

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

Viabilidad de *Lactobacillus casei Shirota* y *Lactobacillus rhamnosus* en Jugo de Cranberry

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

Luís Orlando Villavicencio Vega

Valdivia – Chile

2006

PROFESOR PATROCINANTE

Sr. HAROLDO MAGARIÑOS H.

Técnico en Lechería, Magíster en Ciencias y

Tecnología de la Leche

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESORES INFORMANTES

Sra. MARCIA COSTA L.

Ing. Civil Bioquímico, Dipl.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Sr. FERNANDO FIGUEROLA R.

Ing. Agrónomo, M. Sc.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Los probióticos	3
2.2	Aspectos importantes en la selección de probióticos	4
2.2.1	Seguridad	5
2.2.2	Aspectos funcionales	6
2.2.3	Aspectos tecnológicos	7
2.3	Características de <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7
2.3.1	<i>Lactobacillus casei</i>	7
2.3.2	Comportamiento de <i>L. casei</i> frente al pH	8
2.3.3	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota.	9
2.3.4	Comportamiento de <i>L. casei</i> Shirota frente al pH.	10
2.3.5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	10
2.3.6	Comportamiento de <i>L. rhamnosus</i> frente al pH	11
2.3.7	Beneficios de <i>L. casei</i> , <i>L. casei</i> Shirota y <i>L. rhamnosus</i> sobre la salud humana	11
2.4	Cranberry	12
2.4.1	Características de la especie	12
2.4.2	Composición química y nutricional del Cranberry	13
2.4.3	Beneficios del Cranberry	14

3	MATERIAL Y METODO	16
3.1	Materia prima	16
3.2	Cepas utilizadas	16
3.3	Preparación de los cultivos	16
3.3.1	Preparación del cultivo madre	16
3.3.2	Preparación de las muestras	17
3.4	Medio de crecimiento de <i>L. casei</i> , <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	17
3.5	Siembra y recuento de <i>L. casei</i> , <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	17
3.6	Análisis fisicoquímico	18
3.7	Diseño experimental y análisis estadístico	18
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	19
4.1	Sobrevivencia de <i>Lactobacillus casei Shirota</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	19
4.1.1	Sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i> a temperatura de 4 °C	19
4.1.2	Sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i> a temperatura de 20 °C	20
4.2	Análisis de los factores e interacciones tiempo, temperatura y cepas sobre la sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	22
4.2.1	Análisis de los efectos principales sobre la sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	23
4.2.1.1	Sobrevivencia bacteriana según el factor temperatura	23
4.2.1.2	Sobrevivencia bacteriana según el factor cepa	24
4.2.1.3	Sobrevivencia bacteriana según el factor tiempo	26

4.2.2	Análisis de las interacciones sobre la sobrevivencia de <i>L. rhamnosus</i> y <i>L. casei Shirota</i>	27
4.2.2.1	Análisis de la interacción temperatura-cepa sobre la sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	28
4.2.2.2	Análisis de la interacción temperatura-tiempo sobre la sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	29
4.2.2.3	Análisis de la interacción cepa-tiempo sobre la sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	30
5	CONCLUSIONES	32
6	RESUMEN	33
	SUMMARY	34
7	BIBLIOGRAFÍA	35
	ANEXOS	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Criterios para la definición de microorganismos que pueden ser considerados como probióticos	4
2	Especies primarias de bacterias ácido lácticas utilizadas como probióticos	5
3	Taxonomía de <i>L. casei</i>	8
4	Beneficios de <i>L. casei</i> , <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i> sobre el organismo	12
5	Composición de la fruta y jugo de cranberry	13
6	Análisis estadístico (ANDEVA)	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i> en jugo de cranberry a temperatura de almacenamiento de 4 °C	19
2	Sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i> en jugo de cranberry a temperatura de almacenamiento de 20 °C	21
3	Sobrevivencia bacteriana según el factor temperatura	24
4	Sobrevivencia bacteriana según el factor cepa	25
5	Sobrevivencia de las bacterias según el factor tiempo	27
6	Interacción entre temperatura y cepa sobre la sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	28
7	Interacción entre tiempo y cepa bacteriana sobre la sobrevivencia de <i>L. casei Shirota</i> y <i>L. rhamnosus</i>	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Comportamiento del pH en jugo de cranberry inoculado con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> a temperaturas de 4 y 20 °C	43
2	Recuento de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota inoculado en jugo de cranberry y almacenado a temperatura de 4 °C	44
3	Recuento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> inoculado en jugo de cranberry y almacenado a temperatura de 4 °C	44
4	Recuento de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota inoculado en jugo de cranberry almacenado a temperatura de 20 °C	45
5	Recuento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> inoculado en jugo de cranberry y almacenado a temperatura de 20 °C	45
6	Prueba de rangos múltiples para sobrevivencia según temperatura	46
7	Prueba de rangos múltiples para sobrevivencia según cepa	46
8	Prueba de rangos múltiples para sobrevivencia según tiempo	47
9	Tabla de Medias por mínimos cuadrados para sobrevivencia con 95,0 Intervalos de confianza para	50

temperatura según cepa

- 10 Tabla de Medias por mínimos cuadrados para
sobrevivencia con 95,0 Intervalos de confianza para cepa
según tiempo 51

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos ha surgido una gran preocupación - y que va en aumento - por parte de los consumidores, de ingerir alimentos que, además de ser agradables al paladar, sean beneficiosos para la salud. Esta situación ha llevado a que la industria alimentaria centre sus esfuerzos en el diseño de productos que cumplan con estas exigencias, de manera que el buen sabor vaya aparejado con consecuencias beneficiosas para el organismo.

A fines de la década de los 80, apareció un nuevo concepto en alimentos, definido como alimentos funcionales, los cuales además del aporte nutritivo entregado, causan un efecto positivo sobre la salud. Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos. Este último grupo, corresponde la introducción de microorganismos vivos que adicionados a un alimento, en concentraciones óptimas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana. Bacterias probióticas como *Lactobacillus casei Shirota* y *Lactobacillus rhamnosus*, han sido aplicados en la industria alimentaria durante bastante tiempo, mayoritariamente en productos lácteos, existiendo poca variedad de otros productos, que se utilicen como vehículo para estos microorganismos.

El jugo de cranberry, ha sido intensamente investigado durante estos últimos años, demostrándose que contiene una gran cantidad de componentes que ayudan a disminuir - principalmente - la ocurrencia de infecciones tracto

urinarias (UTI). Actualmente, debido probablemente a las propiedades antibacterianas que éste posee, no se han desarrollado productos que combinen probióticos y jugo de cranberry, por lo que la finalidad de este estudio - dado las características benéficas que estos poseen sobre el organismo -, será determinar si es posible que estas bacterias se mantengan viables en este medio.

HIPÓTESIS

Lactobacillus casei Shirota y *Lactobacillus rhamnosus* son bacterias probióticas capaces de sobrevivir en jugo de cranberry por espacio de 20 días a temperaturas de almacenamiento de 4 y 20 °C.

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

Objetivo general

Determinar la capacidad de sobrevivencia de *Lactobacillus casei Shirota* y *Lactobacillus rhamnosus* en jugo de cranberry bajo condiciones de temperatura y tiempo controlados.

Objetivos específicos

- Comparar la sobrevivencia de *Lactobacillus casei Shirota* y *Lactobacillus rhamnosus* al ser inoculados en jugo de cranberry, almacenados a temperaturas de 4 y 20 °C durante 20 días.
- Determinar cual de las dos cepas en estudio se comporta mejor en el jugo de cranberry y a la temperatura de almacenamiento en que ella lo hace.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Los probióticos

El interés científico de microorganismos vivos que causen algún efecto benéfico sobre el organismo, comenzó a principios del Siglo XX con el biólogo Elie Metchnikoff, el cual sugirió por primera vez, que los lactobacilos contenidos en el yogurt disminuían el número de bacterias productoras de toxinas en el intestino y por consiguiente contribuían a la longevidad de los campesinos búlgaros (SANDERS, 2000).

Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que confieren un efecto saludable sobre el hospedador cuando son consumidos en cantidades adecuadas (GUARNER y SCHAAFSMA, 1998). Una definición más completa es la propuesta por SCHREZENENMEIR y DEVRESE (2001), que dice que alimento probiótico, es un producto que contienen microorganismos definidos y viables en grado suficiente para modificar la microflora (por implantación o colonización) del huésped ejerciendo efectos benéficos saludables sobre éste. Actuales criterios para la definición de un probiótico son mostrados en la CUADRO 1.

Estos microorganismos han sido usados cerca de 100 años para tratar una variedad de infecciones en la superficie mucosa, tales como desórdenes intestinales y vaginales, pero su uso disminuyó después del advenimiento de los antibióticos. Sin embargo estas bacterias están siendo nuevamente reconsideradas como alternativa a los antibióticos, debido a que actúan de la misma manera que estos sin producir efectos colaterales (AHMED, 2003).

Las bacterias que comúnmente son utilizadas como probióticos corresponden a bacterias ácido lácticas, constituyentes de la flora nativa humana, pertenecientes a géneros tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Los dos primeros géneros son conocidos por resistir ácido gástrico, sales biliares y enzimas pancreáticas, además de adherirse y colonizar el tracto intestinal. De estos dos géneros, se han reconocido 54 especies de *Lactobacillus*, de los cuales 18 tienen algún interés en ser probióticos y 31 especies de *Bifidobacterium*, 11 de los cuales han sido detectados en fecas humanas (KLAENHAMMER y KULLEN, 1999). Las especies primarias de bacterias ácido lácticas utilizadas como probióticos son presentados en el CUADRO 2.

CUADRO 1. Criterios para la definición de microorganismos que pueden ser considerados como probióticos.

UN PROBIÓTICO DEBERIA:
• Ser de naturaleza no patógena.
• Ser resistente a la destrucción por procesamiento técnico.
• Ser resistente a la destrucción por ácido gástrico o biliar.
• Adherirse al tejido epitelial del intestino.
• Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal, incluso por un corto tiempo.
• Producir sustancias antimicrobianas.
• Modular respuestas inmunes.
• Influenciar actividades metabólicas humanas (por ejemplo, asimilación de colesterol, producción de vitaminas, etc.).

FUENTE: TEITELBAUM y WALKER. (2002).

2.2 Aspectos importantes en la selección de probióticos

El fundamento teórico para la selección de microorganismos probióticos incluye tres aspectos fundamentales: seguridad, aspectos funcionales y aspectos tecnológicos.

CUADRO 2. Especies primarias de bacterias ácido lácticas utilizadas como probióticos.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium,</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus.</i>
<i>acidophilus</i>	<i>animalis</i>	<i>thermophilus</i>	<i>faecium</i>
<i>casei</i>	<i>bifidum</i>		
<i>amylovorus</i>	<i>breve</i>		
<i>crispatus</i>	<i>infantis</i>		
<i>gallinarum</i>	<i>longum</i>		
<i>gasseri</i>	<i>lactis (animalis)</i>		
<i>johnsonii</i>			
<i>plantarum</i>			
<i>reuteri</i>			
<i>rhamnosus</i>			
<i>salivarius</i>			

Fuente: KLAENHAMMER y KULLEN. (1999).

2.2.1 Seguridad. Los probióticos usualmente se encuentran disponibles en alimentos o en suplementos dietéticos que contienen microorganismos que normalmente habitan del tracto intestinal humano (YOUNG y HUFFMAN, 2003). Bacterias tales como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* han sido usadas extensivamente en alimentos procesados, consumiéndose como bacterias vivas, muertas o metabolitos formados de éstos. Hasta ahora, la seguridad de estos microorganismos no había sido cuestionada y los informes de efectos dañinos de estas bacterias en el huésped eran escasos (ISHIBASHI y YAMAZAKI, 2001). Sin embargo, algunos casos de infecciones locales o sistemáticas han sido informadas, incluyendo septicemia, meningitis y endocarditis, por bacterias ácido lácticas, representando sólo un pequeño número de casos (5-15 % para *Enterococcus* y 0.1 % para *Lactobacillus*), siendo la endocarditis contagiosa, la infección más común asociada con los lactobacilos, en especial, con las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* (ASAHARA *et al.*, 2002).

DONOHUE y SALMINEN (1996), han propuesto las siguientes recomendaciones y sugerencias para probar la seguridad de una bacteria probiótica:

- Determinar las propiedades intrínsecas de la bacteria y las cepas seleccionadas para ser usadas como probiótico, a saber, factores de adhesión al intestino, resistencia a antibióticos, perfil de las enzimas, transferencia de plásmidos.
- Determinar los efectos de los productos metabólicos de la bacteria.
- Determinar la toxicidad subaguda y aguda de la ingestión de cantidades extremadamente grandes de la bacteria.
- Estimar *in vitro* las propiedades infecciosas de la bacteria probiótica.
- Determinar la eficacia de la ingesta de la bacteria probiótica medido por dosis-respuesta (mínima y máxima dosis requerida y sus efectos en la salud).
- Determinar cuidadosamente los efectos secundarios durante estudios voluntarios humanos y estudios clínicos en distintas etapas específicas de la enfermedad.
- Vigilancia epidemiológica de personas que han ingerido grandes cantidades de la bacteria probiótica introducida para las infecciones.
- Los más rigurosos controles de seguridad propuestos anteriormente para cepas genéticamente modificadas y derivadas.

2.2.2 Aspectos funcionales. Otro aspecto importante propuesto por SAARELA et al. (2000), son los requerimientos funcionales de los probióticos, los cuales podrían ser establecidos usando métodos *in vitro* y el resultado de estos estudios podría ser reflejado en estudios controlado en humanos. Mientras se selecciona un probiótico varios aspectos de funcionalidad tienen que ser considerados.

- Tolerancia ácida y tolerancia a los jugos gástricos.
- Tolerancia a la bilis.
- Adherencia a la superficie epitelial y persistencia en el tracto gastrointestinal humano.
- Actividad antagonista contra patógenos tales como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*.
- Propiedades antimutagénicas y anticancerígenas.

2.2.3 Aspectos tecnológicos. Además de brindar seguridad y cumplir con criterios funcionales, aspectos relacionados con la producción y procesamiento de probióticos, son también de suma importancia. Por lo tanto, a la hora de seleccionar un probiótico, se deben considerar los siguientes aspectos:

- Buenas propiedades sensoriales.
- Viabilidad durante el procesamiento.
- Estabilidad del producto durante su almacenamiento. (SAARELA et al., 2000).

2.3 Características de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus rhamnosus*

2.3.1 *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus casei* es una bacteria ácido láctica que se encuentra naturalmente en la leche, carne y vegetales fermentados, así como también en la boca e intestino humano y en el ambiente. (COLLINS et al., 1989). Este microorganismo se caracteriza por ser tipo Gram positivo, anaerobio facultativo, sin motilidad y no formador de esporas. De carácter ácido tolerante, posee un metabolismo estrictamente fermentativo con ácido láctico como su mayor producto final. (MORI et al., 1997).

En forma taxonómica, *L. casei*, es reconocida como un grupo de varias especies, dado a que ellas son genéticamente similares, diferenciándose en ciertas características como son, temperatura óptima de crecimiento y habilidad para fermentar distintos tipos de carbohidratos.

CUADRO 3. Taxonomía de *L. casei*.

Forma taxonómica	Actual taxonomía	Propiedades metabólicas	
		Temperatura de crecimiento	Fermentación de azúcar
<i>L. casei subsp. casei</i>	<i>L. casei</i>	10 - 40°C	Ribosa- sacarosa- D-tiranosa
<i>L. casei subsp. paracasei</i>	<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	10 – 40°C	Gran diversidad de metabolización de azúcares
<i>L. casei subsp. tolerans</i>	<i>L. paracasei subsp. tolerans</i>	10 - 37°C Resistente a 72°C, 40 min	Muy poca metabolización de azúcares
<i>L. casei subsp rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	15 - 45 °C	Ramnosa

FUENTE: DANONE WORLD NEWSLETTER (1995).

2.3.2 Comportamiento de *L. casei* frente al pH. Debido al bajo pH que presenta el estómago y los jugos biliares en los intestinos, varias especies de lactobacilos no son capaces de sobrevivir en su paso a través de estos, siendo destruidos, resultando en una escasa o nula colonización.

GOLDIN et al. (1992), estudiaron el comportamiento de *L. casei* frente al pH del estómago y encontraron que la cepa permanece viable en un rango de pH de 3,0 a 7,0 logrando sobrevivir por el tránsito a través del estómago cuando se ingiere con alimentos o productos lácteos, lo cual aumenta por sobre 3 el valor de pH.

FRAGOSO *et al.* (2001), evaluaron la capacidad probiótica de *L. casei*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, obteniendo entre sus principales conclusiones que *L. casei* y *L. acidophilus* son capaces de proliferar en concentraciones entre 10^7 y 10^9 UFC/g a pH menor de 3,5. Esto se considera un punto importante, ya que, una bacteria probiótica, debe colonizar el tracto gastrointestinal y ejercer un efecto benéfico para la salud.

Por su parte, LACAYO (2004), estudió la viabilidad de *L. casei* en jugo de tomates (T₁), jugo de tomate con 0,5 % de suero de leche (T₂) y caldo MRS (T₃) almacenado durante 27 días a temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$. En el caso de T₁ y T₂, el valor máximo de *L. casei* fue superior a 10^9 UFC/mL a los 2 días y un valor de pH de 3,9; llegando a reducir 1 ciclo logarítmico al alcanzar los 16 días de almacenamiento a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ con un pH de 3,4; conforme transcurrió en tiempo de evaluación y la disminución del pH en los tratamientos, aumentó a una pérdida de 2 ciclos logarítmicos a los 27 días de evaluación con un pH de 3,1; por lo que el autor señala que en base a los resultados obtenidos, el pH influye en la viabilidad de *L. casei* y su disminución también reduce la viabilidad de la bacteria en el tiempo.

2.3.3 *Lactobacillus casei* Shirota. En 1930, el Dr. Japonés, Minoru Shirota, aisló [a partir del intestino humano] lactobacilos y tras un número de investigaciones logró fortalecer estos microorganismos, haciéndolos resistentes a los jugos gástricos y biliares. En su honor, el Dr. Kimono, los nombró *Lactobacillus casei* Shirota.

Utilizada durante muchos años en la producción de Yakult (bebida láctea fermentada), y actualmente como ingrediente alimentario en Japón y Europa, esta bacteria - perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas - se caracteriza por ser altamente resistente al ácido. Puede sobrevivir el trayecto

desde la boca, a través del estómago, llegando viva al tracto digestivo, en el cual se aloja y donde juega el rol de mantener un balance entre bacterias beneficiosas y potencialmente nocivas, promoviendo la salud del intestino y suprimiendo el efecto de las bacterias que producen sustancias perjudiciales para el organismo. Numerosos artículos documentan la seguridad y funcionalidad de esta bacteria (YAKULT, 2004; MATSUZAKI, 1998).

2.3.4 Comportamiento de *L. casei Shirota* frente al pH. Kobayashi et al. (1974), citado por TORRES (2003), investigó la viabilidad de distintas bacterias frente a un medio de pH 3,0. Al tiempo 0, *L. casei Shirota* presenta una población aproximada de $7,8 \times 10^7$ [UFC/mL], manteniéndose igual al cabo de 3 h de experimentación.

Por su parte, PEREIRA y GIBSON (2002), probaron la supervivencia de distintas bacterias probióticas en medio ácido. Los resultados mostraron que *L. casei Shirota* decrece significativamente de 7,9 a 4,1 ciclos logarítmicos en 45 min a pH 2,0; mientras que para un tiempo de 60 min -al mismo valor de pH- la bacteria desaparece completamente.

2.3.5 *Lactobacillus rhamnosus*. Pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas, *L. rhamnosus*, es una bacteria Gram (+), anaerobia facultativa, la cual produce ácido láctico L (+) y etanol, bajo condiciones de anaerobiosis (NARAYANAN et al., 2004).

Esta bacteria, por mucho tiempo fue confundida con *L. casei* y *L. paracasei*, debido a que sus perfiles de fermentación son similares. Sin embargo, WARD y TIMMINS, (1999), usando Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) y DNA Polimórfico Aleatoriamente Amplificado (RAPD), pudieron diferenciar estas bacterias, separando *L. rhamnosus* como una especie diferente.

Las cepas de *L. rhamnosus*, son unas de las cepas más estudiadas, caracterizándose por ser –dentro de las bacterias ácido lácticas- las más convenientes para prevenir enfermedades infecciosas (BOUZAINÉ et al., 2005).

2.3.6 Comportamiento de *L. rhamnosus* frente al pH. GODERSKA et al. (2002), estudiaron el efecto del pH sobre *L. rhamnosus*. Como conclusión obtuvieron que el número de bacterias vivas de *L. rhamnosus* permanece a un nivel de 10^6 UFC/mL en un sustrato de pH 2 y 3 para 0,5 h de experimento, mientras que a pH 2 por espacio de 1 h, este valor puede disminuir a 0 y a pH 3 este valor se alcanza a las 9 h.

En otro estudio, SAARELA et al. (2004), determinaron la viabilidad de distintas bacterias frente a pH ácido. *L. rhamnosus* exhibió un pequeño crecimiento a pH 4,0; mientras que a pH 3,5 no presentó crecimiento, siendo el pH 2,5 levemente letal.

Por su parte, MAINVILLE et al. (2005), simularon el tracto gastrointestinal, a pH 2,0 y con 0,3 % de bilis. Al término de su investigación, pudieron apreciar que *L. rhamnosus* no es capaz de sobrevivir por más de 15 min a este valor de pH. Sin embargo, se ha demostrado que esta cepa es capaz de reaccionar en vivo en el colon, aparentemente en número suficiente para tener efectos fisiológicamente beneficios sobre la salud.

2.3.7 Beneficios de *L. casei*, *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus* sobre la salud humana. Variadas son las investigaciones que se han realizado –tanto en personas como en animales- para demostrar que estos microorganismos aportan beneficios a la salud en la persona que los ingiere. El Cuadro 4 cita algunos ejemplos de los beneficios de estas bacterias.

CUADRO 4. Beneficios de *L. casei*, *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus* sobre el organismo.

Efecto reportado	Especie probiótica	- Referencias
Inmunomodulación.	<i>L. casei Shirota</i> <i>L. rhamnosus</i>	- SANZ <i>et al.</i> , (2003). - HARSHARNJIT (2003). - ISOLAURI <i>et al.</i> (2001).
Reducción de carcinogénesis y crecimiento de tumores.	<i>L. casei</i> <i>L. casei Shirota</i>	- DE ROOS y KATAN, (2000). - TAKAGI <i>et al.</i> (2001). - ASO y AKAZAN (1992). - OKAWA <i>et al.</i> (1993).
Prevención de diarrea del viajero.	<i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i>	- YOUNG y HUFFMAN (2003). - SURAWICZ (2003). - PEDONE <i>et al.</i> (2000)
Efecto sobre <i>Helicobacter pylori</i> .	<i>L. casei</i>	- HAMILTON-MILLER (2003).
Prevención de enfermedades urogenitales.	<i>L. rhamnosus</i>	- REID (2001). - ANURADHA Y RAJESHWARI (2005).
Prevención de diarrea por rotavirus.	<i>L. casei</i> <i>L. casei Shirota</i> <i>L. rhamnosus</i>	- SANZ <i>et al.</i> (2003). - YOUNG y HUFFMAN (2003). - SURAWICZ (2003). - LOCASCIO <i>et al.</i> (2002). - MAJAMAA <i>et al.</i> (1995). - ROBINSON y SAMONA (1992).

2.4 Cranberry

2.4.1 Características de la especie. El cranberry americano (*Vaccinium macrocarpon* Ait), miembro de la familia Ericaceae y género *Vaccinium*, corresponde a una planta leñosa y perenne, de poca altura (15 a 25 cm.), delgada, con aspecto de enredadera y rastrera, que llega a cubrir el 100 % del suelo formando un grueso colchón de ramas y ramillas a ras de suelo. Los frutos que produce esta planta corresponden a bayas de color rojo cuando están maduras y de un diámetro entre 1 a 2 cm. Caracteriza a este fruto su interior hueco (lo que le permite flotar cuando es cosechada por flotación) y su

resistencia, lo cual permite manejarla con facilidad una vez cosechada (BUZETA, 1997).

2.4.2 Composición química y nutricional del Cranberry. Como señala THE CRANBERRY INSTITUTE (2005), este fruto es una rica fuente de componentes activos como flavonoides, tocotrienoles, antocianinas y proantocianidinas, los cuales pueden ejercer una variedad de beneficios para la salud. Además, BUZETA (1997) indica que los productos fabricados en base a cranberry, son bajos en calorías, presentan un alto contenido de vitaminas y minerales y poseen un buen porcentaje de fibra. La composición de la fruta y de jugo de cranberry se presenta en el CUADRO 5.

CUADRO 5. Composición de la fruta y jugo de cranberry.

Ingrediente	Fruta de cranberry	Jugo de cranberry
Agua (%)	86,5	92,9
Sólidos (%)	13,5	7,1
Carbohidratos totales (g)	12,7	6,8
Azúcares (g)	No Analizados	3,7
Fibra dietética (g)	1,2	0,1
Proteína (g)	0,4	<0,1
Grasa (%)	0,2	<0,1
Minerales		
Sodio (mg)	1	3,8
Potasio (mg)	71	85,2
Vitamina C (mg)	13,5	2
pH	No Analizado	2,5

FUENTE: LOWE y FAGELMAN. (2001).

2.4.3 Beneficios del Cranberry. Muchas personas en el campo médico y nutricional creen que hay una clara asociación entre una dieta alta en frutas y vegetales y un bajo riesgo de enfermedades crónicas.

El cranberry contiene una gran cantidad de antioxidantes y de otros fitoquímicos, incluyendo antocianinas y proantocianidinas, las cuales pueden ejercer un rol muy importante en la salud. Entre los beneficios que puede producir el consumo de cranberry se encuentran:

- Efecto antioxidante: De acuerdo a un estudio publicado por VINSON et al. (2001), el cranberry, comparado con otras 19 frutas comunes, contiene una de las mas altas concentraciones de polifenoles antioxidantes, lo cual incluye flavonoides y ácidos fenólicos, lo que podría ayudar a evitar enfermedades cardiovasculares.
- Efecto sobre infecciones en el tracto urinario: Según un estudio realizado por KONTIOKARI et al. (2001), la ingesta regular de jugo de cranberry reduce la ocurrencia de infecciones urinarias en mujeres. Esto se debe a que los taninos condensados o proantocianidinas- las cuales poseen propiedades antibacteriales, antivirales, antiadhesivas y antioxidantes- pueden prevenir la adhesión de *E. coli* y de otras bacterias Gram (-) en las células uroepiteliales. Esto puede ayudar a reducir la necesidad de antibióticos, lo cual disminuye la tendencia de la bacteria a desarrollar resistencia a éstos.
- Ulceras y enfermedades peridontales: *Helicobacter pylori*, la bacteria responsable de enfermedades gastrointestinales, incluyendo úlceras pépticas y gástricas, así como también cáncer gástrico (HAMILTON-MILLER, 2003), puede ser inhibida por jugo de cranberrie. BURGER et al. (2002), demostraron que el jugo de cranberry es capaz de inhibir la adhesión de *Helicobacter pylori* en el mucus gástrico humano, siendo benéfica en la prevención de estas enfermedades.

- Weiss (1998), citado por THE CRANBERRY INSTITUTE (2005), realizó estudios con jugo de cranberry, encontrando que éste tiene la habilidad de inhibir la bacteria responsable de la formación de placa bacteriana y de enfermedades peridontales. Este mismo autor el 2002 llevo a cabo un nuevo estudio, comparando la actividad inhibitoria de extractos de frutas similares -como son frambuesas, arándanos, ciruelas, duraznos y mangos- encontrando una muy baja actividad en arándanos, y nula actividad en las demás frutas.

3. MATERIAL Y MÉTODO

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile (UACH), ubicada en la ciudad de Valdivia.

3.1 Materia prima

Para el experimento, se utilizó jugo clarificado-concentrado de cranberry de la empresa Cran Chile, el cual fue diluido al 10 % con agua previamente esterilizada. Se utilizaron frascos de vidrio estériles para la preparación del jugo de cranberry en toda la investigación.

3.2 Cepas utilizadas

Los microorganismos utilizados para este estudio correspondieron a cultivos liofilizados del tipo DVS (Direct Vat Set), de *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus Rhamnosus* desarrollados por la empresa Vivolac Cultures Corporation, 3862 East Washington Street, Indianápolis, IN 46201. <http://www.vivolac.com>

3.3 Preparación de los cultivos

Para la activación de los cultivos, las cepas se prepararon como se explica a continuación.

3.3.1 Preparación del cultivo madre. Para la activación y posterior repique de cada una de las cepas, se preparó caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe).

Este medio fue distribuido en frascos de vidrio, (previamente esterilizados), conteniendo 20 mL cada uno. Posteriormente, cada frasco fue inoculado por separado con aproximadamente 1 g de cultivo liofilizado de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*, incubándose aeróbicamente por un período de 24 horas a las temperaturas óptimas de 32 y 37 °C, respectivamente.

3.3.2 Preparación de las muestras. Jugo de cranberry, preparado al 10 %, fue distribuido en envases de vidrio estériles, conteniendo cada uno de ellos, 50 mL. Finalizado esto, los frascos fueron inoculados -cada uno- al 2 %, sólo con una especie bacteriana. Para *L. casei Shirota*, se prepararon 66 frascos, 33 de los cuales (correspondientes al T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10, con 3 repeticiones para cada uno), fueron incubados a temperatura de 20 °C. Los 33 restantes, fueron incubados a temperatura de 4 °C. El mismo procedimiento se utilizó para *L. rhamnosus*. Cabe señalar, que desde el T2 hasta el T10, los frascos fueron inoculados con un 1 % más de cepa para cada caso. El procedimiento completo de preparación del jugo y de las muestras fue llevado a cabo en campana de flujo laminar, evitándose una posible contaminación.

3.4 Medio de crecimiento de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*

De acuerdo a la literatura, el medio ideal para la propagación y crecimiento de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus* es Agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) (FORESTIER et al. 2001; YOON et al. 2005).

3.5 Siembra y recuento de *L. casei*, *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*

Para realizar las distintas diluciones, se empleó agua peptonada al 0.1%, la cual se distribuyó en distintos tubos conteniendo cada uno de ellos 9 mL de este medio. Las siembras fueron realizadas en campana de flujo de laminar y para cada una de ellas, se realizaron diluciones seriadas, que consistieron en tomar

1 mL de muestra y agregarlo a un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada. Luego de agitar en Vórtex, nuevamente se tomó 1 mL y se pasó a otro tubo de ensayo, repitiéndose este procedimiento hasta llegar a la dilución adecuada, para finalizar tomando 0,1 mL y pasándolo a una placa Petri con agar MRS, la cual se incubó por 72 h a cada una de las temperaturas óptimas de crecimiento, $32\pm 0,5$ °C para *L. casei shirota* y de $37\pm 0,5$ °C para *L. rhamnosus*. Finalizada la incubación,, se procedió a la lectura de las placas.

3.6 Análisis fisicoquímico

Al término de cada siembra, se midió pH a cada muestra, para lo cual se utilizó un pH-metro marca Corning Incorporated modelo 430 (AOAC, 1995). CUADRO 1, ANEXO 1.

3.7 Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un diseño multifactorial 2x2x11 representado por 3 factores. El primer factor corresponde a cepas probióticas con dos niveles (*L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*); factor temperatura, también a dos niveles (4 °C y 20 °C), y el factor tiempo con 11 niveles (0,2,4,6,8,10,12,14,16,18 y 20 días). Se utilizaron 3 repeticiones en el experimento.

La sobrevivencia de las cepas probióticas a distintas temperaturas de almacenamiento y durante diferentes días de experimentación, fue analizada mediante análisis de VARIANZA (ANDEVA), y una prueba de rango múltiple (Tuckey) con un nivel de confianza de 95 %, en el caso de existir diferencias significativas entre las muestras. Todos estos análisis fueron realizados en el software estadístico Statgraphics, versión 5.1.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Sobrevivencia de *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus rhamnosus*.

Los recuentos de sobrevivencia bacteriana (UFC/mL), obtenidos para *L. casei* Shirota y *L. rhamnosus* se presentan a continuación.

4.1.1 Sobrevivencia de *L. casei* Shirota y *L. rhamnosus* a temperatura de 4 °C. Los resultados que se obtuvieron para las dos cepas en estudio, a temperatura de 4 °C y en un tiempo de 20 días, son mostrados en la FIGURA 1. Los resultados pueden ser observados detalladamente en el ANEXO 2 y ANEXO 3.

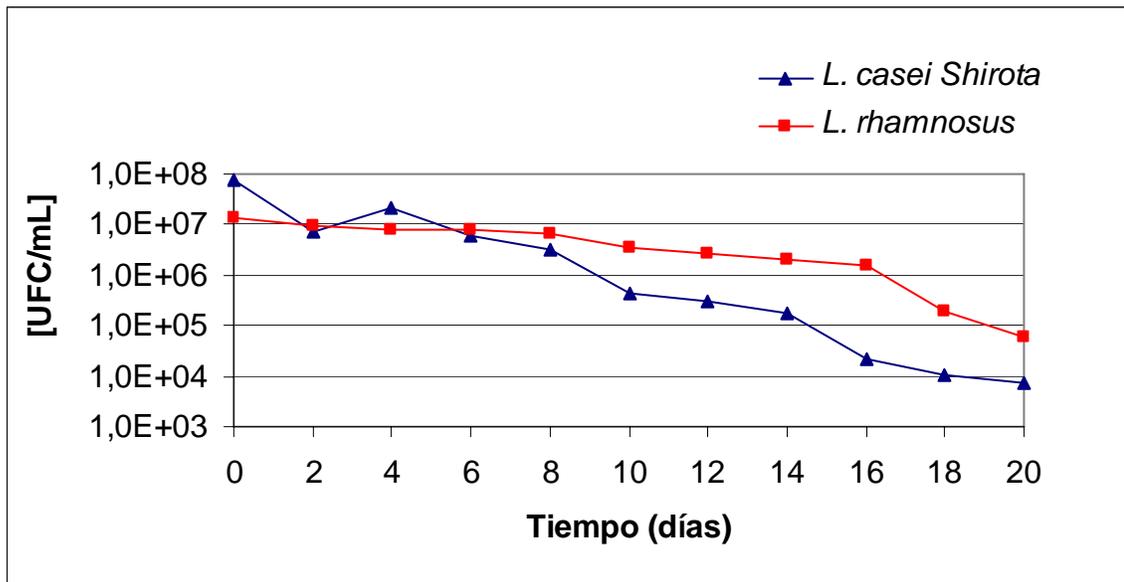


FIGURA 1. Sobrevivencia de *L. casei* Shirota y *L. rhamnosus* en jugo de cranberry a temperatura de almacenamiento de 4 °C.

De acuerdo a la FIGURA 1, se puede observar que el comportamiento de sobrevivencia en jugo de cranberry es mejor en *L. rhamnosus* en comparación a *L. casei Shirota* para un tiempo de 20 días de almacenamiento a temperatura de 4 °C.

L. rhamnosus, partiendo de una concentración de 1.38×10^7 [UFC/mL] se mantiene por espacio de 16 días con una concentración superior a 10^6 [UFC/mL] (necesaria para considerar un alimento como probiótico), finalizando a los 20 días con 6.17×10^4 [UFC/mL]. Por otro lado, *L. casei Shirota* comienza con una concentración de 7.83×10^7 [UFC/mL], superior a la concentración presentada por *L. rhamnosus*. Sin embargo, la disminución de la población es mucho mayor, observándose que a los 8 días de almacenamiento presenta una concentración de 3.30×10^6 [UFC/mL], la cual disminuye bajo 10^6 [UFC/mL] a los 10 días de almacenamiento, presentando una concentración final de 7.33×10^3 [UFC/mL] a los 20 días de experimentación.

4.1.2 Sobrevivencia de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus* a temperatura de 20 °C. Las curvas de sobrevivencia para las 2 cepas en estudio, inoculadas en jugo de cranberry y almacenadas a temperatura de 20 °C, son mostradas en la FIGURA 2. Los datos utilizados para graficar estas curvas pueden ser observados en el ANEXO 4 y ANEXO 5.

Para el caso de las cepas inoculadas en jugo de cranberry y almacenadas a temperatura de 20 °C, se puede observar que las dos bacterias presentan una buena sobrevivencia bajo estas condiciones. Como se observa en la FIGURA 2, *L. casei Shirota* presenta una mejor sobrevivencia con respecto a *L. rhamnosus*. Partiendo de una concentración de 5.98×10^7 [UFC/mL], al cabo de 20 días, la cantidad de bacterias disminuye muy poco, presentando una concentración final de 1.63×10^7 [UFC/mL]. Para *L. rhamnosus*, la cual comienza con 2.5×10^7

[UFC/mL], se puede ver que al cabo de 20 días de almacenamiento, la concentración final disminuye 1 ciclo logarítmico, presentando una concentración final de 4.35×10^6 [UFC/mL], considerándose este producto como alimento probiótico.

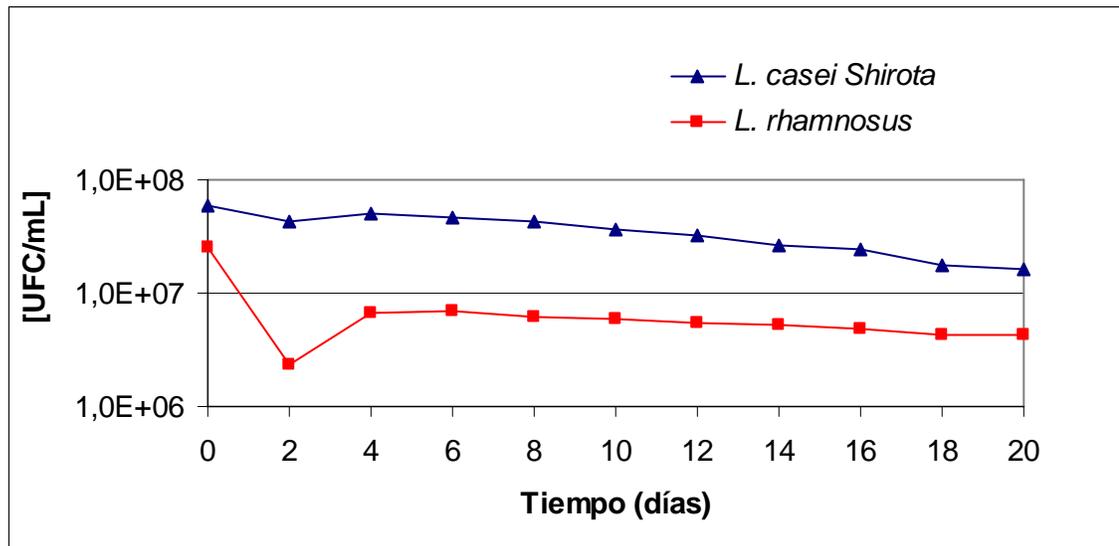


FIGURA 2. Supervivencia de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus* en jugo de cranberry a temperatura de almacenamiento de 20 °C.

En base a estos resultados, podemos agregar que *L. casei Shirota* inoculado en jugo de cranberry presenta un mejor comportamiento de supervivencia a temperatura de 20 °C que cuando es almacenado a 4 °C. Similar caso ocurre para *L. rhamnosus*, el cual sobrevive mejor a temperatura de almacenamiento de 20 °C, sin embargo, esta cepa puede alcanzar un mayor tiempo de supervivencia (16 días) en concentración superior 10^6 [UFC/mL] a temperatura de 4 °C.

4.2 Análisis de los factores e interacciones tiempo, temperatura y cepas sobre la sobrevivencia de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*

Los recuentos de colonias (UFC/mL), obtenidos a temperaturas de 4 y 20 °C, durante los 11 diferentes tiempos, para las tres repeticiones, fueron evaluados por medio del análisis estadístico ANDEVA el cual se presenta en el CUADRO 6.

CUADRO 6. Análisis estadístico (ANDEVA).

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-valor
Efectos principales					
A: Temp.	6,07714E15	1	6,07714E15	79,46	0,0000
B: Cepa	9,89532E15	1	9,89532E15	129,38	0,0000
C: Tiempo	1,47048E16	10	1,47048E15	19,23	0,0000
Interacciones					
AB	4,50237E15	1	4,50237E15	58,87	0,0000
AC	1,29184E15	10	1,29184E14	1,69	0,0939
BC	4,82022E15	10	4,82022E14	6,30	0,0000
Residuos	7,49505E15	98	7,64801E13		
Total corregido	4,87867E16	131			

Al analizar los datos obtenidos en el análisis estadístico (ANDEVA), se puede apreciar que existen diferencias significativas ($p < 0.05$), en lo que se refiere a los efectos principales. Esto quiere decir que cada uno de estos factores (cepa, tiempo y temperatura), si ejercen un efecto sobre la sobrevivencia de las bacterias en el jugo de cranberry.

En el caso de las interacciones, se puede ver que tanto la interacción AB (temperatura-cepa) como BC (cepa-tiempo), muestran diferencias significativas, por lo que estas interacciones ejercen una clara respuesta en la sobrevivencia de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*. Para la interacción AC (temperatura-tiempo), el análisis estadístico ANDEVA no presenta una diferencia significativa,

por lo que no existiría una relación entre estos dos factores en la sobrevivencia de estas bacterias en jugo de cranberry.

4.2.1 Análisis de los efectos principales sobre la sobrevivencia de *L. rhamnosus* y *L. casei Shirota*. Temperatura, cepa y tiempo presentan diferencias significativas las cuales influyen en la sobrevivencia de las cepas y son analizadas a continuación.

4.2.1.1 Sobrevivencia bacteriana según el factor temperatura. El análisis estadístico de ANDEVA, encontró diferencias significativas ($p < 0.05$), en la sobrevivencia de las bacterias para el factor temperatura. La FIGURA 3, presenta la sobrevivencia de las cepas bacterianas frente a las dos temperaturas, destacándose que a 20 °C las cepas presentan una concentración de $2,15 \times 10^7$ [UFC/mL], con respecto a las cepas incubadas a 4 °C, las cuales disminuyen en un ciclo logarítmico, presentando una concentración final de $7,89 \times 10^6$ [UFC/mL] al final del experimento.

La disminución de la concentración a 4 °C, puede deberse a que a esta temperatura, *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus* que son bacterias mesófilas presentan dificultades para desarrollarse. Debemos recordar, que las bacterias necesitan una condición de temperatura óptima para poder desarrollarse ó mantenerse viables a través del tiempo. DANONE WORLD NEWSLETTER (1995), indica que la temperatura óptima de crecimiento para *L. casei Shirota* es de 10- 40 °C, y de 15- 45 °C para el caso de *L. rhamnosus*. A esto se suma el bajo pH que posee el jugo de cranberry (2.54) y una serie de compuestos que inhiben el crecimiento de las bacterias. Foo et al., citado por HOWELL (2002) LEE, et al. (2002) y MILNER (2002), señalan que el jugo de cranberry contiene numerosos componentes bioactivos responsables de la inhibición bacteriana, principalmente flavonas y proantocianidinas.

No obstante, es posible destacar, que si bien, hubo una disminución de la concentración a 4 °C, las cepas permanecen en una concentración superior a 10^6 [UFC/mL], necesaria para considerar a un alimento como probiótico (SANZ et al., 2003).

La distribución de los grupos homogéneos para el factor temperatura se pueden observar detalladamente en el ANEXO 6.

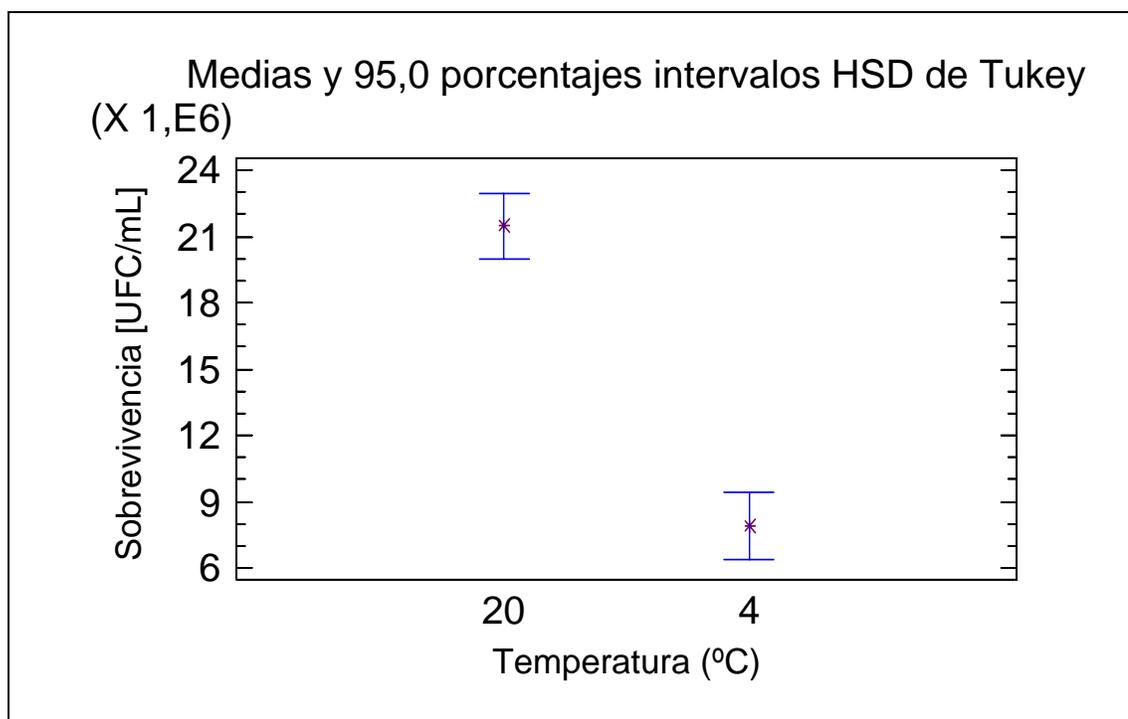


FIGURA 3. Sobrevivencia bacteriana según el factor temperatura.

4.2.1.2 Sobrevivencia bacteriana según el factor cepa. Al observar los resultados obtenidos en el análisis estadístico de ANDEVA, podemos apreciar que existen diferencias significativas sobre la sobrevivencia para el factor cepa, con un p-valor de 0,000, por lo que se procedió a la prueba de rango múltiple de Tukey (ANEXO 7). En la FIGURA 4, se puede apreciar que existe diferencias para las dos cepas en estudio, destacándose que, *L. casei Shirota*, presenta

una concentración media mayor de $2,33 \times 10^7$ [UFC/mL], con respecto a *L. rhamnosus*, la cual disminuye, presentando una concentración media final de $6,01 \times 10^6$ [UFC/mL].

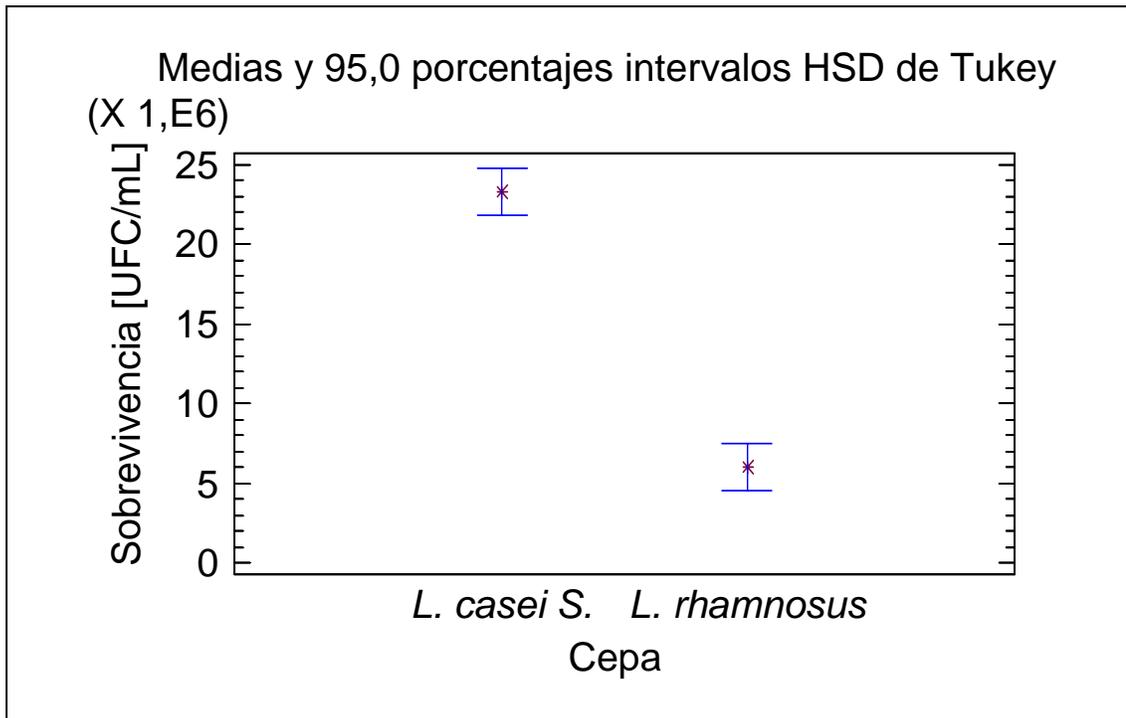


FIGURA 4. Sobrevivencia bacteriana según el factor cepa.

Esta disminución de la viabilidad de *L. rhamnosus*, así como lo menciona Tunell y Sandine (1985), citado por FRAGOSO (2002), se debe a la producción y acumulación de ácido láctico en el medio por parte de las bacterias ácido lácticas, lo cual causa intoxicación de la bacteria y su posterior muerte. Además, se debe recordar que el jugo de cranberry, aparte de poseer sustancias que inhiben el crecimiento bacterial, tiene un pH bajo, igual a 2,54; el cual, según lo mencionado por SAARELA et al. (2004), se considera levemente letal para esta cepa.

De los resultados anteriores, se puede señalar que, *L. casei shirota* y *L. rhamnosus*, presentan un buen comportamiento de sobrevivencia cuando es inoculado en jugo de cranberry, destacándose *L. casei Shirota*, el cual se mantiene en una concentración superior a 10^7 [UFC/mL] a los 20 días de experimentación. Para el caso de *L. rhamnosus*, se puede observar que, si bien la concentración es menor con respecto a la otra bacteria en estudio, la sobrevivencia de este microorganismo es mayor a 10^6 [UFC/mL], concentración necesaria para que este producto se considere como alimento probiótico.

4.2.1.3 Sobrevivencia bacteriana según el factor tiempo. Se puede apreciar que existen diferencias significativas sobre la sobrevivencia de las bacterias a medida que transcurre el tiempo de experimentación. Al analizar la FIGURA 5, obtenida de la prueba de rangos múltiples de Tuckey, se puede apreciar que existen 3 grupos los cuales presentan diferencias significativas en la media de sobrevivencia. El grupo A, compuesto por T0; grupo B, formado por los tiempos T1, T2, T3, T4, T5; y el grupo C formado por los tiempos T1, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 Y T10.

Al observar el ANEXO 8, se puede destacar que existen diferencias significativas entre el grupo A (T0) con los grupos B y C en la media de sobrevivencia de las cepas inoculadas en el jugo de cranberry. Esta diferencia se incrementa a medida que pasa el tiempo, disminuyendo la población de bacterias en el jugo de cranberry. La baja en la concentración de las bacterias puede deberse a que los microorganismos se encuentran en un medio totalmente hostil para su multiplicación. El bajo pH y las sustancias antibacterianas que posee el jugo de cranberry, además de la muerte de las bacterias, hacen que se produzcan cambios químicos en el medio, inhibiendo el crecimiento de estas cepas probióticas. Otra causa puede ser la competencia de las bacterias por los nutrientes en el medio, lo que hace que solamente algunas puedan mantenerse viables a través del tiempo.

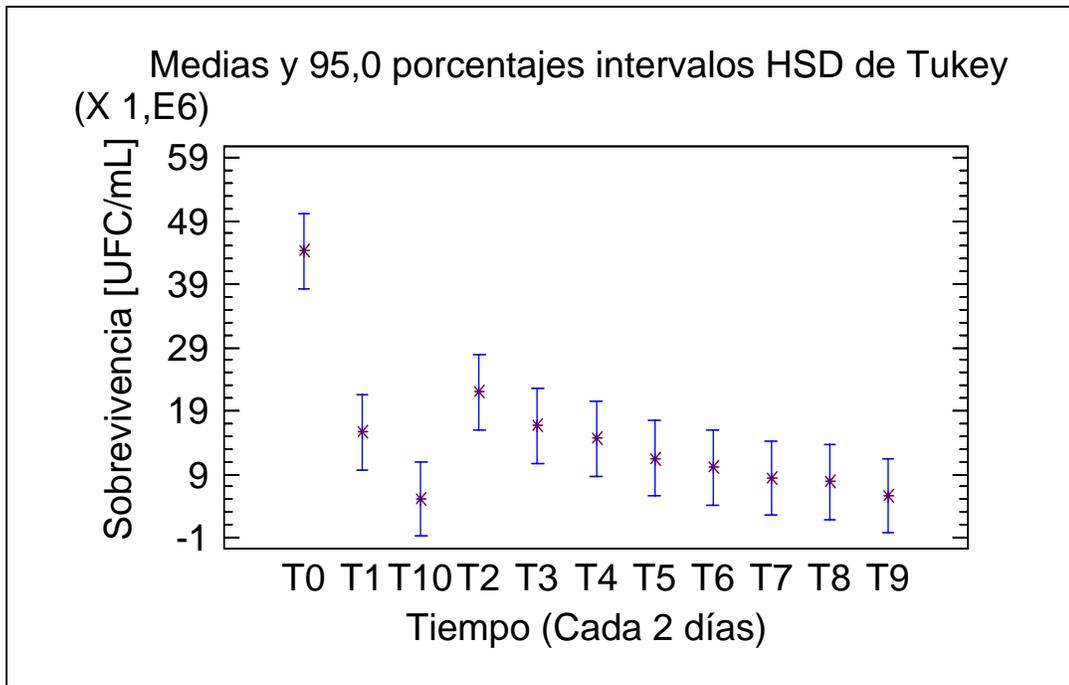


FIGURA 5. Supervivencia de las bacterias según el factor tiempo.

Es necesario destacar, que si bien es cierto, existen diferencias en la supervivencia, partiendo de una concentración inicial de 4.43×10^7 [UFC/mL], al final de los 20 días de experimentación (T10), se observa una concentración de 5.12×10^6 [UFC/mL], lo cual indica que las bacterias inoculadas en el jugo de cranberry, pueden sobrevivir durante este período en concentraciones suficientes para considerarse como alimento probiótico.

4.2.2 Análisis de las interacciones sobre la supervivencia de *L. rhamnosus* y *L. casei* Shirota. Al observar los resultados obtenidos en el análisis estadístico ANDEVA, se puede ver que dos de las tres interacciones ejercen efectos sobre la supervivencia de las bacterias en jugo de cranberry. Estos resultados son comentados a continuación.

4.2.2.1 Análisis de la interacción temperatura-cepa sobre la sobrevivencia de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*. Para el caso de la interacción AB (temperatura, cepa), se puede apreciar que influye directamente sobre la sobrevivencia de estas bacterias. Como se observa en la FIGURA 6, *L. casei Shirota* presenta un mejor comportamiento de sobrevivencia que *L. rhamnosus* a temperatura de 20 °C. La media de sobrevivencia fue de 3.59×10^7 [UFC/mL] para *L. casei Shirota*, mientras que para *L. rhamnosus*, esta media es de 6.95×10^6 [UFC/mL] (ANEXO 9). La misma situación ocurre a temperatura de 4 °C, en la que se puede apreciar que *L. casei Shirota*, presenta una concentración mayor de 1.07×10^7 [UFC/mL], con respecto a *L. rhamnosus*, el cual presenta una sobrevivencia de 5.06×10^6 [UFC/mL]. También hay que mencionar que - tanto para *L. casei Shirota* como para *L. rhamnosus*- la condición de sobrevivencia en el jugo de cranberry es mejor cuando estas cepas interaccionan a temperatura de 20 °C.

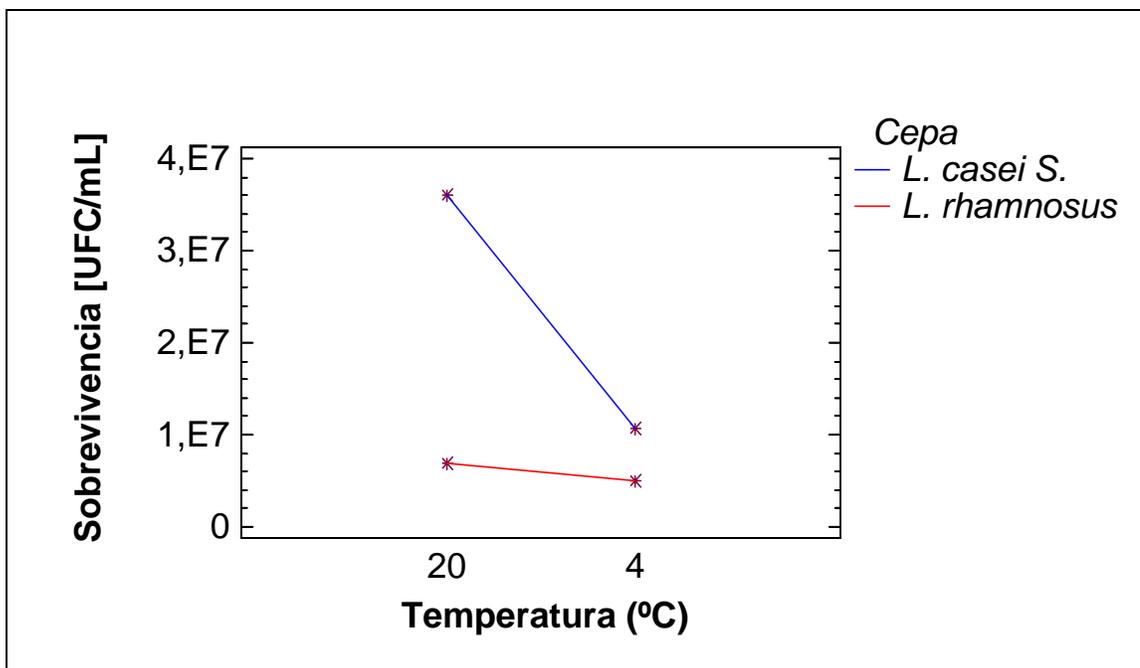


FIGURA 6. Interacción entre temperatura y cepa sobre la sobrevivencia de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*.

Los resultados obtenidos para *L. casei Shirota* a 20 °C, concuerdan con los obtenidos por TORRES et al. (2003), en el cual se observó la sobrevivencia de esta cepa inoculada en leche fermentada (pH 3,6), y almacenada a 20 °C. La concentración inicial en este caso fue de 10^9 [UFC/mL], la cual se mantuvo por espacio de 30 días, finalizando con una concentración superior a 10^7 [UFC/mL], al cabo de 60 días de experimentación. Si bien, el medio utilizado en este ensayo, difiere con el jugo de cranberry, se puede observar que las bacterias, son capaces de sobrevivir a esa temperatura de almacenamiento, manteniéndose de mejor manera que cuando son almacenadas a 4 °C. Además, las muestras de 20 °C, sembradas en agar MRS, (tanto para *L. casei Shirota* como *L. rhamnosus*), muestran colonias de tamaño mucho mayor en comparación a las muestras incubadas a 4 °C, lo que podría deberse a que las bacterias tienden a desarrollarse, compitiendo con el pH y los compuestos antibacteriales que contiene el jugo de cranberry.

Para el caso de la sobrevivencia de *L. casei Shirota* a temperatura de 4 °C, los resultados se asemejan con los obtenidos por YOON et al. (2005), en los cuales se observó la viabilidad de *L. casei Shirota* en jugo de remolacha, comprobando que esta cepa disminuye su concentración en un ciclo logarítmico, de $1,67 \times 10^9$ [UFC/mL] a $7,70 \times 10^8$ [UFC/mL], en un período de 24 días.

4.2.2.2 Análisis de la interacción temperatura-tiempo sobre la sobrevivencia de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*. Debido a que esta interacción analiza las cepas en conjunto, no se disponen de los resultados ya que se trabajó con jugo de cranberry inoculado con una cepa y no con una mezcla de ambas.

4.2.2.3 Análisis de la interacción cepa- tiempo sobre la sobrevivencia de *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus*. Los resultados estadísticos indican que esta interacción si afecta la viabilidad de las bacterias en el jugo de cranberry. La FIGURA 7 muestra las interacciones de los distintos tiempos para las dos cepas en estudio sobre el efecto que producen en la sobrevivencia de estos microorganismos. Se puede observar que *L. casei Shirota*, presenta un mejor comportamiento de sobrevivencia a medida que pasa el tiempo. La concentración inicial fue de $6,90 \times 10^7$ [UFC/mL], para terminar al T10 (20 días) con $8,09 \times 10^6$ [UFC/mL]. *L. rhamnosus*, al T0 (0 días) presento una concentración de $1,94 \times 10^7$ [UFC/mL] finalizando al T10 (20 días) con 2.15×10^6 [UFC/mL]. Además se puede ver que la ubicación de la recta en el gráfico para el T1 está por debajo del T2 y T3. Esto se debe a que, desde T2 hasta el T10, las muestras -tanto de *L. casei Shirota* como de *L. rhamnosus*- fueron inoculadas con un 1% más de cultivo madre, subiendo la concentración para los tiempos restantes. A partir del T4 (8 días) hasta el T10 (20 días), las rectas tienen un comportamiento similar tanto para *L. casei Shirota* como para *L. rhamnosus*. La sobrevivencia de las bacterias para los distintos tiempos, pueden ser observados en el ANEXO 10.

Si bien, estos resultados se encuentran por encima de 10^6 [UFC/mL], pueden mejorarse, aumentando el tiempo de duración del producto con la cantidad requerida de bacterias probióticas mediante la inoculación inicial de una mayor concentración de microorganismos en el jugo de cranberry.

Como se indicó anteriormente TORRES et al., (2000) realizaron un estudio, en el cual inocularon *L. casei Shirota* en leche fermentada partiendo de una concentración inicial de $1,00 \times 10^9$ [UFC/mL]. Pudieron apreciar que a los 60 días de almacenamiento, la leche fermentada presentó una concentración final superior a 10^7 [UFC/mL]. En la presente investigación, la concentración inicial

sólo fue de 10^7 [UFC/mL], bajando la sobrevivencia en un ciclo logarítmico al cabo de 20 días.

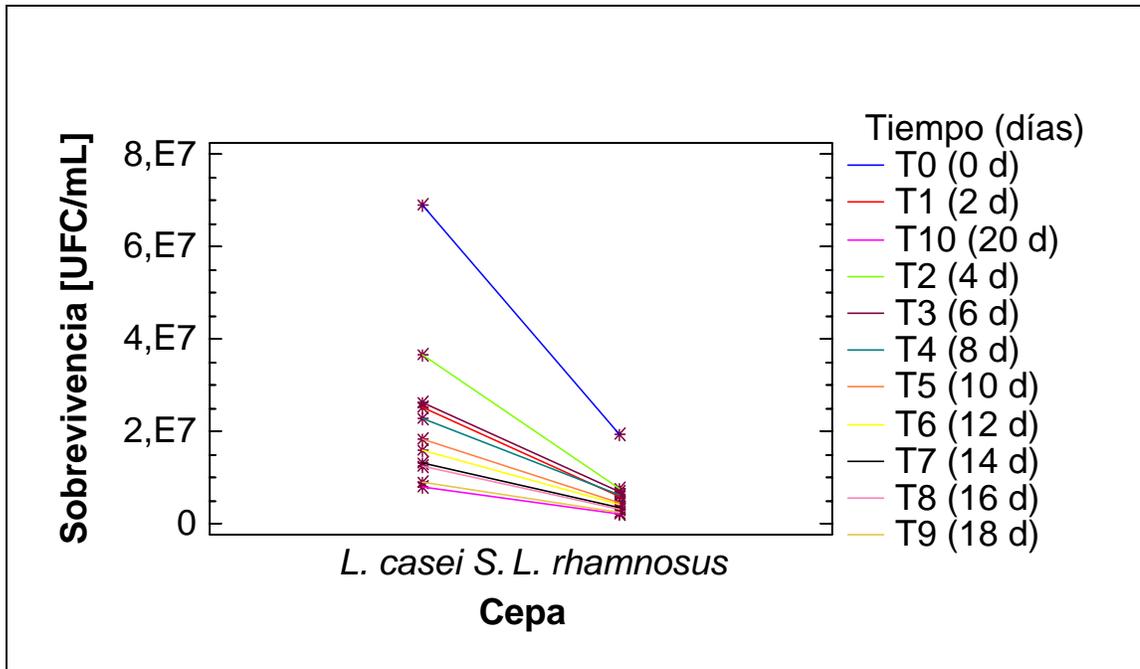


FIGURA 7. Interacción entre tiempo y cepa bacteriana sobre la sobrevivencia de *L. casei* Shirota y *L. rhamnosus*

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten concluir lo que sigue:

- *L. casei Shirota* y *L. rhamnosus* -pertenecientes al grupo de las bacterias ácido-lácticas- presentan una buena sobrevivencia en jugo de cranberry diluido al 10 % y con pH 2,54 durante un período de 20 días de almacenamiento a temperaturas de 4 y 20 °C.
- Las cepas inoculadas en jugo de cranberry, incubadas a temperatura de 20 °C, presentan una mayor sobrevivencia en el tiempo, en comparación a las cepas inoculadas en el mismo jugo pero incubadas a temperatura de 4 °C.
- *L. casei Shirota* presenta una mayor concentración final a temperaturas de 4 y 20 °C, con respecto a *L. rhamnosus*, el cual exhibió una menor concentración final al cabo de un tiempo de 20 días, pero, no obstante, superior a 10^6 [UFC/mL].
- Es posible aumentar la duración del jugo como bebida probiótica, aumentando la concentración inicial de inóculo por sobre 10^7 [UFC/mL] y manteniéndolo a temperatura de almacenamiento de 20 °C.

6. RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la capacidad de sobrevivencia de dos cepas probióticas- *Lactobacillus casei Shirota* y *Lactobacillus rhamnosus*- inoculadas -por separado- en jugo de cranberry y almacenadas a temperatura de 4 y 20 °C. La sobrevivencia de las bacterias fue determinada a los 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 días de almacenamiento.

Los resultados mostraron que a temperatura de 4 °C, *L. rhamnosus* mostró una mayor sobrevivencia que *L. casei Shirota*, presentando a los 16 días una concentración superior a 10^6 [UFC/mL], finalizando a los 20 días con 6.17×10^4 [UFC/mL], mientras que *L. casei Shirota* presentó una concentración mayor a 10^6 [UFC/mL] solo hasta el octavo día, terminado con una concentración de 7.33×10^3 [UFC/mL] al día 20. Para el caso de 20 °C, *L. casei Shirota* mostró una mejor sobrevivencia terminado con 1.63×10^7 [UFC/mL], mientras que *L. rhamnosus* disminuyó su concentración en 1 ciclo logarítmico para finalizar con 4.35×10^6 [UFC/mL].

El análisis de los factores señala diferencias significativas, por lo que cepa, tiempo y temperatura ejercen un efecto en la sobrevivencia de las cepas en el jugo de cranberry. Similar caso ocurre con las interacciones temperatura-cepa y cepa-tiempo las cuales influyen en la sobrevivencia de las bacterias.

SUMMARY

The present study was conducted to determine the survival capacity of two probiotic strains - *Lactobacillus casei Shirota* and *Lactobacillus rhamnosus* – being separately inoculated in cranberry juice and cultivated at 4° and 20° C. The survival of the bacteria was determined after 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 days.

The results showed that at the temperature of 4 °C *L. rhamnosus* has a higher survival than *L. casei Shirota*, showing after 16 days a concentration higher than 10^6 [UFC/mL], finishing at 20 days with 6.17×10^4 [UFC/mL], while *L. casei Shirota* showed a concentration higher than 10^6 [UFC/mL] only until the 8th day, finishing with a concentration of 7.33×10^3 [UFC/mL] on the 20th day.

At the other temperature - 20 °C -, *L. casei Shirota* showed a better survival finishing with 1.63×10^7 [UFC/mL], while *L. rhamnosus* decreased his concentration in one logarithmic cycle, ending with 4.35×10^6 [UFC/mL].

The factor analysis showed significant differences, having strain, time and temperature an effect on the survival of the strains in cranberry juice. Something similar happens with the interactions temperature – strain and strain – time, which have an influence on the survival of baterias.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, F. 2003. Genetically modified probiotics in foods. Trends in biotech. 21(11):491-7.
- ANURADHA, S. Y RAJESHWARI, K. 2005. Probiotics in health and disease. J. Indian Acad. of Clin. Med. 6(1): 67-72.
- ASAHARA, T., TAKAHASHI, M., NOMOTO, K., TAKAYAMA, H., ONOUE, M., MOROTOMI, M., TANAKA, R., YOKOKURA, T. y YAMASHITA, N. 2003. Assessment of safety of *Lactobacillus* Strains based on resistance to host innate defense mechanisms. Clin. diag. lab. immun. 10(1): 169–173.
- ASO, Y. y AKAZAN, H. 1992. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. Urol. Int. 49(3):125-9.
- BOUZAINÉ, T., DAUPHIN, R., THONART, PH, URDACI, M y HAMDÍ, M. 2005. Adherence and colonization properties of *Lactobacillus rhamnosus* TB1, a broiler chicken isolate. Letters in Applied Microbiology. 40(5): 391–396
- BURGER, O., WEISS, E., SHARON, N., TABAK, M., NEEMAN, I., y OFEK, I. 2002. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. Critical Reviews in Food Science & Nutrition. 42(Suppl.): 279-284.
- BUZETA, A. 1997. Chile: Berries para el 2000. Departamento Agroindustrial Fundación Chile. Pp. 15-19.

- COLLINS, M., PHILLIPS, B. y ZANONI, P. 1989. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. Int. J. systematic Bacteriol. 39, 105-108.
- DANONE WORLD NEWSLETTER. 1995. *Lactobacillus casei*. (Disponible en:<http://www.danonevitapole.com>. Consultado 13 de enero de 2004)
- DE ROOS, N. y KATAN, M. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am. J. Clin. Nutr.71(2):405–411.
- DONOHUE, D. y SALMINEN, S. 1996. Safety of probiotic bacteria. Asia pacific J. clin. Nutr. 5:25-28.
- FORESTIER, C., DECHAMPS, C., VATOUX, C. Y JOLY, B. 2001. Probioticactivities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: invitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res.Microbiol.152:167–173
- FRAGOSO, L., FERNANDEZ, M., ALVAREZ, G. y GARCIA, I. 2001. Evaluación de cepas lácticas para su aplicación en probióticos. Alimentaria 01(59): 59- 62.
- GOLDIN, B., GORBACH, S., SAXELIN, M., BARAKAT, S., GUALTIERI, L. y SALMINEN, S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. Dig. Dis. Sci. 37, 121-128.
- GODERSKA, K., CZARNECKA, M. Y CZARNECKI, Z. 2002. Survival rate of Chosen *lactobacillus* bacteria type in media of different pH. Food Science and Technology. 5(1): 1-8.

- GUARNER, F. y SCHAAFSTMA, G. 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microb.* 39:237-238.
- HAMILTON- MILLER, J. 2003. The role of the probiotics in the treatment and prevention of helicobacter pylori infection. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22(4):360-366.
- HARSHARNJIT, S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences In the gastrointestinal tract. *Best pract. Res. Clin. Gastroent.* 17(5): 755- 773.
- HOWELL, A.B.2002. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Critical reviews in food science and nutrition.* 42(suppl.):273-278.
- ISHIBASHI, N. y YAMAZAKI, S. 2001. Probiotics and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2): 465- 470.
- ISOLAURI, E., SÜTAS, Y., KANKAANPÄÄ, P., ARVILOMMI, H. y SALMINEN, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2): 444-450.
- KLAENHAMMER, T. y KULLEN, M. 1999. Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microb.* 50(1-2):45-57.
- KONTIOKARI, T., SUNDQVIST, K., NUUTINEN, M., PKKA, T., KOSKELA, M. y UARI, M. 2001. Randomized trial of cranberry lingonberry juice and lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *Br. Med. J.* 322:1571-1573.
- LACAYO, M. 2004. Diseño de un jugo de hortalizas y estudio de la viabilidad de *Lactobacillus casei* en el jugo. Tesis. Univ. de Chile. p13- 17.

- LEE,L.,Y, OWENS,J, THRUUPP,L, y CESARIO, T. 2000. Does cranberry juice have antibacterial activity?. The Journal of the American Medical Association. 13(283): 1691.
- LOCASCIO, M., GONZALEZ, S., APELLA, M., LABANDA, E. y OLIVER, G. 2002. Probiotic bacteriotherapy in chronic infantile diarrhea. INCL. 27(7):
- LOWE F. y FAGELMAN, E. 2001. Cranberry juice and urinary tract infections: what is the evidence?. Urology. 57:407-13.
- MAJAMAA, H., ISOLAURI, E., SAXELIN, M. Y VESIKARI, T. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. J. Ped. Gastr. Nutr. 20(3):333–338.
- MATSUZAKI, T. 1998. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain *Shirota*. Int. J. Food Microb. 41(2): 133- 140.
- MAINVILLE, I., ARCAND, Y. y FARNWORTH, ER. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal Tract for the study of probiotics. Int. J Food Microb. 99(3): 287- 296.
- MILNER,J.,A, 2002. Foods and health promotion: The case for cranberry. Critical reviews in food science and nutrition. 42(suppl):265-266.
- MORI, K., YAMAZAKI, K., ISHIYAMA, T., KATSUMATA,M., KOBAYASHI, K., KAWAI, Y., INOUE, N. y SHINANO, H. 1997. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:54-57.
- NARAYANAN, N., ROYCHOUDHURY, P. y SRIVASTAVA A. Isolation of *adh* mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) Lactic acid. 2004. Elect. J.Biotec. 7(1): 72- 84.

- OKAWA, T., NIIBE, H., ARAI, T., SEKIBA, K., NODA, K., TAKEUCHI, S., HASHIMOTO, S. y OGAWA, N. 1993. Effect of LC9018 combined with radiation therapy on carcinoma of the uterine cervix. A phase III, multicenter, randomized, controlled study. *Cancer*. 72(6):1949-54.
- PEDONE, C., ARNAUD, C., POSTAIRE, E., BOULEY, C. Y REINERT, P. 2000. Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *IJCP* 54 (9), 568-571.
- PEREIRA, D. Y GIBSON, G. 2002. Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. *Applied and Env. Microb.* 68(9): 4689-4693.
- REID, G. 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2):437– 443.
- ROBINSON, R.y SAMONA, A. 1992. Health aspects of bifidus products: a review. *Int J. Food Sci. Nutr.* 43:175-180.
- SAARELA. M., MOGENSEN, G., FONDEN, R., MATTO, J. y MATTILA-SANDHOLM, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotech.* 84(3): 197- 215.
- SAARELA, M., RANTALA, M., HALLAMAA, K., NOHYNEK, L., VIRKAJÄRVI, .y MÄTTÖ, J. 2004. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J. App. Microb.* 96: 1205- 1214.
- SANDERS, ME. 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* 130: 384- 390.

- SCHREZENENMEIR, J. y DEVRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics- approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2): 361- 364.
- SANZ, Y., COLLADO, M. y DALMAU, J. 2003. Probioticos: criterios de calidad y orientación para su consumo. *Acta pediátrica española.* 6(9): 58-64.
- SURAWICZ, C. 2003. Probiotics, antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* diarrhea in humans. *B. Pract. Res. Clin. Gastr.* 17(5):775–783
- TAKAGI, A., MATSUZAKI, T., SATO, M., NOMOTO, K., MOROTOM, M. y YOKOKURA, T. 2001. Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis* 22 (4), 599-605.
- TEITELBAUM, J. y WALKER, A. 2002. Nutritional impact of pre and probiotics as protective gastrointestinal organism. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 107- 138.
- THE CRANBERRY INSTITUTE. Health research. 2005. (Disponible en <http://www.Cranberryinstitute.com>. Consultado el 11 de abril de 2005).
- TORRES, M. 2003. Cambios en la flora intestinal con la edad. (Disponible en <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/ee-4-2003/02.pdf>. Consultado el 15 de marzo de 2005).
- VINSON, J., SU, X., ZUBIK, L. y BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001. 49(11): 5315-5312.
- WARD, J. Y TIMMINS, M. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. in App. Microb.* 29:90–92.

YAKULT. 2005. Probiotics. (Disponible en: <http://www.yakult.com.au>. Consultado el 25 de marzo de 2005).

YOON, K., WOODAMS, E. y HANG, Y. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*38:73– 75.

YOUNG, R. y HUFFMAN, S. 2003. Probiotics use in children. *J. Ped. Health Care.* 17: 277-283.

ANEXOS

ANEXO 1

Comportamiento del pH en jugo de cranberry inoculado con *L. casei* Shirota y *L. rhamnosus* a temperaturas de 4 y 20 °C.

Cepa	LcS	LcS	Lr	Lr
Tiempo	20 °C	T 4 °C	T 20 °C	T 4 °C
T0	2,85	2,83	2,78	2,82
T1	2,82	2,82	2,77	2,80
T2	2,75	2,73	2,69	2,72
T3	2,74	2,72	2,67	2,71
T4	2,73	2,71	2,66	2,70
T5	2,69	2,69	2,65	2,68
T6	2,65	2,66	2,61	2,64
T7	2,60	2,65	2,57	2,61
T8	2,59	2,64	2,56	2,60
T9	2,56	2,64	2,56	2,59
T10	2,59	2,63	2,54	2,58

ANEXO 2

Recuento de *Lactobacillus casei* Shirota inoculado en jugo de cranberry y almacenado a temperatura de 4 °C.

<i>Lactobacillus casei</i> Shirota (T 4 °C)				
Tiempo	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio general
T0	1,10E+08	4,50E+07	8,00E+07	7,83E+07
T1	4,00E+06	3,00E+06	1,55E+07	7,50E+06
T2	1,50E+07	1,00E+07	4,00E+07	2,17E+07
T3	4,00E+06	2,50E+06	1,20E+07	6,17E+06
T4	2,25E+06	2,05E+06	5,60E+06	3,30E+06
T5	3,50E+05	3,50E+05	5,50E+05	4,17E+05
T6	3,30E+05	1,85E+05	4,15E+05	3,10E+05
T7	2,10E+05	5,00E+04	2,60E+05	1,73E+05
T8	1,50E+04	2,50E+04	2,50E+04	2,17E+04
T9	1,30E+04	9,50E+03	9,00E+03	1,05E+04
T10	7,50E+03	7,00E+03	7,50E+03	7,33E+03

ANEXO 3

Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* inoculado en jugo de cranberry y almacenado a temperatura de 4 °C.

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (T 4 °C)				
Tiempo	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio general
T0	1,35E+07	1,30E+07	1,50E+07	1,38E+07
T1	1,25E+07	1,25E+07	4,00E+06	9,67E+06
T2	8,60E+06	8,50E+06	7,60E+06	8,23E+06
T3	7,65E+06	8,10E+06	7,45E+06	7,73E+06
T4	4,20E+06	7,55E+06	7,30E+06	6,35E+06
T5	3,70E+06	3,60E+06	2,95E+06	3,42E+06
T6	2,20E+06	3,40E+06	2,40E+06	2,67E+06
T7	1,95E+06	2,65E+06	1,45E+06	2,02E+06
T8	1,00E+06	2,40E+06	1,30E+06	1,57E+06
T9	2,00E+05	2,50E+05	1,50E+05	2,00E+05
T10	6,50E+04	7,00E+04	5,00E+04	6,17E+04

ANEXO 4

Recuento de *Lactobacillus Casei Shirota* inoculado en jugo de cranberry almacenado a temperatura de 20 °C.

<i>Lactobacillus casei Shirota (T 20 °C)</i>				
Tiempo	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio general
T0	4,95E+07	6,50E+07	6,50E+07	5,98E+07
T1	2,50E+07	5,10E+07	5,35E+07	4,32E+07
T2	4,75E+07	5,50E+07	5,10E+07	5,12E+07
T3	4,50E+07	4,90E+07	4,50E+07	4,63E+07
T4	4,40E+07	4,30E+07	4,05E+07	4,25E+07
T5	4,20E+07	3,70E+07	3,00E+07	3,63E+07
T6	3,35E+07	3,60E+07	2,55E+07	3,17E+07
T7	3,10E+07	3,00E+07	1,70E+07	2,60E+07
T8	3,15E+07	2,60E+07	1,65E+07	2,47E+07
T9	1,50E+07	2,25E+07	1,55E+07	1,77E+07
T10	1,25E+07	2,00E+07	1,63E+07	1,63E+07

*M.C.: Muestra contaminada

ANEXO 5

Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* inoculado en jugo de cranberry y almacenado a temperatura de 20 °C.

<i>Lactobacillus rhamnosus (T 20 °C)</i>				
Tiempo	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio general
T0	2,00E+07	4,00E+07	1,50E+07	2,50E+07
T1	2,00E+06	3,00E+06	2,00E+06	2,33E+06
T2	7,30E+06	6,00E+06	6,55E+06	6,62E+06
T3	7,00E+06	6,95E+06	7,05E+06	7,00E+06
T4	6,75E+06	5,70E+06	6,05E+06	6,17E+06
T5	6,60E+06	5,45E+06	5,55E+06	5,87E+06
T6	6,15E+06	5,35E+06	5,20E+06	5,57E+06
T7	5,80E+06	5,00E+06	4,75E+06	5,18E+06
T8	5,40E+06	4,75E+06	4,45E+06	4,87E+06
T9	4,80E+06	4,20E+06	4,10E+06	4,37E+06
T10	4,70E+06	4,00E+06	4,35E+06	4,35E+06

ANEXO 6

Prueba de rangos múltiples para sobrevivencia según temperatura.

Método: 95,0 % HSD de Tuckey					
Temperatura	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos	
				A	B
4	66	7,89E6	1,08E6		X
20	66	2,15E6	1,08E6	X	
Contraste		Diferencia		+/- Límites	
20 - 4		*1,36E7		3,02E6	

ANEXO 7

Prueba de rangos múltiples para sobrevivencia según cepa.

Método: 95,0 % HSD de Tuckey					
Cepa	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos	
				A	B
<i>L. rhamnosus</i>	66	6,01E6	1,08E6		X
<i>L. c. Shirota</i>	66	2,33E7	1,08E6	X	
Contraste		Diferencia		+/- Límites	
<i>L. c. Shirota</i> – <i>L. rhamnosus</i>		*1,73E7		3,02E6	

ANEXO 8

Prueba de rangos múltiples para sobrevivencia según tiempo.

Método: 95,0 % HSD de Tuckey						
Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos		
				A	B	C
T10	12	5,12E6	2,52E6			X
T9	12	5,56E6	2,52E6			X
T8	12	7,78E6	2,52E6			X
T7	12	8,34E6	2,52E6			X
T6	12	1,01E7	2,52E6			X
T5	12	1,15E7	2,52E6		X	X
T4	12	1,46E7	2,52E6		X	X
T3	12	1,66E7	2,52E6		X	X
T2	12	2,19E7	2,52E6		X	
T1	12	1,56E7	2,52E6		X	X
T0	12	4,43E7	2,52E6	X		
Contraste		Diferencias		+/- Límites		
T0 - T1		*2,86E7		1,18E7		
T0 - T2		*2,23E7		1,18E7		
T0 - T3		*2,76E7		1,18E7		
T0 - T4		*2,97E7		1,18E7		
T0 - T5		*3,27E7		1,18E7		
T0 - T6		*3,42E7		1,18E7		
T0 - T7		*3,59E7		1,18E7		
T0 - T8		*3,65E7		1,18E7		
T0 - T9		*3,87E7		1,18E7		
T0 - T10		*3,91E7		1,18E7		
T1 - T2		-6,30E6		1,18E7		

(Continuación ANEXO 8)

T1 - T3	-1,02E6	1,18E7
T1 - T4	1,05E6	1,18E7
T1 - T5	4,12E6	1,18E7
T1 - T6	5,57E6	1,18E7
T1 - T7	7,28E6	1,18E7
T1 - T8	7,84E6	1,18E7
T1 - T9	1,00E7	1,18E7
T1 - T10	1,05E7	1,18E7
T10 - T2	*-1,68E7	1,18E7
T10 - T3	-1,15E7	1,18E7
T10 - T4	-9,46E6	1,18E7
T10 - T5	-6,39E6	1,18E7
T10 - T6	-4,94E6	1,18E7
T10 - T7	-3,23E6	1,18E7
T10 - T8	-2,66E6	1,18E7
T10 - T9	-44378,0	1,18E7
T2 - T3	5,28E6	1,18E7
T2 - T4	7,34E6	1,18E7
T2 - T5	1,04E7	1,18E7
T2 - T6	*1,19E7	1,18E7
T2 - T7	*1,36E7	1,18E7
T2 - T8	*1,41E7	1,18E7
T2 - T9	*1,64E7	1,18E7
T3 - T4	2,06E6	1,18E7
T3 - T5	5,13E6	1,18E7
T3 - T6	6,59E6	1,18E7
T3 - T7	8,30E6	1,18E7
T3 - T8	8,86E6	1,18E7

(Continuación ANEXO 8)

T3 - T9	1,11E7	1,18E7
T4 - T5	3,07E6	1,18E7
T4 - T6	4,53E6	1,18E7
T4 - T7	6,24E6	1,18E7
T4 - T8	6,80E6	1,18E7
T4 - T9	9,01E6	1,18E7
T5 - T6	1,46E6	1,18E7
T5 - T7	3,16E6	1,18E7
T5 - T8	3,73E6	1,18E7
T5 - T9	5,95E6	1,18E7
T6 - T7	1,71E6	1,18E7
T6 - T8	2,27E6	1,18E7
T6 - T9	4,49E6	1,18E7
T7 - T8	562917,0	1,18E7
T7 - T9	2,79E6	1,18E7
T8 - T9	2,22E6	1,18E7

*Indica una diferencia significativa

ANEXO 9

Tabla de Medias por mínimos cuadrados para sobrevivencia con 95,0 Intervalos de confianza para temperatura según cepa.

Nivel		Frecuencia Media		Error estándar	Límite inferior	Límite superior
20	L.c.S.	33	3,60E7	1,52E6	3,29E7	3,90E7
20	L.r.	33	6,96E6	1,52E6	3,94E6	9,98E6
4	L.c.S.	33	1,07E7	1,52E6	7,68E6	1,37E7
4	L.r.	33	5,08E6	1,52E6	2,05E6	8,09E6

ANEXO 10

Tabla de Medias por mínimos cuadrados para sobrevivencia con 95,0 Intervalos de confianza para cepa según tiempo

Nivel		Frecuencia Media		Error estándar	Límite inferior	Límite superior
L.c.S.	T0	6	6,91E7	3,57E6	6,20E7	7,62E7
L.c.S.	T1	6	2,53E7	3,57E6	1,82E7	3,23E7
L.c.S.	T2	6	3,64E7	3,57E6	2,93E7	4,35E7
L.c.S.	T3	6	2,63E7	3,57E6	1,92E7	3,33E7
L.c.S.	T4	6	2,29E7	3,57E6	1,58E7	2,99E7
L.c.S.	T5	6	1,84E7	3,57E6	1,13E7	2,55E7
L.c.S.	T6	6	1,59E7	3,57E6	8,90E6	2,31E7
L.c.S.	T7	6	1,31E7	3,57E6	6,00E6	2,02E7
L.c.S.	T8	6	1,23E7	3,57E6	5,26E6	1,94E7
L.c.S.	T9	6	8,84E6	3,57E6	1,75E6	1,59E7
L.c.S.	T10	6	8,09E6	3,57E6	1,00E6	1,52E7
L.r.	T0	6	1,94E7	3,57E6	1,23E7	2,65E7
L.r.	T1	6	6,00E6	3,57E6	-1,09E6	1,31E7
L.r.	T2	6	7,43E6	3,57E6	339944,0	1,45E7
L.r.	T3	6	7,03E6	3,57E6	-51723,1	1,41E7
L.r.	T4	6	6,26E6	3,57E6	-826723,0	1,33E7
L.r.	T5	6	4,64E6	3,57E6	-2,44E6	1,17E7
L.r.	T6	6	4,12E6	3,57E6	-2,97E6	1,12E7
L.r.	T7	6	3,60E6	3,57E6	-3,49E6	1,07E7
L.r.	T8	6	3,22E6	3,57E6	-3,87E6	1,03E7
L.r.	T9	6	2,28E6	3,57E6	-4,80E6	9,36E6
L.r.	T10	6	2,15E6	3,57E6	-4,94E6	9,23E6