de Rango para tiempo 0 según microorganismos

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Microorganismos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
<i>Bifidobacterium lactis</i>	3	1,09667E8	X
Mezcla	3	1,91333E8	X
<i>L. casei shirota</i>	3	3,58333E8	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
<i>B. lactis</i> – <i>L. casei shirota</i>	*-2,48667E8	9,55397E7
<i>B. lactis</i> - mezcla	-8,16667E7	9,55397E7
<i>L. casei shirota</i> - mezcla	*1,67E8	9,55397E7

* indica diferencia significativa.

Tabla ANOVA para microorganismos según tiempo 1

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6,06682E16	2	3,03341E16	12,66	0,0070
Intra grupos	1,43747E16	6	2,39578E15		
Total (Corr.)	7,50429E16	8			

Contraste Múltiple de Rango para tiempo según microorganismos

Método: 95,0% HSD de Tukey			
Microorganismo	Frec.	Media	Grupos homogéneos
B. lactis	3	1,12E8	X
Mezcla	3	2,54E8	X
L.casei shirota	3	3,06333E8	X
Contraste	Diferencias		+/- Límites
B. lactis – L. casei shirota	*-1,94333E8		1,22624E8
B. lactis – mezcla	*-1,42E8		1,22624E8
L. casei shirota - mezcla	5,23333E7		1,22624E8

* indica diferencia significativa.

ANEXO 4

**Recuento de microorganismos probióticos durante el almacenamiento de
quesillo de soya a 5°C (log ufc/g)**

<i>Lactobacillus casei shirota</i>			
Día	1º Repetición	2º Repetición	3º Repetición
0	8,60	8,50	8,56
1	8,51	8,47	8,48
2	8,29	8,43	8,47
3	8,28	8,57	8,50
6	8,45	8,54	8,36
8	8,53	8,64	8,47
10	8,39	8,51	8,51

<i>Bifidobacterium lactis</i>			
Día	1º Repetición	2º Repetición	3º Repetición
0	8,06	8,17	7,83
1	8,10	8,14	7,86
2	8,13	8,09	8,28
3	8,26	8,33	8,25
6	8,26	8,45	8,06
8	8,44	8,42	8,22
10	8,39	8,41	8,14

<i>Lactobacillus casei shirota en mezcla</i>			
Día	1º Repetición	2º Repetición	3º Repetición
0	8,34	8,19	8,30
1	8,53	8,29	8,36
2	8,21	8,43	8,41
3	8,48	8,52	8,33
6	8,54	8,17	8,48
8	8,53	8,39	8,44
10	8,36	8,48	8,53

<i>Bifidobacterium lactis mezcla</i>			
Día	1º Repetición	2º Repetición	3º Repetición
0	8,16	7,95	8,06
1	8,21	7,87	8,13
2	8,26	8,02	8,22
3	8,17	8,18	8,01
6	8,35	8,07	8,20
8	8,46	8,09	8,21
10	8,41	7,89	8,16

ANEXO 5

Análisis de Varianza para concentración de *Lactobacillus casei shirota* solo y en mezcla por tiempo.

Tabla ANOVA para *L. casei shirota* sólo y en mezcla al tiempo 0

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,18335E16	1	4,18335E16	30,52	0,0052
Intra grupos	5,48333E15	4	1,37083E15		
Total (Corr.)	4,73168E16	5			

Contraste Múltiple de Rango para cada tiempo según Concentración de microorganismos.

Tabla ANOVA para *L. casei shirota* sólo y en mezcla al tiempo 0

Método: 95,0 % HSD de Tukey

Col_1	Frec.	Media	Grupos homogéneos
<i>L. casei shirota</i> mezcla	3	1,91333E8	X
<i>L. casei shirota</i>	3	3,58333E8	X
Contraste			Diferencias +/- Límites
<i>L. casei shirota</i> mezcla – <i>L. casei shirota</i> solo			*-1,67E8 8,39338E7

* indica diferencia significativa.

Tabla ANOVA para *L. casei shirota* sólo y en mezcla al tiempo 1

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	8,16667E14	1	8,16667E14	0,08	0,7870
Intra grupos	3,91427E16	4	9,78567E15		
Total (Corr.)	3,99593E16	5			

Tabla ANOVA para *L. casei shirota* sólo y en mezcla al tiempo 2

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,60167E14	1	1,60167E14	0,02	0,8899
Intra grupos	2,94587E16	4	7,36467E15		
Total (Corr.)	2,96188E16	5			

Tabla ANOVA para *L. casei shirota* sólo y en mezcla al tiempo 3

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	5,4E13	1	5,4E13	0,01	0,9347
Intra grupos	2,83893E16	4	7,09733E15		
Total (Corr.)	2,84433E16	5			

Tabla ANOVA para *L. casei shirota* sólo y en mezcla al tiempo 6

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	3,75E15	1	3,75E15	0,25	0,6442
Intra grupos	6,0316E16	4	1,5079E16		
Total (Corr.)	6,4066E16	5			

Tabla ANOVA para *L. casei shirota* sólo y en mezcla al tiempo 8

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1,35E13	1	1,35E13	0,00	0,9762
Intra grupos	5,3734E16	4	1,34335E16		
Total (Corr.)	5,37475E16	5			

Tabla ANOVA para *L. casei shirota* sólo y en mezcla al tiempo 10

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	8,06667E13	1	8,06667E13	0,03	0,8672
Intra grupos	1,01547E16	4	2,53867E15		
Total (Corr.)	1,02353E16	5			

ANEXO 6

Análisis de Varianza para concentración de *Bifidobacterium lactis* solo y en mezcla tiempo.

Tabla ANOVA para *B. lactis* sólo y en mezcla al tiempo 0

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	C M	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,81667E13	1	4,81667E13	0,04	0,8495
Intra grupos	4,70333E15	4	1,17583E15		
Total (Corr.)	4,7515E15	5			

Tabla ANOVA para *B. lactis* sólo y en mezcla al tiempo 1

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,04167E14	1	2,04167E14	0,13	0,7406
Intra grupos	6,48467E15	4	1,62117E15		
Total (Corr.)	6,68883E15	5			

Tabla ANOVA para *B. lactis* sólo y en mezcla al tiempo 2

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,66667E12	1	2,66667E12	0,00	0,9686
Intra grupos	6,07667E15	4	1,51917E15		
Total (Corr.)	6,07933E15	5			

Tabla ANOVA para *B. lactis* sólo y en mezcla al tiempo 3

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	GI	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,5375E15	1	4,5375E15	7,78	0,0494
Intra grupos	2,33333E15	4	5,83333E14		
Total (Corr.)	6,87083E15	5			

Contraste Múltiple de Rango para tiempo 3 según Concentración de *Bifidobacterium lactis*.

Método: 95,0 % HSD de Tukey

Col_4	Frec.	Media	Grupos homogéneos
-------	-------	-------	-------------------

bifidobacterium lactis	mezcla	3	1,34667E8	X
bifidobacterium lactis	solo	3	1,89667E8	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
-----------	-------------	-------------

bifido mezcla - bifido solo	*-5,5E7	5,47524E7
-----------------------------	---------	-----------

* indica diferencia significativa.

Tabla ANOVA para *B. lactis* sólo y en mezcla al tiempo 4

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	Gl	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	9,375E14	1	9,375E14	0,19	0,6871
Intra grupos	1,9972E16	4	4,993E15		
Total (Corr.)	2,09095E16	5			

Tabla ANOVA para *B. lactis* sólo y en mezcla al tiempo 6

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	Gl	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	9,375E14	1	9,375E14	0,19	0,6871
Intra grupos	1,9972E16	4	4,993E15		
Total (Corr.)	2,09095E16	5			

Tabla ANOVA para *B. lactis* sólo y en mezcla al tiempo 8

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	Gl	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,86017E15	1	2,86017E15	0,53	0,5072
Intra grupos	2,16107E16	4	5,40267E15		
Total (Corr.)	2,44708E16	5			

Tabla ANOVA para *B. lactis* sólo y en mezcla al tiempo 10

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	Gl	CM	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	4,5375E15	1	4,5375E15	0,74	0,4386
Intra grupos	2,45773E16	4	6,14433E15		
Total (Corr.)	2,91148E16	5			

ANEXO 7

Test Friedman

Microorganismos	Tamaño Muestral	Rango Medio
<i>L casei shirota</i>	22	2,18182
<i>B lactis</i>	22	1,43182
mezcla	22	2,38636

Estadístico = 12,7013 P-valor = 0,00174561

