

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

**Estudio de la Viabilidad de *Lactobacillus casei*
en Jugo de Pera**

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

Ana Odette Vergara Sobarzo

VALDIVIA – CHILE

2007

PROFESOR PATROCINANTE:

FERNANDO FIGUEROLA RIVAS:

Ingeniero Agrónomo

M. S. Food Science

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos _____

PROFESOR COPATROCINANTE:

BERNARDO CARRILLO LOPEZ:

Ingeniero Agrónomo

Master en Ciencia e Ingeniería en alimentos

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos _____

PROFESOR INFORMANTE:

HAROLDO MAGARIÑOS HAWKINS:

Técnico en Lechería

Magíster en Ciencia y Tecnología de la leche

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos _____

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y toda mi familia por su apoyo en el desarrollo de toda mi carrera.

A mis profesores y la escuela de Ingeniería en Alimentos por todo su respaldo durante mi estadía en la Universidad.

A mis compañeros y amigos con los que compartí alegrías y penas.

A todos quienes de alguna u otra forma hicieron posible que completara mi formación profesional.

Finalmente a todos quienes me cuidaron, me sostuvieron y protegieron en los momentos difíciles que me tocó vivir.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Probiótico	3
2.2	Característica de la cepa probiótica	3
2.3	Viabilidad y estabilidad de la cepa	4
2.4	Mecanismo de acción de la bacterias ácido lácticas	5
2.5	<i>Lactobacillus casei</i>	6
2.6	Jugo de pera como materia prima	9
3	MATERIAL Y MÉTODO	10
3.1	Materiales	10
3.1.1	Materia prima	10
3.1.2	Insumos microbiológicos	10
3.1.3	Insumos químicos	10
3.1.4	Instrumentos y utensilios	10
3.2	Lugar de ensayo	10
3.3	Metodología	10
3.3.1	Proceso de activación e inoculación de <i>L. casei</i> al jugo de pera	11
3.4	Determinaciones analíticas	11
3.4.1	Determinación de pH	11
3.4.2	Determinación de acidez	11
3.4.3	Cuantificación de <i>L. casei</i> en jugo de pera	11

3.4.3.1	Preparación de agar MRS	13
3.4.3.2	Preparación de agua peptonada	13
3.4.3.3	Diluciones seriadas e inóculo de <i>L. casei</i> en placa Petri para recuento microbiológico	14
3.4.4	Análisis sensorial	17
3.5	Diseño experimental	17
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	19
4.1	Jugo y sus características	19
4.2	Cinética de crecimiento	19
4.3	Comportamiento de pH	22
4.4	Relación viabilidad – comportamiento de pH	23
4.5	Comportamiento de acidez	23
4.6	Análisis sensorial	25
4.6.1	Grado de acidez	25
4.6.2	Aceptación general	27
4.7	Relación aceptación y grado de acidez	27
5	CONCLUSIONES	28
6	RESUMEN	29
7	BIBLIOGRAFÍA	31
8	ANEXOS	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Beneficios de probióticos	7
2	Taxonomía de <i>L. casei</i>	8
3	Diseño experimental	18
4	Especificación del jugo de pera comercial	19
5	Comportamiento de pH , acidez y recuento microbiológico en el jugo de pera durante el periodo de almacenamiento	21
6	Evaluación entregada por los panelistas para aceptación y acidez del jugo de pera durante el periodo de almacenamiento	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama de flujo para la activación e inóculo de <i>L. casei</i>	12
2	Jugo de pera inoculado con <i>L. casei</i> , almacenado a temperatura ambiente	13
3	Metodología de siembra en placa Petri	15
4	Recuento de <i>L. casei</i> mediante diluciones seriadas	16
5	(a) Colonias características de <i>L. casei</i> en placa Petri, (b) <i>L. casei</i> observado en el microscopio	20
6	Cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> en jugo de pera obtenida mediante recuento viable sobre agar MRS	21
7	Comportamiento de PH en jugo de pera con <i>L. casei</i> almacenado durante 23 días a temperatura ambiente variable	22
8	Comportamiento de la acidez expresada como % de ácido málico en jugo de pera con <i>L. casei</i> almacenado durante 23 días a temperatura ambiente variable	24
9	Calificación otorgada por los panelistas para el grado de acidez según escala no estructurada de 150 mm	26
10	Calificación otorgada por los panelistas para el grado de aceptación general según escala hedónica de 9 puntos	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Ficha para escala hedónica	39
2	Planilla de evaluación de acidez sensorial	40
3	Recuento de <i>L. casei</i> en el jugo de pera durante el periodo de almacenamiento	41
3.1	Análisis estadístico para recuento de <i>L. casei</i> en función del tiempo	42
4	Evaluación de pH del jugo de pera durante el periodo de almacenamiento	43
4.1	Análisis estadísticos para pH en función del tiempo	44
5	Evaluación de acidez del jugo de pera durante el periodo de almacenamiento	45
5.1	Análisis estadístico para acidez en función del tiempo	46
6	Puntuación grado de acidez entregado por los panelistas	47
6.1	Análisis estadístico para grado de acidez sensorial en función del tiempo	48
7	Puntuación aceptación general por los panelistas	49
7.1	Análisis estadístico para grado de aceptación general en función del tiempo	50

1. INTRODUCCIÓN

En estos últimos años se han llevado a cabo muchos estudios centrados en cómo introducir especies bacterianas beneficiosas dentro del tracto gastrointestinal, para reestablecer el equilibrio microbiano y prevenir enfermedades, surge así el interés por la incorporación de microorganismos probióticos como ingrediente funcional a diversos alimentos. Para que se produzca el efecto beneficioso estos microorganismos deben encontrarse en altas cantidades y activos al momento de ser ingeridos.

Entre los microorganismos mas utilizados con este fin se encuentran algunos de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, a los cuales se les atribuyen efectos beneficiosos sobre la salud del huésped, que incluyen mejoras en el balance de la microflora intestinal, reducción del colesterol sanguíneo, actividad antitumoral e incremento en la respuesta inmune entre otros.

Los alimentos más usados como vehículos de microorganismos probióticos son los productos lácteos, por lo cual diversas investigaciones centran su interés en la incorporación de estos organismos al yogurt, queso, postres y leche saborizada. Sin embargo, el contenido de colesterol puede ser una desventaja relacionada con su consumo. Se ha sugerido que el jugo de fruta podría servir como un medio adecuado para cultivar microorganismos probióticos.

Debido a que no se encuentran en el mercado jugos de frutas como alimentos probióticos, la incorporación de microorganismos a estos productos presenta una atractiva y accesible fuente tanto de nutrientes como agentes beneficiosos, por lo tanto, una alternativa de desarrollo de nuevos productos.

Hipótesis:

La hipótesis de este trabajo es que la viabilidad de *Lactobacillus casei* en jugo de pera permite su uso como microorganismo probiótico en este sustrato.

Objetivo general

Estudiar la viabilidad de *Lactobacillus casei* en jugo de pera esterilizado, larga vida, de una marca comercial.

Objetivos específicos

- Obtener las curvas cinéticas de crecimiento y destrucción de *Lactobacillus casei* en el jugo de pera.
- Conocer el comportamiento del pH en el jugo de pera durante el tiempo de estudio.
- Conocer el comportamiento de la acidez en el jugo de pera durante el tiempo de estudio.
- Evaluar la aceptación sensorial general del jugo de pera durante el tiempo de estudio.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Probiótico

El interés científico por las bacterias como agente protector frente a diferentes enfermedades surge de la observación de el biólogo Elie Metchnikoff, quien a principio del siglo XX remarcó la longevidad y buena salud de los campesinos búlgaros que consumían grandes cantidades de yogurt. Propuso que el consumo regular de bacterias no patógenas ayudaba a mantener una flora intestinal saludable y que ese equilibrio entre bacterias patógenas y no patógenas era benéfico para la salud (ALVAREZ Y OBERHELMAN, 2001).

Los probióticos son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino (FULLER, 1989). Además, estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (PENNA, 1998).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define probiótico como "Microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas (FAO, 2002).

2.2 Características de la cepa probiótica

Ouwehand *et al.*, citado por HELLER (2001), señala que una cepa probiótica potencialmente acertada debe tener varias características deseables para poder ejercer sus efectos beneficiosos, SALMINEN *et al.*, (1998), propuso las:

características que debían tener los microorganismos usados como probióticos y se resumen en los siguientes puntos:

- Origen humano, ya que algunos de los efectos sobre la salud pueden ser dependientes de la especie.
- Resistentes al ácido y bilis, al menos temporalmente, para poder colonizar el tracto intestinal por vía oral.
- Presentar mecanismos de adherencia a la superficie epitelial y persistencia en el tracto gastrointestinal humano.
- Ser antagonistas de microorganismos perjudiciales por la producción de alguna sustancia antimicrobiana o por competencia.
- Ser inocuos para el consumo humano y tener validados clínicamente sus efectos sobre la salud.
- Ser resistente a antibióticos (TUOMOLA *et al.*, 2001).

Otros autores plantean que las características de la cepa probiótica propuestas anteriormente son sólo las deseables en cuanto a las propiedades relacionadas con la salud. Si se refiriera a las características desde el punto de vista industrial, habría que ampliar éstas a la capacidad para mantener la viabilidad y el mantenimiento de sus propiedades tras el procesado y almacenamiento del alimento (GARCÍA *et al.*, 2003; TEITELBAUM y WALKER, 2002).

2.3 Viabilidad y la estabilidad de la cepa

Varios factores influyen la viabilidad de las bacterias probiótico ácido lácticas ya sea en yogurt y otros fermentos lácteos. Estos factores incluyen las cepas usadas, las interacciones entre especie, el pH, la temperatura y condición de almacenamiento, la presencia de inhibidores microbianos en la matriz del alimento (cloruro de sodio y peróxido de hidrógeno, etc.). También la composición química del medio de la fermentación para el crecimiento (por ejemplo la fuente de carbohidratos, contenido de sólidos en la leche, disponibilidad de nutrientes y promotores del crecimiento, contenido en oxígeno

disuelto), las condiciones de cultivación (por ejemplo, nivel de inoculación, temperatura de incubación, tiempo de fermentación), acidez final, etc. (LUC DE VUYST, 2000; VINDEROLA *et al.*, 2000; KRISTO *et al.*, 2003).

Otros factores que pueden afectar la viabilidad de los microorganismos son tratamientos térmicos, homogeneización, y envasado. La viabilidad de *Lactobacillus* y de *Bifidobacterium* disminuye drásticamente durante la refrigeración, almacenaje y transporte. Esto puede dar lugar a números bajos de células vivas al acercarse la fecha de vencimiento del producto (LUC DE VUYST, 2000).

Para que el producto probiótico a la hora de ser consumido pueda realizar beneficios para la salud debe disponer de una concentración mínima de 10^6 células viables por mililitro o gramo del producto (SHAH *et al.*, 1995; SHAH, 2001; LUC DE VUYST, 2000).

2.4 Mecanismo de acción de las Bacterias ácido lácticas

Savard *et al.*, citado por KAROVIÈOVÁ y KOHAJDOVÁ (2003) señala que las bacterias ácido lácticas tienen efectos inhibitorios fuertes en el crecimiento y la producción de la toxina de otras bacterias. Esta actividad antagónica puede ser el resultado de la competición por los alimentos disponibles.

Los nutrientes están en cantidades limitada en el intestino, si las bacterias beneficiosas consumen estos nutrientes necesarios para el desarrollo del agente patógeno, limitan así su proliferación (FUMAROLA *et al.*, 1999).

Los microorganismos probióticos compiten con los patógenos no sólo por los nutrientes, sino que además por el espacio físico. Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de bloqueo específico del receptor por lo que se produce una

prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión (SHAH, 2001).

Por otro lado, los probióticos producen numerosas sustancias antimicrobianas específicas, como peróxido de hidrógeno, ácido láctico (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*), por lo que reduce el pH, se considera el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas como *E. Coli*, *Streptococcus* y *Salmonellas* (FONS, 2000).

MEYDANI (2002), realizaron estudios en animales y humanos, indicando que las bacterias lácticas incrementan la resistencia al organismo en las enfermedades del sistema inmunitario, aumentando la actividad fagocítica y la producción de anticuerpos, además señala que no se sabe con exactitud el mecanismo antitumoral de los prebióticos y que algunos estudios han demostrado la capacidad de cepas probióticas de producir una disminución de la actividad enzimática de la β - glucoronidasa y la β - glucosidasa, asociada con la síntesis de procancerígenos.

Muchos estudios se han realizado tanto en humanos como en animales enfocándose a los beneficios que aportan las cepas probióticas al ser ingeridas por vía oral, algunos de estos estudios se indican en el CUADRO 1.

2.5 *Lactobacillus casei*

Kandler y Weiss , citado por JOIN GENOME INSTITUTE /JGI (2004) señala que *Lactobacillus casei* es gram (+), anaeróbicamente facultativa, no esporulada, industrialmente importante como bacteria ácido láctica. Además, es tolerante al ácido, posee un metabolismo estrictamente fermentativo, siendo el ácido láctico el principal producto metabólico, para su crecimiento requiere la

riboflavina, el ácido fólico, el pantotenato del calcio, y nacían como factor de crecimiento (MORI *et al.*, 1997).

CUADRO 1. Beneficios de probióticos.

Efectos reportados	Cepa probiótica	Referencia
Prevención y tratamiento de diarreas como helicobacter pylori e infecciones intestinales	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus GG</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Wang <i>et al.</i> , 2004 Galpin <i>et al.</i> , 2005 Sheu <i>et al.</i> , 2006 Seppo <i>et al.</i> , 2004 Pessi <i>et al.</i> , 1998 Pedone <i>et al.</i> .,2002
Prevención del colesterol	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Greany <i>et al.</i> , 2004
Prevención de cáncer de colon y reducción de tumores	<i>Lactobacillus spp</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Wollowski <i>et al.</i> , 2001 Prieto <i>et al.</i> , 2002 Aso y Akazan 1992
Efecto moduladores sobre el sistema inmune	<i>Lactobacillus casei</i>	Maldonado y Perdigón 2006

COLLING *et al.*, (1989), señala que *L. casei* es una especie notablemente adaptable, se puede aislar de los productos cárneos, fermentados lácteos, productos vegetales frescos y fermentados, y del tracto intestinal de seres humanos y animales.

AXELSSON (1998) destaca que dentro del género *Lactobacillus*, *L. casei* forma parte del grupo de las especies facultativas heterofermentativos, que producen el ácido láctico a partir de las hexosas mediante la vía de Embden-Meyerhof y a partir de pentosas por la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa.

Goldin *et al.*, citado por SALOFF-COSTE, (c) (2002) señala que para ser un microorganismo probiótico, debe sobrevivir a la acidez del estómago donde puede encontrarse un pH < 3 y también a los ácidos biliares ya que se pueden destruir muchos microorganismos. Según estudios realizado en vivo, *L. casei* es resistente al ácido de la bilis por su viabilidad en una gama de pH de 3,0 a 7,0. Concluyendo que sobrevive al tránsito a través del estómago, particularmente cuando el alimento o los productos lácteos que actúan como vehiculo tienen un pH \geq 3,0.

Lactobacillus casei, taxonómicamente, es reconocida como un grupo de varias especies, dado que son genéticamente similares, diferenciándose en ciertas características como son, temperatura optima de crecimiento y habilidad para fermentar distintos tipos de carbohidratos, esto es indicado con mayor detalle en CUADRO 2.

CUADRO 2. Taxonomía de *L. casei*.

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

FUENTE: DANONE WORLD NEWSLETTER (1995).

2.6 Jugo de pera como materia prima

Los microorganismos activos interactúan con su medio ambiente intercambiando componentes del medio para sus productos metabólicos. De este modo, la composición química del sustrato, por ejemplo, presencia de carbohidratos disponibles, vitaminas, minerales, es de suma importancia para el desarrollo de los microorganismos (LUC DE BUYS, 2000).

SALMINEN (1998), señala que las bacterias ácido lácticas en su metabolismos fermentan las hexosas como glucosa, manosa, fructosa, galactosa, también fermenta los disacáridos lactosa, manosa, sucrosa; señala además, que aminoácidos y vitaminas son factor de crecimiento.

KIRK (1983), en su estudios señala que el jugo de pera es una buena fuente de azucares naturales y cuando está mezclado con otros jugos de fruta o utilizado en jugo de fruta proporciona cuerpo a la mezcla, es usado como sustituto para jarabe de azúcar en conservas de fruta, produciendo un producto natural.

Los jugos de fruta se envasan asépticamente tras tratamientos térmicos a temperaturas elevadas durante tiempos cortos, lo que mejora la retención de nutrientes y la calidad de jugo (RUTEY y ASHURTS, 1996).

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Materiales

Los materiales usados en el desarrollo del proceso se detallan a continuación.

3.1.1 Materia prima. Jugo de pera esterilizado, larga vida, de una marca comercial.

3.1.2 Insumos microbiológicos. Cultivo puro de *Lactobacillus casei*. CHR – HANSEN L. CASEI-01, agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe), caldo MRS (Lactobacilli MRS Broth – DIFCO), peptona bacteriológica (peptone protease).

3.1.3 Insumos químicos. NaOH 0,1N.

3.1.4 Instrumentos y utensilios. Balanza, termómetro, pHmetro, refractómetro, campana de flujo laminar, estufa 32 ± 1 °C, autoclave, baño termostático, matraz Erlenmeyer, bureta, frascos de vidrio, pipetas total y parcial, placas Petri, bortex, tubos de ensayos con tapa rosca, botellas de vidrio.

3.2 Lugar de ensayo

La investigación se realizó en los laboratorios de microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Austral de Chile.

3.3 Metodología

La metodología de trabajo en el laboratorio se describirá en los párrafos siguientes y para mayor claridad se esquematiza con figuras.

3.3.1 Proceso de activación e inoculación de *L. casei* al jugo de pera. A un tubo de ensayo con 10 ml de caldo MRS esterilizado a 121 °C se le agregó 0,1 g de *L. casei* liofilizado e incubó por 24 horas a la temperatura óptima de desarrollo de 32 ± 1 °C (cultivo madre), posteriormente a partir del cultivo madre se realizó una inoculación del 2% en 100 ml de caldo MRS estéril, incubándolo por 24 horas a 32 ± 1 °C. Terminado este periodo se traspasaron 20 ml de este caldo MRS, a cinco cajas de jugo de pera UHT de una marca comercial de un mismo lote, conteniendo *L. casei* al 2%, en una campana de flujo laminar. Luego de la homogenización, se adicionaron 200 ml de jugo a 20 frascos para análisis sensorial y 50ml a otros 20 frascos para recuento de *L. casei*, posteriormente estos frascos se almacenaron a temperatura ambiente variable, no controlada.

En la FIGURA 1 se muestra el diagrama del proceso de activación, inoculación y lectura de recuento total de *L. casei* en las placas.

3.4 Determinaciones analíticas

Al jugo de pera inoculado con *L. casei*, almacenado a temperatura ambiente, que se muestra en la FIGURA 2, se le realizaron mediciones de pH., acidez y recuento microbiológico los días 0,1,2,3,4,7,9,11,14,16,18,21,23 y análisis sensorial los días 0,3,7,10,14,17,21,24.

3.4.1 Determinación de pH. se determinó mediante un potenciómetro Radiometer Copenhagen.

3.4.2 Determinación de acidez. Se determinó potenciométricamente según AOAC descritos por HART y FISHER, 1984.

3.4.3 Cuantificación de *L. casei* en jugo de pera. Basándose en estudios de THARMARAJ y SHAH (2003), se determinó la población de *L. casei* en UFC/mL

mediante recuento en placas Petri con agar MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARPE). Para lo cual fue necesario preparar tubos con agua peptonada y placas Petri con agar MRS.

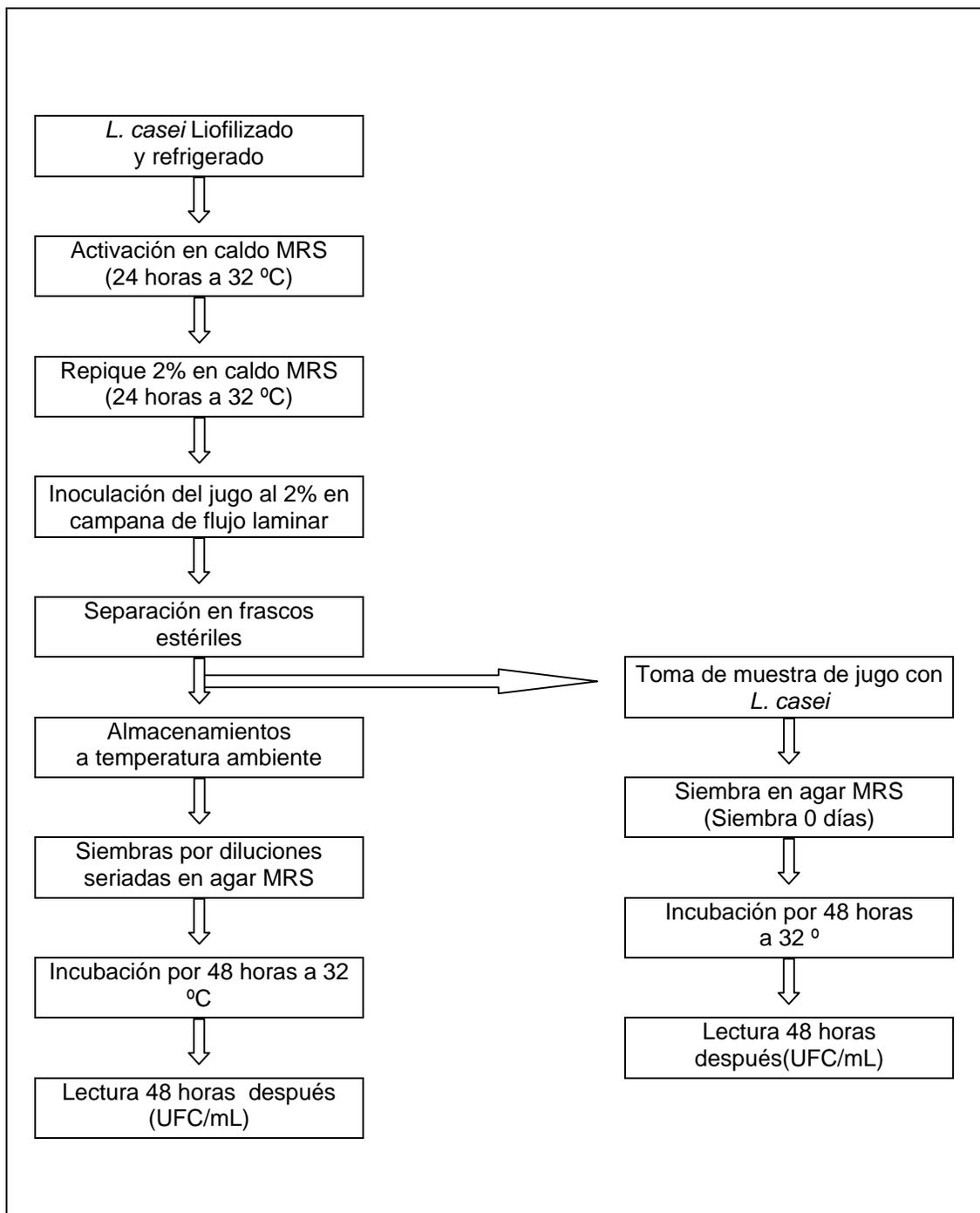


FIGURA1. Diagrama de flujo para la activación e inóculo de *L. casei*.

3.4.3.1 Preparación de agar MRS. De acuerdo a las instrucciones del envase 70,3 g de agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) se disolvieron con agua destilada y se aforó a un litro, se homogeneizó la mezcla calentándola en un microonda y luego se pasaron 300 ml aproximadamente a matraces Erlenmeyer, los matraces se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min. Luego de ser enfriados en un baño María a 45°C, en una campana de flujo laminar se prepararon placas Petri, con 30 ml aproximadamente de agar MRS, las placas fueron guardadas en el refrigerador para los posteriores análisis.



FIGURA 2. Jugo de pera inoculado con *L. casei*, almacenado a temperatura ambiente.

3.4.3.2 Preparación de agua peptonada. Peptona bacteriológica usada como medio de dilución fue preparada al 0,1% (un gramo de proteosa peptona por litro de agua destilada) ajustando su pH a $7,0 \pm 0.2$ con NaOH 0,1N. El medio

de dilución fue puesto en tubo de ensayos, adicionando alícuotas de 9,9 y 9 ml. Luego fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C por 15 min. Los tubos fueron guardados a temperatura ambiente para los posteriores análisis.

3.4.3.3 Diluciones seriadas e inóculo de *L. Casei* en placas Petri para recuento microbiológico. Con el propósito de asegurar lecturas con cantidades entre 25 y 250 UFC/mL, se procedió a prepara diluciones seriadas de 10^5 , 10^6 y 10^7 , incubadas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, para determinar la población de microorganismos hasta el momento en que se presenta un crecimiento menor a 10^4 UFC/mL.

En el párrafo siguiente se describe la metodología empleada para las siembras de las placas Petri y parte de los procedimientos se muestran en la FIGURA 3, en la cual, primero se observa el mesón de trabajo bajo campana de flujo laminar y materiales empleados, seguidamente la secuencia desde toma de muestra de jugo hasta siembra en placa Petri mediante diluciones seriadas.

Se desinfectó el mesón de trabajo y manos con alcohol, la siembra se realizó al lado de un mechero bunsen, dando así condiciones de trabajo lo más asépticas posibles, primeramente se agitó el envase y se extrajo 0,1 ml de jugo de pera inoculado con *L. casei* y se colocó en 9 ml de agua peptonada estéril, agitando el tubo de ensayo con dilución 10^2 en un vortex, luego se tomó 1ml de éste y colocándolo en otro tubo de ensayo con 9 ml de agua peptonada para obtener una dilución 10^3 y así sucesivamente hasta llegar a varias diluciones, después se tomaron 0,1 ml de la dilución y se pasaron directamente a la placa Petri con agar MRS, para incubarlas por 48 horas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Se trabajó con tres diluciones y en duplicado. Para mejor claridad ver FIGURA 4.

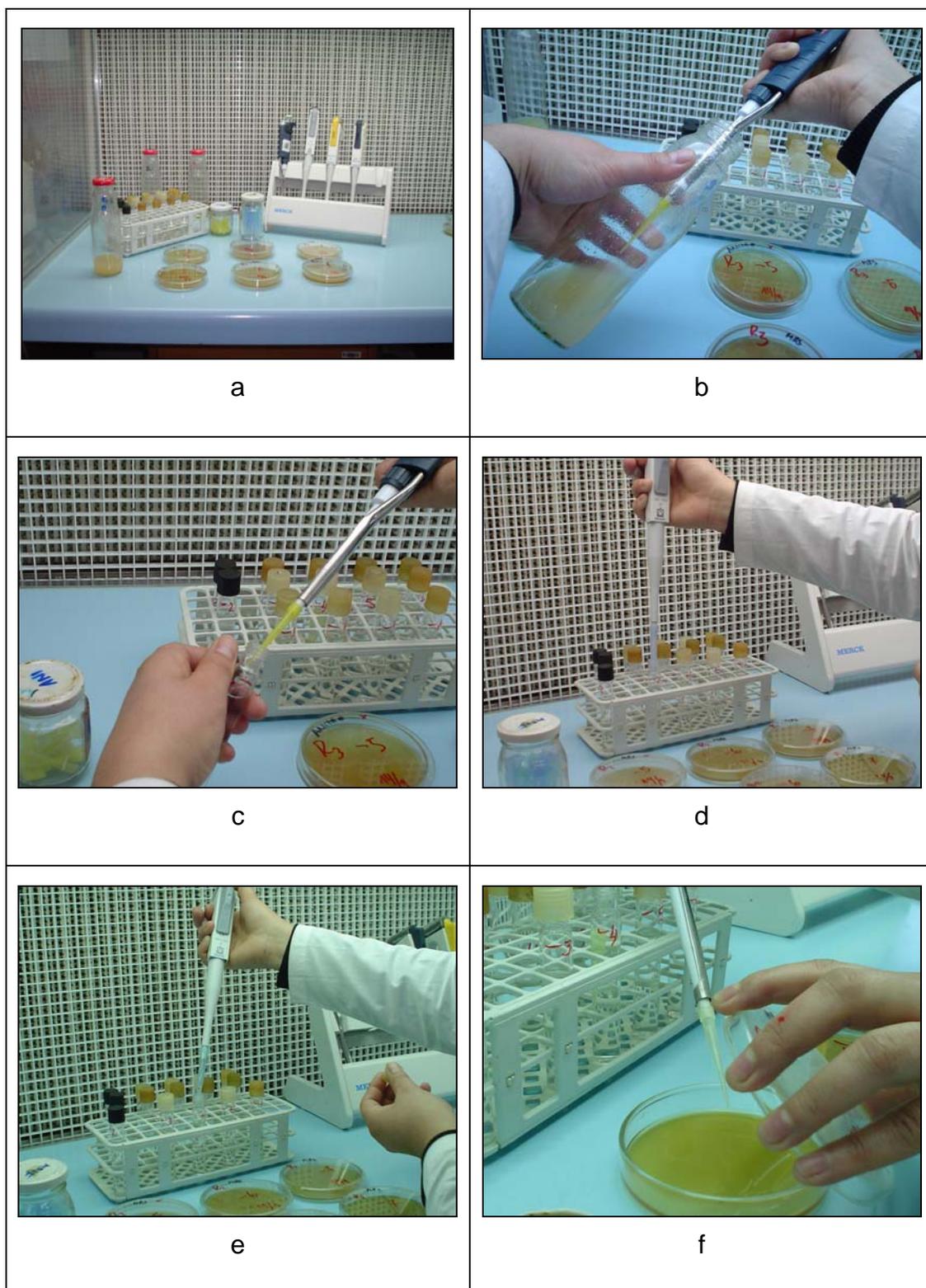


FIGURA 3. Metodología de siembra en placa Petri.

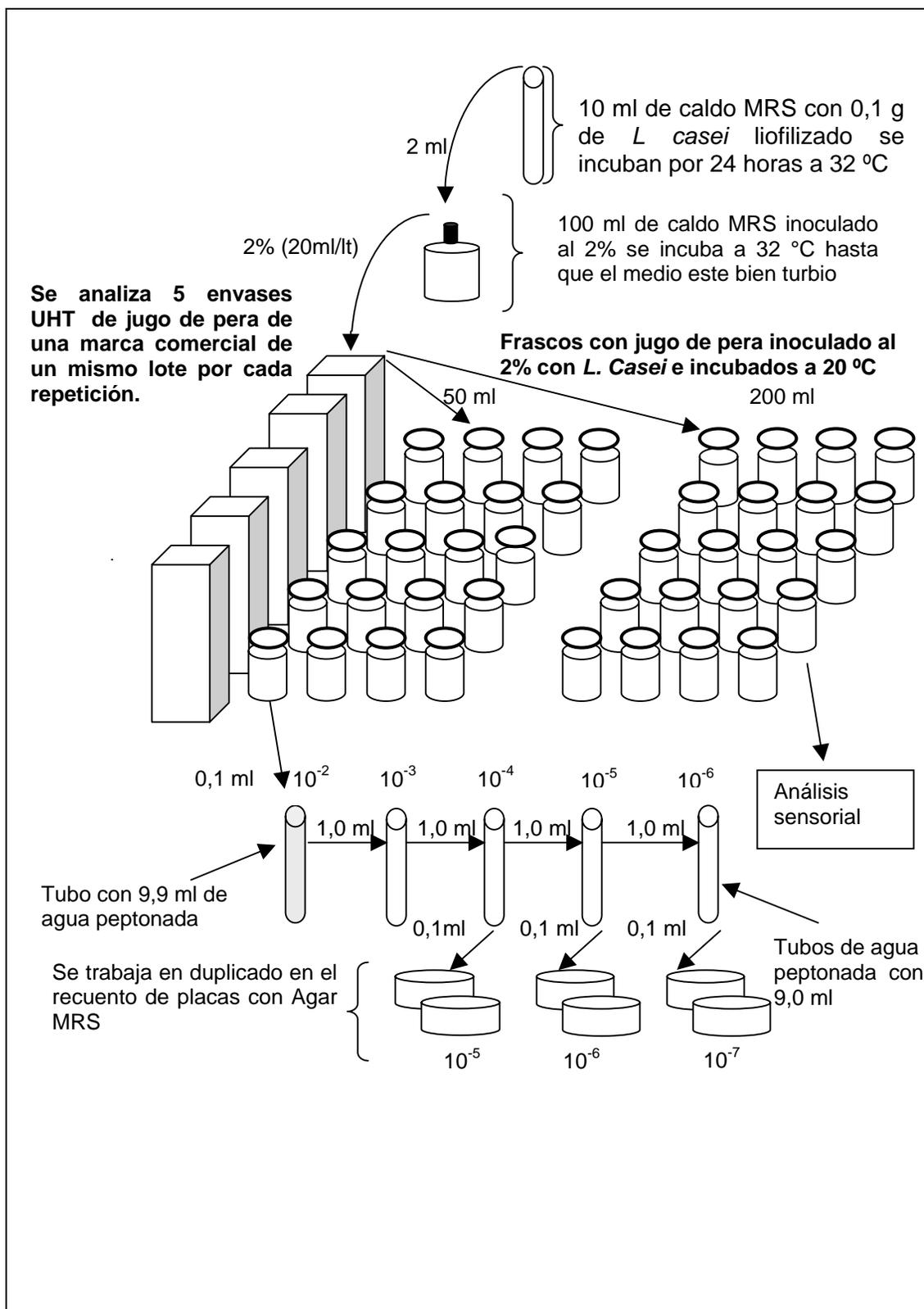


FIGURA 4. Recuento de *L. Casei* mediante diluciones seriadas.

3.4.4 Análisis sensorial. Las escalas empleadas para las evaluaciones fueron obtenidas de MEILGAARD (1999). El jugo de pera fue evaluado por 10 panelistas no estrenados, los que se eligieron por su disponibilidad, y el gusto por jugo de pera y productos ácidos. Se trabajó con muestras de 20 ml de jugo, las tres repeticiones se entregaron separadas y al azar a cada panelista, se determinó el nivel de aceptabilidad, utilizando una escala hedónica de 9 puntos. (1= me disgusta extremada mente, 5= no me gusta ni me disgusta y 9= me gusta extremadamente) (ANEXO 1).

El nivel de acidez, fue evaluado utilizando una escala no estructurada de 15 cm, (0= "Falta de acidez", 7= la "acidez normal" de acuerdo a su propia percepción y 15 ="Exceso de acidez"). La cual fue ajustada a 5 puntos (ANEXO 2).

3.5 Diseño experimental

Se trabajó con un diseño experimental completamente al azar, la unidad experimental consistió en 250 ml jugo de pera, extraído de cajas UHT de 1 litro de una marca comercial, inoculado previamente con *Lactobacillus casei* al 2%, 200 ml fueron destinados para análisis sensorial y 50 ml para análisis microbiológicos. Con 13 niveles de tiempo se estudiaron los factores pH, acidez y crecimiento bacteriano expresado como UFC/mL durante el periodo de almacenamiento, y para evaluación sensorial, el grado de aceptación y acidez se evaluaron con 8 niveles de tiempo de almacenamiento, con tres repeticiones cada periodo, que corresponden a 3 grupos de 5 cajas extraídas de un mismo lote.

Los resultados se expresan como promedio \pm D.E. (desviación de estándar), los datos se analizaron a través de un análisis de varianza con un nivel de significancia del 95%. En caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$) se realizó un test de comparación múltiple al 95% de

confianza. Los resultados fueron analizados mediante el software estadístico *Statgraphics Plus 5.1*. Lo expuesto anterior se resume en el CUADRO 3.

CUADRO 3. Diseño experimental.

Unidad experimental	Factor a estudiar	Análisis de resultados
250 ml de jugo de pera inoculado con <i>L. casei</i> .	<p>Número de UFC/mL, pH, acidez potenciométrica</p> <p>13 niveles de tiempo: 0,1,2,3,4,7,9,11,14,16,18,21,23 días</p> <p>Aceptación general y grado de acidez sensorial</p> <p>8 niveles de tiempo 0,3,7,10,14,17,21,24 días</p> <p>Con tres repeticiones.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Promedio \pm D.E. (desviación estándar). • Análisis de varianza nivel de significancia al 95% • Diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0,05$) se realizará test de comparación al 95% de confianza. • Los resultados fueron analizados mediante el software estadístico <i>Statgraphics Plus 5.1</i>

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Jugo y sus características

Para este estudio se utiliza un jugo pulposo (cloudy juice) comercial, con tratamiento UHT (ultra high temperature), envasado asépticamente en cajas Tetra Pak de un litro, según envase contenía como ingredientes; azúcar, concentrado de pera, ácido cítrico, aroma natural y ácido ascórbico; sin preservantes. Las especificaciones del jugo se presentan en el CUADRO 4.

CUADRO 4. Especificación del jugo de pera comercial

	100 mL
Energía (Kcal)	58
Proteínas (g)	0
Grasa total (g)+	0,2
Hidratos de carb. Disp. (g)	14
pH	3,45*
Acidez en función de ácido málico (g)	0,24*
° Brix	12,5*

FUENTE: Etiquetado del envase del jugo comercial

* Mediciones realizadas en el estudio

4.2 Cinética de crecimiento

Se realizó el recuento de colonias a las placas Petri, algunas de las colonias de *L. casei* fueron separadas previamente, observándolas al microscopio. Un ejemplo de imagen observada se muestra en la FIGURA 5

Por medio de un análisis de varianza se procedió a comparar los periodos de tiempo para un nivel de significancia del 95%, con el objeto de establecer si existe diferencia entre el contenido de microorganismos a los diferentes

tiempos, encontrándose que existían diferencias entre los tiempos para las UFC/mL. Para establecer entre qué tiempos existían las diferencias se realizó una prueba de rango múltiple LSD. (anexo 3.1)

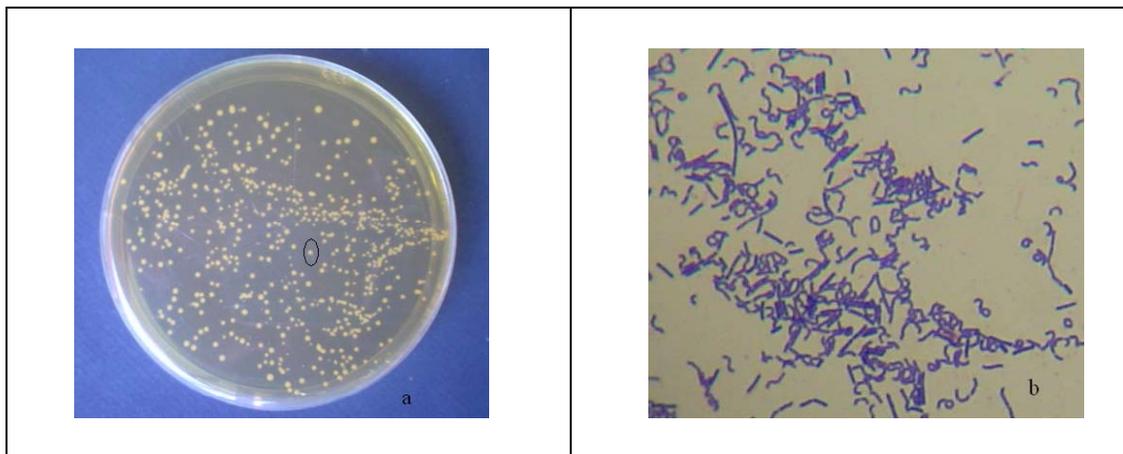


FIGURA 5: (a) Colonias características de *L. casei* en placa Petri, (b) *L. casei* observado en el microscopio.

Según el CUADRO 5, los análisis estadísticos para recuento de *L. casei* en UFC/mL, determinaron que la población inicial de *L. casei* fue de $(6,77 \pm 1,04) \times 10^7$ UFC/mL, alcanzando un máximo de desarrollo el cuarto día de iniciado el ensayo con un valor de $(9,67 \pm 2,35) \times 10^7$ UFC/ mL, los valores mínimos se registran los días 21 y 23 con valor de $(1,74 \pm 1,69) \times 10^7$ y $(1,07 \pm 1,67) \times 10^7$ UFC/ mL respectivamente.

En el ANEXO 3 se encuentran los datos que apoyan la FIGURA 6, en la cual se describe la cinética de crecimiento para *L. casei* en jugo de pera, se puede observar que se mantuvo el recuento de UFC/mL durante los primeros 16 días de almacenamiento con un valor muy próximo a 1×10^8 después se observa una disminución aproximada de una unidad logarítmica al día 23 pero aun por sobre 1×10^7 . Esto es muy importante porque indica que durante los 23 días de almacenamiento *L. casei* en el jugo de pera superó el valor de 1×10^7 UFC/mL que es la mínima cantidad de microorganismos que debe estar presente en un alimento para ser considerado probiótico, para que produzca algún efecto sobre

la salud del consumidor (SHAH, 1995, GOMES y MALCATA, 1999, SAMONA y ROBINSON, 1991).

CUADRO 5. Comportamiento de pH, acidez y recuento microbiológico en el jugo de pera durante el periodo de almacenamiento.

Tiempos	Recuento $\times 10^7$	pH	Acidez
0	$6,77 \pm 1,04^{ab}$	$3,43 \pm 0,03^a$	$0,24 \pm 0,01^e$
1	$6,77 \pm 6,93^{ab}$	$3,40 \pm 0,01^{ab}$	$0,25 \pm 0,00^e$
2	$5,67 \pm 1,54^{bc}$	$3,33 \pm 0,04^{bc}$	$0,26 \pm 0,01^{de}$
3	$8,50 \pm 1,39^{ab}$	$3,30 \pm 0,04^c$	$0,28 \pm 0,01^d$
4	$9,67 \pm 2,35^a$	$3,27 \pm 0,03^{cd}$	$0,32 \pm 0,04^c$
7	$7,93 \pm 1,76^{ab}$	$3,20 \pm 0,00^{de}$	$0,34 \pm 0,02^{bc}$
9	$8,58 \pm 3,91^{ab}$	$3,13 \pm 0,05^{ef}$	$0,36 \pm 0,01^b$
11	$8,28 \pm 3,71^{ab}$	$3,13 \pm 0,07^{ef}$	$0,40 \pm 0,03^a$
14	$6,32 \pm 1,17^{abc}$	$3,07 \pm 0,06^{fg}$	$0,40 \pm 0,02^a$
16	$6,55 \pm 3,66^{abc}$	$3,07 \pm 0,02^{fg}$	$0,41 \pm 0,02^a$
18	$2,82 \pm 1,13^{cd}$	$3,07 \pm 0,01^{fg}$	$0,41 \pm 0,02^a$
21	$1,74 \pm 1,69^d$	$3,03 \pm 0,03^h$	$0,43 \pm 0,02^a$
23	$1,07 \pm 1,67^d$	$3,03 \pm 0,01^h$	$0,43 \pm 0,02^a$

* Promedio \pm desviación estándar (D.E.) de 3 evaluaciones.

Letras distintas en las columnas indican diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza (LSD) entre días.

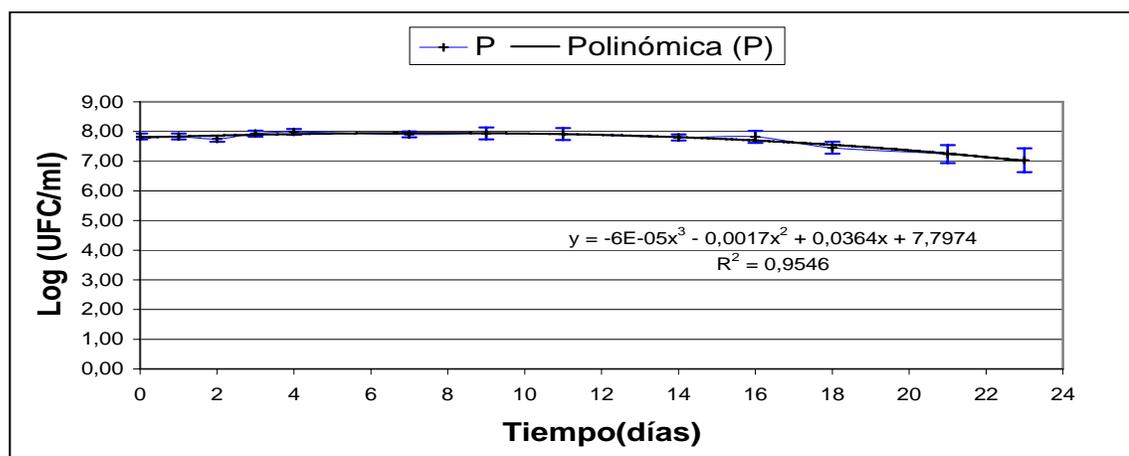


FIGURA 6. Cinética de crecimiento de *L. casei* en jugo de pera obtenida mediante recuento viable sobre agar MRS.

NIGHSWONGER *et al.*, (1996) estudió la viabilidad de *L. casei* GG en yogurt y “buttermilk” almacenados a 5°C y 7°C, entre los resultados presentó un desarrollo promedio de 1×10^7 UFC/g a los cero días en ambos productos y durante los 28 días de evaluación el desarrollo fue igual o superior a 1×10^7 UFC/mL. Otro estudio fue realizado por VINDEROLA *et al.*, (2000), en sus resultados muestra que *L. casei* mantuvo durante 60 días una viabilidad del orden de 1×10^7 UFC/mL en queso almacenado a 5°C. Aunque las características de los productos alimenticios estudiados son diferentes, el comportamiento de *L. casei* es similar en jugo de pera ya que mantuvo concentraciones similares a los encontrados por estos autores entre 0 y 18 días con poblaciones superiores a 1×10^7 UFC/mL a temperatura ambiente variable.

4.3 Comportamiento de pH

Al realizar el análisis de varianza, para la variación de pH se encontraron diferencias estadísticamente significativa al 95 % para los tiempos de medición, por lo que se procedió a la prueba de rango múltiple LSD (ANEXO 4.1).

En el CUADRO 5 se encuentran los datos que apoyan la FIGURA 7

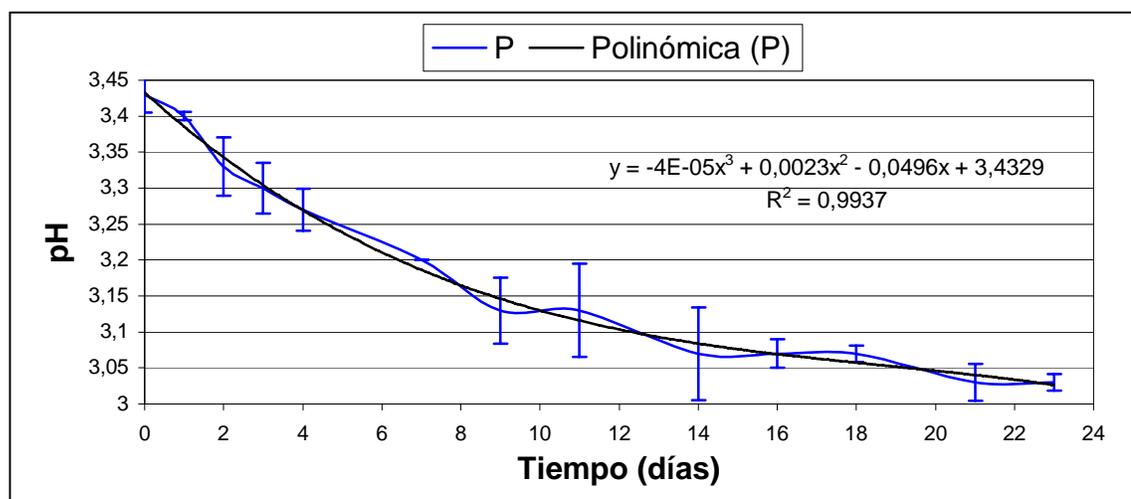


FIGURA 7. Comportamiento del pH en el jugo de pera con *L. casei* almacenado durante 23 días a temperatura ambiente variable.

El pH del jugo inoculado mostró un descenso marcado entre los 0 y 18 días. Inicialmente se tiene un valor promedio de $3,43 \pm 0,03$ y a los 18 días alcanza un valor de $3,07 \pm 0,02$ y luego se mantiene constante.

4.4 Relación Viabilidad – comportamiento de pH

FRAGOSO (2002) menciona que entre las características de los microorganismos para ser identificados como cepas probióticas está la capacidad de sobrevivir y proliferar a pH menores de 3,5 debido al tránsito a través del tracto gastrointestinal que le permita ser viable para realizar las funciones específicas de cada organismo probiótico, proporcionando los beneficios a la salud de la persona que lo ingiere. En este caso, durante los 23 días de almacenamiento la población de *L. casei* fue superior a 1×10^7 UFC/mL. Durante los 18 días la población microbiana se mantuvo sobre 1×10^7 UFC/mL variando el pH de 3,43 a 3,07, en los días posteriores se observa un descenso de la población de *L. casei* con un pH constante en promedio de 3,03 pero aún se tienen recuentos superiores a 1×10^7 UFC/mL, con lo que se puede señalar que el pH influye sobre la viabilidad de *L. casei* conforme disminuye reduciendo la viabilidad de la bacteria en el tiempo. Esto concuerda con estudios que señalan que la pérdida de la viabilidad de organismos probióticos se atribuye a la disminución del pH del medio y de la acumulación del ácido orgánico, ácido láctico por ejemplo, como resultado del crecimiento y de la fermentación (HOOD y ZOTTOLA, 1988; SHAH y JELEN, 1990).

4.5 Comportamiento de acidez

Al realizar el análisis de varianza, para variación de acidez se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 95% para los tiempos de medición, por lo cual se realizó la prueba de comparación múltiple LSD (ANEXO 5.1).

En la FIGURA 8 obtenida con los datos de CUADRO 5 se observa un aumento

de acidez de $0,24 \pm 0,01$ a $0,43 \pm 0,02$ y el análisis estadístico señala que la acidez se mantiene constante después del día 11, lo cual tiene sentido, pues como ya se dijo, la disminución de pH se produce por un aumento de ácido láctico producto del metabolismo de *L. casei*. Como consecuencia, producen grandes cantidades de ácidos orgánicos de cadena corta, a partir de azúcares. El principal producto es el ácido láctico obtenido a partir de piruvato por acción de la enzima lactato deshidrogenada (MARTINES, 2005).

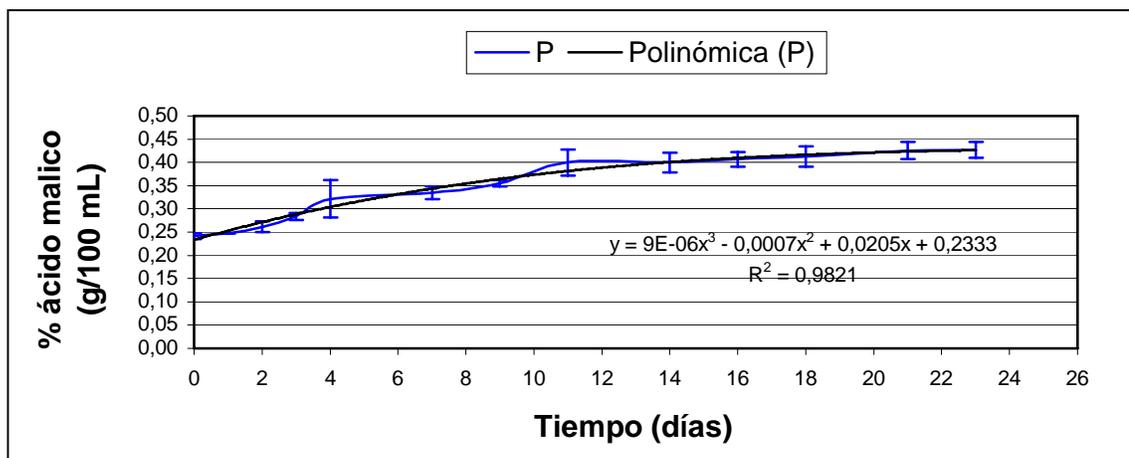


FIGURA 8. Comportamiento del acidez expresada como % de ácido málico en el jugo de pera con *L. casei* almacenado durante 23 días a temperatura ambiente variable.

En el estudios realizados por YOON *et al.*, (2004) *L. casei* sobrevivió en jugo de tomate a pH bajo de 3,5 y altas condiciones de acidez durante 4 semanas de conservación en cámara frigorífica a 4°C; se observa una disminución de pH y un aumento de acidez por formación de ácido láctico. Además, los recuentos de células viables disminuyeron levemente. Este mismo comportamiento se observa en el jugo de pera almacenado a temperatura ambiente.

AXELSSOR (1998) señala que en su metabolismo la bacteria ácido láctica tiene una gran capacidad de degradar diferentes carbohidratos y generalmente predomina como producto, el ácido láctico.

4.6 análisis sensorial

Los resultado de la evaluación sensorial entregada por los panelista se señala en los párrafos siguientes.

4.6.1 Grado de acidez. Según el ANDEVA, se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) del grado de acidez en el jugo de pera entre los diferente días evaluados con un nivel de la confianza del 95.0% (ANEXO 6.1).

Según el CUADRO 6, los panelistas dieron una puntuación promedio mas baja el día cero, encontrando “levemente falta de acidez” y los días 7 ,10, 21, 24 dieron puntuaciones mayores que el resto, encontrando “levemente exceso de acidez “, pero estos días estadísticamente no tuvieron diferencias. Esto se ve representado en la FIGURA 9 la cual se realizó con los datos del CUADRO 5 y 6.

CUADRO 6. Evaluación entregada por los panelistas para aceptación y acidez del jugo de pera durante el periodo de almacenamiento.*

Tiempo	Aceptación	Acidez
0	7,50 ± 0,34 ^a	59,37 ± 2,27 ^c
3	7,00 ± 0,40 ^{abc}	69,30 ± 2,14 ^{bc}
7	6,90 ± 0,66 ^{abc}	83,53 ± 5,51 ^a
10	6,40 ± 0,49 ^{bc}	86,70 ± 8,12 ^a
14	7,20 ± 0,20 ^{ab}	79,70 ± 7,10 ^{ab}
17	6,30 ± 0,10 ^c	82,30 ± 7,64 ^{ab}
21	6,30 ± 0,72 ^c	84,40 ± 5,05 ^a
24	6,30 ± 0,70 ^c	92,27 ± 14,85 ^a

*Promedio ± desviación estándar (D.E.) de 3 evaluaciones obtenidas de los panelistas

Letras distintas en las columnas indican diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza (LSD) entre días

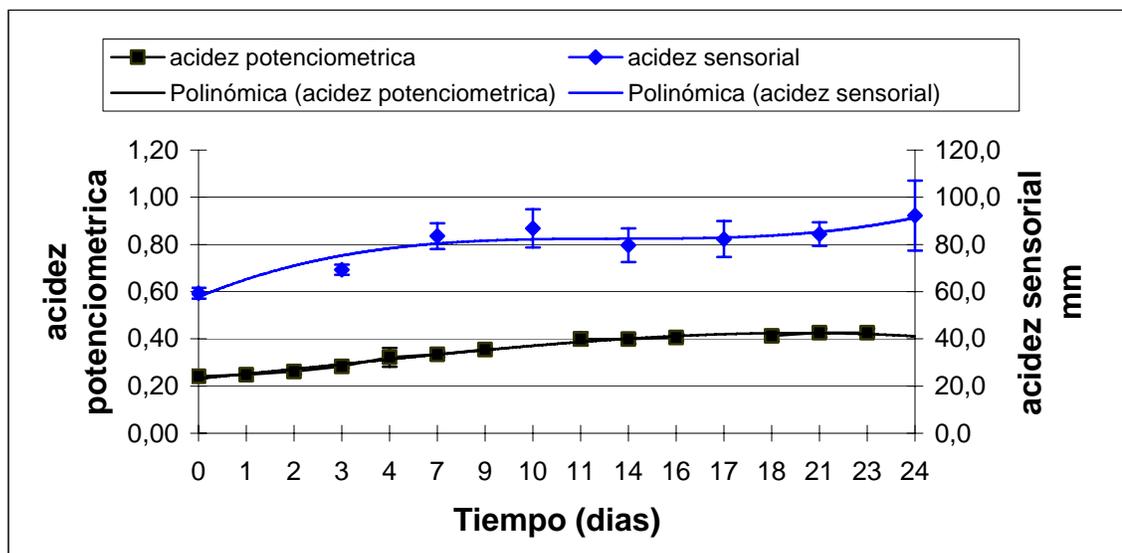


FIGURA 9. Calificación otorgada por los panelistas para el grado acidez según escala no estructurada de 150 mm.

De la figura se puede extraer que tanto los panelistas, como las mediciones obtenidas mediante métodos instrumentales, dieron puntuaciones más altas de acidez al jugo de pera durante el correr de los días.

4.6.2 Aceptación general. Según el ANDEVA, se encontró diferencias estadísticamente significativas del grado de aceptación en el jugo de pera entre los diferentes días evaluados con un nivel de la confianza del 95.0%, por lo cual se realiza test de comparación múltiple LSD (ANEXO 7.1).

A partir del análisis estadístico realizado para la aceptación del jugo de pera, en el CUADRO 6 se observa que los panelistas dieron una puntuación promedio que estuvo entre “me gusta ligeramente” y “me gusta moderadamente”. La puntuación más baja estuvo en los 17, 21, 23 días, sin diferencia estadística entre ellos, la puntuación fue de “me gusta ligeramente”. Esto se ve representado en la FIGURA 10, la cual fue apoyada con los valores del CUADRO 6.

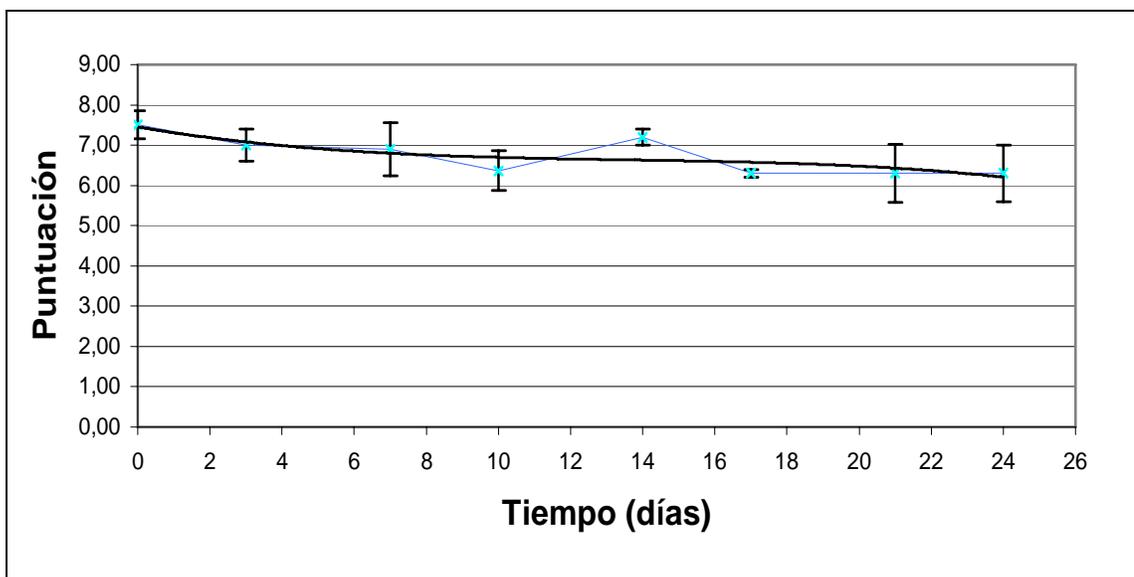


FIGURA 10. Calificación otorgada por los panelistas para el grado de aceptación general según escala hedónica de 9 puntos.

Según SAARELA *et al.*,(2000), la obtención de un producto fermentado con excelentes propiedades sensoriales depende del sinergismo que debe establecerse entre las bacterias probióticas agregadas a los alimentos funcionales y los iniciadores de la fermentación (fermentos, cultivos iniciadores).

4.7 Relación aceptación y grado de acidez.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede indicar que en general el jugo de pera fue aceptado por parte de los panelistas aún cuando detectaron aumento de acidez, observándose que a la gente le gusta menos ácido el jugo, Esto es importante pues además de su eficiencia como alimento probiótico es deseable que el jugo posea características que lo hagan comercialmente aceptable por sus propiedades organolépticas.

5. CONCLUSIONES

La viabilidad de *L. casei* en jugo de pera durante 23 días fue mayor a 1×10^7 por lo cual el jugo se puede considerar una buena fuente de *L. casei* para los consumidores y por lo tanto un producto probiótico.

L. casei sobrevivió en el jugo de pera en condiciones de alta acidez y pH bajos durante 23 días a temperatura ambiente variable (17-22 °C).

Los panelistas apreciaron el jugo, aun cuando hubo diferencia en la aceptación en el correr de los días, sin embargo, se puede indicar que el jugo fue aceptable para un periodo de 14 días.

6. RESUMEN

El propósito de este estudio fue evaluar la viabilidad de *L. casei* en jugo de pera almacenado a temperatura ambiente variable, paralelo a esto se estudió el comportamiento de pH, acidez y aceptación general del jugo. Para cumplir con estos objetivos se inoculó jugo de una marca comercial con *L. casei* al 2%.

Para recuento de *L. casei* el jugo fue sembrado en agar MRS en diluciones seriadas y se midió el pH y la acidez. La aceptación general se midió mediante una escala hedónica de 9 puntos y el grado de acidez con escala no estructurada de 15 cm.

La concentración de *L. casei* en el jugo de pera fue mayor de 1×10^7 UFC/ ml durante los 23 días de almacenamiento. Con una variación de 3,43 a 3,03 pH, la acidez alcanzó un valor de 0,43 g ácido málico/ 100 ml, la puntuación entregada por los panelistas no varió durante los 23 días y de una escala de 9 puntos le asignaron un valor entre 6 y 7.

La viabilidad de *L. casei* en jugo de pera durante 23 días fue mayor a 1×10^7 por lo cual el jugo de puede presentar una buena fuente de *L. casei* para los consumidores.

L. casei sobrevivió en el jugo de pera en condiciones de alta acidez durante 23 días a temperatura ambiente variable.

Los panelistas aceptaron el jugo de pera y la aceptación no fue afectada por el aumento de acidez en el periodo de almacenamiento.

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the *Lactobacillus casei* viability in pear juice stored at variable room temperature. At the same time the pH, acidity and general acceptance behavior of the juice was studied. In order to accomplish with these goals, commercial juice was inoculated with *L. casei* at 2% concentration.

To obtain the *L. casei* plate count juice was seeded in MRS agar in series dilutions and pH and acidity was measured. General acceptance was measured by mean of a hedonic 9 points scale and acidity by mean a non structured scale of 15 cm.

Concentration of *L. casei* in pear juice was higher than 1×10^7 during the 23 storing days. Variation of pH was from 3.4 to 3.0, acidity reached a value of 0.43 g malic/100ml, and sensory punctuation was stable in 23 days with a value of 6 and 7 in the 9 points scale.

Since viability of *L. casei* in pear juice was higher than 1×10^7 for 23 days, the juice could be considered as a probiotic food and to be a good source of *L. casei* to consumers.

L. casei survived to the pear juice conditions, high acidity, during the 23 assay days.

Sensory panel accepted pear juice and this acceptance were not affected by changes in acidity during the period.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALVAREZ-OLMOS, M. I. y OBERHELMAN, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases* 32: 1567–1576
- ASO, Y. y AKAZAN, H. 1992. Prohylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urol. Int.* 49 (3):125 – 129.
- AXELSSON, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Capitulo 1. En: *Lactic Acid Bacteria .Microbiology and Functional Aspects*. Editado por Salmminen S. Editorial Marcel Dekker, New York. 1-72 p.
- COLLING, M., PHILLIPS,B. y ZANONI, P. 1989. Desoxyribonucleic 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 15 de marzo de 2005)
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2002. Probiotic. Disponible en: <http://www.fao.org>. (consultado 20 de marzo de 2005)

- FONS, M., GOMEZ, A. y KARJALAINEN, T. 2000. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microbial Ecol Health Dis.* 2: 240 – 246.
- FRAGOSO, L., FERNANDEZ, M., ALVARES, G. y GARCIA I. 2001. Evaluación de cepas lácticas para su separación en prebióticos. *Alimentaria* 1(59): 59 - 62.
- FUMAROLA, G., DE SIMONE, C., MATEEUZZI, D. y PIROBANO, F. 1999. Traditional and high potency probiotic for oral bacteriotherapy. *Bio – Drugs* 12: 455 – 470.
- FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Applied Bacter.* 66:365-378.
- GARCÍA, J., JIMÉNEZ, J., JIMÉNEZ, P., RECHE, M., ÁLVAREZ, F., ROJAS, A. y MENDOZA. 2003. Estudio microbiológico comparativo de yogur fresco y termizado en un modelo animal *in vivo*. *Nutr. Hosp.* 18(4):207-214.
- GALPIN, L.; MANARY, M.; FLEMING, K.; OU, C.; ASHORN, P. y SHULMAN, R. 2005. Effect of *Lactobacillus* GG on intestinal integrity in Malawian children at risk of tropical enteropathy. *American Journal of Clinical Nutrition* 82(5):1040-1045.
- GOMES, A., MALCATA, F. 1999. *Bifidobacterium spp* and *lactobacillus acidophilus*: Biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 10:4/5:139-159.
- GREANY, K.; NETTLETON, J.; WANGEN, K.; THOMAS, W. Y KURZER, M. 2004. Probiotic Consumption Does Not Enhance the Cholesterol-

Lowering Effect of Soy in Postmenopausal Women. *J. Nutr.* 134:3277-3283.

HELLER, J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristic and starter organisms. *American Journal of Nutrition* 73(2): 374S – 379S.

HOOD, S.K., ZOTTOLA, M.L., 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cell. *Journal of Food Science* 53:1514–1516.

ISHIKAWA, H., AKEDO, I., OTANI, T., SUZUKI, T., NAKAMURA, T., TAKEYAMA, I., ISHIGURO, S., MIYAOKA, E., SOBUE, T. y KAKIZOE, T. 2005. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *Int. J. Cancer.* 116(5):762-767.

JOIN GENOME INSTITUTE /JGI. 2004. *Lactobacillus casei* Info. Disponible en <http://www.jgi.doe.gov/index.html> (consultado el 4 junio 2005)

KAROVIEŇOVÁ, J. y KOHAJDOVÁ, Z. 2003. Lactic acid fermented vegetable juices. *hort. sci.* 30,4: 152–158.

KRISTO, E., BILIADERIS, C., TZANETAKIS, N., 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal* 13: 517-528

LUC DE VUYST. 2000. Application of Functional Starter Cultures. *Food Technology. biotechnology* 38(1): 105 – 112.

- MARTÍNEZ, G. 2005. Ingeniería metabólica y desarrollos fermentativos en *Lactobacillus casei* . Disponible en:<http://micelio.unex.es/sem2005/Ponencias/PerezMartinez.htm>_(consultado el 5 de enero del 2005)
- MALDONADO, C. Y PERDIGÓN, G. 2006. The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* 13(2): 219-226.
- MEILGAARD, M.; CARR, B. y CIVILLE, G. 1999. Sensory evaluation techniques. 3a. ed. Washington, D. C. CRS Press. 379 p.
- MEYDANI, S. y HA, W. 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr.* 71: 861 – 872.
- MOLLET B, ROWLAND I, 2002. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Current in Opinion and Biotechnology* 13:483-485
- MORI, K.; YAMASAKI, K.; ISHIYAMA, T.; KATSUMATA, M.; KOBAYASHI, K.; KAWAI, Y.; INQUE, N. y SHINANO, H. 1997. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei* – related taxa. *Int. J. Syst. Bacterol.* 47: 54 – 57.
- NIGHSWONGER, B., BRASHERS, M. y GILLILAND, S. 1996. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in Fermented Milk Products During Refrigerated Storage. *Journal Dairy Science* 79: 212 – 219.
- PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; MATHARA, J.; GUERZONIM, M; HOLZAPFEL, W. 2006. Potential of functional strains, isolated from

traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. International Journal of Food Microbiology 107:1 – 11

PENNA F. 1998. Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Rev. Enfer. Infec. Ped. 11(6):182.

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 diarrhea. IJCP. 54(9), 568 – 571.

PESSI, T.; SÜTAS, Y.; MARTTINEN, A. y ISOLAURI, E. 2005. Probiotics Reinforce Mucosal Degradation of Antigens in Rats: Implications for Therapeutic Use of Probiotics J. Nutr. 135: 1294–1298.

PIETRO, A.; LUCERI, C., DOLARA, P.; GIANNINI, A.; BIGGERI, A.; SALVADORI, M.; CLUNE, Y.; COLLINS, K.; PAGLIERANI, M. y CADERNI, G. 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. Carcinogenesis 23(11): 1953-1960.

KIRK, D.E., MONTGOMERY, M.W. y KORTEKAAS, M.G. 1983. Clarification of Pear Juice by Hollow Fiber Ultrafiltration. Journal of Food Science 48:1663- 1666.

SAARELA M, MOGENSEN G, FONDÉN R, MATTO J, MATTILA-SANDHOLM T, 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technology properties. Journal of Biotechnology 84: 197-215.

- SALMINEN, S., BOULEY, CH. y BOUTRO-RUAULT, M. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.*; 80: 147–171.
- SAMONA, A., ROBINSON, R.K., 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy Products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 44: 64– 66.
- SALOFF–COSTE, 2002. *Lactobacillus casei*. Danone World Newsletter. Disponible en <http://www.danonevitapole.com> (consultado el 15 de marzo 2005)
- SEPPO, J.; SALMINEN, R.; GUEIMONDE, M. y ISOLAURI, E.2004. Probiotics That Modify Disease Risk. *American Journal of Clinical Nutrition* 80(3):737-741.
- SHEU,B.; CHENG,H.; KAO,A.; WANG,S.; YANG,Y.; YANG,H. y WU,J. 2006. Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *American Journal of Clinical Nutrition* 83 (4):864-869.
- SHAH, N.P. 2001. Functional Foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology* 55(11): 46-53.
- SHAH, N., LANKAPUTHRA, W., BRITZ, M. y KYLE, W. 1995. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt during refrigerated storage. *Int. Dairy J.* 5:515-521.
- SHAH, N.P., JELEN, P. 1990. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *Journal of Food Science* 55: 506– 509.

- THARMARAJ , N. y SHAH. N. 2003. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria . J. Dairy Sci. 86:2288–2296
- TEITELBAUM, J. y WALKER, A. 2002. Nutritional impact of pre and probiotics as protective gastrointestinal organism. Annu. Rev. Nutr. 22: 107-138.
- TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M.; ISOLAURI, E., y SALMINEN, S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. Am. J. Clin. Nutr. 73: 393–398.
- VINDEROLA, G.; PROSELLO, W; GHIBERTO, D. y REINHEIMER, J. 2000. Viability of Probiotic (*Bifidubacterium*, *Lactobacillus Acidophylus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. J. Dairy Sci. 83: 1905 – 1911.
- WANG,K; LI,S.; LIU,C.; PERNG,D.; SU.Y;WU,D.; JAN,C.; LAI,C.; WANG,T Y WANG,M. 2004. Peret al. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. Am J Clin Nutr. 80:737–741.
- WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER , G.; y POOL-ZOBEL, B .2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal of Clinical Nutrition 73(2): 451-455
- YOON, k.; WOODAMS, E. y HANG, Y. 2004. Probiotication of Tomato Juice by Lactic Acid Bacteria. The Journal of Microbiology 42(4): 315 – 118.

ANEXOS

ANEXO 1

Ficha para escala hedónica

Nombre. _____ Fecha _____

Producto _____

9 me gusta extremadamente	_____	_____	_____
8 me gusta mucho	_____	_____	_____
7 me gusta moderadamente	_____	_____	_____
6 me gusta ligeramente	_____	_____	_____
5 no me gusta ni me disgusta	_____	_____	_____
4 me disgusta ligeramente	_____	_____	_____
3 me disgusta moderadamente	_____	_____	_____
2 me disgusta mucho	_____	_____	_____
1 me disgusta extremadamente	_____	_____	_____

Comentarios: _____

ANEXO 2**Planilla de evaluación de acidez sensorial**

NOMBRE _____ FECHA _____

Se le ha entregado muestras de jugo de pera codificados. Marque la acidez que Ud. estime conveniente para el producto con una línea vertical sobre la escala no estructurada que va desde “falta de acidez” a “exceso de acidez”.

Código de muestra _____ (Repetición 1)

Falta de acidez	Exceso de acidez
-----------------	------------------

Código de muestra _____ (Repetición 2)

Falta de acidez	Exceso de acidez
-----------------	------------------

Código de muestra _____ (Repetición 3)

Falta de acidez	Exceso de acidez
-----------------	------------------

ANEXO 3

Recuento *L. casei* en el jugo de pera durante el periodo almacenamiento

Tiempos (días)	R1 x 10 ⁷ (UFC/mL)	R2 x 10 ⁷ (UFC/mL)	R3 x 10 ⁷ (UFC/mL)	Recuento x 10 ⁷ UFC/mL	Promedio ± D.E. Log (UFC/mL)
0	5,85	6,55	7,90	6,77 ± 1,04	7.83 ± 0.1
1	6,95	6,00	7,35	6,77 ± 6,93	7.83 ± 0.1
2	6,70	3,90	6,40	5,67 ± 1,54	7.75 ± 0.1
3	9,45	6,90	9,15	8,50 ± 1,39	7.9 ± 0.1
4	7,55	12,20	9,25	9,67 ± 2,35	8.0 ± 0.1
7	5,95	8,55	9,30	7,93 ± 1,76	7.9 ± 0.1
9	4,50	8,95	12,30	8,58 ± 3,91	7.9 ± 0.2
11	4,75	7,95	12,15	8,28 ± 3,71	7.9 ± 0.2
14	5,05	7,35	6,55	6,32 ± 1,17	7.8 ± 0.1
16	10,35	6,25	3,05	6,55 ± 3,66	7.8 ± 0.2
18	3,75	3,15	1,55	2,82 ± 1,13	7.4 ± 0.2
21	3,40	1,81	0,01	1,74 ± 1,69	7.2 ± 0.3
23	3,00	0,21	0,00	1,07 ± 1,67	7.0 ± 0.4

ANEXO 3.1

Análisis estadístico para recuento de *L. casei* en función del tiempo

Análisis de Varianza para UFC/ mL por TIEMPO					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coficiente-F	Valor-P
-					
Entre grupos	2,67102E16	12	2,22585E15	4,43	0,0007
Dentro de grupos	1,30599E16	26	5,02303E14		
-					
Total (Corr.)	3,97701E16	38			

Test de comparación múltiple para UFC/ mL por TIEMPO			
Method: 95,0 % LSD			
tiempo	datos	promedio	grupos homogéneos
23	3	1,07E7	X
21	3	1,74E7	X
18	3	2,82E7	XX
2	3	5,67E7	XX
14	3	6,32E7	XXX
16	3	6,55E7	XXX
1	3	6,77E7	XX
0	3	6,77E7	XX
7	3	7,93E7	XX
11	3	8,28E7	XX
3	3	8,50E7	XX
9	3	8,58E7	XX
4	3	9,67E7	X

ANEXO 4

Evaluación de pH del jugo de pera durante el periodo de almacenamiento

TIEMPOS (días)	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	PROMEDIO	D.E.
0	3.45	3.40	3.43	3.43	0,03
1	3.38	3.39	3.39	3.40	0,01
2	3.33	3.36	3.28	3.33	0,04
3	3.32	3.25	3.28	3.30	0,04
4	3.29	3.29	3.24	3.27	0,03
7	3.19	3.19	3.19	3.20	0,00
9	3.17	3.11	3.08	3.13	0,05
11	3.19	3.12	3.06	3.13	0,07
14	3.12	3.14	3.02	3.07	0,06
16	3.05	3.07	3.03	3.07	0,02
18	3.05	3.05	3.03	3.07	0,01
21	3.01	3.06	3.04	3.03	0,03
23	3.04	3.06	3.04	3.03	0,01

ANEXO 4.1

Análisis estadístico para pH en función del tiempo

Análisis de la Varianza para pH - TIEMPO					
Análisis de Varianza					

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coficiente-F	Valor-P
---	---	---	---	---	---
Entre grupos	0,729231	12	0,0607692	23,70	0,0000
Dentro de grupos	0,0666667	26	0,0025641		
---	---	---	---	---	---
Total (Corr.)	0,795897	38			

Test de comparación múltiple LSD para PH por TIEMPO			
Metodo: 95,0% LSD			
TIEMPO	Datos	Promedio	Grupos Homogéneos
---	---	---	---
21	3	3,03	X
23	3	3,03	X
14	3	3,07	XX
18	3	3,07	XX
16	3	3,07	XX
9	3	3,13	XX
11	3	3,13	XX
7	3	3,20	XX
4	3	3,27	XX
3	3	3,30	X
2	3	3,33	XX
1	3	3,40	XX
0	3	3,43	X

ANEXO 5

**Evaluación de acidez del jugo de pera durante el periodo de
almacenamiento**

TIEMPO (días)	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	PROMEDIO	D.E.
0	0,25	0,23	0,24	0,24	0,01
1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
2	0,25	0,27	0,27	0,26	0,01
3	0,27	0,29	0,29	0,28	0,01
4	0,28	0,36	0,32	0,32	0,04
7	0,32	0,34	0,35	0,34	0,01
9	0,35	0,36	0,36	0,36	0,01
11	0,42	0,37	0,41	0,40	0,03
14	0,38	0,41	0,42	0,40	0,02
16	0,39	0,42	0,42	0,41	0,02
18	0,39	0,42	0,43	0,41	0,02
21	0,41	0,42	0,45	0,43	0,02
23	0,41	0,43	0,44	0,43	0,02

ANEXO 5.1

Análisis estadístico para acidez en función del tiempo

Análisis de la Varianza para acidez por tiempo					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coficiente-F	Valor-P
Entre grupos	0,179574	12	0,0149645	40,81	0,0000
Dentro de grupos	0,00953333	26	0,000366667		
Total (Corr.)	0,189108	38			

Test de comparación múltiple para acidez por tiempo			
Metodo: 95,0 % LSD			
TIEMPO	Datos	Promedio	Grupos Homogéneos
0	3	0,24	X
1	3	0,25	X
2	3	0,26	XX
3	3	0,28	X
4	3	0,32	X
7	3	0,34	XX
9	3	0,37	X
11	3	0,40	X
14	3	0,40	X
16	3	0,41	X
18	3	0,41	X
23	3	0,43	X
21	3	0,43	X

ANEXO 6

Puntuación grado de acidez entregado por los panelistas

TIEMPO (días)	REPETICIÓN 1	REPETICIÓN 2	REPETICIÓN 3	PROMEDIO \pm D.E
0	61,90	58,70	57,50	59,37 \pm 2,27
3	71,00	66,90	70,00	69,30 \pm 2,14
7	77,80	88,80	84,00	83,53 \pm 5,51
10	93,90	88,30	77,90	86,70 \pm 8,12
14	76,90	74,40	87,80	79,70 \pm 7,13
17	86,20	73,50	87,20	82,30 \pm 7,64
21	86,20	78,70	88,30	84,40 \pm 5,05
24	76,50	94,30	106,00	92,27 \pm 14,85

ANEXO 6.1

Análisis estadístico para grado de acidez sensorial en función del tiempo

Análisis de la Varianza para grado de acidez por tiempo					
Análisis de Varianza					
fuelle	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coficiente-F	Valor-P
Entre grupos	2316,21	7	330,887	5,74	0,0019
Dentro de grupos	922,62	16	57,6637		
Total (Corr.)	3238,83	23			

Test de comparación múltiple para grado de acidez por tiempo			
Metodo: 95,0 % LSD			
TIEMPO	Datos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	59,37	X
3	3	69,30	XX
14	3	79,70	XX
17	3	82,30	XX
7	3	83,53	X
21	3	84,40	X
10	3	86,70	X
24	3	92,27	X

ANEXO 7

Puntuación aceptación general entregada por los panelistas

TIEMPO (días)	REPETICIÓN 1	REPETICIÓN 2	REPETICIÓN 3	PROMEDIO \pm D.E.
0	7,90	7,30	7,30	7,5 \pm 0,34
3	7,40	6,60	7,00	7,0 \pm 0,40
7	7,00	6,20	7,50	6,9 \pm 0,66
10	6,60	5,80	6,70	6,4 \pm 0,49
14	7,40	7,20	7,00	7,2 \pm 0,20
17	6,40	6,30	6,20	6,3 \pm 0,10
21	6,50	6,90	5,50	6,3 \pm 0,72
24	7,00	6,30	5,60	6,3 \pm 0,70

ANEXO 7.1

Análisis estadístico para grado de aceptación general en función del tiempo

Análisis de la Varianza para aceptación por tiempo					
fuelle	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coficiente-F	Valor-P
Entre grupos	4,80667	7	0,686667	2,73	0,0457
Dentro de grupos	4,02667	16	0,251667		
Total (Corr.)	8,83333	23			

Test de comparación múltiple para aceptación por tiempo			
Método: 95,0 % LSD			
TIEMPO	Datos	Promedios	Grupos Homogéneos
21	3	6,3	X
17	3	6,3	X
24	3	6,3	X
10	3	6,4	XX
7	3	6,9	XXX
3	3	7,0	XXX
14	3	7,2	XX
0	3	7,5	X