



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Evaluación del comportamiento de cultivos probióticos y prebióticos en bebidas de frutos rojos**

**Camila Andrea Bernal Castro**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos  
Bogotá, Colombia  
2017



# **Evaluación del comportamiento de cultivos probióticos y prebióticos en bebidas de frutos rojos**

**Camila Andrea Bernal Castro**

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Directora: Consuelo Díaz Moreno  
Ingeniera de Alimentos MBA, PhD.  
Profesora Asociada  
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos- ICTA

Codirectora: Judith Figueroa Ramírez  
Microbióloga Msc, PhD(C)  
Profesora Asociada  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad Ciencias Agrarias  
Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos  
Bogotá, Colombia  
2017



*A Dios, a mi familia y simplemente a la vida.*

## Agradecimientos

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que aportaron en el cumplimiento de este logro. A Dios, mi madre desde la eternidad, a mi padre que he encontrado de nuevo con su amor, a mi tía Cecilia, a mi tío Carlos, a mis abuelos, primas y a mi amiga LUMA. A el ingeniero químico Miguel Ángel Paramo en el diseño, desarrollo y formulación de la bebida de frutos rojos. A mis colegas y amigas que me orientaron académicamente, acompañaron y colaboraron en el desarrollo de esta investigación, la candidata de doctorado, microbióloga Carolina Gutiérrez Cortés y a la microbióloga industrial y ambiental Elizabeth Acevedo, estudiante de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. A la microbióloga industrial Pamela Camacho por su apoyo en la fase inicial. Agradezco a la ingeniera Maribel García por su apoyo incondicional en todo el desarrollo del proyecto. A mí siempre amiga, la ingeniera Yamile Isabel Buitrago por su apoyo y guía.

Estoy profundamente agradecida con mi directora de tesis Consuelo Díaz Moreno, profesora asociada del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) y guía de este trabajo, persona que desarrolló mis capacidades y creyó en mí como profesional y persona. A mi codirectora Judith Figueroa Ramírez, profesora asociada de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá por su profunda orientación y guía académica en el desarrollo de esta investigación.

Finalmente extendiendo mis agradecimientos al Jardín Botánico de Bogotá por su apoyo en la Convocatoria Permanente para asignar estímulos a la investigación “Thomas Van Der Hammen” y al Proyecto “Uso de bacterias ácido-lácticas para biopreservación y generación de nuevos productos con características probióticas” financiado por la Dirección de Investigación, Sede Bogotá–Universidad Nacional de Colombia. Al personal del Laboratorio de Microbiología de Alimentos y a la Planta de Investigación en Procesos Vegetales del Instituto de Ciencia y Tecnología en Alimentos (ICTA).

## Resumen

Las bebidas de fruta han sido propuestas como vehículos de inclusión de probióticos, como una alternativa potencial para el desarrollo de alimentos con cualidades funcionales. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las condiciones de inclusión, viabilidad y estabilidad de probióticos y prebióticos en bebidas de frutos rojos (FR).

Se evaluaron cepas comerciales de cultivos probióticos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Lactobacillus paracasei*. Se evaluó la capacidad probiótica: tolerancia a sales biliares y a pH ácido. Se encontró que *L. casei* difiere en estos criterios respecto a las otras cepas, razón por la cual se seleccionó como cepa de trabajo. Seleccionada la cepa se procedió a formular una bebida de FR como vehículo de inclusión para el microorganismo probiótico con 35%p/v de fruta mezclando el 20%p/v de fresa (*Strawberry x ananassa* L), 10% p/v de mora (*Rubus glaucus* Benth) y adicionando 5% de papaya (*Carica papaya*) como estabilizante de pH. Posteriormente se realizó una cinética de crecimiento de *L. casei* durante 50 horas a 37°C en bebida de frutos rojos con 1% de inulina. Los resultados indicaron que la inclusión del prebiótico ( $p < 0.05$ ) afectó significativamente la viabilidad de *L. casei* y los parámetros fisicoquímicos (pH, °Brix y acidez titulable). Estos resultados fueron similares durante la evaluación de la viabilidad de *L. casei* en la bebida de FR en condiciones de almacenamiento (4°C por 21 días). Se mantuvo la estabilidad fisicoquímica de la bebida de frutos rojos al no presentar cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en el pH y la acidez, sin embargo, se evidenció un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la inulina sobre los °Brix e igualmente un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de los probióticos sobre el color del producto. Finalmente se aisló la cepa de la bebida para realizar las pruebas de capacidad probiótica al final del almacenamiento y se encontró un efecto de la acidez y el pH del producto sobre la tolerancia del microorganismo al resistir a un pH más ácido (pH=2). La bebida de frutos rojos puede considerarse vehículo de inclusión de probiótico con la adición de inulina al 1% por periodo no mayor a 12 días

**Palabras clave:** frutos rojos, bacterias ácido-lácticas, prebióticos.

## Abstract

Fruit beverages have been proposed as inclusion vehicles for probiotics as a potential alternative for the development of foods with functional qualities. The aim of the present work was to evaluate the conditions of inclusion, viability and stability of probiotics and prebiotics in red fruit (FR) beverages.

Commercial strains of probiotic cultures were evaluated: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus paracasei*. The probiotic capacity was evaluated: tolerance to bile salts and acid pH. It was found that *L. casei* differs in these criteria from the other strains for which it was selected as the working strain. With the selection of the strain the beverage was formulated as the inclusion vehicle for the probiotic microorganism with 35% w / v by mixing 20% w / v strawberry (*Strawberry x ananassa* L) and 10% w / v blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and adding 5% papaya (*Carica papaya*) as a pH stabilizer. Then a growth kinetics of *L. casei* was performed for 50 hours at 37 °C in a red fruit beverage with 1% inulin. The results indicated that the inclusion of the prebiotic ( $p < 0.05$ ) significantly affected the viability of *L. casei* and the physicochemical parameters (pH, °Brix and titratable acidity). These results were similar during the evaluation of the viability of *L. casei* in the FR beverage under storage conditions (4°C for 21 days). The viability at the end of storage of *L. casei* was 5.79 and 4.42 Log CFU mL<sup>-1</sup> for treatments with 1% inulin and without prebiotic respectively. The physicochemical stability of the red fruit drink was maintained as it did not show significant changes ( $p > 0.05$ ) in pH and acidity; however, a significant effect ( $p < 0.05$ ) of inulin on ° Brix was observed a possible significant effect ( $p < 0.05$ ) meanwhile a significant effect ( $p < 0.05$ ) of probiotics on the color of the product was observed. Finally, the strain of the beverage was isolated to perform probiotic capacity assays and an effect of the acidity and pH of the product on the tolerance of the microorganism was found to resist a more acidic pH (pH = 2). The red fruit beverage could be considered as the inclusion vehicle for probiotics with the addition of 1% inulin for a period of no more than 12 days

**Keywords:** Red fruits, lactic acid bacteria, prebiotic.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen y Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XXII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XIXIII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
Capítulo 1. Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas.....	7
<b>Resumen</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
1.1 Introducción.....	8
1.2 Probióticos .....	9
1.3 Probióticos en matrices vegetales: criterios para la inclusión en productos hortofrutícolas .....	11
1.4 Avances sobre probióticos en matrices vegetales: bebidas de fruta .....	14
1.5 Prebióticos .....	19
1.6 Avances sobre prebióticos en matrices vegetales.....	21
1.7 Conclusión .....	23
1.8 Bibliografía .....	24
<b>Capítulo 2. Efecto de la inclusión de prebióticos en la viabilidad de un probiótico comercial (<i>Lactobacillus casei</i>) en bebida de frutos rojos</b> .....	<b>31</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>31</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>32</b>
2.1 Introducción .....	33
2.2 Materiales y métodos .....	34
2.2.1 Cepa probiótica .....	34
2.2.2 Producción de inóculo en medio sintético de Frutos rojos (Cinética de crecimiento)	35
2.2.3 Evaluación de prebióticos en caldo MRS modificado .....	35
2.2.4 Formulación y elaboración de la bebida de frutos rojos (FR).....	36
2.2.5 Análisis sensorial de bebidas de Frutos rojos con prebióticos .....	36
2.2.6 Cinética de crecimiento en bebida de frutos rojos (Viabilidad y parámetros fisicoquímicos)	37

2.2.7 Análisis estadístico.....	37
2.3 Resultados.....	37
2.3.1 Producción de inóculo en medio sintético de FR (Cinética de crecimiento).....	37
2.3.2 Evaluación de prebióticos en caldo MRS modificado.....	37
2.3.3 Análisis sensorial de bebidas de FR con prebióticos.....	38
2.3.4 Cinética de crecimiento en bebida de frutos rojos (Viabilidad y parámetros físicoquímicos).....	39
2.4 Discusión.....	41
2.5 Conclusiones.....	46
2.6 Bibliografía.....	47
<b>Capítulo 3. Selección de una cepa probiótica comercial para la inclusión en una bebida de frutos rojos y determinación de la viabilidad y los parámetros físicoquímicos durante el almacenamiento.....</b>	<b>53</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>53</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>54</b>
3.1 Introducción.....	55
3.2 Materiales y métodos.....	58
Capacidad probiótica <i>in vitro</i> de cepas comerciales probióticas.....	58
3.2.1 Cepas Comerciales.....	60
3.2.2 Identificación molecular de las cepas.....	60
3.2.3 Tolerancia a las sales biliares.....	60
3.2.4 Tolerancia a pH ácido.....	61
3.2.5 Adherencia intestinal.....	61
3.2.6 Resistencia a antibióticos.....	62
3.2.7 Actividad antimicrobiana.....	62
Desarrollo y elaboración de la bebida de frutos rojos (FR).....	64
3.2.8 Elaboración de la bebida de frutos rojos (FR). .....	64
3.2.9 Inclusión de <i>Lactobacillus casei</i> en bebida de FR:.....	67
3.2.10 Evaluación de <i>Lactobacilos casei</i> durante el almacenamiento.....	67
3.2.11 Evaluación de las características físicoquímicas de las bebidas de frutos rojos durante el almacenamiento.....	68
3.2.12 Control de calidad microbiológico de las bebidas de FR.....	68
3.3 Resultados.....	69
3.3.1 Identificación molecular de las cepas probióticas.....	69
3.3.2 Tolerancia a las sales biliares.....	70
3.3.3 Tolerancia a pH ácido.....	70
3.3.4 Adherencia intestinal.....	71
3.3.5 Resistencia a antibióticos.....	73
3.3.7 Evaluación de la viabilidad de <i>Lactobacillus casei</i> durante el almacenamiento de la bebida de FR.....	74
3.3.8 Evaluación de las características físicoquímicas de las bebidas de frutos rojos durante el almacenamiento.....	74
3.3.9 Control de calidad microbiológico de las bebidas de FR.....	77
3.4 Discusión.....	78
3.5 Conclusiones.....	93
3.6 Bibliografía.....	94
<b>4. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>103</b>

---

4.1 Conclusiones .....	103
4.2 Recomendaciones .....	104
<b>Anexos .....</b>	<b>107</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>122</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1</b> Producción de inóculo en medio sintético de FR.....	35
<b>Figura 2-2</b> Cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> en bebida de FR.....	39
<b>Figura 2-3</b> . Efecto de IN 1% en el pH en la cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> en bebida de FR.....	40
<b>Figura 2-4</b> Efecto de IN 1% en acidez titulable en la cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> en bebida de FR .....	40
<b>Figura 2-5</b> Efecto de IN 1% en los sólidos solubles en la cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> en bebida FR.....	41
<b>Figura 3-1</b> Evaluación de la capacidad probiótica <i>in vitro</i> de cultivos comerciales.....	61
<b>Figura 3-2</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana .....	64
<b>Figura 3-3</b> Diagrama de flujo elaboración de pulpas .....	65
<b>Figura 3-4</b> Diagrama de flujo de elaboración de bebida de FR.....	66
<b>Figura 3-5.</b> Lámina de tejido de mucina humana Sigma-Aldrich (Mucin Tissue – Trol TM, AR-Med LTD- Runnymed Malthouse- TW20 9BD U.K) con coloración de Giemsa e inoculada con <i>S. enteritis</i> .....	72
<b>Figura 3-6</b> Prueba de antagonismo de cultivos comerciales en agar semi sólido de BHI frente a <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114.....	73
<b>Figura 3-7</b> Viabilidad de <i>L. casei</i> en bebida de FR durante almacenamiento .....	74

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1</b> Inclusión de probióticos en matrices vegetales .....	15
<b>Tabla 1-2</b> Uso de prebióticos en matrices vegetales .....	21
<b>Tabla 2-1</b> Diseño experimental para la evaluación de prebióticos en caldo MRS con sacarosa y prebióticos .....	36
<b>Tabla 2-2</b> Efecto de prebióticos en la viabilidad de <i>L. casei</i> (absorbancia 600nm) en caldo MRS modificado con sacarosa 5%. .....	38
<b>Tabla 2-3</b> Análisis sensorial: prueba de preferencia entre prebióticos en bebida de FR .....	38
<b>Tabla 3-1</b> Tratamientos evaluados en la viabilidad de <i>L. casei</i> durante el almacenamiento de la bebida de FR .....	67
<b>Tabla 3-2</b> Identificación molecular de las cepas comerciales .....	69
<b>Tabla 3-3</b> Evaluación de la supervivencia a sales biliares <i>in vitro</i> de las cepas comerciales en caldo MRS modificado .....	70
<b>Tabla 3-4</b> Evaluación de la supervivencia a sales biliares <i>in vitro</i> después de almacenamiento en caldo MRS modificado .....	70
<b>Tabla 3-5</b> Evaluación de la resistencia a pH ácido <i>in vitro</i> de las cepas comerciales en caldo MRS modificado. ....	71
<b>Tabla 3-6</b> Evaluación de la supervivencia a pH ácido <i>in vitro</i> después de almacenamiento en caldo MRS modificado .....	71
<b>Tabla 3-7.</b> Resistencia a antibióticos de <i>L. casei</i> .....	73
<b>Tabla 3-8</b> Efecto parámetros fisicoquímicos durante almacenamiento de <i>L. casei</i> en bebidas de FR .....	75
<b>Tabla 3-9</b> Evaluación del contenido de ácidos orgánicos y azúcares en la bebida de FR .....	76
<b>Tabla 3-10</b> Evaluación del color (parámetros L*, a* y b*) en bebidas de FR durante el almacenamiento .....	76

<b>Tabla 3-11</b> Control de calidad de las bebidas (tiempo 0) .....	77
<b>Tabla 3-12</b> Control de calidad de las bebidas (tiempo 21).....	77

# Introducción

Colombia es considerado como un productor primario de frutas debido a su ubicación geográfica que permite el cultivo de variadas especies vegetales, incluyendo frutas como la mora, la fresa y la papaya, las cuales hacen parte de los productos con potencial “de exportación”, gracias a la mejora de sus procesos productivos y a los estándares de calidad implementados, contribuyendo en el sector agroindustrial con el 21% en las exportaciones y con el 19% del empleo total del país (Serpa Guerra, Barajas Gamboa, Velásquez Cock J et al., 2016).

El sector productivo de los alimentos en Colombia está dirigiendo sus esfuerzos al desarrollo de productos novedosos, de fácil consumo y atractivos sensorialmente, como por ejemplo, la generación de bebidas a base frutas, especialmente las de origen tropical debido a la necesidad de desarrollar productos y procesos tecnológicos, tanto en la producción como en el manejo postcosecha que generen alternativas en la comercialización de estas fruta en el mercado nacional como internacional (Serna, 2012), impactando socialmente dentro de las comunidades que cultivan estas frutas, al reducir la brecha en el aprovechamiento tecnológico.

Por otra parte, el desarrollo de bebidas a base de frutas está en crecimiento dentro de la industria debido a que representa una manera fácil y conveniente de consumir frutas fuente de compuestos que promueven la salud como la vitamina C y los compuestos fenólicos (Rodríguez-Roque M. J et al., 2015). A partir del año 2007 en el mercado colombiano de bebidas, los jugos de fruta constituyen la categoría con mayor crecimiento en el país con un 20% anual debido a la innovación que aplica la industria para tener una mejor oferta a los consumidores (Mintel, 2016).

En la industria de alimentos la inclusión de cultivos probióticos y de sustancias prebióticas se ha realizado tradicionalmente en productos lácteos, la tendencia de los consumidores hacia hábitos más saludables como el vegetarianismo, la intolerancia a la

lactosa y los niveles de colesterol han llevado a los investigadores a proponer las matrices vegetales como vehículos de inclusión, especialmente las bebidas de fruta, debido a sus características bioactivas y perfiles sensoriales (Sheehan, Ross, & Fitzgerald, 2007). Por tal motivo el desarrollo de una bebida no fermentada de frutos rojos (fresa y mora) con probióticos y prebióticos es una idea interesante en la cadena agroindustrial colombiana aportando en la disminución de las pérdidas postcosecha de estas frutas mediante el desarrollo de un producto con valor agregado y siendo una alternativa para los consumidores. El impacto de esta investigación radica en el uso de frutas de origen tropical, cultivos probióticos comerciales y sustancias prebióticas en la evaluación de las condiciones de desarrollo y posible escalamiento industrial de una bebida funcional. El estado del arte muestra estudios en otros países con inclusión de probióticos en productos derivados de frutos rojos (ciruela, arándanos, etc.), sin embargo, la información aún es muy escasa con relación al desarrollo de productos con inclusión de probióticos a partir de este tipo de frutas. Adicionalmente se debe considerar que los frutos rojos (fresa y la mora) son consumidos a nivel mundial en fresco y en forma de productos procesados, tales como jugos, confituras, frutas deshidratadas, helados (Shahidi & Alasalvar, 2016). Los frutos rojos son considerados fuentes de compuestos fenólicos en la dieta especialmente el ácido benzoico y cinámico, antocianinas, flavonoides, catequinas y taninos, compuestos que permanecen presentes también en los productos elaborados a partir de las misma (Meret et al., 2011).

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue evaluar las condiciones de inclusión, viabilidad y estabilidad de probióticos y prebióticos en bebidas de frutos rojos. Los objetivos específicos fueron: evaluar la capacidad probiótica *in vitro* de cultivos comerciales como criterio de selección para la cepa de trabajo y al final del almacenamiento de la bebida. El segundo objetivo fue determinar las condiciones de inclusión de probióticos y prebióticos en una bebida de frutos rojos y finalmente el último objetivo fue establecer la viabilidad y la estabilidad microbiológica y fisicoquímica del producto durante el almacenamiento.

La metodología de esta investigación consistió en tres fases, inicialmente se evaluaron las cepas comerciales de cultivos probióticos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Lactobacillus paracasei* identificados molecularmente mediante la región ribosomal 16S por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida

como PCR por sus siglas en inglés. Dentro de las pruebas de capacidad probiótica *in vitro* se evaluó: tolerancia a sales biliares, pH ácido, evaluación de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram negativos y Gram positivos (*Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Escherichia coli* ATCC 25922., *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y resistencia a antibióticos. La metodología para evaluar la adherencia fue mediante láminas con tejido de mucina humana, sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados para ninguna de las cepas probióticas y de control evaluadas. Con relación a la actividad antimicrobiana se encontró que ninguna cepa presentó antagonismo frente a los patógenos evaluados. Igualmente *L. casei* presentó resistencia a antibióticos antes y después de ser inoculada en la bebida de FR. Según los resultados obtenidos se seleccionó como cepa de trabajo *L. casei* debido a que difiere en los ensayos de tolerancia a condiciones ácidas y a las sales biliares respecto a las otras bacterias.

Como segunda fase experimental se determinaron las condiciones de inclusión de probióticos y prebióticos en bebidas de frutos rojos se formuló una bebida con el propósito de ser un vehículo de inclusión para la cepa probiótica seleccionada (*L. casei*). La formulación de la bebida fue con 35%p/v de fruta mezclando 20% p/v de fresa (*Strawberry x ananassa* L) y 10% p/v de mora (*Rubus glaucus* Benth). Se adicionó 5% de papaya (*Carica papaya*) como estabilizante de pH. Las condiciones finales del producto fueron pH de 3,36 y los sólidos solubles totales de 10°Brix. Se evaluó el efecto sinérgico de prebióticos sobre el crecimiento de *L. casei* a 37°C, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones: inulina (IN), fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS) incluidos en dos niveles: 1 y 5% en caldo MRS-Oxoid® (Man, Rogosa y Sharpe) respecto a los controles MRS con sacarosa 5% (medio modificado con el fin de simular la concentración aproximada de sacarosa en la bebida) y caldo MRS sin adición mediante densidad óptica (DO) a 600nm. Los prebióticos de IN al 1% (DO=3,99±0,36) y FOS 1% (DO=3,48±0,28) fueron los que prestaron los mejores resultados. Después, se evaluó en la bebida de frutos rojos el efecto de la inulina al 1% sobre el crecimiento de la cepa, se encontró que la inclusión del prebiótico afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) la viabilidad de *L. casei* y los parámetros fisicoquímicos (pH, °Brix y acidez titulable) en una cinética de crecimiento durante 50 horas a 37°C.

Finalmente se estudió la viabilidad de la cepa de *L. casei* en el producto durante el

almacenamiento (4°C por tres semanas, 21 días). Se encontró un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la inulina sobre la viabilidad de *L. casei* en la bebida de frutos rojos bajo condiciones de refrigeración hasta el día 19 de almacenamiento. Al final de los 21 días del almacenamiento la viabilidad fue de 5,79 y de 4,42 Log UFC mL<sup>-1</sup> para los tratamientos con inulina al 1% y sin prebiótico respectivamente. La viabilidad se mantuvo en valores requeridos para los productos probióticos (10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) hasta el día 12 de almacenamiento para ambos tratamientos. Con relación a los parámetros fisicoquímicos evaluados se encontró una estabilidad fisicoquímica durante los 21 días de almacenamiento de la bebida de frutos rojos con relación al pH y la acidez, sin embargo, se determinó un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la inulina sobre los °Brix del producto, Respecto al efecto de *L. casei* sobre el color de la bebida se encontró que los probióticos ejercieron cambios en el color de las bebidas de frutos rojos (parámetros a\* y b\*). Los resultados de los análisis cromatográficos de alta eficacia (HPLC) al inicio y final del almacenamiento del producto evidenciaron cambios en la concentración de fructosa y sacarosa presentes en la bebida, evidenciando un posible consumo de *L. casei*, sin embargo, no se evidenció producción de ácido láctico. La bebida de frutos rojos al inicio y final del almacenamiento cumplió con los requerimientos de calidad microbiológica acordes a la Resolución 3929 de 2013.

Posterior al almacenamiento de las bebidas de frutos rojos se aisló la cepa para realizar las pruebas de capacidad probiótica evidenciando que la acidez y el pH de la bebida de frutos rojos pudieron afectar positivamente la tolerancia de la cepa al resistir un pH más Ácido (pH=2) igualmente se encontró un efecto sobre la resistencia frente a antibióticos. En conclusión, la bebida de frutos rojos puede ser un vehículo de inclusión de probióticos con adición de sustancias prebióticas bajo condiciones de refrigeración por un periodo máximo de 12 días.

Los resultados obtenidos en la tesis de maestría fueron publicados en el artículo: “Avances en el desarrollo de bebidas de frutas tropicales con inclusión de probióticos: *in vitro*” aceptado en la revista de Agronomía Colombiana y en el Congreso IICTA 2016, por otra parte fue sometido y aceptado en la Revista Chilena de Nutrición el artículo de revisión “Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: avances en el desarrollo de bebidas de frutas” y el artículo “Effect of including prebiotics on the viability of a commercial probiotic (*Lactobacillus casei*) in a red fruit beverage.”. En la revista Journal

of Food Science and Technology (JFST) by the Association of Food Scientists and Technologists of India (AFSTI)

También se participó en un evento internacional con el trabajo “Efecto de la inclusión de prebióticos en la viabilidad de microorganismo probiótico en bebidas de frutos rojos” en la modalidad de poster en el “XXI Congreso Chileno de Ciencias y Tecnología de Alimentos SOCHITAL 2017” el día 22 de mayo de 2017 en la Universidad de los Andes en la ciudad de Santiago de Chile. El resumen de este trabajo será publicado en un número especial de la Revista AGRO SUR. La Revista Agro Sur es una publicación científica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, indexada y de periodicidad cuatrimestral.



# Capítulo 1. Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas

**Probiotics and prebiotics in vegetable matrix: advances in the development of fruit beverages**

## Resumen

Los Alimentos Funcionales (AF) son beneficiosos para la salud, trascienden a las características nutricionales e involucran efectos fisiológicos, dentro de esta categoría se encuentran: los probióticos, prebióticos y simbióticos, los cuales generan el balance en la microbiota intestinal. Por lo anterior, se ha incrementado en el mercado la demanda de alimentos que permiten al consumidor implementar hábitos alimenticios más saludables esto acompañado con el incremento de la intolerancia a la lactosa, lo que ha incentivado a investigar, estudiar y desarrollar una generación de productos de origen vegetal, principalmente bebidas de fruta, con adición de microorganismos probióticos; lo que implica desafíos tecnológicos, entre ellos la viabilidad y el efecto sensorial. El objetivo de este artículo es revisar las condiciones de adición de microorganismos probióticos y de agentes prebióticos en productos de origen vegetal y las características que permiten el uso de estas matrices alimentarias como vehículos de inclusión en el desarrollo de bebidas funcionales.

**Palabras claves:** Alimentos funcionales, probióticos, prebióticos, simbióticos, bebidas de frutas.

## Abstract

Functional Foods (FF) are beneficial to health, transcend nutritional characteristics and

involve physiological effects, within this category are: probiotics, prebiotics and symbiotics, which generate balance in the intestinal microbiota. Due to the above, the demand for foods that allow the consumer to implement healthier food habits has been accompanied by the increase in lactose intolerance, which has stimulated the research, study and development of a generation of food products. Vegetable origin, mainly fruit drinks, with addition of probiotic microorganisms; implying technological challenges, including viability and sensory effect. The aim of this article is review the conditions of addition of probiotic microorganisms and prebiotic agents in products of vegetable origin and the characteristics that allow the use of these food matrices as inclusion vehicles in the development of functional beverages.

**Keywords:** Functional foods, probiotics, prebiotics, symbiotic, fruits beverages.

## 1.1 Introducción

El término alimento funcional (AF) surgió en Japón en la década de los 80`s y a partir de entonces ha sido aceptado internacionalmente (Shimizu, 2014), no existe una definición universal, una de las más utilizadas es: “Un alimento funcional es un alimento convencional, que hace parte de una dieta estándar en cantidades normales, además de aportar un valor nutritivo, ha demostrado tener un beneficio en la salud mediante un efecto fisiológico en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas” (Younesi & Ayseli, 2015). En la actualidad, la gama de alimentos funcionales incluye: alimentos para bebés, productos horneados y cereales, productos lácteos, confitería, comidas preparadas, aperitivos, productos cárnicos, pastas para untar y bebidas (Corbo, Bevilacqua, Petruzzi, Casanova, & Sinigaglia, 2014).

El mercado de alimentos funcionales está en continuo crecimiento al igual que los productos dirigidos a la salud gastrointestinal, en particular los probióticos y prebióticos son ampliamente estudiados (Annunziata & Vecchio, 2013). Los prebióticos (oligosacáridos y polisacáridos), componentes bioactivos que generan sinergia con los microorganismos probióticos ofreciendo un beneficio a la salud del huésped (Annunziata & Vecchio, 2013).

Las frutas son matrices alimenticias con contenido de micronutrientes, antioxidantes y

fibra con un potencial para el desarrollo de alimentos funcionales (Corbo et al., 2014). Colombia es un país productor de frutas tropicales y las pérdidas post cosecha son altas (55% de la producción local para frutas y verduras) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2016) por lo tanto, es imprescindible generar estrategias tecnológicas que permitan el desarrollo de nuevos productos aprovechando los recursos de la biodiversidad.

La inclusión de microorganismos probióticos en matrices vegetales es un desafío para la industria hortofrutícola. Existen diversos factores (composición fisicoquímica, bioactiva y sensorial) que limitan la viabilidad del microorganismo y la estabilidad del producto en almacenamiento. Aun así, estas matrices han demostrado ser excelentes sustratos para la síntesis celular y la producción de ácido láctico (Yoon, Woodams, & Hang, 2006). Con base en lo anterior, revisaremos las condiciones de adición de microorganismos probióticos y de agentes prebióticos en productos de origen vegetal y las características que permiten el uso de estas matrices alimentarias como vehículos de inclusión en el desarrollo de bebidas funcionales.

## 1.2 Probióticos

Estos ingredientes funcionales han sido definidos “Microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped en cantidades adecuadas”(Hill et al., 2014). El término probiótico (del griego “para la vida”) incluye una amplia gama de microorganismos, principalmente bacterias y levaduras, sin embargo, el efecto en la salud humana es específico de la cepa (Rai & Bai, 2015).El concepto de “probiótico” en los últimos años desde la divulgación de la Guía de Probióticos y Prebióticos publicada por la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Guarner et al., 2012) ha sido malinterpretado, empleando el término en productos con insuficiente base científica (Hill et al., 2014).

Los probióticos se han validado para aumentar la respuesta inmune contra las infecciones virales y reestablecer la homeostasis intestinal (Patel, Shukla, & Goyal, 2015). La evidencia de números estudios en humanos y modelos animales han demostrado la eficacia clínica de diversas cepas con capacidad probiótica sobre el tratamiento de enfermedades como cáncer de colon (efecto anticancerígeno), enfermedad inflamatoria intestinal, diarrea (actividad

antimicrobiana), complicaciones postoperatorias e intolerancia a la lactosa (Fontana et al., 2013). Sin embargo, en el mercadeo de los probióticos existen generalizaciones relativas a los beneficios potenciales para la salud (Patel et al., 2015). Los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de estos microorganismos ingeridos siguen sin estar completamente claros, se presume que pueden ser mecanismos multifactoriales (Fontana, Bermudez-Brito, Plaza-Díaz, Muñoz-Quezada, & Gil, 2013; Patel et al., 2015; Vasudha & Mishra, 2013). En la mayoría de los casos, el efecto es mediado a través de una interacción entre moléculas en la superficie del microorganismo probiótico y el sistema inmune del huésped, provocando una respuesta antiinflamatoria (Fontana et al., 2013). El metabolismo bacteriano a menudo parece ser irrelevante, aunque en otros casos se presume que la eficacia se basa en la producción de metabolitos bacterianos (ácidos grasos de cadena corta) (Gosá Lbez & Ramó, 2015). Las investigaciones recientes indican que la relación puede ser más compleja y residir en redes ecológicas microbianas dentro del intestino del huésped (Gosá Lbez & Ramó, 2015).

Las especies de géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son usadas frecuentemente como probióticos igualmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Chen & Sears, 2014; Hill et al., 2014), varias especies de *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Oenococcus*, *Bacillus*, *Faecalibacterium* y *Enterococcus* se perfilan como candidatos probióticos (Patel et al., 2015).

Las bacterias ácido-lácticas, entre las que se incluye el género *Lactobacillus*, tienen funciones como agentes para la fermentación de alimentos, herramienta tecnológica en la conservación de productos y pueden generar efectos fisiológicos benéficos al huésped mediante la capacidad probiótica (Hill et al., 2014)

Para producción de bebidas probióticas no lácteas, la fermentación se realiza para prevenir el deterioro y proporciona un medio para obtener un producto seguro, como una alternativa para países en vía de desarrollo y con problemas de malnutrición (Shahidi & Alasalvar, 2016).

Con el objetivo de mantener la homeostasis intestinal la funcionalidad de las diferentes matrices alimentarias con inclusión de probióticos está determinada por la mínima concentración de microorganismos vivos al final de la vida útil del producto con valores mínimos de  $10^7$  UFC/g. Esta concentración se calculó sobre la base de la porción diaria de microorganismos probióticos viables que deben ser ingeridos para obtener efectos

funcionales (Gosá Lbez & Ramó, 2015; Hill et al., 2014).

Por estas razones, la industria de alimentos funcionales busca constantemente el desarrollo de cepas probióticas y agentes prebióticos con funcionalidades específicas y novedosas (Dreyer & Renn, 2014). Para el año 2022 el mercado de probióticos a nivel mundial tiene proyecciones de ventas mayores a US\$ 63 billones (Global Industry Analysts Inc., 2016). Los beneficios de los probióticos en leches fermentadas u otras bebidas, combinado con el uso extenso de suplementos probióticos, son los principales contribuyentes del crecimiento del mercado de probióticos (Shahidi & Alasalvar, 2016). Las bebidas funcionales se encuentran en auge considerando que en la última década los consumidores están orientados a productos funcionales con imagen “saludable” (Corbo et al., 2014).

En términos de bebidas funcionales (incluyendo productos con microorganismos probióticos) a nivel mundial presenta tendencias heterogéneas, evolucionando en diferentes países, por ejemplo, en Estados Unidos han experimentado tasas de crecimiento impresionantes en los últimos años en comparación con los mercados francés, alemán, español y británico (Corbo et al., 2014). Las características sociodemográficas y las diferencias socioculturales juegan un rol significativo, estos productos requieren en su desarrollo y almacenamiento tecnologías de alto costo que se traducen en el consumidor en alimentos de alto valor agregado diferenciando la aceptación en segmentos con mayor poder adquisitivo (Corbo et al., 2014).

### **1.3 Probióticos en matrices vegetales: criterios para la inclusión en productos hortofrutícolas**

En la industria de alimentos la inclusión de cultivos probióticos se ha realizado tradicionalmente en productos lácteos (queso, yogur, helados, entre otros) (Martins et al., 2013; Shori, 2016). La investigación en el desarrollo de soluciones alternativas a los productos probióticos derivados de la leche es una opción en crecimiento dentro de la industria de alimentos, especialmente el diseño de bebidas de frutas y/o vegetales como ingrediente principal es una iniciativa factible (Vijaya Kumar, Vijayendra, & Reddy, 2015). Los avances tecnológicos han permitido alterar algunas características estructurales de las matrices vegetales modificando los componentes de estos alimentos de una forma

controlada y generando una serie de productos con valor agregado en el mercado de alimentos (Lewandowski, 2015).

Con el fin de proporcionar los efectos funcionales, las cepas a menudo requieren una matriz específica que permita la supervivencia óptima del cultivo lo largo del tracto gastrointestinal (Vandenplas, Huys, & Daube, 2015). El creciente número de personas con intolerancia a la lactosa, la dislipidemia y el vegetarianismo refuerzan la importancia del desarrollo de los productos probióticos no lácteos (Shori, 2016). Estas condiciones han permitido el lanzamiento de nuevos productos que contienen cepas probióticas, particularmente bebidas a base de frutas, verduras, cereales y soja (Corbo et al., 2014).

Las cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* son las más utilizadas en la formulación de nuevos productos probióticos de origen hortofrutícola (Shori, 2016). Desde el punto de vista del desarrollo tecnológico, la inclusión de diferentes microorganismos para procesos fermentativos es un método biopreservación tradicional para la fabricación de alimentos, que puede ser considerado una herramienta biotecnológica sencilla, relativamente económica y valiosa para mantener o mejorar la seguridad, propiedades sensoriales y la vida útil de productos hortofrutícolas (Di Cagno & Coda, 2014). La información disponible sobre las matrices vegetales como fuente de aislamiento de microorganismos probióticos es menor en comparación con los utilizados en productos lácteos. Adicionalmente es necesario realizar nuevos estudios sobre microorganismo nativos de alimentos vegetales en relación a supervivencia, frente a los desafíos tecnológicos, criterios de fermentación, uso como cultivos iniciadores y relación ecológicas (Vijaya Kumar et al., 2015).

Las matrices vegetales son fuentes fundamentales de agua, vitaminas (vitamina C vitaminas del grupo B, provitamina A), fibra dietaria, minerales y fitoquímicos significativos para la dieta humana y para los cultivos probióticos (Di Cagno, Coda, De Angelis, & Gobbetti, 2013; Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, & Martín-Belloso, 2012). Especialmente las bebidas de fruta son consideradas vehículos de inclusión para estos microorganismos debido a las ventajas funcionales que presentan como fuente de micronutrientes, bajo contenido de alérgenos y su mayor digestibilidad (Vijaya Kumar et al., 2015).

En la actualidad existe una gran preocupación por el incremento de enfermedades asociadas

con la obesidad, motivo por el cual se están considerando los beneficios de los probióticos en bebidas de fruta y/o vegetales en la prevención y el tratamiento de una serie de condiciones de salud (Shahidi & Alasalvar, 2016).

La inclusión de estos ingredientes funcionales en matrices de origen vegetal puede ser una alternativa para aumentar el bajo consumo de frutas y verduras que actualmente está presente a nivel mundial, sobre todo en países en vía de desarrollo, según reporta la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (Di Cagno et al., 2013) además de generar un aprovechamiento tecnológico dentro de la cadena agroindustrial evitando pérdidas poscosecha. Sin embargo, en la generación de estos productos se deben considerar retos tecnológicos a nivel de viabilidad (vida útil del producto) y del impacto sensorial.

En la generación y diseño de alimentos con probióticos con diferentes funcionalidades, se deben considerar propiedades intrínsecas de la cepa como son sobrevivir y colonizar en el tracto gastrointestinal, ser tolerantes a un rango de pH (pH 2.5 a 3.5) y a la pepsina del estómago, sales biliares, pancreatina en la parte superior del intestino, y la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal (Ren et al., 2014). Recientemente se ha demostrado que estas propiedades pueden variar dependiendo de las condiciones de fabricación y procesamiento del producto (Toit & Vesterlund, 2013), por tanto, es crítico la evaluación de estas características en el desarrollo de bebidas funcionales pre y post procesamiento.

En general, de acuerdo con los estudios realizados, el crecimiento y la viabilidad de las bacterias probióticas en bebidas de frutas y verduras depende de la especie y cepa de la bacteria utilizada, el pH y la concentración de ácido láctico y ácido acético del producto final, entre otros factores (Shori, 2016). La adición de probióticos en estos productos es más compleja que la formulación en los productos lácteos porque las bacterias necesitan protección de las condiciones ácidas en las bebidas a base de frutas y/o vegetales (Perricone et al., 2015). Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que algunas cepas son capaces de crecer y sobrevivir a niveles estables (densidad celular superior a  $10^7$  UFC/mL) en bebidas de fruta generando un aumento en el consumo como vehículos de inclusión para microorganismo probióticos (Lewandowski, 2015).

## 1.4 Avances sobre probióticos en matrices vegetales: bebidas de fruta

En todo el mundo se producen una variedad de bebidas tradicionales no lácteas fermentadas, como Boza, Bushera, Mahewu, Pozol, Togwa Hardaliye y Kinema, elaborado a partir de la fermentación de la soya utilizando *Bacillus subtilis* consumido por los habitantes de Nepal (Rai & Bai, 2015). Otros productos de origen vegetal son los encurtidos fermentados de origen étnico como Tursu de Turquía (fermentación de repollo y tomate verde por bacterias autóctonas ácido lácticas y levaduras como *Torulopsis sp.*, *Hansenula sp.*, y *Saccharomyces sp.*) y el Pak-Gard-Dong (fermentación de hojas de mostaza por bacterias autóctonas ácido lácticas) (Rai & Bai, 2015).

El crecimiento positivo de bacterias ácido-lácticas en estos tipos de alimentos muestra que es factible utilizar las matrices vegetales como sustrato para los probióticos, obteniendo todos los beneficios del proceso de fermentación, es por tanto que frutas y vegetales representan alimentos que promueven la salud gracias a la combinación de probióticos y prebióticos naturalmente presentes sus estructuras (Rai & Bai, 2015).

La primera bebida de fruta sin leche con adición de probióticos fue Proviva® lanzada en Suecia en 1994 por la compañía Skane Lácteos (Molin, 2001) El componente activo de este producto se compone de bacterias ácido-lácticas (*L. plantarum* 299v) crecidas en harina de avena. El producto final contiene concentraciones entre  $5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^{11}$  UFC/ml (Molin, 2001). Otros ejemplos de productos disponibles en el mercado son: Rela® (Biogai, Suecia), un jugo de fruta con *L. reuteri* MM53; Geflius® (Valio Ltd., Finlandia) bebida de fruta con 7 semanas de vida útil en refrigeración; Bioprofit® (Valio Ltd.) con *L. rhamnosus* y *Propionibacterium freuden-reichii* ssp. *shermanii* JS y Biola® (Tiene BA, Noruega) una bebida con más del 95% de fruta sin adición de azúcar (Corbo et al., 2014). Varias frutas y verduras como manzanas, naranjas, grosella negra, plátano, arándano, piña, melón, frambuesa, granada, zanahoria, remolacha. han sido utilizadas para el diseño de diferentes productos enriquecidos con probióticos (Martins et al., 2013a; Vijaya Kumar et al., 2015) .

En la tabla 1-1 se encuentra los estudios más recientes sobre la inclusión de probióticos en productos derivados de matrices vegetales

**Tabla 1-1** Inclusión de probióticos en matrices vegetales

Matriz alimentaria	Probiótico	Tipo de producto	Efecto sensorial	Viabilidad	Condiciones de inclusión	Referencia
Ananá, Naranja, Melocotón, Manzana.	<i>L. casei</i> LC-01 <i>L. casei</i> BGP 93	Bebidas (jugos) comerciales.	Los cambios sensoriales indicaron que la vida útil de jugo inoculado no excede 1 semana.	La viabilidad fue óptima con ananá, melocotón y manzana ( $10^8$ UFC/mL)., sólo el jugo de naranja afectó la proliferación de ambas cepas.	Se estabilizó el pH en un rango entre 3,34 a 4,28. Almacenamiento a 5°C durante 4 semanas.	(Céspedes, Cárdenas, Staffolani, Ciappini, & Vinderola, 2013)
Manzana verde, Naranja, Piña, Frutos rojos	<i>L. reuteri</i> DSM 20016	Bebidas (jugos) comerciales	<i>L. reuteri</i> no ejerció ningún efecto negativo en los atributos sensoriales de los jugos en refrigeración	Los resultados sugieren que la viabilidad de <i>L. reuteri</i> fue afectada por el tipo de jugo, la bacteria sobrevivió en jugos piña, naranja y manzana, mientras que experimentó una fuerte reducción de jugos de frutos rojos (menor a. ( $10^7$ UFC/mL).	Se estabilizaron los rangos de pH y se evaluó el contenido de sólidos totales y de azúcares.	(Perricone, Corbo, Sinigaglia, Speranza, & Bevilacqua, 2014)
Piña, Naranja, Arándano	<i>L. salivarius ssp.</i> <i>L. paracasei ssp.</i> <i>paracasei</i> NFBC43338.	Bebidas (jugos) comerciales.	No se evaluó el efecto sensorial, pero si el efecto a tratamientos térmicos (pasteurización).	Las cepas examinadas fueron viables durante más tiempo en el jugo de piña y en el de naranja en comparación con el de arándano. ( $10^7$ UFC/mL).	Se ajustó el pH a 3,5, 4,5 y 5. Periodo de almacenamiento de 12 semanas a 4°C.	(Sheehan et al., 2007)
Arándano, Grosella negra	<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	Polvos liofilizados de frutas	No se evaluó el efecto sensorial.	El polvo de grosella negra fue el que mantuvo la viabilidad celular. ( $10^8$ UFC/g).	Almacenamiento por 12 meses, reconstitución en agua	(Nualkaekul, Deepika, & Charalampopoulos, 2012)
Manzana	<i>B. animalis subsp.</i> <i>lactis Bb-12</i>	Jugo de manzana	No se evaluó efecto sensorial.	Mutagénesis UV y la posterior incubación en medio ácido lograron mejorar la estabilidad de la cepa ( $10^7$ UFC/mL). al incluirla en la matriz	El jugo se estabilizo a un pH 3,5	(Saarela, Alakomi, Mättö, Ahonen, & Tynkkynen, 2011)
Piña, manzana, naranja	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> <i>L. rhamnosus</i>	Jugos comerciales (formulados con pulpas y purés)	No se evaluó el efecto sensorial.	Estabilidad de los probióticos ( $10^7$ UFC/mL) durante el almacenamiento por 35 días a 4°C.	El pH de la bebida fue ajustado a 4,2	(Champagne & Gardner, 2008)

Granada y arándano	<i>L. plantarum B. longun</i>	Jugos de Granada y arándano	No se evaluó el efecto sensorial.	La encapsulación mejoró la viabilidad con una concentración final de aproximadamente $10^8$ UFC/mL y $10^6$ UFC /mL.	Evaluación de la viabilidad de las células libres y encapsuladas en perlas de pectina y alginato con diferentes	(Nualkaekul, Cook, Khutoryanskiy, & Charalampopoulos, 2013)
Moras, ciruelas, kiwis y papaya,	<i>L. plantarum, Lactobacillus pentosus</i>	Diseño de bebidas tipo smoothies de frutos verdes (GS) y rojos (RS).	La diferencia de color $\Delta E^*$ ab y el índice de pardeamiento se vieron afectados positivamente.	Los cultivos se mantuvieron viables a una concentración de ( $10^9$ UFC/g) durante 30 días de almacenamiento a 4°C.	Se asilaron las cepas de las matrices vegetales y se realizó la identificación molecular.	(Di Cagno, Minervini, Rizzello, De Angelis, & Gobetti, 2011)
Naranja	<i>L. rhamnosus GG, L. casei Imunitass</i>	Jugo naranja (bebida comercial sin pulpa)	Jugos enriquecidos con probióticos fueron evaluados sensorialmente por un panel descriptivo	Para el jugo de naranja con <i>L. paracasei</i> MFBC 43338, se observaron $5 \times 10^8$ UFC / mL.	Los resultados mostraron que los jugos tenían significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes perfiles sensoriales	(Tracy Luckow, Sheehan, Delahunty, & Fitzgerald, 2005)
Durazno	<i>L. rhamnosus</i> Cepas salvajes.	Mermelada comercial de durazno	Los cultivos probióticos añadidos a mermelada no cambiaron significativamente los parámetros de color.	Todas las cepas mostraron un mejor rendimiento en la mermelada, con valores superiores a ( $10^7$ UFC/g). hasta los 78 días de almacenamiento a 5°C.	Almacenamiento durante 78 días a 25 °C y 5 °C. Diseño de medio sintético de durazno (control).	(Randazzo & Pitino, 2013)
Remolacha roja	<i>L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii, L. plantarum</i>	Jugo fermentado de remolacha	No se evaluó el efecto sensorial.	Los recuentos en placa de las bacterias de ácido lácticas, en el jugo de remolacha fermentado, se mantuvieron a $10^6$ - $10^8$ UFC / mL excepto para <i>L. acidophilus</i> después de 4 semanas de almacenamiento en frío a 4°C.	Los cultivos lácticos en el jugo de remolacha fermentada perdieron gradualmente su viabilidad durante el almacenamiento en frío.	(Yoon, Woodams, & Hang, 2005)
Mora	<i>L. casei</i> ATCC 393	Láminas de mora	El análisis sensorial arrojó un puntaje de aceptación superior a 5 en una escala de 1 a 7.	La presencia de prebióticos sobre la viabilidad del microorganismo al permitir la supervivencia por más de 40 días, con recuentos superiores a $10^6$ UFC/mL. mientras en la muestra control fue inferior luego de 25 días	Efecto de la fibra prebiótica en la supervivencia del probiótico en matrices de mora mediante un proceso de impregnación a vacío y posterior liofilización.	(Rodríguez-Barona, Giraldo, & Zuluaga, 2015)

Según el análisis de los estudios presentados (Tabla 1-1) existen factores a considerar en el desarrollo matrices vegetales como vehículos de inclusión de probióticos. A continuación, se describen algunos de estos factores:

- **Composición de las matrices vegetales:** la naturaleza de los ácidos orgánicos desempeña un factor intrínseco a la matriz que puede presentar un efecto inhibitor en la viabilidad de las bacterias probióticos como lo señala Sheehan et al. (2007)(Sheehan et al., 2007) quienes desarrollaron un jugo de arándano con probióticos con una alta concentración de ácido benzoico (Tabla 1-1.). El contenido de compuestos fenólicos en frutos rojos (ácido benzoico y lactonas) presente en concentraciones de aproximadamente 34 mg/L en ciertas variedades de frutos rojos puede tener efectos nocivos en la viabilidad de los probióticos en este tipo de frutas debido a que están en el rango de concentración usado en la preservación de la mayoría de los alimentos perecederos (Sheehan et al., 2007). Sin embargo, las fuentes no lácteas contienen acidulantes naturales, que aumentan la vida útil del producto creando un ambiente anaeróbico, óptimo para cultivos probióticos mediante la depuración del oxígeno disponible. También tiene contenido de azúcares naturales para apoyar el crecimiento de probióticos (Perricone, Bevilacqua, Altieri, Sinigaglia, & Corbo, 2015; Vijaya Kumar et al., 2015). Se debe considerar el efecto en la viabilidad de los probióticos, presencia de sal, azúcar y productos químicos como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, saborizantes y colorantes artificiales (Tripathi & Giri, 2014).
- **Cepas probióticas (factores de crecimiento y viabilidad):** la viabilidad de los microorganismos durante las operaciones de procesamiento y el almacenamiento, la supervivencia durante el tránsito intestinal, y los potenciales beneficios de salud de los consumidores son los criterios principales para la selección de cepas adecuadas con capacidad probiótica (Tripathi & Giri, 2014). La selección de cepas de autóctonas de origen vegetal puede ayudar a superar los retos tecnológicos, algunas cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas de verduras y frutas fermentadas se pueden utilizar como probióticos, ya que son capaces de resistir altos niveles de acidez y de sal durante el período de almacenamiento (Rai & Bai, 2015). Numerosos factores influyen en el crecimiento microbiano como: concentración de oxígeno, acidez, pH, tipo de empaque, temperatura de

producción y de almacenamiento, tecnologías de conservación como secado y congelación (Rai & Bai, 2015). La tolerancia al ácido de las bacterias ácido lácticas es un factor tecnológico en el desarrollo de estos productos, las bebidas de frutas tienen un pH inferior a 4, es un aspecto fundamental en la pérdida de viabilidad de los probióticos (Tripathi & Giri, 2014). Los parámetros de producción de las bebidas de fruta con probióticos son claves como el pH del producto final que permita la supervivencia de los microorganismos; la temperatura de almacenamiento, preferiblemente en condiciones de refrigeración (4°C), logrando la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial del producto, evitando la producción de metabolitos que impacten en la viabilidad de los probióticos, el perfil sensorial de la bebida; y la temperatura de crecimiento por encima de 45°C durante el procesamiento resulta ser perjudicial para la supervivencia probiótica (Tripathi & Giri, 2014).

- **Inóculo:** se debe considerar la concentración celular de los microorganismos a inocular debido a que la selección de las cepas probióticas apropiadas en la dosis adecuada es el primer requisito para el desarrollo de un producto alimenticio con características probióticas (Tripathi & Giri, 2014). Los alimentos con probióticos deben contener altas dosis de microorganismos viables a lo largo de la vida útil del producto, sin embargo, no todas las cepas probióticas añadidas a las frutas y verduras dan buenos resultados en términos de supervivencia (Perricone et al., 2015; Rai & Bai, 2015). La adaptación a la matriz vegetal del inóculo mediante suplementación de la bebida para frutos rojos como lo sugiere Perricone et al. 2015 (Perricone et al., 2014) junto a la adición de prebióticos (Perricone et al., 2015) son estrategias efectivas para mejorar la estabilidad y la viabilidad de los probióticos en condiciones hostiles.
- **Efecto sensorial:** el efecto sensorial derivado de la inclusión de probióticos en productos de origen vegetal es crítico en el desarrollo de bebidas funcionales. Este parámetro ha sido explorado por algunos autores, por ejemplo, se ha reportado sabores salados, agrios y olores perfumados en bebidas de fruta con adición de probióticos (T Luckow & Delahunty, 2004; Tracy Luckow et al., 2005; Perricone et al., 2015) concluyeron que los jugos de naranja con probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Imunitass®, *Lactobacillus paracasei* NFBC 43338) presentaban por parte de un panel descriptivo

perfiles sensoriales poco agradables descritos como sabores medicinales y con toques lácteos, sin embargo estos autores sugieren que la exposición y la familiaridad con las bebidas probióticas ayuda a mejorar la aceptación y el gusto de los consumidores por las características sensoriales de las bebidas de fruta con probiótico (T Luckow & Delahunty, 2004).

Las bebidas de fruta formuladas con probióticos y/o prebióticos con estabilidad microbiológica, proporcionan una forma conveniente de complementar las dietas diarias y de mejorar la salud e inmunidad digestivas (Shahidi & Alasalvar, 2016). Por lo tanto, las bebidas funcionales pueden servir como un medio exitoso para ofrecer beneficios para la salud, nutrición, amplios perfiles sensoriales y comodidad en el mundo exigente de hoy (Shahidi & Alasalvar, 2016).

Las bebidas de frutas y/o vegetales presentan perfiles sensoriales refrescantes y son una elección preferida para personas de todas las edades (Vijaya Kumar et al., 2015). Una ventaja importante es que las bebidas de frutas permanecen menos tiempo en el estómago y por lo tanto las especies probióticas que transitan se tienen una menor exposición al ambiente ácido del estómago. (Vijaya Kumar et al., 2015) múltiples estudios muestran la factibilidad de desarrollar estos productos en mercados emergentes como respuesta a las necesidades cambiantes de los consumidores y al aprovechamiento tecnológico de estas matrices alimentarias.

## 1.5 Prebióticos

La definición de los prebióticos está relacionada con el concepto de fibra dietaria, excepto por la selectividad como sustrato para varios géneros de bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal humana (Al-Sheraji et al., 2013). Los prebióticos son sustancias de la dieta, fundamentalmente carbohidratos no digeridos por enzimas humanas, una serie de di, oligo y polisacáridos, almidones resistentes y polioles de azúcar que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino, favoreciendo la multiplicación de bacterias benéficas y disminuyendo la población de las patógena (Hill et al., 2014; Perricone et al., 2015).

La demanda mundial de prebióticos se estima en alrededor de 167.000 toneladas y 390 millones de euros para el año 2016 (Siró, Kápolna, Kápolna, & Lugasi, 2008). Los fructooligosacáridos (FOS), inulina, isomalto-oligosacáridos (OMI), povidextrosa, lactulosa y el

almidón resistente se consideran los principales componentes prebióticos (Lewandowski, 2015). Los oligosacáridos, tales como los oligosacáridos de soja (SOS), los galactolisacáridos (GOS) y los xiloligosacáridos (XOS), también se comercializan en Japón como agentes prebióticos (Lewandowski, 2015). Las fuentes de estos compuestos son variadas, están presentes naturalmente en las frutas, las verduras, el bambú, la miel y la leche, pueden ser producidos a partir de residuos lignocelulósicos (Singh, Banerjee, & Arora, 2015).

Actualmente, las mezclas de probióticos y prebióticos se utilizan a menudo con el fin de aprovechar sus efectos sinérgicos en la aplicación a productos alimenticios, estas mezclas se denominan simbióticos (Al-Sheraji et al., 2013). Por otra parte, el diseño de productos simbióticos es el nuevo reto para las bebidas funcionales, ya que los prebióticos pueden mejorar la viabilidad de las bacterias probióticas y estimular activamente la microbiota beneficiosa en el tracto gastrointestinal humano (Corbo et al., 2014). El efecto fisiológico de los prebióticos parece estar relacionado con un aumento de la viscosidad del contenido del tracto gastrointestinal, reduciendo la tasa de vaciamiento gástrico y aumentando la absorción de nutrientes (Shahidi & Alasalvar, 2016).

El patrón de producción de ácidos grasos de cadena corta tanto el colon como el efecto prebiótico son procesos dinámicos que varían con el tipo de oligosacárido y es afectado por el grado de polimerización, la naturaleza de los restos de hexosa, la duración del tratamiento prebiótico, la composición inicial de la microbiota o la dieta en la que se incorporan (Lewandowski, 2015).

Los prebióticos tienen actividades biológicas adicionales, a la influencia en la microbiota intestinal, específicamente, se ha sugerido que algunos prebióticos, como los galactooligosacáridos (GOS) pueden ser capaces de inhibir las infecciones gastrointestinales a través de actividades anti-adhesivas (Shoaf, Mulvey, Armstrong, & Hutkins, 2006), sin embargo, otros estudios también han reportado que ciertos prebióticos comerciales como Orafiti GR®, Orafiti P95®, y Orafiti Sinergy® (Beneo GmbH, Mannheim, Alemania), y Vivinal® (Friesland Foods Domo, Holanda) pueden reducir la capacidad de adherencia de cultivos probióticos en estudios *in vitro* en líneas celulares (Caco-2) (Kadlec & Jakubec, 2014).

## 1.6 Avances sobre prebióticos en matrices vegetales

En la Tabla 1-2, están descritos los estudios relacionados con la inclusión de prebióticos en matrices vegetales, los cuales pueden cumplir múltiples funciones más allá de la prebiótica, mejorando las características sensoriales y fisicoquímicas de las bebidas, como agentes edulcorantes para bebidas de fruta, como estabilizadores para evitar procesos de licuefacción y como componentes sinérgicos y protectores en las diferentes técnicas de encapsulación de microorganismos con capacidad probiótica, con el fin de favorecer las condiciones ambientales y de adaptabilidad a estas bacterias en diferentes clases de matrices.

**Tabla 1-2** Uso de prebióticos en matrices vegetales

Prebiótico	Matriz vegetal/producto	Efecto evaluado	Referencia
Oligofruktosa e Inulina de origen comercial	Néctar de papaya	Caracterización química y aceptación sensorial	(Braga & Conti-Silva, 2015)
Fructooligosacáridos	Jugo de piña, mango y naranja	Parámetros de calidad	(Renuka, Kulkarni, Vijayanand, & Prapulla, 2009)
Polisacáridos de la harina de colza	Colza	Proliferación y actividad de acidificación de los probióticos <i>in vitro</i>	(Wang et al., 2015)
Galactooligosacáridos Inulina	Jugos de frutas	Agentes protectores en el proceso de encapsulación de <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	(Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014)
Oligofruktosa Sucralosa (sustitutos de azúcar)	Jugo de manzana	Perfil sensorial y de aceptación. Efecto sinérgico con el probiótico.	(Pimentel, Madrona, & Prudencio, 2015)
Oligosacáridos	Jugo de acerola	Síntesis sin adición en el jugo por medio de una reacción química	(Araújo et al., 2014)
Oligosacáridos derivados de lactulosa	Jugo de manzana	Modificaciones fisicoquímicas de los agentes prebióticos durante el procesamiento del jugo de manzana	(López-Sanz, Montilla, Moreno, & Villamiel, 2015)
Oligofruktosa (sustituto de azúcar y prebiótico)	Jugo clarificado de manzana	Evaluar el efecto sinérgico (probiótico y prebiótico)	(Pimentel, Madrona, Garcia, & Prudencio, 2015)
Inulina Lactulosa Ácido lactobiónico	Preparaciones simbióticas	Mejorar el crecimiento de los cultivos y proporcionar protección contra el estrés del ácido biliar.	(Adebola, Corcoran, & Morgan, 2014)

Los prebióticos tales como FOS,  $\beta$ -glucanos e inulina pueden ser una alternativa saludable al ser adicionados en bebidas funcionales. Las bebidas probióticas no lácteas

comercialmente disponibles son en su mayoría bebidas refrigeradas de frutas y/o vegetales que contienen cultivos de probióticos viables, últimamente estas bebidas probióticas se complementan con prebióticos (Betoret, Betoret, Vidal, & Fito, 2011; Shahidi & Alasalvar, 2016). La adición de prebióticos a una dieta mediante el uso de bebidas funcionales es un reto de preocupación en el área nutricional (Corbo et al., 2014). A continuación, se describen algunos de las aplicaciones de los prebióticos en bebidas de fruta:

- **Efecto sensorial: y en las propiedades fisicoquímicas:** se han realizado pocos estudios relacionados con el efecto sensorial de la adición de prebióticos en bebidas de frutas y vegetales (Braga & Conti-Silva, 2015) sin embargo, estudios realizados en néctares de papaya con oligofructosa (Tabla 1-2) por Braga y Conti-Silva, 2015 han mostrado los análisis de preferencia que los néctares con adición de oligofructosa e inulina son apreciados con respecto al sabor y la aceptabilidad general en igual medida que los néctares que contiene solamente azúcar. Adicionalmente en otras bebidas no lácteas como batidos de frutas que contiene *Bifidobacterium lactis* HN019 y fructooligosacáridos han demostrado que la formulación que contiene el prebiótico, contribuyen al perfil sensorial, la composición nutricional del batido y posiblemente cambian sus propiedades fisicoquímicas a través de la reducción de la actividad del agua (Elizabeth Tymczyszyn, Gerbino, Illanes, & Gómez-Zavaglia, 2011). También se ha reportado que los prebióticos pueden proporcionar atributos en la textura final del producto (Karimi, Azizi, Ghasemlou, & Vaziri, 2015).
- **Agentes protectores en la microencapsulación:** para aumentar la supervivencia de los probióticos en estas nuevas bebidas funcionales (Shahidi & Alasalvar, 2016) las tecnologías de encapsulación han sido aplicadas (Tabla 1-2). Se ha sugerido a los prebióticos como agentes protectores en la microencapsulación de probióticos (Montes Ramírez, 2013) Varios estudios han demostrado que el uso de probióticos en los alimentos procesados a partir de frutas o verduras es posible. Sin embargo, se recomienda el uso de barreras protectoras y la microencapsulación para conservar estos microorganismos (Rai & Bai, 2015). La microencapsulación ofrece el potencial de reducir los efectos adversos sobre la viabilidad de los probióticos en los alimentos y los efectos gastrointestinales en el huésped, así como durante el procesamiento, almacenamiento y consumo (Manojlovi et al., 2010). La co-encapsulación con

prebióticos, antioxidantes, péptidos o polímeros que mejoran el sistema inmunológico también podría explorarse más a fondo. Además, se necesita investigación sobre la estabilidad y liberación de probióticos micro encapsulados en productos alimenticios (Manojlovi et al., 2010).

- **Sustitutos de sacarosa en bebidas de fruta:** los prebióticos también puede ser sustitutos de sacarosa como lo demuestran estudios realizados por Renuka et al. (2009) (Renuka et al., 2009) en los cuales se adicionó fructooligosacáridos (FOS) a jugos de piña, mango y naranja. Los resultados indicaron que la sacarosa, que usualmente se usa como edulcorante en bebidas de jugos de frutas, puede ser sustituida con FOS sin afectar significativamente la calidad global. Las bebidas de jugo de fruta fueron evaluadas para detectar cambios fisicoquímicos y sensoriales durante 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) y refrigeración (4°C) (Renuka et al., 2009).

Como conclusión el uso de prebióticos en matrices vegetales es bastante amplio y prometedor en la industria de alimentos a nivel global por lo cual se considera a estos ingredientes funcionales son una de las estrategias aplicadas para mejorar la estabilidad y viabilidad de los probióticos en bebidas de fruta. igualmente se debe considerar en el desarrollo de estos productos, la selección y evaluación de las cepas y establecer la dosis adecuada de inoculación de las bacterias probióticas (Perricone et al., 2015; Shori, 2016).

## 1.7 Conclusión

Existen grandes retos tecnológicos para asegurar la viabilidad, estabilidad en el almacenamiento y efectos sensoriales de productos a partir de matrices vegetales con potenciales características probióticas. En el mercado existe un gran interés por los alimentos funcionales en especial por el desarrollo en bebidas a base de frutas enriquecidas con probióticos y prebióticos, más aún cuando se ha encontrado que estas matrices son sustratos ideales para las cepas de probióticos y fuentes de prebióticos, debido a que contienen agua, minerales, vitaminas, fibra dietaria y antioxidantes, y además son consideradas por los consumidores como bebidas refrescantes y saludables. Diversos estudios evidencian la tendencia y viabilidad de desarrollar estos productos con base en frutas exóticas o de origen tropical.

## 1.8 Bibliografía

Adebola, O. O., Corcoran, O., & Morgan, W. a. (2014). Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *Journal of Functional Foods*, 10, 75–84.

Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542–1553.

Annunziata, A., & Vecchio, R. (2013). Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. *Food Quality and Preference*, 28(1), 348–355.

Araújo, A. D. a., Coelho, R. M. D., Fontes, C. P. M. L., Silva, A. R. a., Da Costa, J. M. C., & Rodrigues, S. (2014). Production and spouted bed drying of acerola juice containing oligosaccharides. *Food and Bioproducts Processing*, 1–7.

Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 498–508.

Braga, H. F., & Conti-Silva, A. C. (2015). Papaya nectar formulated with prebiotics: Chemical characterization and sensory acceptability. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 854–860.

Céspedes, M., Cárdenas, P., Staffolani, M., Ciappini, M. C., & Vinderola, G. (2013). Performance in nondairy drinks of Probiotic *L. casei* strains usually employed in dairy products. *Journal of Food Science*, 78(5), 756–762.

Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41(5), 539–543.

Chen, L. A., & Sears, C. L. (2014). 3 - Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eight Edi).

Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192–1206.

Di Cagno, R., & Coda, R. (2014). Fermented vegetable products. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2, 83–91.

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1–10.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28(5), 1062–71.

Dreyer, M., & Renn, O. (2014). Safety of food and beverages: Safety Consideration in Developing Functional Foods. *Encyclopedia of Food Safety (Vol. 3)*. Elsevier Ltd.

Fontana, L., Bermúdez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(S2), S35–S50.

Global Industry Analysts Inc. (2016). *Probiotics: A Global Strategic Business Report*. Estados Unidos.

Gosá Lbez, L., & Ramó, D. (2015). Probiotics in transition: novel strategies. *Cell Press*, 33(4), 195–196.

Guarner, F., Khan, A., J, et al (2012). World Gastroenterology Organization Global Guidelines: probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(6), 36.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.

Kadlec, R., & Jakubec, M. (2014). The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 1983–1990.

Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 761–766.

Kumar, H., Salminen, S., Verhagen, H., Rowland, I., Heimbach, J., Bañares, S., ... Lalonde, M. (2015). Novel probiotics and prebiotics: road to the market. *Current Opinion in Biotechnology*, (32), 99–103.

Lewandowski, C. M. (2015). *Advances in Fruit Processing Technologies*. The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference (Vol. 1).

López-Sanz, S., Montilla, A., Moreno, F. J., & Villamiel, M. (2015). Stability of oligosaccharides derived from lactulose during the processing of milk and apple juice. *Food Chemistry*, 183, 64–71.

Luckow, T., & Delahunty, C. (2004). Which juice is “healthier”? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference*, 15(7–8), 751–759.

Luckow, T., Sheehan, V., Delahunty, C., & Fitzgerald, G. (2005). Determining the Odor and Flavor Characteristics of Probiotic, Health-promoting Ingredients and the Effects of Repeated Exposure on Consumer Acceptance. *Journal of Food Science*, 70(1), S53–S59.

Manojlovi, V., Nedovic, V. A., & Kailasapathy, K. (2010). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. In N. J. Zuidam & V. Nedovic (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (pp. 269–302). New York, NY: Springer New York.

Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., de Oliveira Pinto, C. L., & Martins, J. M. (2013a). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764–770.

Molin G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2 Suppl): 380-385.

Montes Ramírez, L. M. (2013). Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469), Universidad Nacional de Colombia.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martín-Belloso, O. (2012). Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 205–214.

- Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, 53(1), 304–311.
- Nualkaekul, S., Deepika, G., & Charalampopoulos, D. (2012). Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Research International*, 48(2), 627–633.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2016). Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe. Boletín 3. febrero 2016. p. 23. Edit.: Miguel Herrera
- Patel, S., Shukla, R., & Goyal, A. (2015). Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *Journal of Functional Foods*, 14, 549–561.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages*, 1, 95–103.
- Perricone, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Speranza, B., & Bevilacqua, A. (2014). Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. *Journal of Functional Foods*, 10, 421–426.
- Pimentel, T. C., Madrona, G. S., Garcia, S., & Prudencio, H. (2015). Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT - Food Science and Technology*.
- Pimentel, T. C., Madrona, G. S., & Prudencio, S. H. (2015). Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 838–846.
- Rai, V., & Bai, J. (2015). Probiotics and Prebiotics in Fruits and Vegetables: Technological and Sensory Aspects. In *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods* (p. 20). Taylor & Francis Group.
- Randazzo, C., & Pitino, I. (2013). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Science and Technology*, 33(4), 652–659.

Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Ye, F., Jin, N. (2014). *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30, 1–10.

Renuka, B., Kulkarni, S. G., Vijayanand, P., & Prapulla, S. G. (2009). Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 1031–1033.

Rodríguez-Barona, S., Giraldo, G. I., & Zuluaga, Y. P. (2015). Evaluación de la incorporación de fibra prebiótica sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei* impregnado en matrices de mora (*Rubus glaucus*). *Información Tecnológica*, 26(5), 25–34.

Saarela, M., Alakomi, H.-L., Mättö, J., Ahonen, A.-M., & Tynkkynen, S. (2011). Acid tolerant mutants of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* with improved stability in fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1012–1018.

Shahidi, F., & Alasalvar, C. (2016). *Handbook of Functional Beverages and Human Health*.

Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 279–284.

Shimizu, M. (2014). *History and Status of Functional Food Regulations in Japan. Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World: Second Edition (Second Ed)*. Elsevier Inc.

Shoaf, K., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., & Hutkins, R. W. (2006). Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 74(12), 6920–6928.

Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1–8.

Singh, R. D., Banerjee, J., & Arora, A. (2015). Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 19–30.

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). *Functional food. Product*

development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite*, 51(3), 456–67.

Toit, E. du, & Vesterlund, S. (2013). Assessment of the effect of stress-tolerance acquisition on some basic characteristics of specific probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 165(1), 51–56.

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.

Tymczyszyn, E., Gerbino, E., Illanes, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Cryobiology*, 62(2), 123–129.

Vandenplas, Y., Huys, G., & Daube, G. (2015). Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria*, 91(1), 6–21.

Vasudha, S., & Mishra, H. (2013). Nondairy probiotic beverages. *Int. Food Res. J.*, 20(1), 7–15.

Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6112–6124.

Wang, X., Huang, M., Yang, F., Sun, H., Zhou, X., Guo, Y, Zhang, M. (2015). Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics *in vitro*. *Carbohydrate Polymers*.

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, 6(100), 205–214.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 73–75.

Younesi, E., & Ayseli, M. T. (2015). An integrated systems-based model for substantiation of health claims in functional food development. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 95–100.

## Anexo

Este artículo fue sometido y aprobado por la Revista Chilena de Nutrición, fue realizado acorde a las normas de la revista (en link se encuentra la página web con las instrucciones: <http://www.scielo.cl/revistas/rchnut/einstruc.htm>). A continuación, se encuentra la comunicación electrónica donde se expresa por el Editor (Profesor Miguel Arredondo) la aceptación del artículo.

[rchnut] **Decisión del Editor** Recibidos x    

 **Sistema SciELO Chile de Publicación** <suporte.aplicacao@scie 19 ago. ☆  

para mí 

señorita Camila Andrea Bernal Castro:

Hemos tomado una **decisión** sobre su presentación a Revista Chilena de Nutrición, "PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS EN MATRICES DE ORIGEN VEGETAL: AVANCES EN EL DESARROLLO DE BEBIDAS DE FRUTAS".

Nuestra **decisión** es: ACEPTADO

En breve nos volveremos a contactar con Ud. para enviar las galeradas del manuscrito o algún otro requerimiento relacionado a su manuscrito.

Cordialmente

Miguel Arredondo  
[revista@sochinut.cl](mailto:revista@sochinut.cl)

---

Revista Chilena de Nutrición  
<http://cl.submission.scielo.org/index.php/rchnut>

**Sistema SciELO Chile de ...**  
suporte.aplicacao@scielo.org  
    
[Mostrar detalles](#)

# Capítulo 2. Efecto de la inclusión de prebióticos en la viabilidad de un probiótico comercial (*Lactobacillus casei*) en bebida de frutos rojos

Effect of including prebiotics on the viability of a commercial probiotic (*Lactobacillus casei*) in a red fruit beverage.

## Resumen

Una estrategia para mejorar la viabilidad de los probióticos en bebidas de fruta puede ser la adición de prebióticos por su efecto sinérgico. El trabajo evaluó la viabilidad de un probiótico comercial (*Lactobacillus casei*) en presencia de tres prebióticos diferentes: inulina (IN), fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS) incluidos en dos niveles: 1 %y 5% en una bebida de frutos rojos (FR). Se formuló el producto con fresa (20%), mora (10%) y una adición de papaya (5%) como estabilizante de pH. Se determinó el tiempo que tarda el microorganismo probiótico en alcanzar la producción máxima de biomasa, estableciendo este punto como referencia en la producción del inóculo en una cinética de crecimiento ( $9,96 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ ) mediante el diseño de un medio sintético: caldo MRS suplementado con bebida de FR (10%) para adaptar *L. casei* al producto. Posteriormente se evaluó la viabilidad de *L. casei* en presencia de los prebióticos en un caldo MRS modificado (Oxoid®) mediante densidad óptica (DO) a 600nm. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, los prebióticos de IN al 1% ( $DO = 3,99 \pm 0,36$ ) y FOS 1% ( $DO = 3,48 \pm 0,28$ ) fueron los que presentaron los mejores resultados. Se realizó una prueba sensorial con un panel no entrenado (60 individuos) sobre la preferencia entre bebidas con adición de IN y FOS al 1% sin inocular. No se encontraron diferencias significativas entre las preferencias del

tipo de prebiótico adicionado en la bebida de FR ( $p > 0,05$ ), sin embargo, el mayor número de respuestas en la preferencia de los consumidores (33) fue para la bebida de FR con adición de IN 1%, adicionalmente en la elección del prebiótico se consideraron los resultados de la viabilidad en el caldo MRS modificado. Se seleccionó la IN al 1% para evaluar su efecto en la viabilidad de *L. casei* inoculado en la bebida de FR, posteriormente se realizó una cinética de crecimiento durante 50 horas a 37°C, se midió el recuento de células viables, el pH, la acidez titulable y los sólidos solubles (°Brix) a las 0, 10, 24 y 50 horas de fermentación. Se encontró que la inclusión del prebiótico (IN 1%) afectó significativamente ( $p < 0,05$ ) tanto la viabilidad de *L. casei* como las propiedades fisicoquímicas de la bebida de FR.

**Palabras claves:** probiótico, prebiótico, frutos rojos, inulina

## Abstract

This study evaluated the viability of a commercial probiotic (*Lactobacillus casei*) in the presence of three different prebiotics for its synergistic effect: inulin (IN), fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) added at two levels: 1% and 5% in a red fruit beverage. (RF). The product was made with strawberries (20%), blackberries (10%) and papaya (5%) as a pH stabilizer. Using a synthetic medium supplemented with a RF beverage (10%), the inoculum was produced to achieve an adaptation of *L. casei* to the product. The viability of *L. casei* was evaluated in the presence of prebiotics in a modified MRS broth (Oxoid®) using optical density (OD) at 600nm. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between the treatments; the prebiotics 1% IN (OD =  $3.99 \pm 0.36$ ) and 1% FOS (OD =  $3.48 \pm 0.28$ ) had the best results. A sensory test with an untrained panel was carried out for the preference between the beverages with the addition of 1% IN and FOS without inoculation. There were no significant differences between the preferences for the prebiotic type added to the RF beverage ( $p > 0.05$ ). 1% IN was selected to evaluate its effect on the viability of *L. casei* inoculated in a RF beverage, by growth kinetics for 50 hours at 37°C, viable cell count, pH, titratable acidity and soluble solids (°Brix) at 0, 10, 24 and 50 hours of fermentation. It was found that the inclusion of prebiotic (1% IN) significantly affected ( $p < 0.05$ ) both the viability of *L. casei* and the physicochemical properties of the RF beverage.

**Key words:** probiotic, prebiotic, red fruits, inulin.

## 2.1 Introducción

En la actualidad las bebidas son la categoría de alimentos funcionales con mayor crecimiento debido a la demanda de los consumidores por ser un excelente vehículo de suministro de compuestos bioactivos como vitaminas, minerales, antioxidantes, fibra, prebióticos y probióticos (Corbo et al., 2014).

Existe un cambio en los hábitos de consumo de bebidas tradicionales como bebidas carbonatadas a opciones más saludables como jugos y concentrados de frutas (Mintel, 2016), especialmente las mezclas de frutas tropicales en jugos y smoothies, incluyendo frutas como la piña, mango y papaya están ganando popularidad alrededor del mundo (Huang, Rasco, & Cavinato, 2009). Existen en el mercado jugos fortificados con calcio y vitaminas con un consumo regular y empiezan a desarrollarse bebidas de fruta o mezcla de frutas con inclusión de microorganismos probióticos y prebióticos, como una alternativa factible en la industria de bebidas (Costa, Fonteles, De Jesus, & Rodrigues, 2013).

Una bebida con mezclas de frutos rojos (fresa y mora) puede ser una opción atractiva a los consumidores, los productos derivados de estas frutas son fuente significativa de componentes bioactivos tales como polifenoles, flavonoides, ácido elágico, taninos, ácido gálico, ácido benzoico, antocianinas, entre otros (Meret, Brat, Mertz, Lebrun, & Günata, 2011; Romero J & Yépez V, 2015; Shahidi & Alasalvar, 2016). Así mismo, estos productos tipo mezcla han sido propuestos como vehículos novedosos y apropiados para la inclusión de cepas probióticas por su contenido de micronutrientes esenciales, permitiendo la producción de ácido láctico y de biomasa en condiciones fermentativas (Perricone et al., 2015; Yoon et al., 2006). Los probióticos han sido definidos como “Microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped en cantidades adecuadas”(Hill et al., 2014). Adicionalmente las bebidas tipo mezcla de fruta tiene una imagen saludable y variedad en los perfiles sensoriales (Pereira, Maciel, & Rodrigues, 2011; Sheehan et al., 2007).

Tradicionalmente la inclusión de probióticos se ha realizado en alimentos lácteos, sin embargo, los cambios y preferencias de consumo han llevado a la búsqueda de nuevas matrices de inclusión y los productos vegetales son una opción saludable dirigida a

consumidores alérgicos a los productos de origen lácteo y con dietas vegetarianas (Corbo et al., 2014). Las frutas más utilizadas en las preparaciones comerciales con probióticos incluyen arándano, manzana, grosella negra, cereza, guaraná, mango, uvas, kiwis, fresas, durazno y ciruelas y las cepas más utilizadas en formulación de nuevos productos son *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* (Martins et al., 2013b). Sin embargo, la viabilidad de los probióticos en bebidas de fruta es más compleja que en los productos lácteos debido a diversos factores: la presencia de cantidades insuficientes de péptidos y aminoácidos libres necesarios para el metabolismo de cepas probióticas, así como la susceptibilidad a condiciones ácidas extremas (pH 2,5–3,6) y la presencia de colorantes, aromas y conservantes (Perricone et al., 2015; Tripathi & Giri, 2014).

En el diseño de bebidas de fruta con probióticos, la adición de prebióticos, sustancias que ejercen un efecto sinérgico al estimular selectivamente el crecimiento de estos microorganismos en el intestino humano (Perricone et al., 2015; Shori, 2016). Se han reportado como prebióticos con efecto sobre la viabilidad de microorganismos probióticos la inulina (**IN**), fructooligosacáridos (**FOS**) y galactooligosacáridos (**GOS**). Estos prebióticos se encuentran naturalmente en frutas, vegetales, leche, miel y bambú (Singh et al., 2015). Actualmente las mezclas de probióticos y prebióticos se utilizan a menudo con el fin de aprovechar sus efectos sinérgicos en alimentos funcionales, estos productos se denominan simbióticos (Al-Sheraji et al., 2013). El consumo de alimentos y bebidas que contienen prebióticos y probióticos es la tendencia actual del consumidor global (Shori, 2015). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la adición de inulina (**IN**), fructooligosacáridos (**FOS**) y galactooligosacáridos (**GOS**) en la viabilidad de una cepa probiótica de tipo comercial (*Lactobacillus casei*) en una bebida de frutos rojos (FR).

## 2.2 Materiales y métodos

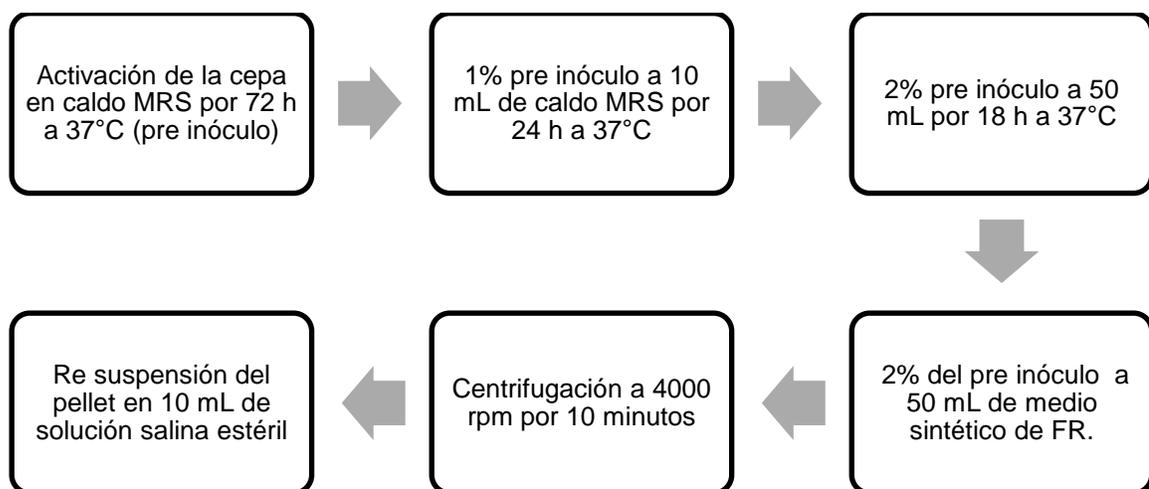
### 2.2.1 Cepa probiótica

Se utilizó un cultivo comercial probiótico liofilizado *Lactobacillus casei*. Se activó la cepa por rehidratación en 5 mL de caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS-Oxoid®) por un periodo de incubación de 72 horas a 37°C y se verificó la morfología del microorganismo mediante coloración de Gram.

## 2.2.2 Producción de inóculo en medio sintético de FR (Cinética de crecimiento)

Se determinó el tiempo que tarda el microorganismo probiótico en alcanzar la producción máxima de biomasa para establecer este punto como referencia en la producción del inóculo mediante el diseño un medio de cultivo que simuló la formulación de la bebida de frutos rojos: caldo MRS suplementado con 10% de bebida de FR, según la metodología recomendada por Perricone *et al.* 2014 (Perricone et al., 2014). En la Figura 2-1 se describe la metodología para la producción de inóculo.

**Figura 2-1** Producción de inóculo en medio sintético de Frutos rojos.



## 2.2.3 Evaluación de prebióticos en caldo MRS modificado

La evaluación de los prebióticos se realizó en MRS suplementado con 5% de sacarosa y las sustancias prebióticas: inulina (**IN**), fructooligosacáridos (**FOS**), y galactooligosacáridos (**GOS**). Estas modificaciones del caldo de cultivo se realizaron con el fin de simular las condiciones de la bebida de FR y evaluar el efecto de los prebióticos en la viabilidad de la cepa de *L. casei*. En la Tabla 2-1 se presentan los tratamientos evaluados. A cada tratamiento (20mL) se inoculó el 2% (400µL) del microorganismo en estudio. Los controles fueron caldo MRS sin adición de prebiótico y MRS suplementado con 5% de sacarosa (concentración aproximada de sacarosa en la bebida). Se determinó la biomasa a las 0, 10, 24 y 48 horas de incubación a 37°C a través de densidad óptica a 600 nm (DO). Se realizaron las mediciones por triplicado (Adebola et al., 2014).

**Tabla 2-1** Diseño experimental para la evaluación de prebióticos en caldo MRS con sacarosa y prebióticos

Tratamiento	Descripción
T1	Caldo MRS + sacarosa 5% + IN 1%
T2	Caldo MRS + sacarosa 5% + IN 5%
T3	Caldo MRS + sacarosa 5% + FOS 1%
T4	Caldo MRS + sacarosa 5% + FOS 5%
T5	Caldo MRS + sacarosa 5% + GOS 1%
T6	Caldo MRS + sacarosa 5% + GOS 5%
C1	Caldo MRS
C2	Caldo MRS + sacarosa 5%

T = tratamiento, C= controles, IN (inulina), FOS (fructooligosacáridos), GOS (galactooligosacáridos)

### 2.2.4 Formulación y elaboración de la bebida de frutos rojos (FR)

Se realizó una mezcla de fresa (*Strawberry x ananassa* L) (20%) y mora (*Rubus glaucus* Benth) (10%) y papaya (*Carica papaya*) (5%), como estabilizante de pH (5,3) y fuente de fibra (1,7 g/ 100g) (Nithya & Vasudevan, 2016). El porcentaje total de fruta en la bebida fue del 35% p/v, el pH fue de  $3,36 \pm 0,02$  y los sólidos solubles totales fueron de  $10^\circ\text{Brix} \pm 0,01$ . Estas condiciones fueron establecidas para satisfacer tanto las necesidades de sustrato y condiciones ambientales (pH superior a 3) requeridas para la viabilidad del microorganismo probiótico y lograr aceptabilidad sensorial del producto final. El producto se esterilizó ( $120^\circ\text{C}$ , 15 psi, por 15 minutos) previo a la inoculación para evitar la interacción del probiótico con la microbiota nativa de las frutas evitando posibles alteraciones en la bebida (Perricone et al., 2015; Sheehan et al., 2007). Se realizó la inoculación a una temperatura de 18 a  $20^\circ\text{C}$  en condiciones asépticas. Todos los procedimientos fueron realizados según las directrices de las Buenas Prácticas de Manufactura y Laboratorio (Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, 2013).

### 2.2.5 Análisis sensorial de bebidas de FR con prebióticos

Debido al efecto que tuvieron sobre la viabilidad de *L. casei*, se seleccionaron los tratamientos (IN 1% y FOS 1%) y se realizó una prueba de preferencia (comparación pareada) con un panel de evaluadores no entrenados (60 personas), constituido por hombres y mujeres con un rango de edad entre 19 y 60 años. Se evaluaron dos tratamientos, bebidas con IN (1%) y FOS (1%), las muestras se presentaron en un volumen de 10 mL de bebida de FR sin inocular, codificado con tres dígitos aleatorios, a una temperatura entre 7 a  $10^\circ\text{C}$ , fueron presentados a los panelistas que expresaron su preferencia (Nuñez Hinostroza & Brumovsky, 2010).

## **2.2.6 Cinética de crecimiento en bebida de frutos rojos (Viabilidad y parámetros fisicoquímicos)**

Según pruebas de viabilidad en caldo MRS modificado y preferencia sensorial se seleccionó el tratamiento con IN al 1%, posteriormente se realizó la cinética de crecimiento en la bebida de FR con adición de IN (1%) (200mL) e inoculada con el 2% (4 mL) de probiótico *L. casei* a partir del inóculo diseñado en el MRS suplementado con 10% de la bebida FR. Los tratamientos se incubaron a 37°C por 50 horas, se midió la viabilidad mediante recuento en placa en agar MRS a las 0, 10, 24 y 50 horas. Adicionalmente se determinaron los parámetros fisicoquímicos durante la cinética de crecimiento en la bebida: acidez (AOAC 942.15, expresada como porcentaje de ácido cítrico) y pH (AOAC 942.15, con un pHmetro Meprohm®). Los sólidos solubles totales (AOAC 932.12) por el método refractométrico fueron estimados como °Brix con un refractómetro marca Atago® a 20°C. Los análisis fisicoquímicos se realizaron de acuerdo al método oficial AOAC (AOAC, 2012). Los controles fueron: la bebida de frutos rojos sin inulina y la bebida sin inocular. Las mediciones se hicieron por triplicado.

## **2.2.7 Análisis estadístico**

Para la interpretación de los resultados de las pruebas de preferencia sensorial se consultó la tabla de Roessler et al, 1978 reimpressa en Stone y Sidel, 1993 (Stone & Sidel, 1993). En referencia a las pruebas de evaluación de prebióticos y la cinética de crecimiento en bebida de FR con IN 1 % se analizaron los resultados mediante la prueba de modelo lineal generalizado con el paquete estadístico de Minitab®.

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Producción de inóculo en medio sintético de FR (Cinética de crecimiento)**

La producción del inóculo fue en un medio sintético (MRS suplementado con 10% de bebida de FR), alcanzando la mayor obtención de biomasa de 9,96 Log UFC mL<sup>-1</sup> a las 24 horas de incubación a 37°C (Ver Anexo D).

### **2.3.2 Evaluación de prebióticos en caldo MRS modificado**

En la tabla 2-2 se describen los resultados del efecto de los prebióticos sobre la viabilidad de *L. casei* en caldo MRS modificado. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los

tratamientos con IN, FOS y GOS al 1 y al 5% en comparación con los controles (caldo MRS y caldo MRS con sacarosa 5%), presentando un efecto favorable sobre el crecimiento del probiótico en concentraciones bajas.

**Tabla 2-2** Efecto de prebióticos en la viabilidad de *L. casei* (absorbancia 600nm) en caldo MRS modificado con sacarosa 5%.

Tratamiento	Tiempo (h)			
	0	10	24	50
IN 1%	0,08 ±0,03 <sup>ab</sup>	0,71±0,04 <sup>ab</sup>	3,43±0,30 <sup>ab</sup>	3,99±0,36 <sup>ab</sup>
IN 5%	0,09 ±0,01 <sup>c</sup>	0,75 ±0,07 <sup>c</sup>	2,31±0,04 <sup>c</sup>	3,15±0,40 <sup>c</sup>
FOS 1%	0,06±0,03 <sup>abc</sup>	0,82±0,05 <sup>abc</sup>	2,99±0,05 <sup>abc</sup>	3,48±0,24 <sup>abc</sup>
FOS 5%	0,07±0,00 <sup>bc</sup>	0,64±0,03 <sup>bc</sup>	2,69±0,15 <sup>bc</sup>	3,34±0,34 <sup>bc</sup>
GOS 1%	0,06±0,06 <sup>abc</sup>	0,80±0,07 <sup>abc</sup>	2,42±0,18 <sup>abc</sup>	4,02±0,11 <sup>abc</sup>
GOS 5%	0,03±0,03 <sup>bc</sup>	0,65±0,10 <sup>bc</sup>	2,67±0,20 <sup>bc</sup>	3,67±0,16 <sup>bc</sup>
Caldo MRS (control)	0,08±0,07 <sup>abc</sup>	0,75±0,03 <sup>abc</sup>	3,23±0,13 <sup>abc</sup>	3,83±0,06 <sup>abc</sup>
Caldo MRS + sacarosa 5% (control)	0,04±0,01 <sup>a</sup>	0,86±0,03 <sup>a</sup>	2,94±0,08 <sup>a</sup>	4,95±0,30 <sup>a</sup>

\*Valores de absorbancia con la misma letra en los tratamientos no se diferencian significativamente entre sí, y a un nivel de significancia del 95%, según la prueba de Tuckey.  $\rho=0,05$ .  $n=3$ .

### 2.3.3 Análisis sensorial de bebidas de FR con prebióticos

En la tabla 2-3 se muestra el número de respuestas de aceptación en el juicio llevado a cabo por los panelistas. Los resultados reflejan que no existieron diferencias significativas entre las bebidas con los prebióticos ( $\rho>0,05\%$ ). Se encontraron diferencias significativas ( $\rho<0,05$ ) entre los tratamientos con IN, FOS y GOS al 1 y al 5% en comparación con los controles (caldo MRS y caldo MRS con sacarosa 5%).

**Tabla 2-3** Análisis sensorial: prueba de preferencia entre prebióticos en bebida de Frutos rojos

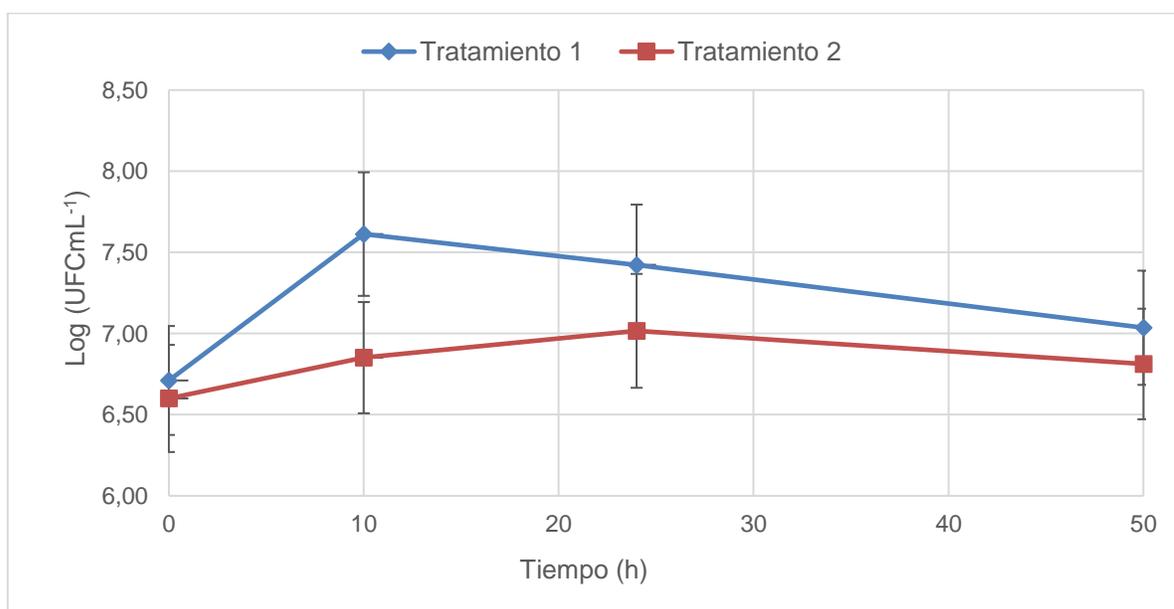
Tipo de bebida	Número de respuestas de aprobación del producto
Bebida de FR con 1% IN	33 <sup>a</sup>
Bebida de FR con 1% FOS	27 <sup>a</sup>

Número de respuestas seguidas de la misma letra en las filas no se diferencian significativamente entre sí, a un nivel de significancia del 95%, según la tabla estadística de Roessler *et al.* (1978) reimpressa en (Stone y Sidel 1993).

### 2.3.4 Cinética de crecimiento en bebida de frutos rojos (Viabilidad y parámetros fisicoquímicos)

Se seleccionó la IN 1% como prebiótico para determinar el efecto de esta sustancia en la viabilidad de *L. casei* en la bebida de FR a través de una cinética de crecimiento como se observa en la Figura 2-2. Se realizaron dos tratamientos bebida de FR con IN 1% y sin IN inoculados con *L. casei*. El análisis estadístico demostró que la adición de inulina afectó significativamente ( $p < 0,05$ ) la viabilidad de *L. casei* en la bebida de FR. Los recuentos en placa fueron 7.03 y 6.81 Log UFC mL<sup>-1</sup> en los tratamientos con IN y sin IN, respectivamente.

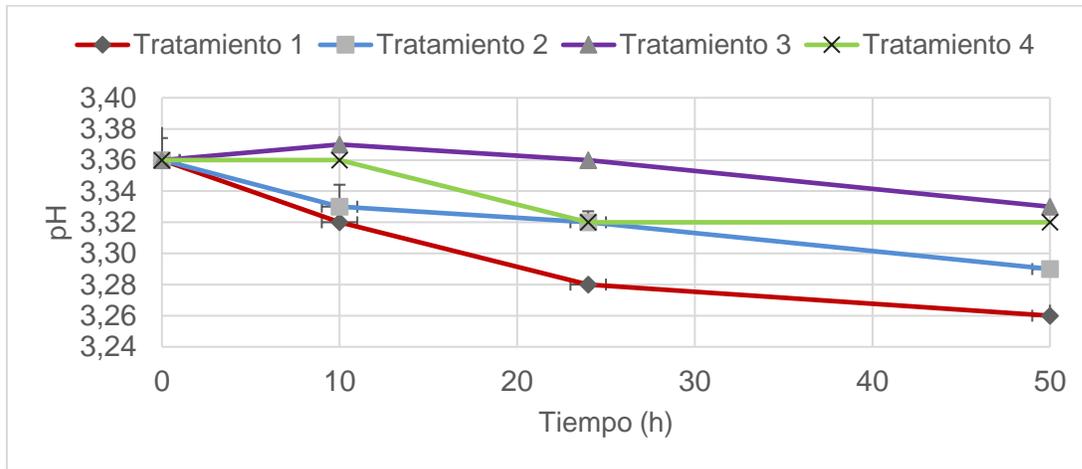
**Figura 2-2** Cinética de crecimiento de *L. casei* en bebida de Frutos rojos



**Tratamiento 1:** bebida de frutos rojos con IN 1%. **Tratamiento 2:** bebida de frutos rojos sin adición de prebiótico\* Log en base 10

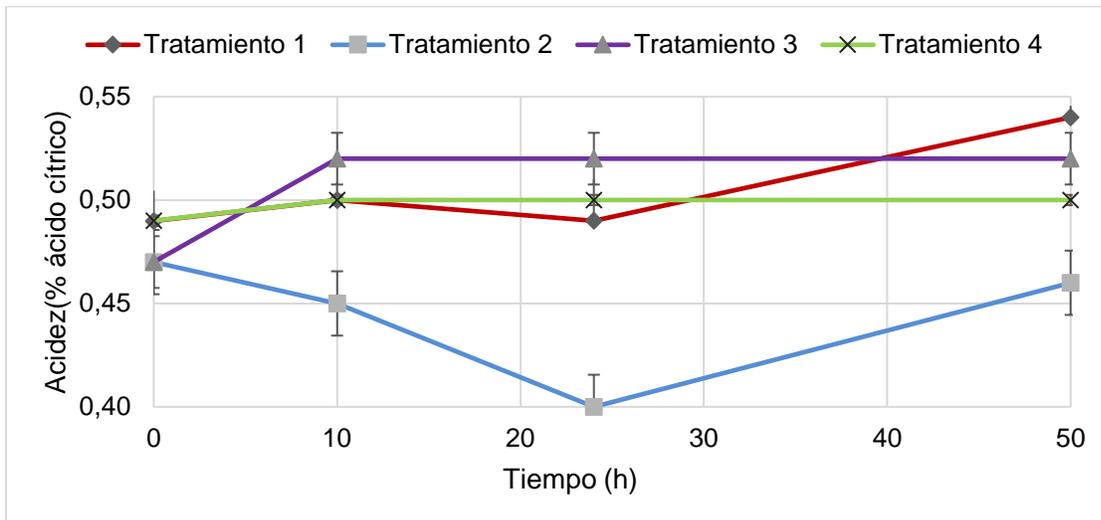
En las figuras 2-3, 2-4 y 2-5 se describen los parámetros fisicoquímicos evaluados (pH, °Brix y acidez titulable) en la cinética de crecimiento de *L. casei* en bebida de FR. Con respecto a los parámetros fisicoquímicos tanto el pH, los sólidos solubles y la acidez titulable se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos evaluados, incluyendo los controles sin inocular.

**Figura 2-3** . Efecto de IN 1% en el pH en la cinética de crecimiento de *L. casei* en bebida de Frutos rojos



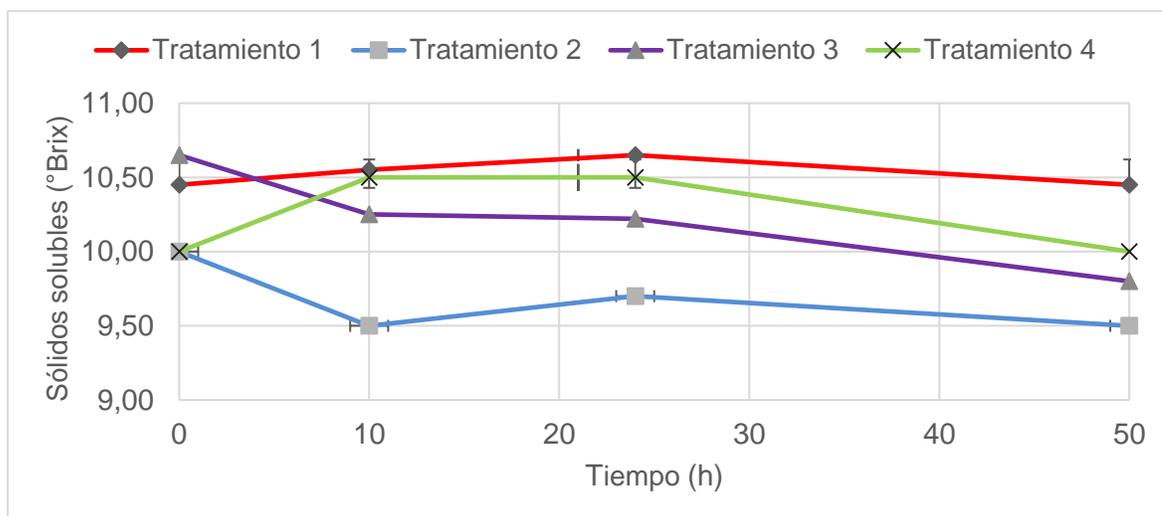
**Tratamiento 1:** bebida de frutos rojos con adición de IN 1% y con *L. casei*. **Tratamiento 2:** bebida de frutos rojos sin adición de IN 1% con *L. casei*. **Tratamiento 3:** control de bebida de frutos rojos con adición de IN 1% sin inocular. **Tratamiento 4:** bebida de frutos rojos sin adición de IN 1% y sin inóculo. La acidez esta expresada como porcentaje de ácido cítrico presente en la muestra.

**Figura 2-4** Efecto de IN 1% en acidez titulable en la cinética de crecimiento de *L. casei* en bebida de Frutos rojos



**Tratamiento 1:** bebida de frutos rojos con adición de IN 1% y con *L. casei*. **Tratamiento 2:** bebida de frutos rojos sin adición de IN 1% con *L. casei*. **Tratamiento 3:** control de bebida de frutos rojos con adición de IN 1% sin inocular. **Tratamiento 4:** bebida de frutos rojos sin adición de IN 1% y sin inóculo. La acidez esta expresada como porcentaje de ácido cítrico presente en la muestra

**Figura 2-5** Efecto de IN 1% en los sólidos solubles en la cinética de crecimiento de *L. casei* en bebida Frutos rojos.



**Tratamiento 1:** bebida de frutos rojos con adición de IN 1% y con *L. casei*. **Tratamiento 2:** bebida de frutos rojos sin adición de IN 1% con *L. casei*. **Tratamiento 3:** control de bebida de frutos rojos con adición de IN 1% sin inocular. **Tratamiento 4:** bebida de frutos rojos sin adición de IN 1% y sin inóculo

## 2.4 Discusión

En el desarrollo de alimentos con microorganismos probióticos se consideran factores como la cepa utilizada, el método de preparación del inóculo, el estado fisiológico de las células, los niveles de oxígeno y la presencia de prebióticos (Perricone et al., 2014). Estos productos deben mantener la supervivencia de los microorganismos en niveles entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> durante la vida útil del producto (Vandenplas et al., 2015). Por lo anterior, la bebida FR fue formulada considerando su efectividad como vehículo para *L. casei* manteniendo una densidad celular mínima de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> sin alterar las características fisicoquímicas del producto en condiciones de almacenamiento. Para lograr este propósito, la formulación de la bebida se estableció con un pH superior a 3.5, varios reportes confirman que valores por debajo de 4 pueden disminuir la viabilidad de los probióticos (Saarela et al., 2011), por lo tanto, fue necesario adicionar 5% de papaya a la mezcla de fresa y mora para estabilizar los valores de pH logrando valores promedio de  $3,36 \pm 0,02$  en los que se mantuvo la viabilidad. Un pH bajo puede tener un efecto antagónico contra microorganismos patógenos y alteradores. Los frutos rojos como cereza, arándano, mora y frambuesa contienen componentes con efectos antimicrobianos (Perricone et al., 2015; Sheehan et al., 2007). Otros factores que pueden influir en la viabilidad de los probióticos en este tipo de matriz es el alto contenido de fenoles

que pueden influir en la baja supervivencia, por ejemplo, se ha reportado baja viabilidad de *Lactobacillus plantarum* en jugos de limón, granada, grosella negra, arándano, pomelo y piña (Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011).

La producción de inóculo mediante la adaptación y escalamiento del probiótico a través del medio sintético fue clave para adaptar al microorganismo a la matriz como sustrato de fermentación permitiendo la estabilidad microbiológica (Pereira et al., 2011). Estas condiciones permitieron un proceso de adaptación de *L. casei*, induciendo levemente la resistencia al pH ( $3,36 \pm 0,02$ ) de la bebida de FR y obteniendo una mayor densidad celular de acuerdo con la metodología sugerida por (Perricone et al., 2014).

En la tabla 2-2 se describen los resultados del efecto de los prebióticos sobre la viabilidad de *L. casei* en caldo MRS modificado. Previamente se realizó una curva de calibración del microorganismo por 24 horas en caldo MRS donde se estableció la fase exponencial de *L. casei* a las 24 horas (Anexo E). En ensayos previos se encontró hasta las 50 horas, el microorganismo en estudio mantiene la estabilidad microbiológica requerida en un producto probiótico. El valor mayor de absorbancia a las 50 horas de incubación fue obtenido en el tratamiento con GOS al 1% (D.O  $4,02 \pm 0,11$ ), seguido por el de tratamiento con IN al 1% ( $3,99 \pm 0,36$ ) y FOS al 1% (D.O  $3,48 \pm 0,24$ ). Sin embargo, se observó una caramelización excesiva en el medio de cultivo con adición de GOS en ambas concentraciones utilizadas después de la esterilización, factor que condujo a descartar este prebiótico por su posible efecto en las cualidades sensoriales de la bebida (Braga & Conti-Silva, 2015). Se observó que en el tratamiento con IN 1% se presentó mayor crecimiento en comparación al control con MRS ( $3,83 \pm 0,06$ ) debido al efecto sinérgico del prebiótico, esto puede deberse al posible efecto sobre el crecimiento de *L. casei*. Se ha reportado que la IN tiene efectos prebióticos más pronunciados que la oligofructosa en condiciones fermentativas en simuladores del ecosistema microbiano intestinal humano (Karimi et al., 2015).

Considerando estos resultados, se realizó un análisis sensorial mediante una prueba de preferencia entre una bebida de FR con IN al 1 % y FOS 1%. En la tabla 2-3 se muestra el número de respuestas de aceptación en el juicio llevado a cabo por los panelistas. Los resultados reflejan que no existieron diferencias significativas entre las bebidas con los prebióticos ( $p > 0,05\%$ ). El número de respuestas similares en la prueba indica que no existe un efecto sensorial tácito sobre la preferencia de las bebidas respecto al tipo del prebiótico,

sin embargo, como se observa el mayor número de respuestas fue para la bebida con inclusión de IN 1%. Otros autores han reportado resultados similares en los que no se evidenciaron diferencias en la preferencia entre bebidas con prebióticos y sus contrapartes tradicionales. En un estudio se evaluó el efecto sensorial de prebióticos y sustituyentes de azúcar en néctares de papaya adicionando oligofruktosa e inulina, se encontró que la preferencia fue similar respecto a néctares con azúcar (Braga & Conti-Silva, 2015). Adicionalmente en procesos de optimización para la formulación de jugos de fresa con probióticos se ha demostrado que la adición de inulina y oligofruktosa al producto no tiene implicaciones negativas sobre la calidad sensorial (Cassani, Tomadoni, Moreira, Ponce, & Agüero, 2017).

Dados los resultados respecto a la viabilidad del probiótico en el caldo MRS modificado y considerando que el tipo de prebiótico no altera la respuesta sensorial se seleccionó la IN 1% como prebiótico para determinar el efecto de esta sustancia en la viabilidad de *L. casei* en la bebida de FR, en una cinética de crecimiento como se observa en la Figura 2-2. Se realizaron dos tratamientos bebida de FR con IN 1% y sin IN inoculados con *L. casei*. El análisis estadístico demostró que la adición de inulina afectó significativamente ( $p < 0,05$ ) la viabilidad y las propiedades fisicoquímicas de la bebida FR. Los recuentos en placa fueron 7.03 y 6.81 Log UFC mL<sup>-1</sup> en los tratamientos con IN y sin IN, respectivamente. Lo anterior sugiere que la adición de IN 1% puede mejorar la viabilidad del microorganismo probiótico. Se debe considerar el efecto de la matriz: bebida de FR en comparación con el medio sintético con relación al comportamiento de *L. casei* en su crecimiento bajo condiciones de incubación a 37°C.

En algunos estudios en jugos con frutos rojos como arándanos, grosella negra y mora reportaron una drástica disminución en la viabilidad debido a la presencia de ciertos ácidos orgánicos (ácido benzoico) de las frutas que pueden tener efectos tóxicos a los microorganismos y afectar considerablemente la viabilidad del cultivo probiótico durante el procesamiento y en la futura vida útil (Sheehan et al., 2007). Se ha encontrado que el jugo de arándano ejerce un efecto inhibitorio mayor para *Lactobacillus paracasei* ssp. *NFBC 43338*. *L. casei* 431R que el jugo de piña, al mismo pH, probablemente debido al alto contenido de ácido benzoico (34 mg/L) que contiene el jugo de arándano (Sheehan et al., 2007) Por lo anterior, autores como Perricone et al. 2015 recomiendan estrategias

de adaptación de las cepas, e igualmente el uso de prebióticos las cuales fueron utilizadas en este estudio.

Adicionalmente se ha evidenciado un efecto sobre la estabilidad de *L. casei* en la fase inicial de crecimiento en yogurt con adición de inulina a bajas concentraciones (1-2%) demostrando que este prebiótico puede estimular el crecimiento de *L. casei* en condiciones de refrigeración. La estimulación del metabolismo de las bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus*) por la inulina puede ser debido a la hidrólisis parcial y posterior metabolización de la fructosa como fuente adicional de carbono y de energía (De Souza Oliveira, Perego, de Oliveira, & Converti, 2012; Donkor, Nilmini, Stolic, Vasiljevic, & Shah, 2007).

La adaptación de las cepas a través de suplementación con la bebida de FR (10%) ha demostrado su eficacia en otros trabajos donde se evaluó la viabilidad de *L. reuteri* en jugos de fruta sugiriendo que la viabilidad de la bacteria puede ser fuertemente afectada por el tipo de jugo, sobreviviendo en jugos de piña, naranja y de manzana mientras que con frutos rojos se observa una fuerte reducción. En esta investigación se superó esta condición por medio de la adaptación de la cepa (suplementación con 10% de la bebida en MRS) obteniendo un aumento significativo del primer tiempo de reducción a 9,28 - 11,20 días (Perricone et al., 2014).

En el desarrollo de smoothies funcionales con frutos rojos fermentados (sin prebióticos) con bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sp.* and *Lactobacillus pentosus*) aislados de frutas (mora, ciruelas y pasas) se encontró que a pesar del ambiente hostil (pH aproximado de 3,51 y alto contenido de polifenoles) permanecieron viables los probióticos a una densidad celular de 9,0 Log UFC g<sup>-1</sup> del producto por un periodo de 30 días de almacenamiento a 4°C (Di Cagno et al., 2011).

El efecto positivo de la IN1% ha sido reportado también en la viabilidad de una cepa de *L. plantarum* (LP) CECT 220 en jugos de zanahoria y naranja presentando 9,2 Log UFC/mL en jugos con IN 1% y 5,8 Log UFC/mL en los jugos sin adición de prebiótico, manteniendo la concentración de monosacáridos más alta con respecto al jugo sin inulina (40% inferior) (Valero-Cases & Frutos, 2017b).

Adicionalmente el uso de prebióticos ha sido estudiado en otros productos como

laminados de mora impregnados con probióticos (*L. casei*) y prebióticos (IN/FOS) estudio en el que se observó un efecto favorable de la presencia de prebióticos sobre la viabilidad del microorganismo al permitir la supervivencia por más de 40 días de almacenamiento, con recuentos superiores a  $10^6$  UCF/g mientras en las muestras sin prebiótico fue inferior ( $10^4$  UCF/g) luego de 25 días (Rodríguez-Barona et al., 2015).

Con respecto a los parámetros fisicoquímicos tanto el pH, los sólidos solubles y la acidez titulable se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos evaluados, incluyendo los controles sin inocular. Cabe señalar que el pH en la formulación de la bebida fue ajustado a valores superiores a 3,5 que en ensayos anteriores y estudios previos demostró ser un rango que permite el crecimiento y la estabilidad de cepas con potencial probiótico, sin embargo, debido a las condiciones fermentativas de incubación se determinó una baja de pH de  $3,36 \pm 0,02$  a  $3,26 \pm 0,01$  tanto para el tratamiento con IN1% como sin prebiótico (Figura 2-3) debido posiblemente a la rápida transformación de los monosacáridos y la conversión del ácido málico en ácido láctico a través de la vía fermentativa (Valero & Frutos, 2017 a) . En consecuencia, la producción de ácido láctico a partir del metabolismo de estos sustratos resultó en una disminución del pH de los valores iniciales. Se ha reportado que el cultivo de bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus*) se caracteriza por una producción ácida que baja el pH y aumenta la acidez del medio creando un ambiente desfavorable para patógenos y microorganismos alteradores (Pereira et al., 2011). La acidez, aunque mostró diferencias significativas entre los tratamientos con y sin IN no presentó variaciones importantes en el tiempo de fermentación respecto a los controles sin inocular (Figura 2-4) con excepción del tratamiento 2 en la hora 24 aproximadamente que presentó una variación significativa debido posiblemente a la producción de los ácidos orgánicos presentes en la bebida (Meret et al., 2011).

En la Figura 2-5 se observa el efecto de la IN 1% sobre los sólidos solubles totales en las bebidas de FR ( $p < 0,05$ ) encontrando un aumento en el contenido de sólidos solubles (°Brix) en las bebidas con FR con IN (tratamientos 1 y 3) respecto a las que no contenían el prebiótico (tratamientos 2 y 4) independiente del crecimiento de *L. casei*. Resultados similares se han observado en la formulación y caracterización de néctares de papaya con inulina (Orafti®P95) otorgando una mayor aceptación sensorial (Braga & Conti-Silva,

2015). Estos resultados indican que posiblemente las principales fuentes de carbono y energía para *L. casei* fueron glucosa y fructosa, mientras que la inulina es fermentado más lentamente (Valero-Cases & Frutos, 2017a, 2017b), sin embargo se deben realizar análisis cromatográfico de azúcares y ácidos orgánicos para corroborar estos resultados sobre todo en condiciones de almacenamiento.

La adición de prebióticos es beneficiosa en bebidas de FR con un rango de pH bajo y presencia de ácidos orgánicos y componentes fenólicos como es el caso de una mezcla de fresa y mora. Cabe señalar que la selección de la inulina como sustancia prebiótica en la bebida de FR puede tener beneficios al momento de realizar el escalamiento industrial del producto, se ha demostrado mayor estabilidad química de este prebiótico frente a tratamientos térmicos altos y en condiciones de pH bajo (Huebner et al., 2008) como las presentadas en la bebida de FR de esta investigación.

En este estudio, se observó que la selección de un prebiótico para ser adicionado en un producto con funcionalidades probióticas (bebida de FR) requiere la evaluación de varios factores como: tipo de cepa con potencial probiótico, condiciones de crecimiento y adaptación, producción de inóculo, clase de sustancia prebiótica, características fisicoquímicas de la matriz alimentaria, condiciones de diseño, formulación y desarrollo de producto y el efecto sensorial.

## 2.5 Conclusiones

La formulación de la bebida de FR con una concentración de 30%p/v de fruta (mora y fresa) y la adición de la papaya (5%) favorecen las condiciones de sustrato para el microorganismo probiótico en estudio y ofrecen al producto unas condiciones sensoriales aceptadas por los consumidores.

Las estrategias de adaptación de la cepa (*L. casei*) por medio de la suplementación con la bebida de FR (10%) para la producción de inóculo fue positiva en la estabilidad del microorganismo.

Se determinó que la adición con 1% de inulina en una bebida de FR afecta significativamente ( $p < 0,05$ ) la viabilidad y los parámetros fisicoquímicos de *L. casei* en las bebidas de frutos rojos bajo condiciones fermentativas.

## 2.6 Bibliografía

Adebola, O. O., Corcoran, O., & Morgan, W. a. (2014). Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *Journal of Functional Foods*, 10, 75–84.

Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542–1553.

AOAC. (2002). *AOAC Official Methods of Analysis*. (K. Helrich, Ed.) (17th ed.).

Braga, H. F., & Conti-Silva, A. C. (2015). Papaya nectar formulated with prebiotics: Chemical characterization and sensory acceptability. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 854–860.

Cassani, L., Tomadoni, B., Moreira, M. R., Ponce, A., & Agüero, M. V. (2017). Optimization of inulin: Oligofructose proportion and non-thermal processing to enhance microbiological and sensory properties of fiber-enriched strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 446–455.

Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192–1206.

Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., De Jesus, A. L. T., & Rodrigues, S. (2013). Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimization and product stability. *Food Chemistry*, 139(1–4), 261–266.

De Souza Oliveira, R. P., Perego, P., de Oliveira, M. N., & Converti, A. (2012). Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 358–363.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28(5), 1062–71.

Donkor, O. N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17(6), 657–665.

Guarner, F., Khan, et al. (2012). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(6), 36.

Huang, Y., Rasco, B. A., & Cavinato, A. G. (2009). *Fruit Juices. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control* (1st ed., Vol 1). Elsevier Inc.

Huebner, J., Wehling, R. L., Parkhurst, A., & Hutkins, R. W. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 18(3), 287–293.

Karimi, R., Azizi, M. H., Ghasemlou, M., & Vaziri, M. (2015). Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119, 85–100.

Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., de Oliveira Pinto, C. L., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764–770.

Meret, M., Brat, P., Mertz, C., Lebrun, M., & Günata, Z. (2011). Contribution to aroma potential of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.). *Food Research International*, 44(1), 54–60.

Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Resolución 3929 de 2013 (2013). Colombia.

Mintel. Data -base. Agencia de mercadeo inteligente. (2016). “Non-Alcoholic Drink Market Research.”

Nualkaekul, S., & Charalampopoulos, D. (2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 111–117.

Nithya, S., & Vasudevan, A. (2016). Effect of lactic acid bacteria in development of papaya juice using response Surface methodology. *International Journal of*

Biotechnology and Biochemistry, 12(1), 27-32

Nuñez Hinojosa, R., & Brumovsky, L. A. (2010). Evaluación sensorial de jugos de uva turbios y límpidos. *Rev. Cienc. Tecnol.*, 13.

Pereira A, Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44(5), 1276–1283.

Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). Challenges to produce Probiotic Fruit Juices. *Beverages*, 1, 95–103.

Perricone, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Speranza, B., & Bevilacqua, A. (2014). Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. *Journal of Functional Foods*, 10, 421–426.

Rodríguez-Barona, S., Giraldo, G. I., & Zuluaga, Y. P. (2015). Evaluación de la incorporación de fibra prebiótica sobre la viabilidad de *Lactobacillus casei* impregnado en matrices de mora (*Rubus glaucus*). *Información Tecnológica*, 26(5), 25–34.

Romero J, C. a, & Yépez V, B. D. (2015). Ultrasound as pretreatment to convective drying of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth). *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 205–10.

Saarela, M., Alakomi, H. L., Mättö, J., Ahonen, a M., Puhakka, A., & Tynkkynen, S. (2011). Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 106–110.

Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 279–284.

Shimizu, M. (2014). History and Status of Functional Food Regulations in Japan. *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World: Second Edition (Second Edn)*. Elsevier Inc.

Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1–8.

Singh, R. D., Banerjee, J., & Arora, A. (2015). Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 19–30.

Stone, H., & Sidel, J. (1993). *Sensory Evaluation Practices*. San Diego: Academic Press, Inc.

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.

Tymczyszyn, E., Gerbino, E., Illanes, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Cryobiology*, 62(2), 123–129.

Valero-Cases, E., & Frutos, M. J. (2017). Effect of Inulin on the Viability of *L. plantarum* during Storage and *in Vitro* Digestion and on Composition Parameters of Vegetable Fermented Juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1–7. -x

Vandenplas, Y., Huys, G., & Daube, G. (2015). Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria*, 91(1), 6–21.

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, 6(100), 205–214.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 73–75.

## Anexo

Este artículo fue sometido a la revista Journal of Food Science and Technology (JFST) by the Association of Food Scientists and Technologists of India (AFSTI), fue realizado acorde a las normas de la revista (en link se encuentra la página web con las instrucciones: <http://www.springer.com/food+science/journal/13197> ). A continuación, se encuentra la comunicación electrónica donde se expresa por el comité Editor el sometimiento del artículo:

Journal of Food Science and Technology - Submission Notification to co-author Recibidos x  

---

 **Journal of Food Science and Technology** <em@editorialmanager.com> 5 oct. (hace 5 días) ★  

para mí 

---

 inglés  >  español  Traducir mensaje Desactivar para: inglés x

---

Re: "Effect of including prebiotics on the viability of a commercial probiotic (*Lactobacillus casei*) in a red fruit beverage"  
Full author list: Amanda Consuelo Díaz-Moreno, Ph.D.; Camila Andrea Bernal - Castro, Industrial Microbiology; Carolina Gutiérrez - Cortés, Microbiology

Dear Msc Camila Bernal - Castro,

We have received the submission entitled: "Effect of including prebiotics on the viability of a commercial probiotic (*Lactobacillus casei*) in a red fruit beverage" for possible publication in **Journal of Food Science and Technology**, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the **journal** by Dr. Prof. Amanda Consuelo Díaz-Moreno who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office



# Capítulo 3. Selección de una cepa probiótica comercial para la inclusión en una bebida de frutos rojos y determinación de la viabilidad y los parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento

Selection of a commercial probiotic for inclusion in a red fruit beverage and determination of viability and physicochemical parameters during storage

## Resumen

Actualmente en la industria de bebidas de fruta existe una tendencia en la adición de probióticos y prebióticos para el desarrollo de productos funcionales orientados a la salud gastrointestinal. En este estudio se utilizaron las cepas comerciales de cultivos probióticos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Lactobacillus paracasei* identificados molecularmente mediante la región ribosomal 16S por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se evaluó la capacidad probiótica *in vitro* con las pruebas de tolerancia a las sales biliares (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0%) y a pH ácido (2,0; 2,5 y 3,0), resistencia a antibióticos, evaluación de la actividad antimicrobiana frente a microorganismo Gram negativos y Gram positivos y adherencia intestinal mediante láminas con tejido de mucina humana. En los resultados ninguna cepa presentó actividad antimicrobiana. *L. casei* presentó resistencia a antibióticos. Se encontró que *L. casei* difiere en la resistencia a pH y sales biliares respecto a las otras cepas razón por la cual se seleccionó como cepa de trabajo. Se inoculó el 2% de *L. casei* en una bebida tipo mezcla de frutos rojos (FR) con un pH 3,6; 10°Brix y 30%p/v de fruta (fresa 20%, mora 10%), como estabilizante de pH se adicionó 5%p/v de papaya. Durante el almacenamiento del producto por 21 días a 4°C se encontró que la inulina 1% ( $p < 0.05$ ) afectó significativamente la viabilidad del probiótico en la bebida de FR. Los parámetros fisicoquímicos de la acidez y el pH no cambiaron significativamente en el almacenamiento. Se encontró cambios en la concentración de los azúcares evaluados y no se evidenció producción de ácido láctico mediante análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Adicionalmente los probióticos y el prebiótico ejercieron cambios en la diferencia total de color ( $\Delta E$ ) en comparación con el producto fresco. La calidad

microbiológica la bebida cumplió con los parámetros de calidad según la Resolución 3929 de 2013. *L. casei* se adaptó a la bebida de FR mejorando su capacidad de tolerar la acidez y manteniendo la tolerancia a las sales biliares. La viabilidad recomendada del probiótico fue hasta el día 12 de almacenamiento.

**Palabras claves:** capacidad probiótica *in vitro*, frutos rojos, inulina, bebidas, *Lactobacillus*

## Abstract

Currently in the fruit drinks industry there is a tendency in the addition of probiotics and prebiotics for the development of functional products oriented to gastrointestinal health. In this study, commercial strains of probiotic cultures were used: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus HN001* and *Lactobacillus paracasei* molecularly identified by the 16S ribosomal region by the polymerase chain reaction (PCR) technique. *In vitro* probiotic capacity was evaluated with bile salt tolerance tests (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%) and acid pH (2.0, 2.5 and 3.0), resistance to antibiotics, evaluation of the antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive microorganisms and intestinal adhesion by slides with human mucin tissue. In the results, no strain showed antimicrobial activity. *L. casei* showed resistance to antibiotics. It was found that *L. casei* differed in the resistance to pH and bile salts with respect to the other strains, which is why it was selected as a working strain. 2% of *L. casei* was inoculated in a red fruit (FR) type drink with a pH of 3.6, 10° Brix and 30% p / v of fruit (strawberry 20%, blackberry 10%), as a stabilizer of pH was added 5% w / v of papaya. During storage of the product for 21 days at 4 ° C it was found that 1% inulin ( $p < 0.05$ ) significantly affected the viability of the probiotic in the FR drink. The physicochemical parameters of acidity and pH did not change significantly in storage. Changes were found in the concentration of the evaluated sugars and no production of lactic acid was evidenced by high efficiency liquid chromatography (HPLC) analysis. Additionally, the probiotics and the prebiotic exerted changes in the total color difference ( $\Delta E$ ) in comparison with the fresh product. The microbiological quality of the beverage complied with the quality parameters according to Resolution 3929 of 2013. *L. casei* adapted to the FR drink, improving its ability to tolerate acidity and maintaining tolerance to bile salts. The recommended viability of the probiotic was until day 12 of storage.

**Key words:** Probiotic capacity *in vitro*, red fruits, inulin, beverages, *Lactobacillus*.

### 3.1 Introducción

En los alimentos funcionales se encuentran los productos orientados a la salud gastrointestinal, dentro de esta categoría están los probióticos, prebióticos y simbióticos (Annunziata & Vecchio, 2013). Los probióticos han sido definidos como "Microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando se los administra en cantidades adecuadas" (Hill et al., 2014). En las últimas décadas, las bacterias ácido-lácticas (especies del género *Lactobacillus*) son más comúnmente estudiadas como microorganismos probióticos. Estas bacterias hacen parte de la microbiota comensal del tracto gastrointestinal humano (TGI), considerándose como bacterias "seguras" (Angmo, Kumari, Savitri, & Bhalla, 2016).

Aunque las leches fermentadas con probióticos son los productos más populares en el mercado, es necesario proponer alternativas factibles como matrices alimentarias sin contenido lácteo (frutas y vegetales), para compensar las necesidades de aquellas personas que padecen intolerancia a la lactosa o hipercolesterolemia igualmente para satisfacer la demanda de la población vegetariana (Corbo et al., 2014). Por esta razón, existe un aumento de la demanda de productos probióticos alimentos a base de frutas y vegetales, como las bebidas funcionales, representando un potencial vehículo de inclusión y fuente de probióticos (Rai & Bai, 2015).

El uso de bebidas de fruta como vehículo de inclusión de probiótico ha aumentado últimamente (Lewandowski, 2015; Shori, 2016), a pesar que añadir probióticos a bebidas de frutas es más complejo que la formulación en productos lácteos. Las bacterias necesitan protección de las condiciones ácidas en las bebidas de fruta. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunas cepas son capaces de crecer y sobrevivir a en bebidas de fruta (con un densidad celular mínima de  $1 \times 10^7$  UFC/mL) (Lewandowski, 2015; Rai & Bai, 2015).

La viabilidad microbiana es fuertemente dependiente de la matriz, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento. Así, una cepa podría ser adecuada para algunas bebidas de frutas e inviable para otras (Lewandowski, 2015). El desarrollo de un producto en particular debe ser ampliamente estudiado en términos de evaluación de capacidad probiótica, tecnológica y sensorial. Así el diseño y formulación de bebidas de frutas y la

cepa correcta es la clave para la aceptación del producto (Lewandowski, 2015). Sin embargo, se ha indicado que la supervivencia de las bacterias probióticas en diferentes alimentos durante el almacenamiento y durante el tránsito en el tracto gastrointestinal a menudo es baja (Fijalkowski, Peitler, Rakoczy, & Zywicka, 2016).

La composición de las bebidas de frutas con probióticos puede plantear desafíos específicos a la supervivencia de los microorganismos (pH, impacto sensorial, presencia de ácidos orgánicos y compuestos con características antioxidantes) (Pimentel, Madrona, Garcia, et al., 2015). Para superar estos retos tecnológicos la selección y protección de la cepa desempeñan un papel integral en la formulación de un producto estable (Shahidi & Alasalvar, 2016). Una forma de lograr la protección de las células viables ha sido la adición de prebióticos, donde estos ingredientes (generalmente oligosacáridos) pueden proteger las células probióticas en el producto (Tymczyszyn et al., 2011). Además de ser moléculas protectoras, los prebióticos se consideran una reserva energética para las bacterias a medida que recorren el tracto gastrointestinal permitiendo la colonización de los microorganismos probióticos (Shahidi & Alasalvar, 2016). Factores como la composición y el tipo de enlaces glucosídicos en la cadena de carbohidratos son los factores claves en la adición de prebióticos en bebidas de fruta (Lewandowski, 2015). En el diseño de bebidas de frutas con adición de microorganismos probióticos se puede considerar el uso de ingredientes prebióticos como la inulina que generan un efecto protector, al mejorar la supervivencia y la actividad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento del producto final, así como durante el paso a través del tracto gastrointestinal (Bedani, Vieira, Rossi, & Saad, 2014).

Los prebióticos han sido definidos recientemente por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos como "Un ingrediente fermentado selectivamente que da lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, lo que confiere beneficios sobre la salud del huésped (Shahidi & Alasalvar, 2016).

Los fructanos de tipo inulina son los oligosacáridos mejor documentados por su efecto sobre las bacterias probióticas en el intestino al ser importantes sustratos prebióticos (Ross & Preedy, 2016). La inulina es un carbohidrato compuesto por unidades de fructosa (2-60 unidades) unidos a través de enlaces  $\beta$  (1-2) con un extremo terminal de

glucosa. Durante la fermentación anaeróbica por microbiota intestinal, la inulina produce ácidos grasos de cadena corta al tiempo que aumenta la densidad bacteriana (Karimi et al., 2015). El uso de la inulina mejora los efectos fermentativos metabolizándose selectivamente en diferentes secciones del intestino grueso (Guarner et al., 2012; Karimi et al., 2015). Por tal motivo la inulina es un ingrediente funcional interesante que se utiliza cada vez más para formular nuevos productos con declaraciones de salud como “enriquecidos con fibra” o “con beneficio prebiótico”(Ross & Preedy, 2016).

La selección de las cepas probióticas apropiadas en la dosis adecuada (Tripathi & Giri, 2014) es clave en el diseño de una bebida funcional con Probióticos. De hecho, estos productos deben contener altas dosis de microorganismos viables a lo largo de la vida útil del producto (Rai & Bai, 2015) con fin de cumplir las diferentes funcionalidades en el huésped. La viabilidad durante las operaciones de procesamiento, almacenamiento y supervivencia durante el tracto intestinal, son los criterios principales para la selección de cepas adecuadas con capacidad probiótica (Tripathi & Giri, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido unos requerimientos mínimos para garantizar las propiedades probióticas de una cepa: la identidad de la cepa (género, especie), ensayos *in vitro* de resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas y evaluación de la seguridad:(resistencia a antibióticos y búsqueda de genes de patogenicidad) (Guarner et al., 2012; Hill et al., 2014; Vandenplas et al., 2015).

Las resistencias a las condiciones gastrointestinales (pH ácido y presencia de sales biliares) simulados en ensayos *in vitro* se sugieren frecuentemente para la evaluación del potencial probiótico de las cepas (Bedani et al., 2014; Champagne & Gardner, 2008; Reale et al., 2014; Todorov, Botes, Danova, & Dicks, 2007).Comprobar la tolerancia a las condiciones gastrointestinales de microorganismos probióticos en el producto final puede ayudar a seleccionar una matriz alimentaria adecuada y contribuir a la supervivencia y eficacia del probiótico en el tracto gastrointestinal (Bedani et al., 2014), varios autores han reportado que el tipo de matriz alimentaria y las condiciones de almacenamiento afectan la supervivencia de los microorganismos probióticos al medio gástrico (Adebola et al., 2014; Champagne & Gardner, 2008; Saarela, Virkajärvi, Alakomi, Sigvart-Mattila, &

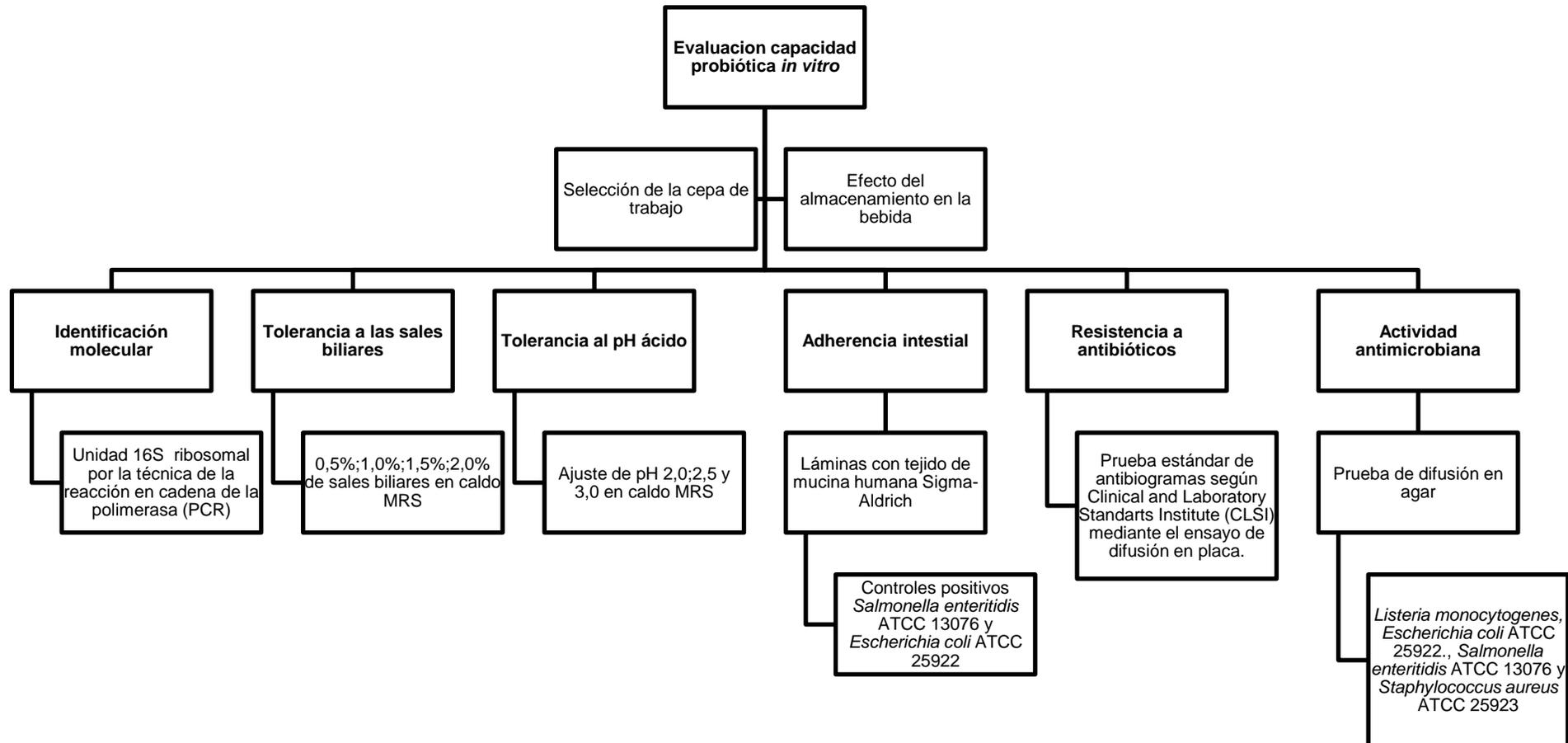
Mättö, 2006).El objetivo de este estudio fue seleccionar una cepa probiótica comercial para la inclusión en una bebida de frutos rojos (FR) determinando la .viabilidad y los parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento.

## 3.2 Materiales y métodos

### Capacidad probiótica *in vitro* de cepas comerciales probióticas

Se evaluó la capacidad probiótica *in vitro* mediante una serie de ensayos a cepas probióticas de tipo comercial con el objetivo de seleccionar el microorganismo a inocular en una bebida en condiciones de almacenamiento (4°C por tres semanas o 21 días). El tiempo de almacenamiento fue determinado por medio de ensayos preliminares en refrigeración (4°) y según recomendaciones de Shori, 2016 y Pereira *et al.* 2011. Posterior al almacenamiento de la bebida inoculada con *Lactobacillus casei* se recuperó por cultivo la cepa probiótica y se realizaron de nuevo estas pruebas para verificar el efecto del almacenamiento y la matriz alimentaria, sobre la capacidad probiótica *in vitro* del microorganismo de trabajo. A continuación, se describen las pruebas de capacidad probiótica *in vitro* (Figura 3-1)

Figura 3-1 Evaluación de la capacidad probiótica *in vitro* de cultivos comerciales



### 3.2.1 Cepas Comerciales

Se utilizaron cultivos comerciales probióticos liofilizados *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* (HN001) y *Lactobacillus paracasei*. Se reactivaron las cepas por rehidratación en 5 mL de caldo Man, Ragosa y Sharpe (MRS-Merck®) por un periodo de incubación de 72 horas a 37°C. Se verificó la morfología mediante cultivo y coloración de Gram.

### 3.2.2 Identificación molecular de las cepas

Se realizó una identificación molecular de las tres cepas utilizadas en este estudio. Primero se aisló cada cepa en agar MRS, posteriormente se extrajo el ADN y se amplificó la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mori et al., 1997; Savo Sardaro et al., 2016) empleando los primers 27F, 518F, 800R, y 1492R. Se verificó mediante electroforesis la amplificación de los fragmentos y se enviaron a MacroGen Inc® (Corea) para ser secuenciados. El ensamblaje se efectuó por comparación contra las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information- RefSeq), Greengenes (Laurence Berkeley National Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project).

### 3.2.3 Tolerancia a las sales biliares

La capacidad de las cepas para crecer en presencia de bilis (p/v) se determinó según el método adaptado de García-Ruiz *et al.* 2014 (García-Ruiz et al., 2014) con modificaciones. Cada cepa evaluada fue activada por 48 horas. El inóculo se ajustó con el tubo No 5 de la escala de McFarland ( $3.0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) y se sembró 100 µL de cada cepa en 5 mL de caldo MRS suplementado con 0,5%, 1%, 1,5% y 2 % de bilis (p/v) (Sigma Aldrich) respectivamente por un periodo de incubación de 6 horas según Hellstrom *et al.*, 2006 (Hellström., Grybäck, & Jacobsson, 2006) que es el tiempo promedio que tarda el alimento en el estómago (4 horas). Sin embargo, se buscó evaluar las condiciones extremas hasta un periodo de seis horas. Posteriormente los cultivos fueron transferidos (100µL) en caldo MRS. Se incubó a 37°C por 24 horas tiempo en el cual se determinó la supervivencia mediante la observación de turbidez en el caldo comprando con un cultivo de control (caldo MRS sin sales biliares). Los ensayos se realizaron por triplicado. Esta prueba se realizó a la bebida después del almacenamiento.

### 3.2.4 Tolerancia a pH ácido

Se determinó según el método adaptado García-Ruiz *et al.* 2014 (García-Ruiz *et al.*, 2014) con modificaciones. Cada cepa evaluada fue activada por 48 horas, el inóculo se ajustó con el tubo No 5 de la escala de McFarland ( $3.0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) y se sembró 100 µL de cada cepa en 5 mL de caldo MRS ajustado con ácido clorhídrico 1N a pH 2; 2,5 y 3,0 por un periodo de incubación de 6 horas, según Hellström. *et al.*, 2006 (Hellström. *et al.*, 2006) Posteriormente se transfirió (100µL) del cultivo en caldo MRS sin ajuste de pH. Se incubó a 37°C por 24 horas tiempo en el cual se determinó la supervivencia mediante la observación de turbidez en el caldo comprando con un caldo control (pH 6,5). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los ensayos se realizaron por triplicado. Esta prueba se realizó a la bebida después del almacenamiento.

### 3.2.5 Adherencia intestinal

Para medir la adhesión de los cultivos comerciales a las células de la mucosa intestinal de forma cualitativa, se siguió la metodología de Serna, 2012 (Serna, 2012) donde se utilizaron láminas con tejido de mucina humana Sigma-Aldrich (Mucin Tissue – Trol TM, AR-Med LTD-Runnymed Malthouse- TW20 9BD U.K). Las láminas fueron des-parafinadas antes de realizar la inoculación con los microorganismos evaluados y de control. Las bacterias empleadas como controles positivos de adhesión fueron *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Escherichia coli* ATCC 25922 aisladas de muestras clínicas. La metodología se describe a continuación:

- **Activación de cepas:** la activación de *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Escherichia coli* ATCC 25922 se realizó en caldo Infusión cerebro corazón (BHI), tomando una perla del criovial de almacenamiento y sembrándola en 5,0mL del caldo. El cultivo se incubó a 37°C por 24 horas. Las cepas se subcultivaron en caldo BHI hasta concentraciones celulares  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a las 24 horas. Para los cultivos en estudio, se realizó el mismo procedimiento anterior, pero en caldo MRS.
- **Obtención y purificación de células:** la obtención y purificación de las células bacterianas se llevó a cabo por centrifugación a 9000,0g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se extrajo el sobrenadante generado, y al pellet recuperado se le adicionó 1,0 mL de solución salina estéril (0.85%) para diluir la muestra.
- **Adhesión a células de mucosa intestinal:** la adhesión a las células de la mucosa

intestinal se evaluó transfiriendo 80,0µL de la muestra de las células bacterianas sobre la lámina con mucina (Sigma-Aldrich). Las láminas inoculadas se dejaron a 37°C por 30 minutos para perder humedad y luego se incubaron en cámara húmeda por 24 horas a 37°C. Después de la incubación las láminas se lavaron con solución salina estéril 0.85%, para retirar las bacterias que no se unieron a las células de la mucosa de la lámina. Luego se colorearon por medio de la tinción de Giemsa (Cramer, Rogers, Parker, & Lukes, 1973) y se lavaron nuevamente con solución salina. Finalmente, las láminas se observaron en el microscopio para analizar si las células bacterianas se adhirieron a la mucina en la región de las criptas del intestino. Este procedimiento se efectuó para las bacterias control (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) y para los cultivos probióticos antes y después de adaptarse a la bebida. Como controles negativos se utilizaron las láminas (Sigma-Aldrich) teñidas con la tinción, pero sin adición de células bacterianas. Los resultados se analizaron mediante comparación de las microfotografías (400x y 100x).

### 3.2.6 Resistencia a antibióticos

La susceptibilidad a varios antibióticos se determinó usando discos comerciales de Ampicilina(AMP), Gentamicina(GN), Tetraciclina(TE), Florfenicol(FFC), Sulfatrimetropin(SXT) y Ceftiofur(EFT) a las concentraciones recomendadas por la prueba estándar de antibiogramas por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mediante el ensayo de difusión en placa(Hummel, Hertel, Holzappel, & Franz, 2007). Las colonias bacterianas recién crecidas ( $3.0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) se sembraron en placas de agar MRS por siembra masiva y los discos antibióticos se pusieron en las placas a distancias apropiadas. Se incubaron durante 72 horas a 37°C en campana de anreobiosis con 5% de Co<sub>2</sub>. Después de la incubación se midió la zona de inhibición formada por cada antibiótico y se comparó con las tablas de lectura estándar.

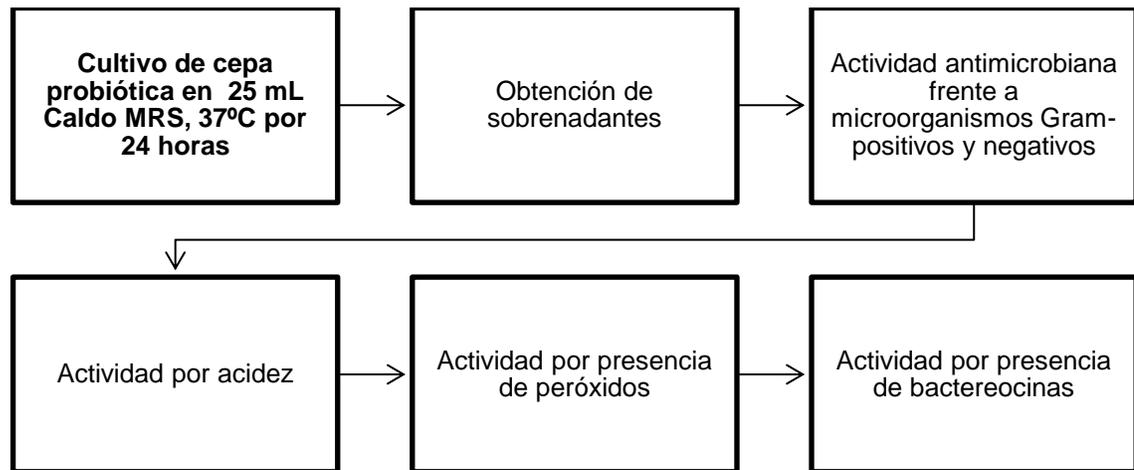
### 3.2.7 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó según el método de Tuo et al. 2013 (Tuo et al., 2013) y Todorov et al. 2007 (Todorov et al., 2007). A continuación, se describe la metodología (Figura 3-2).

- **Cepas utilizadas:** las cepas comerciales de *Lactobacillus* fueron analizadas para

determinar la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Escherichia coli* ATCC 25922., *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

- **Obtención de los sobrenadantes:** se obtuvo los sobrenadantes del cultivo de los lactobacilos (25 mL de caldo MRS 24 horas de incubación a 37°C). Para el ensayo por efecto de acción de acidificación no se ajustó el pH, se transfirieron 5 mL a un tubo estéril. Para el ensayo de detección de peróxidos y bacteriocinas se ajustó el pH del sobrenadante a 6,5 con NaOH 1N. En todos los casos, los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 12.000 rpm por 10 minutos, luego fueron calentados para eliminar las bacterias por 1 hora a 80°C en baño serológico. Para el ensayo de presencia de peróxidos previo al calentamiento se adicionó solución de catalasa al 1% por una hora a 37°C.
- **Actividad antimicrobiana:** se determinó mediante ensayos de difusión en placa. En cada ensayo de prueba, a partir de un cultivo de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> de las cepas patógenas se inocularon 60 µL en 100 mL de agar semi sólido de BHI (1% p/v) a temperatura próxima al punto de gelificación, luego la mezcla homogénea se sirvió en cajas de Petri. Los sobrenadantes (10 µl) de los cultivos de los lactobacilos a prueba, se sembraron en distintos puntos sobre las placas preparadas anteriormente y se incubaron a 37°C por 24 horas. La actividad antimicrobiana se determinó por la presencia de halos de inhibición de la bacteria patógena incluida en el agar.
- **Controles de la prueba:** como control positivo de la actividad de la bacteriocina se utilizaron 10ul de nisina (Cimpa® S. A. S). Como control de la posible interferencia por presencia de peróxido de hidrogeno se empleó el sobrenadante con adición de solución de catalasa 1% y para la posible interferencia por acidez se utilizó el sobrenadante con pH ajustado a 6,5. Finalmente como control positivo de actividad antagónica se empleó como una cepa de *Pediococcus pentosaceus* 147(10µl). (cepa aislada de un queso en la ciudad de Viçosa en el estado de Minas de Gerais-Brasil obtenida por cortesía del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia-IBUN) Los ensayos se realizaron por triplicado.

**Figura 3-2** Evaluación de la actividad antimicrobiana

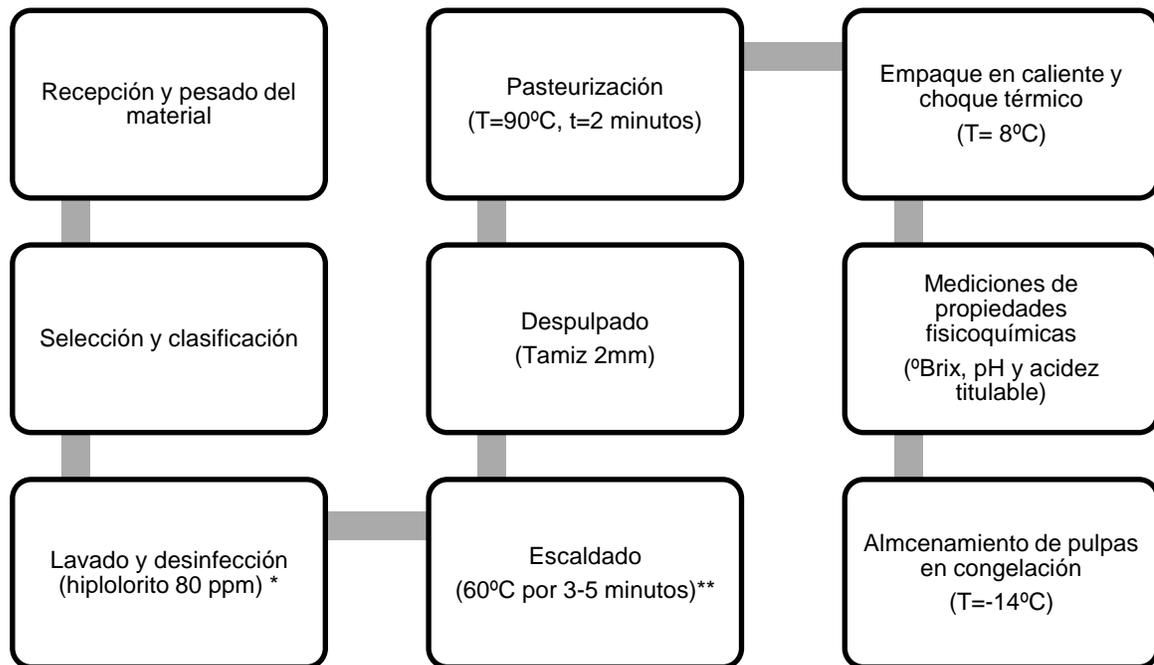
### Desarrollo y elaboración de la bebida de frutos rojos (FR)

Después de la selección de la cepa de trabajo mediante las pruebas de capacidad probiótica en condiciones *in vitro* se elaboró la bebida de frutos rojos (FR) con inclusión de *Lactobacillus casei*.

### 3.2.8 Elaboración de la bebida de frutos rojos (FR).

En la Figura 3-1, se puede observar el diagrama de flujo para la obtención de pulpas, materia prima para el desarrollo de las bebidas (mezcla de frutas).

**Figura 3-3** Diagrama de flujo elaboración de pulpas



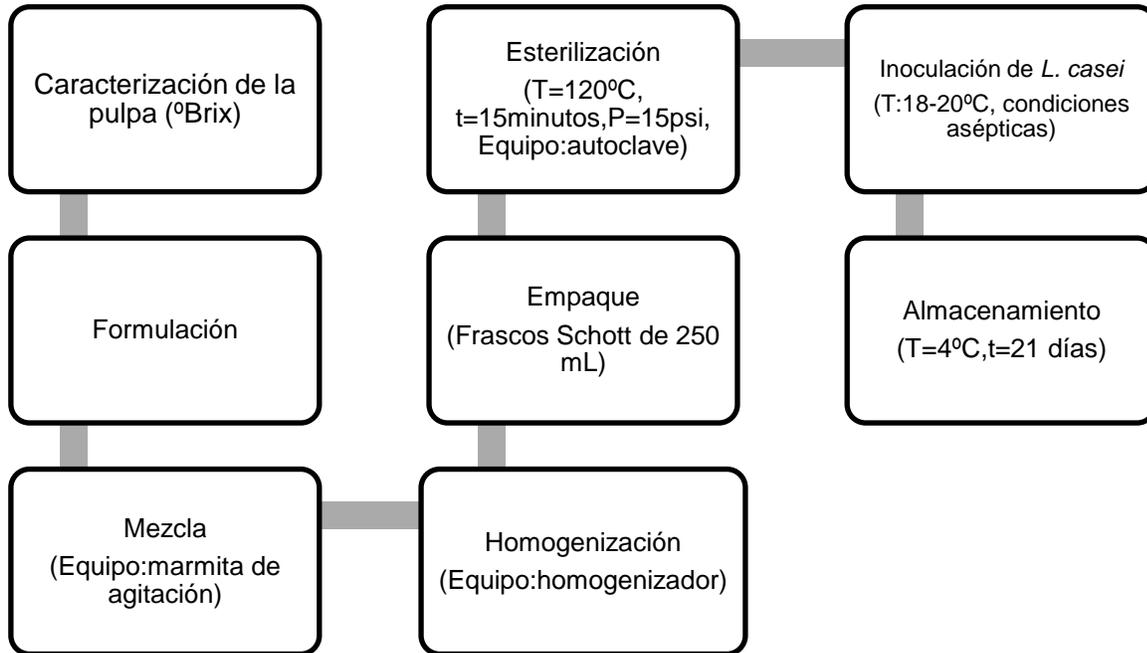
\*La operación de lavado y desinfección varía de acuerdo con la fruta a procesar: para los frutos carnosos simples (Bayas como las moras) el lavado se realizó por aspersión, para la papaya y la fresa fue por inmersión.

\*\*La operación de escaldado varía dependiendo del fruto, realizándose por inmersión en agua, o con vapor vivo.

Las frutas utilizadas fueron fresa (*Strawberry x ananassa L*) (20%) y mora (*Rubus glaucus Benth*) (10%) y papaya (*Carica papaya*) (5%), como estabilizante de pH (5,3) y fuente de fibra (1,7 g/ 100g) (Nithya & Vasudevan, 2016). El porcentaje total de fruta en la bebida fue del 35% p/v, el pH fue de  $3,36 \pm 0,07$  y los sólidos solubles totales fueron de  $11,4^\circ\text{Brix} \pm 0,01$ . Estos parámetros fisicoquímicos fueron establecidos cumpliendo con los requisitos de la normativa colombiana vigente para este tipo de productos (Resolución 3929 de 2013). Esta bebida de fruta puede considerarse como tipo néctar (pH 2,5 a 4,6, sólidos solubles totales mínimo de 10). La normatividad establece que cuando el producto se elabora con dos o más jugos o pulpa de frutas (tipo mezcla), los sólidos solubles totales de fruta en el producto están determinados por la suma del aporte porcentual de sólidos solubles de cada una de las frutas constituyentes. La fruta predominante (fresa 20%) fue la que más sólidos aportó a la formulación (Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, 2013).

El siguiente diagrama de flujo (Figura 3-4) se describe las operaciones unitarias para el proceso de elaboración de la bebida de FR.

**Figura 3-4** Diagrama de flujo de elaboración de bebida de Frutos rojos



La selección de estas frutas fue debida a que la fresa y la mora son generalmente usadas en el desarrollo de bebidas tipo mezcla (Hui, 2006). Se ha reportado en literatura que los frutos rojos como las fresas y la moras contienen un alto contenido de compuestos bioactivos, especialmente antocianinas y compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante (Hui, 2006; Shahidi & Alasalvar, 2016). Las operaciones tecnológicas fueron realizadas con el objetivo de que los compuestos bioactivos se transfieran de materias primas al producto (Ashurst & Hargitt, 2009; Shahidi & Alasalvar, 2016).

La papaya se adicionó como estabilizante natural del pH, debido a que en ensayos previos se demostró que el pH es un factor crítico para la viabilidad de los microorganismos probióticos, varios estudios sustentan que el pH y el contenido de ácidos orgánicos pueden afectar la supervivencia de estas bacterias en las bebidas de fruta (Sheehan et al., 2007). La pulpa de papaya contiene cantidades aproximadas de potasio de 182 mg /100 g y en menor proporción de sodio de 5 mg / 100 g, minerales que podrían beneficiar el crecimiento del

microorganismo probiótico en la bebida de FR (Perricone et al., 2015; Vijaya Kumar et al., 2015). Adicionalmente la formulación de la bebida tipo mezcla de frutas buscaba la aceptación sensorial del producto final.

El producto se esterilizó (120°C, 15 psi, por 15 minutos) (Ashurst & Hargitt, 2009). Todos los procedimientos fueron realizados según las directrices de las Buenas Prácticas de Manufactura y Laboratorio (Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, 2013).

### 3.2.9 Inclusión de *Lactobacillus casei* en bebida de FR:

El inóculo de *L. casei* (cepa de trabajo según las pruebas descritas en la Figura 2-2), se produjo a partir de caldo MRS suplementado con 10% de bebida de frutos rojos según la metodología de Perricone et al. 2014 (Perricone et al., 2014). Se inóculo el 2%(4mL) del microorganismo probiótico en 200mL de la bebida de frutos rojos en los tratamientos descritos a continuación: Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de modelo lineal generalizado en el paquete estadístico de Minitab®.

**Tabla 3-1** Tratamientos evaluados en la viabilidad de *L. casei* durante el almacenamiento de la bebida de Frutos rojos

Tratamiento	Descripción
Tratamiento 1	Bebida de frutos rojos con 1 % de inulina e inóculo
Tratamiento 2	Bebida de frutos rojos sin 1 % de inulina e inóculo
Tratamiento 3 (Control)	Bebida de frutos rojos con 1 % de inulina sin inóculo
Tratamiento 4 (Control)	Bebida de frutos rojos sin 1 % de inulina y sin inóculo

Después de la inoculación de los diferentes tratamientos fueron almacenados en condiciones de refrigeración (4°C) por un periodo de tres semanas (21 días).

### 3.2.10 Evaluación de *Lactobacilos casei* durante el almacenamiento

Los análisis se efectuaron por muestreo del lote en almacenamiento. Se tomó un total de seis tiempos para análisis distribuidos en dos ocasiones por semana los análisis de viabilidad de la cepa probiótica se evaluaron mediante recuentos en placa en agar MRS por profundidad, por un periodo de incubación de 48 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis (Valero-Cases & Frutos, 2017b).

### **3.2.11 Evaluación de las características fisicoquímicas de las bebidas de frutos rojos durante el almacenamiento.**

Se determinó la acidez y el pH (AOAC 942.15 y 982.12). Los sólidos solubles totales (AOAC 932.12) por el método refractométrico de acuerdo al método oficial AOAC (AOAC, 2012). Se hicieron estas mediciones una vez cada semana y por triplicado. Se estableció un perfil de azúcares A.O.A.C. 925.36 y ácidos orgánicos de la bebida de frutos rojos por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) según el método oficial A.O.A.C. 986.13 (AOAC, 2012), para conocer la composición del sustrato para inoculación de cultivos probióticos. Este análisis cromatográfico se realizó antes y después del almacenamiento.

Para la determinación del color de las bebidas en los diferentes tratamientos se utilizó el espacio de color CIE L\*a\*b\* usando un colorímetro Minolta CR-5 (Gomes et al., 2014). Se determinó la diferencia de color ( $\Delta E$ ) =  $\{(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}\}$  a cada uno de los tratamientos durante los 21 días de almacenamiento. Se analizaron las muestras por triplicado. Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de modelo lineal generalizado en el paquete estadístico de Minitab®.

### **3.2.12 Control de calidad microbiológico de las bebidas de FR**

Se realizó un control de calidad del producto en los diferentes tratamientos evaluados. Se siguieron las indicaciones de la metodología establecida en el Manual de Técnicas de Análisis para Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para consumo humano del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA (INVIMA, 1998). La evaluación microbiológica también fue acorde a los requisitos microbiológicos establecidos por la normatividad vigente en Colombia para este tipo de productos NTC 5468 (Icontec, 2012). Las pruebas que se efectuaron comprendieron a:

- Coliformes totales y fecales por Número Más Probable (NMP)
- Recuento en placa de hongos y levaduras.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Identificación molecular de las cepas probióticas

Los resultados de tipificación de los cultivos comerciales se resumen en la Tabla 3-2, que incluye: longitud de la secuencia ensamblada y la búsqueda en las bases de datos RDP, Green genes y RefSeq(NCBI) (Tabla3-2). Se obtuvo los árboles filogenéticos de cada uno de los cultivos comerciales (Anexo C).

El clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) pudo determinar que se tratan de secuencias de microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* con un 100% de coincidencia.

**Tabla 3-2** Identificación molecular de las cepas comerciales

Longitud de la secuencia ensamblada		1438 pb	1456 pb	1456 pb
Resultados RefSeq Genomic-NCBI	Microorganismo	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
	% de identidad	99	99	99
	% de cobertura	100	100	100
Resultados RDP		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Resultados Green-genes		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Conclusión	Género	<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Lactobacillus</i></b>
	Especie	<b><i>rhamnosus</i></b>	<b><i>casei</i></b>	<b><i>paracasei</i></b>

La base de datos de secuencias 16S RDP, usando el algoritmo Seqmatch-RDP contra Los aislamientos cultivados indica que las secuencias ensambladas del ADN de los microorganismos en estudio son muy similares en la mayoría de su longitud con las cepas tipo identificadas como ***Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei***

Las cepas estudiadas son muy similares a secuencias de ***Lactobacillus rhamnosus*,**

### 3.3.2 Tolerancia a las sales biliares

Los resultados indicaron diferencias entre la supervivencia de *L. casei* a estas condiciones respecto a las otras dos cepas evaluadas específicamente a una concentración de 2% de sales biliares (Tabla 3-3).

**Tabla 3-3** Evaluación de la supervivencia a sales biliares *in vitro* de las cepas comerciales en caldo MRS modificado

Cepa	Caldo MRS a diferentes concentraciones (p/v) de sales biliares				
	0,5%	1,0%	1,5%	2%	Control 0%
<i>L. paracasei</i>	+	-	-	-	+++
<i>L. rhamnosus</i>	++ <sup>c</sup>	+	-	-	+++
<i>L. casei</i>	++	++	++	++	+++

\*(+++) Crecimiento (turbidez) en el control, (++) Crecimiento relativamente similar al control, (+) Presencia de turbidez, (-) No hubo crecimiento (No presencia de turbidez). La Evaluación se realizó en caldo MRS al sub-cultivar las cepas probióticas. Control: MRS sin suplementación. n=3

Los resultados indican que *L. casei* mantiene su capacidad de resistencia a bilis después del periodo de almacenamiento de 21 días (Tabla 3-4).

**Tabla 3-4** Evaluación de la supervivencia a sales biliares *in vitro* después de almacenamiento en caldo MRS modificado

Cepa	Caldo MRS a diferentes concentraciones (p/v) de sales biliares				
	0,5%	1,0%	1,5%	2%	Control
<i>L. casei</i> Tratamiento 1 con 1% de inulina	+++	++	+++	++	+++
<i>L. casei</i> Tratamiento 2 sin inulina	+++	++	+++	++	+++

\*(+++) Crecimiento (turbidez) en el control, (++) Crecimiento relativamente similar al control, (+) Presencia de turbidez, (-) No hubo crecimiento (No presencia de turbidez). Control: MRS sin suplementación. Número de réplicas n=3.

### 3.3.3 Tolerancia a pH ácido

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la supervivencia de la cepa comerciales de lactobacilos en presencia de pH ácido (Tabla 3-5). Se evidenció que *L. casei* difiere de las otras cepas en la supervivencia al pH ácido, siendo mejor a pH 2.

**Tabla 3-5** Evaluación de la resistencia a pH ácido *in vitro* de las cepas comerciales en caldo MRS modificado.

Cepa	Caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH			
	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0	Control(pH6,5)
<i>L. paracasei</i>	-	-	+	+++
<i>L. rhamnosus</i>	-	-	+	+++
<i>L. casei</i>	-	++	++	+++

\*(+++)  
Crecimiento (turbidez) en el control, (++) Crecimiento relativamente similar al control, (+) Presencia de turbidez, (-) No hubo crecimiento (No presencia de turbidez). La Evaluación se realizó en caldo MRS al sub-cultivar las cepas probióticas. Control: MRS sin suplementación. n=3

Se halló que *L. casei* después de ser inoculado en el producto se adaptó mejor a las condiciones acidas, específicamente se observa la supervivencia al pH 2 en el tratamiento con adición de inulina (1%) en comparación con la cepa previo a la inclusión en la matriz alimentaria (Tabla 3-6).

**Tabla 3-6** Evaluación de la supervivencia a pH ácido *in vitro* después de almacenamiento en caldo MRS modificado

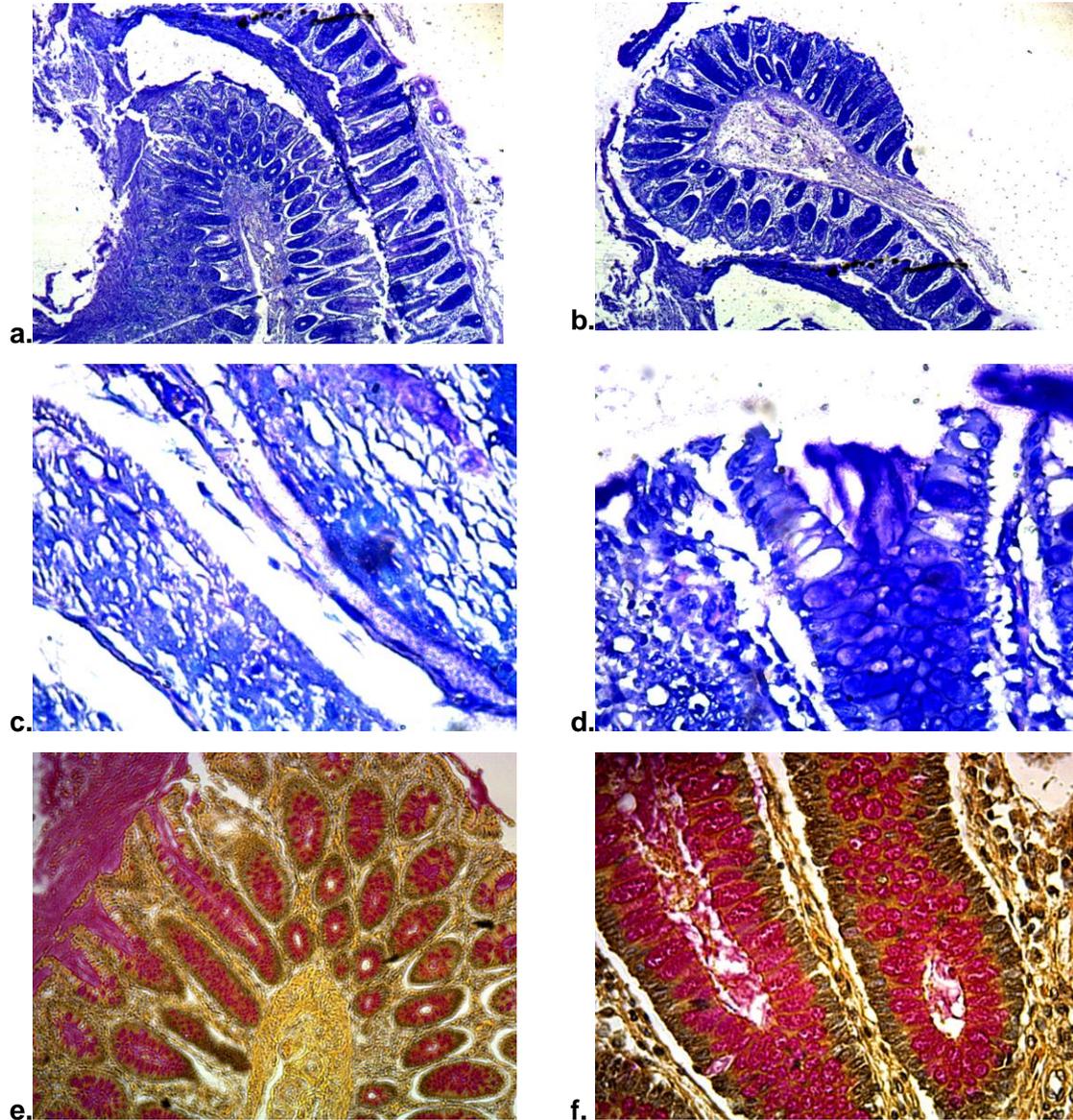
Cepa	Caldo MRS ajustado a diferentes valores de pH			
	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0	Control(pH6,5)
<i>L. casei</i> Tratamiento 1 con Inulina al 1%	++	+++	+++	+++
<i>L. casei</i> Tratamiento 2 sin inulina	-	++	++	+++

\*(+++)  
Crecimiento (turbidez) en el control, (++) Crecimiento relativamente similar al control, (+) Presencia de turbidez, (-) No hubo crecimiento (No presencia de turbidez). Número de réplica. n=3.

### 3.3.4 Adherencia intestinal

Los cortes histológicos y las tinciones mostraban integridad de tejido y buena coloración, sin embargo, no se evidenció adherencia de los cultivos de las cepas utilizadas (incluyendo los controles positivos de patógenos intestinales: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Escherichia coli* ATCC 25922) en las regiones específicas del tejido (criptas de mucina en la parte apical) (Figura 3-5). En la Figura se evidencia diferentes secciones del tejido inoculado con *S. enteritidis*.

**Figura 3-5** Tejido inoculado con *S. enteritis* **a y b**. Lámina tejido de mucina humana Sigma-Aldrich (Mucin Tissue – Trol TM, AR-Med LTD- Runnymed Malthouse- TW20 9BD U.K) con coloración de Giemsa e inoculada con *S. enteritis* (100X). **c y d**. Lámina tejido de mucina humana Sigma-Aldrich con coloración de Giemsa e inoculada con *S. enteritis*(400X). **e** Lámina de control de tejido de mucina humana **f** Lámina de control de tejido de mucina humana Sigma-Aldrich.



### 3.3.5 Resistencia a antibióticos

*L. casei* presentó resistencia antibióticos antes y después de ser incluida en la bebida de FR Tabla 3-7). La cepa aislada de la bebida con prebiótico (IN 1%) presentó el mayor número de antibióticos con resistencia, sin embargo, el microorganismo antes de ser incluido a la matriz alimentaria ya presentaba resistencia a Florfenicol(FFC)y Sulfatrimetropin(SXT).

**Tabla 3-7.** Resistencia a antibióticos de *L. casei*

Cepa	Resultado
<i>L. casei</i> Tratamiento 1 (Inulina 1%)	Sensible: EFT, FFC, AMP Resistente: CN, SXT, TE
<i>L. casei</i> Tratamiento 2 (Sin inulina)	Resistente: CN, AMP, TE, FFC,SXT,CFT
<i>L. casei</i> previo a la inoculación	Sensible: TE, AMP, CN EFT Resistente: SXT, FFC

\*Ampicilina(AMP), Gentamicina(GN), Tetraciclina(TE),Florfenicol(FFC),Sulfatrimetropin(SXT) y Ceftiofur(EFT), a las concentraciones recomendadas por la prueba estándar de antibiogramas por la Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) mediante el ensayo de difusión en placa.

### 3.3.6 Actividad Antimicrobiana

No se encontró antagonismo frente a ninguno de los patógenos Gram positivos y Gram negativos evaluados en este estudio tanto de los Lactobacilos como de la cepa aisladas de la bebida de FR (*L. casei*). En la Figura 3-6, se observó una zona de inhibición para a *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 en los controles (C: nisina y 4: cepa control *Pediococcus pentosaceus* 147). No se observó la formación de zonas de inhibición alrededor del patógeno de interés (*L. monocytogenes* ATCC 19114) para los lactobacilos.

**Figura 3-6** Prueba de antagonismo de cultivos comerciales en agar semi sólido de BHI frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19114

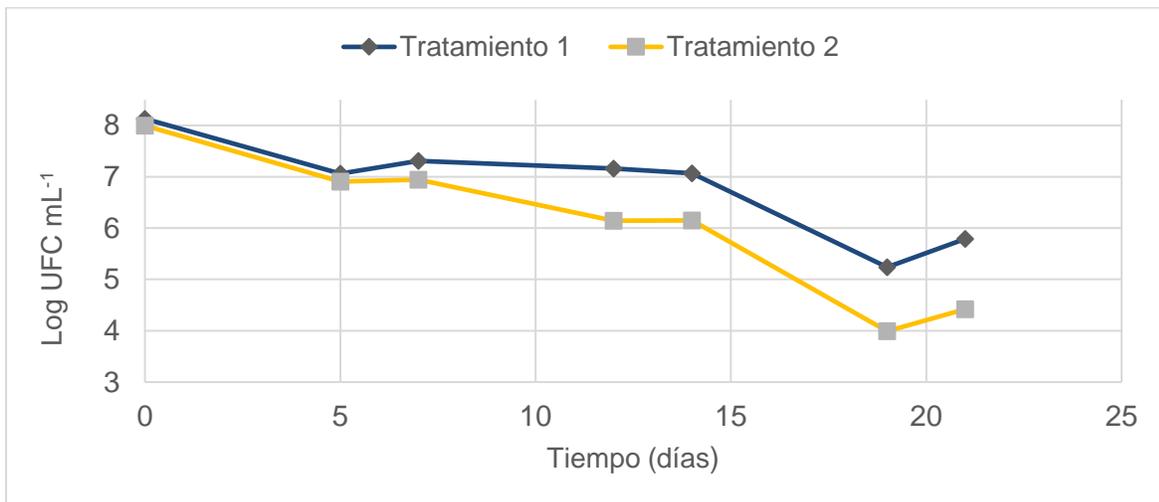


\*1: *L. paracasei*. 2: *L. rhamnosus*.3: *L. casei*. 4: Cepa control (*Pediococcus pentosaceus* 147) C: Control bacteriocina comercial (Nisina, Cimpa® S. A. S) frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 19114

### 3.3.7 Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* durante el almacenamiento de la bebida de FR

La viabilidad al final del almacenamiento fue de 5,79 y de 4,42 Log UFC mL<sup>-1</sup> para los tratamientos con inulina al 1% y sin la inulina respectivamente. La densidad celular recomendada para un alimento probiótico (aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) fue hasta el día doce de almacenamiento para ambos tratamientos (Tratamiento 1: 7,15±0,19; tratamiento 2: 6,14±0,04 Log UFC mL<sup>-1</sup>). (Figura 3-7) El análisis estadístico evidenció que la inulina al 1% tiene un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre viabilidad de *L. casei* en la bebida de FR en condiciones de almacenamiento en comparación del tratamiento sin inulina hasta el día 19 de almacenamiento.

**Figura 3-7** Viabilidad de *L. casei* en bebida de Frutos rojos durante almacenamiento



**Tratamiento 1:** bebida de frutos rojos con IN 1%. **Tratamiento 2:** bebida de frutos rojos sin adición de prebiótico. \*Log en base 10.

### 3.3.8 Evaluación de las características fisicoquímicas de las bebidas de frutos rojos durante el almacenamiento.

En la evaluación de los parámetros fisicoquímicos de los tratamientos de las bebidas durante el almacenamiento, el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ) durante el almacenamiento de la bebida de FR para las variables de pH y acidez. Los sólidos solubles totales aumentaron por la adición de la inulina (Tabla 3-8).

**Tabla 3-8** Efecto parámetros fisicoquímicos durante almacenamiento de *L. casei* en bebidas de Frutos rojos

Tiempo (días)	Tratamiento	pH	Acidez (% ácido cítrico en la muestra)	Sólidos solubles totales(°Brix)
0	1	3.36±0.07 <sup>a</sup>	0.47±0.01 <sup>b</sup>	11.4±0.07 <sup>c</sup>
	2	3.36±0.04 <sup>a</sup>	0.47±0.02 <sup>b</sup>	10.65±0.05 <sup>g</sup>
	3	3.36±0.05 <sup>a</sup>	0.48±0.01 <sup>b</sup>	11.4±0.07 <sup>c</sup>
	4	3.36±0.07 <sup>a</sup>	0.48±0.01 <sup>b</sup>	10.65±0.07 <sup>g</sup>
8	1	3.30±0.06 <sup>a</sup>	0.48±0.02 <sup>b</sup>	11.85±0.01 <sup>b</sup>
	2	3.32±0.01 <sup>a</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>	11.1±0.05 <sup>d</sup>
	3	3.30±0.07 <sup>a</sup>	0.46±0.04 <sup>b</sup>	11.65±0.02 <sup>b</sup>
	4	3.30±0.04 <sup>a</sup>	0.46±0.01 <sup>b</sup>	10.55±0.07 <sup>g</sup>
13	1	3.29±0.01 <sup>a</sup>	0.47±0.02 <sup>b</sup>	11.65±0.02 <sup>a</sup>
	2	3.31±0.01 <sup>a</sup>	0.46±0.03 <sup>b</sup>	11.90±0.04 <sup>a</sup>
	3	3.30±0.05 <sup>a</sup>	0.46±0.02 <sup>b</sup>	11.4±0.01 <sup>c</sup>
	4	3.30±0.01 <sup>a</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>	10.55±0.01 <sup>c</sup>
21	1	3.28±0.06 <sup>a</sup>	0.48±0.01 <sup>b</sup>	11.85±0.05 <sup>a</sup>
	2	3.30±0.07 <sup>a</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>	11.65±0.07 <sup>b</sup>
	3	3.30±0.05 <sup>a</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>	11.00±0.02 <sup>e</sup>
	4	3.29±0.01 <sup>a</sup>	0.47±0.02 <sup>b</sup>	10.55±0.07 <sup>c</sup>

Valores promedio que no compartan la misma letra en la fila indican diferencias significativas, con un valor de significación del 95%, según la prueba de Tuckey  $p=0,05$ ,  $n=3$ . **Tratamiento 1:** bebida de FR con 1% de inulina e inóculo. **Tratamiento 2:** Bebida de FR sin inulina y con inóculo. **Tratamiento 3:** Bebida de frutos rojos con inulina y sin inóculo. **Tratamiento 4:** Bebida de frutos rojos sin inulina y sin inóculo.

Con relación al contenido de azúcares (glucosa y fructosa) y ácidos orgánicos de las bebidas en el tiempo 0 y 21 del almacenamiento no se encontró producción de ácido láctico, sin embargo, se encontró ácido cítrico en los tratamientos 2 (0,46% $m/m$ ) y en el 3(0,48% $m/m$ ). Se observó consumo de glucosa y fructosa por parte de *L. casei* (Tratamientos 1 y 2) (Tabla3-9).

**Tabla 3-9** Evaluación del contenido de ácidos orgánicos y azúcares en la bebida de Frutos rojos.

Tiempo (días)	Tratamiento	Glucosa (% m/m)	Fructosa (% m/m)	Ácido cítrico (% m/m)	Ácido láctico (% m/m)
0	1	5,44	4,75	0,44	0,0
	2	4,68	4,21	0,0	0,0
	3	5,27	4,59	0,0	0,0
	4	5,58	4,85	0,51	0,0
20	1	5,25	4,12	0,48	0,0
	2	4,24	3,42	0,46	0,0
	3	5,15	4,06	0,48	0,0
	4	4,83	3,82	0,49	0,0

**Tratamiento 1:** bebida de FR con 1% de inulina e inóculo. **Tratamiento 2:** Bebida de FR sin inulina y con inóculo. **Tratamiento 3:** Bebida de frutos rojos con inulina y sin inóculo. **Tratamiento 4:** Bebida de frutos rojos sin inulina y sin inóculo.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ) durante el almacenamiento de la bebida de FR para la coordenada L (luminosidad), mientras que la coordenada a (matiz, coloración de tonos rojos) y b (ausencia de color) si presentaron diferencias significativas entre tratamientos independiente de la adición de probióticos y prebióticos (Tabla 3-10).

**Tabla 3-10** Evaluación del color (parámetros L\*, a\* y b\*) y diferencia de color  $\Delta E$  en bebidas de Frutos rojos durante el almacenamiento

Tiempo(días)	Tratamiento	L*	a*	b*	$\Delta E$
0	1	42,06±0.09 <sup>a</sup>	15,85±0.05 <sup>j</sup>	9,78±0.1 <sup>j</sup>	0 <sup>a</sup>
	2	45,87±0.09 <sup>a</sup>	15,69±0.04 <sup>j</sup>	10,65±0.1 <sup>j</sup>	0 <sup>a</sup>
	3	43,98±0.09 <sup>a</sup>	19,04±0.05 <sup>f</sup>	15,98±0.03 <sup>f</sup>	0 <sup>a</sup>
	4	40,54±0.08 <sup>a</sup>	19,77±0.02 <sup>c</sup>	15,39±0.03 <sup>h</sup>	0 <sup>a</sup>
8	1	41,79±0.12 <sup>a</sup>	20,03±0.04 <sup>c</sup>	16,55±0.1 <sup>e</sup>	9,06 <sup>b</sup>
	2	43,63±0.08 <sup>a</sup>	18,81±0.1 <sup>g</sup>	15,9 ±0.5 <sup>g</sup>	6,49 <sup>b</sup>
	3	40,2±0.1 <sup>a</sup>	20,33±0.05 <sup>c</sup>	16,43±0.1 <sup>c</sup>	4,40 <sup>b</sup>
	4	39,25±0.09 <sup>a</sup>	21,99±0.2 <sup>b</sup>	15.07±0.03 <sup>i</sup>	4,15 <sup>ab</sup>
13	1	37,22±0.09 <sup>a</sup>	22,60±0.1 <sup>a</sup>	20,15±0.05 <sup>a</sup>	6,35 <sup>c</sup>
	2	40,25±0.09 <sup>a</sup>	19,52±0.1 <sup>d</sup>	17,41±0.02 <sup>c</sup>	3,77 <sup>c</sup>
	3	43,88±0.1 <sup>a</sup>	17,65±0.2 <sup>i</sup>	17,82±0.03 <sup>e</sup>	4,74 <sup>c</sup>
	4	44,09±0.01 <sup>a</sup>	18,38±0.07 <sup>h</sup>	15,02 ±0.1 <sup>b</sup>	7,06 <sup>c</sup>
21	1	43,14±0.01 <sup>a</sup>	19.52±0.05 <sup>d</sup>	17,56±0.1	7,15 <sup>d</sup>
	2	42,94±0.1 <sup>a</sup>	19,18±0.09 <sup>e</sup>	17,83±0.5 <sup>c</sup>	2,74 <sup>d</sup>
	3	42,76±0.09 <sup>a</sup>	18,55±0.2 <sup>g</sup>	17,92 ±0.03 <sup>c</sup>	2,27 <sup>d</sup>
	4	43,26±0.09 <sup>a</sup>	18,78±0.05 <sup>g</sup>	17,39 ±0.1 <sup>d</sup>	2,56 <sup>d</sup>

Valores promedio de que no compartan la misma letra en la fila indican diferencias significativas, con un valor de significación del 95%, según la prueba de Tuckey. **Tratamiento 1:** bebida de FR con 1% de inulina e inóculo. **Tratamiento 2:** Bebida de FR sin prebiótico y con inóculo. **Tratamiento 3:** Bebida de frutos rojos con prebiótico y sin inóculo. **Tratamiento 4:** Bebida de frutos rojos sin prebiótico y sin inóculo.

### 3.3.9 Control de calidad microbiológico de las bebidas de FR

La bebida cumplió con los parámetros de calidad microbiológica según la normatividad vigente en Colombia para zumos, jugos y bebidas de frutas la NTC5468 de 2012 (Icontec, 2012) al inicio y final del tiempo de almacenamiento (Tablas 3-11 y 3-12)

**Tabla 3-11** Control de calidad microbiológica de las bebidas (Tiempo 0)

<b>Análisis</b>	<b>Método</b>	<b>Resultado</b>	<b>Valor de referencia</b>
NMP Coliformes totales/mL	NMP INVIMA N. 13	<3	<10
NMP Coliformes fecales /mL	NMP INVIMA N. 14	<3	(Ausencia)
Recuento de mohos y levaduras UFC/mL	Recuento en placa INVIMA N. 7	<10	100-200

Tiempo 0 días de almacenamiento. Los resultados expresados son para los cuatro tratamientos evaluados de la bebida de FR durante el almacenamiento. Los valores de referencia son basados según la Resolución 3929 de 2013.

**Tabla 3-12** Control de calidad microbiológica de las bebidas (tiempo 21 días)

<b>Análisis</b>	<b>Método</b>	<b>Resultado</b>	<b>Valor de referencia</b>
NMP Coliformes totales/mL	NMP INVIMA N. 13	<3	<10
NMP Coliformes fecales /mL	NMP INVIMA N. 14	<3	(Ausencia)
Recuento de mohos y levaduras UFC/mL	Recuento en placa INVIMA N. 7	<10	100-200

Tiempo 21 días de almacenamiento. Los resultados expresados son para los cuatro tratamientos evaluados de la bebida de FR durante el almacenamiento. Los valores de referencia son basados según la Resolución 3929 de 2013.

### 3.4 Discusión

La identificación molecular es considerado el primer paso para la selección de microorganismos con potencial probiótico en el desarrollo de productos (Fontana et al., 2013) debido a que cuando se utiliza un microorganismo para la formulación de suplementos alimenticios u otros productos para el consumo humano, su caracterización debe ser completa tanto a nivel genómico como fisiológico (Toscano, De Grandi, Pastorelli, Vecchi, & Drago, 2017). Cada microorganismo adicionado en productos probióticos debe ser identificado a nivel de género y especie, de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura (Toscano et al., 2017). En consecuencia, la seguridad de los productos alimenticios y, sobre todo, de las cepas probióticas comerciales debe evaluarse antes de su lanzamiento en el mercado (Toscano et al., 2017), como parte integral en el desarrollo de un producto.

La identificación indicó que los cultivos comerciales correspondían a las especies de: ***Lactobacillus casei***, ***Lactobacillus rhamnosus*** y ***Lactobacillus paracasei***, microorganismos con amplio uso en productos de origen vegetal (Di Cagno et al., 2013), se buscó verificar la identificación de las cepas debido a la necesidad de certificar la identidad de las cepas en orden de garantizar que sean microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* especies que son consideradas como GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) y que pueden adicionarse en un alimento para el consumo humano (Tulumoğlu, Kaya, & Şimşek, 2014) (tabla 3-2).

El género *Lactobacillus* actualmente contiene 204 especies, es el grupo más grande de la familia *Lactobacillaceae* (Fontana et al., 2013). Dentro de este género, las especies heterofermentativas facultativas como ***Lactobacillus casei***, ***Lactobacillus paracasei*** y ***Lactobacillus rhamnosus*** (género y especie de los cultivos comerciales probióticos en este estudio), están estrechamente relacionadas filogenéticamente y fenotípicamente. Estas tres especies se consideran dentro del grupo taxonómico de *Lactobacillus*. Sin embargo, aún se precisa de estudios más profundos para determinar la estructura filogenética de este género (Savo Sardaro et al., 2016).

Muchas cepas del grupo de *Lactobacillus casei* han sido aisladas e identificadas con el propósito de determinar su potencial probiótico y sus características tecnológicas para la

adaptación en nuevas matrices de inclusión como las bebidas de fruta, por cual es significativo en el diseño de una bebida de frutos con inclusión de este microorganismo probiótico (Bertazzoni Minelli et al., 2004).

La clasificación taxonómica de las cepas candidatas a probióticos durante muchas décadas dependió en gran medida del tipo de fermentación del azúcar y de los productos de fermentación generados debido a que los probióticos se han clasificado principalmente como bacterias ácido-lácticas, sin embargo, actualmente, el análisis de la subunidad 16S del ARN se ha convertido en el método de elección preferido (Fontana et al., 2013) por lo cual fue el método seleccionado para la identificación de las cepas comerciales en estudio. Durante las dos últimas décadas, los microbiólogos han utilizado este fragmento conservado para la clasificación filogenética (Zárate et al., 2009).

Con relación a la actividad probiótica *in vitro* de estas cepas, se halló diferencias entre la supervivencia de *L. casei* a estas condiciones respecto a las otras dos cepas evaluadas específicamente a una concentración de 2% de sales biliares. Las sales biliares disuelven los lípidos de la membrana que conducen a la lisis y muerte celular (M. Succi et al., 2005). Por lo tanto, los probióticos deben sobrevivir a la exposición a la bilis para llegar con vida al intestino delgado y al colon. (Das, Khowala, & Biswas, 2016). Generalmente las bacterias ácido lácticas puede tener mejores resultados en términos de supervivencia a esta sustancia que al pH ácido del estómago (Reale et al., 2014). A diferencia de otros estudios donde la supervivencia a estos componentes fue mayor para las cepas de *L. rhamnosus*. y de *L. paracasei* (DO>1) después de exposición por 24 horas a 1,5% de sal biliar (Reale et al., 2014), este trabajo encontró que la cepa de *L. casei* presentó resultados satisfactorios sobreviviendo a un concentración de 2% (Reale et al., 2014).

Se ha observado una posible relación entre la supervivencia al pH ácido y a las sales biliares en condiciones simuladas para cepas de *L. fermentum* aisladas de productos autóctonos (pastas de mijo fermentadas de África occidental). Después de la exposición de 48 cepas de *L. fermentum* a pH 2,5 durante 4 horas, 16 cepas se consideraron resistentes a los ácidos (Owuasu-Kwarteng et al., 2015).

El mecanismo molecular que le permite a las bacterias con capacidad probiótica resistir a las sales biliares conjugadas tóxicas manteniendo la viabilidad de los microorganismos en el tracto gastrointestinal es debido a la actividad de la hidrolasa de sales biliares (BSH) (Toscano et al., 2017). La actividad de la BSH se ha detectado en microorganismos probióticos pertenecientes a los géneros de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, bacterias que generalmente se encuentran en el ambiente intestinal (Toscano et al., 2017).

Con relación a la supervivencia de los cultivos comerciales en estudio al pH ácido se encontró diferencias entre la supervivencia de *L. casei* a estas condiciones respecto a las otras dos cepas evaluadas, específicamente a un pH 2,0 y 2,5. En otros estudios se ha encontrado que cepas de *L. rhamnosus* (SB5L, J5L yIN1L) presentan porcentajes de resistencia de mayores al 10% después de cuatro horas de exposición a un pH de 2,5, sin embargo, en este estudio se encontró que esta cepa resistió mejor a pH 3,0. Estos autores sugieren que para proteger del estrés gástrico a los microorganismos probióticos con baja supervivencia al ambiente ácido se recomienda la inclusión en productos lácteos debido a que la leche puede ejercer un efecto protector por su contenido graso (Tuo et al., 2013). En relación con la cepa de *L. paracasei* podemos inferir similitudes al estudio anteriormente descrito ya que evidenció los valores más bajos de resistencia a pH 2,5

Estudios sobre cepas *L. casei* aisladas de vino han encontrado que al final del tratamiento en condiciones de simulación del ambiente ácido, cuando el jugo gástrico llegó a pH 1.8, la reducción de la viabilidad de las cepas enológicas fue de aproximadamente 3 unidades logarítmicas, excepto para *L. casei* CIAL-51 y *L. casei* CIAL-52, que exhibió una reducción de sólo 1 unidad logarítmica (García-Ruiz et al., 2014). En términos generales la adaptación a las condiciones ácidas puede variar según las relaciones filogenéticas entre especies posiblemente al origen y condiciones ecológicas del aislamiento (Reale et al., 2014; M. Succi et al., 2005), por ejemplo, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, posee la más alta tolerancia al ácido entre las especies *Bifidobacterium*, que generalmente muestran una muy baja resistencia a condiciones ácidas (Toscano et al., 2017). Las bacterias probióticas tienen varios mecanismos de protección, lo que les permite tener una respuesta adaptativa a la exposición a pH bajo, como la capacidad de excluir los protones desde el interior de la

---

célula mediante el aumento de la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa (Matsumoto, Ohishi, & Benno, 2004). El mismo mecanismo está implicado en la tolerancia ácida de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, que puede aumentar significativamente la biosíntesis de la H<sup>+</sup>-ATPasa en la membrana celular cuando se incuban en condiciones ácidas (Toscano et al., 2017).

Se observa la supervivencia al pH 2 en el tratamiento con adición de inulina (1%) en comparación con la cepa previo a la inclusión en la matriz alimentaria (posiblemente a la inducción de la cepa a una mayor resistencia a condiciones ácidas por las condiciones medioambientales de la bebida (pH 3,36± 0,07).

En estudios previos se ha demostrado que el tipo de matriz alimentaria puede tener un efecto significativo en la supervivencia a condiciones ácidas y sales biliares (pH 2,5 con pepsina) ( $p < 0,01$ ) de la cepa evidenciando una resistencia mayor en alimentos de tipo lácteo (leche pasteurizada) que en jugos de fruta (naranja, uva, maracuyá) para la cepa liofilizada de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* E-2010 (Bb-12) (Maria Saarela et al., 2006).

Otros autores han demostrado que en condiciones de almacenamiento (35 días a 4°C) en bebidas de fruta (jugos comerciales) inoculados con *L. rhamnosus* LB11 encontraron que la resistencia a la bilis (0,3%) no tuvo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en comparación con el cultivo fresco, previo al almacenamiento (Champagne & Gardner, 2008). Sin embargo respecto a la resistencia al pH ácido encontraron que los cultivos recuperados después de haber sido almacenados en la bebida de fruta tenían un promedio de pérdidas en la viabilidad de 1,2 Log/mL en comparación con los cultivos frescos cuando se expusieron a una incubación de 2 horas a pH 2,0 simulando un estrés gástrico (Champagne & Gardner, 2008).

Adicionalmente se puede observar que independiente de la adición de inulina a la bebida la cepa presenta mejores condiciones de resistencia a condiciones ácidas (pH 2,0). Respecto a las sales biliares se mantuvo estable la resistencia con relación al cultivo fresco liofilizado. Valero y Frutos, 2017 demostraron que comparando la supervivencia *L. plantarum* inoculado en jugos fermentados de zanahoria con 0%, 1% y 2% de inulina bajo condiciones simuladas de jugos gástricos (SJM, 100 mL de caldo MRS pH 3, pepsina de 3g/L) en el primer día de almacenamiento (4°C), la presencia de inulina no afectó el

porcentaje de supervivencia de la bacteria después de 120 minutos de incubación, presentando valores de 73% de supervivencia en todos los jugos fermentados sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, después de la digestión *in vitro* a los 15 y 30 días de almacenamiento, *L. plantarum* mostró la misma resistencia durante SGJ, independientemente de la presencia de inulina. Este efecto puede ser debido a la preferencia mostrada por las bacterias ácido-lácticas por carbohidratos simples en la resistencia a las condiciones digestivas gástricas (Valero-Cases & Frutos, 2017b).

En otros tipos de productos como margarinas con adición de inulina (3%) y probióticos (*Bifidobacterium animalis* Bb-12) se encontró que las margarinas con inulina presentaron menores reducciones en las poblaciones de Bb-12 (Log  $10^6$  UFC/mL) durante todo el período de ensayos *in vitro* (pH ácido y presencia de sales biliares por 6 horas de incubación) en comparación con los recuentos iniciales (Souza, Gioielli, & Saad, 2017). Souza, Gioielli y Saad, 2017 sugieren que el microorganismo probiótico es protegido por la inulina durante los ensayos *in vitro*, ya que cuando se mezcla la inulina con agua puede formar un gel protegiendo las células (Souza et al., 2017). Este gel probablemente evitó la acción del ácido y de las sales biliares sobre el probiótico durante los ensayos *in vitro* (Souza et al., 2017).

Otra propiedad evaluada en este estudio fue la capacidad de adherencia al tejido intestinal por las bacterias comerciales. La mucosa intestinal se compone de una monocapa de células epiteliales polarizadas, así como de la región sub-epitelial que contiene la lámina propia, el sistema nervioso entérico, el tejido conectivo y las capas musculares. En el epitelio están presentes los enterocitos, las células de Goblet, que sintetizan y liberan mucina (Figura 3-5 Sección B), zona específica de adherencia intestinal tanto de patógenos como de probióticos.

Una buena capacidad de adherencia de microorganismos probióticos puede promover el tiempo de residencia intestinal, la exclusión de patógenos y la interacción con las células del huésped para la protección de la modulación epitelial o inmunológica (Tuo et al., 2013). Este argumento define la importancia de estos ensayos en condiciones *in vitro* sin embargo, los resultados expuestos en este trabajo sugiere que la técnica recomendada para exponer mejores resultados es la evaluación de la adherencia mediante líneas celulares Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano (García-Ruiz et al., 2014; Pan,

Chen, Wu, Tang, & Zhao, 2009; Todorov et al., 2007; Tulumoglu et al., 2014), otras líneas celulares que se han utilizado son la línea celular de carcinoma de colon humano (HT-29)(Tuo et al., 2013). Las fallas en el desempeño de esta técnica es que los microorganismos tanto patógenos como probióticos requieren posiblemente de las células vivas para realizar los mecanismos moleculares para adherirse satisfactoriamente al tejido epitelial del intestino grueso del huésped (Ohland & Macnaughton, 2010). Los resultados obtenidos en este estudio en forma contraria a lo reportado por Serna, 2012, indican que la valoración por adherencia intestinal no puede realizarse por esta técnica. Se supone que los mecanismos moleculares de los probióticos son desencadenados por interacciones entre las células microbianas y las células epiteliales en el sitio de aplicación(intestino) (Chen & Sears, 2014). Se debe considerar que la adherencia observa en las criptas del intestino recubiertas por mucina donde se encuentran los sitios de competencia de espacio entre patógenos y microorganismos probióticos como ocurre *in vivo*.

Varios mecanismos juegan un papel en la adhesión de las células microbianas a las células epiteliales intestinales (Shoaf et al., 2006). Las células con una alta hidrofobicidad superficial podrían dar a las células una ventaja competitiva por un mayor anclaje al tracto gastrointestinal (Todorov et al., 2007).

En otros estudios cepas aisladas a partir de muestras marinas de *L. casei* con potencial probiótico tenían un buen potencial para adherirse a las células (45%±1,5) de adherencia a las células Caco-2 (Das et al., 2016). De hecho, los probióticos pueden bloquear la adherencia de los patógenos que compiten por el mismo receptor intestinal o inducir un aumento de la producción de mucina que inhibe la adhesión de varios microorganismos patógenos, como *Escherichia coli* (Toscano et al., 2017). Por otra parte, la capacidad de adherirse, colonizar el intestino y sobrevivir con el tiempo en el medio intestinal es una característica fundamental para los microorganismos probióticos, ejerciendo sus actividades benéficas (Toscano et al., 2017). Cabe señalar que la capacidad de la adherencia de los probióticos es relativa para cada cepa y especie (Das et al., 2016; Toscano et al., 2017).

Una de las propiedades requeridas para las cepas probióticas es su seguridad para el consumo humano sin albergar resistencia adquirida y transferible a los antibióticos

(Tulumoğlu et al., 2014). Además, se debe considerar la adquisición de resistencia a los antibióticos y los factores de la virulencia de cepas probióticas, incluyendo bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus*) que son consideradas como GRAS como nuevos riesgos de seguridad emergentes (Fontana et al., 2013). En este estudio, la cepa de *L. casei* aislada de la bebida con prebiótico (IN 1%) presentó el mayor número de resistencia a los antibióticos, sin embargo, la cepa comercial para uso en probiótico ya presentaba resistencia a Florfenicol (FFC) y Sulfatrimetropin (SXT). Estos resultados deben ser considerados cuidadosamente ya que pueden existir divergencias en relación a los problemas encontrados en los antibiogramas, los genes de resistencia pueden estar presentes, pero en silencio, y la base genética y los mecanismos de resistencia asociados con algunos antibióticos son todavía desconocidos (Hummel et al., 2007).

La mayoría de los lactobacilos incluyendo *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. plantarum* son resistentes a la vancomicina (Sutula, Coulthwaite, & Verran, 2012), también la resistencia a este antibiótico ha sido reportada para cepas de *L. fermentum* (Tulumoğlu et al., 2014). Otros estudios han encontrado resistencia a antibióticos de cepas con potencial probiótico como lo reporta Das et al. 2016 para bacterias ácido-lácticas (*L. casei*) presentando resistencia a kanamicina, gentamicina, vancomicina, ampicilina, penicilina, tetraciclina y estreptomina (Das et al., 2016).

Los numerosos estudios sobre la resistencia a antibióticos encontrada en muchas cepas probióticas pueden ser la consecuencia de un uso extensivo de antibióticos, lo que ha creado una presión selectiva positiva para mutaciones puntuales y la adquisición de elementos genéticos móviles que codifican la resistencia antimicrobiana y conducen a la propagación de una variedad de factores que influyen en la resistencia a los antimicrobianos (Toscano et al., 2017).

La capacidad de antagonismo frente a patógenos intestinales por probióticos es uno de los mecanismos funcionales de estas bacterias (Chen & Sears, 2014). En este estudio las cepas comerciales no presentaron antagonismo frente a ninguno de los patógenos Gram positivos y Gram negativos. La actividad antimicrobiana de las bacterias del ácido láctico se debe a una serie de metabolitos, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas. Estos resultados pudieron deberse a que la producción de estas

sustancias es mediada por la interacción en el medio ambiente con otras bacterias y las cepas evaluadas fueron cultivos puros que pasaron por condiciones de estrés estructural (microorganismos liofilizados) (Tripathi & Giri, 2014), que pudieron evitar la generación de mecanismos de antagonismo (bacteriocinas, etc.).

Se ha demostrado que la inhibición de las bacterias patógenas por los probióticos es una combinación orquestada de estructura y función., las bacteriocinas, compuestos antibacterianos producidos por probióticos, pueden ser antagonistas dentro de un espectro específico, inhibiendo incluso otras cepas de Lactobacilos. Por lo tanto, la práctica de combinar probióticos debe incluir bacterias beneficiosas que no inhiban otras cepas incluidas en las matrices alimentaria (Drisko, Giles, & Bischoff, 2003).

La producción de mecanismo de antagonismo frente a patógenos por parte de lactobacilos es relativo a cada especie, recientemente los genomas completos de 13 cepas de *Lactobacillus* fueron analizados y comparados (Zoumpoulou, Pot, Tsakalidou, & Papadimitriou, 2016) Se observaron diferencias marcadas con relación a su capacidad para catabolizar la fructosa o glucosa, su defensa contra el estrés oxidativo, su producción de bacteriocinas (Zoumpoulou et al., 2016).

Se ha reportado que cepas de *L. fermentum* aisladas de productos fermentados (pasta de mijo) presentan actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Owusu-Kwarteng, Tano-Debrah, Akabanda, & Jespersen, 2015). Bacteriocinas como SB93 de cepas de *L. casei* aisladas de muestras marinas han mostrado acción antiadhesiva (1 mg/mL) oscilando con valores entre 85% contra *S. aureus* y 80% contra *E. coli* y *B. cereus*, (Das et al., 2016).

La producción de bacteriocinas también puede ser afectada por condiciones de crecimiento de las bacterias. En algunos casos la cepa de *Lactococcus lactis ssp. lactis* HV219 produce la bacteriocina bachHV219 activa contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *L. casei*, *Listeria innocua*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad se pierde cuando se trata con enzimas proteolíticas, pero no cuando se incubaba a pH 2,0-10,0 o se calienta a 121°C durante 20 minutos (Todorov et al., 2007).

Se seleccionó como cepa de trabajo al cultivo comercial probiótico *L. casei*, debido a los resultados en las pruebas anteriormente descritas, para la inclusión en una bebida de frutos rojos (FR) no fermentada en condiciones de refrigeración con dos tratamientos: la bebida con adición de IN al 1% y otra sin inclusión de prebiótico (Figura 3-2).

Mediante una cinética de crecimiento se encontró que la inclusión de inulina afectaba significativamente el crecimiento de *L. casei* en la bebida de frutos rojos. En condiciones de refrigeración (4°C) se buscó determinar si la adición del prebiótico podría tener el mismo efecto. El análisis estadístico confirmó que la inulina al 1% tiene un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la viabilidad del probiótico en la bebida de FR en condiciones de almacenamiento en comparación con el tratamiento sin inulina hasta el día 19 de almacenamiento (Ver Figura 3-7).

La viabilidad al final del almacenamiento fue de 5,79 y de 4,42 Log UFC mL<sup>-1</sup> para los tratamientos con inulina al 1% y sin prebiótico respectivamente. La densidad celular recomendada para un alimento probiótico (aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) (Hill et al., 2014) fue hasta el día doce de almacenamiento para ambos tratamientos (Tratamiento 1: 7,15±0,19; tratamiento 2: 6,14±0,04 Log UFC mL<sup>-1</sup>).

Estudios sobre bebidas de frutos rojos con probióticos demuestran que la formulación de la bebida y el ajuste del pH en el producto final son claves para la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento, por ejemplo, en la evaluación del efecto de la refrigeración en la viabilidad de una cepa nativa de *L. casei* (T4), en una bebida de cereza se encontró que la viabilidad se mantuvo en el jugo con un ajuste de pH a valores superiores a 3,5 por un periodo de 28 días en comparación con las bebidas sin ajustar el pH (2,5) que perdieron totalmente su viabilidad a los siete días de almacenamiento. Demostrando que el pH es un factor crítico en el diseño de una bebida funcional a base de frutos rojos con adición de probióticos (Nematollahi, Sohrabvandi, Mortazavian, & Jazaeri, 2016).

*L. casei* como probiótico en bebidas de fruta ha mostrado resultados satisfactorios en términos de viabilidad durante el almacenamiento demostrando que las bebidas de fruta pueden ser vehículos de inclusión para los probióticos como lo sugiere estudios realizados por Pereira et al. 2011 en bebidas de marañón con adición de *L. casei* NRRL B-442 pudieron optimizar las condiciones del cultivo en jugo de marañón, como la cantidad

apropiada del inóculo y el tiempo de fermentación. Además, estos autores investigaron la capacidad de supervivencia de *L. casei* en jugo de marañón durante el almacenamiento refrigerado (4°C) durante 42 días.

Las bebidas con mezclas de frutas han demostrado ser matrices adecuadas para los probióticos, un estudio realizado por Champagne *et al.* 2008 en donde evaluaron *L. rhamnosus* R0011 inoculado en una bebida tipo mezcla de manzana, frambuesa y pera durante 28 días en condiciones de almacenamiento simulando las condiciones de consumo. Se utilizaron botellas de tereftalato de polietileno de 1L. Las botellas se abrieron cada 7 días, y se tomaron muestras de 250 ml. Estos autores concluyeron que los consumidores pueden esperar una buena viabilidad de *L. rhamnosus* R0011 durante 28 días de almacenamiento en un refrigerador, incluso si las botellas han sido abiertas y las células están expuestas al oxígeno (Champagne, Raymond, & Gagnon, 2008). Se debe considerar el efecto protector de la inulina a las condiciones de refrigeración como moléculas protectoras evitando la muerte celular (de Souza Oliveira *et al.*, 2012; Elizabeth Tymczynszyn *et al.*, 2011; Karimi *et al.*, 2015). La fortificación de jugos de frutas con ingredientes funcionales novedosos como los prebióticos es un desarrollo reciente en la dirección de la creación de nuevos alimentos funcionales (Renuka *et al.*, 2009). Aunque se han publicado algunos estudios sobre los beneficios del uso de oligosacáridos en formulaciones de alimentos, se han publicado pocos estudios sobre su producción a gran escala (Lewandowski, 2015). Estudios realizados en jugo de marañón con oligosacáridos y *L. johnsonii* han demostrado el efecto prebiótico de estas sustancias. Se demostró mejor crecimiento de *L. johnsonii* en la bebida de marañón que en los medios cultivos que contenían únicamente glucosa y fructosa (Lewandowski, 2015).

Se ha demostrado en estudios realizados por Bedani *et al.*, 2014 que las pulpas frutas de origen tropical (mango y guayaba) al ser añadidas en yogur de soja (SY) pueden disminuir la supervivencia probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La-5 y *Bifidobacterium animalis* Bb-12 en condiciones gastrointestinales simuladas en el producto durante 28 días de almacenamiento a 4°C (Bedani *et al.*, 2014). Los resultados mostraron que todas las formulaciones mostraron viabilidades probióticas entre 8 a 9 Log UFC/g (Bedani *et al.*, 2014). Las pulpas de fruta disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) la supervivencia probiótica al simular el estrés gastrointestinal (Bedani *et al.*, 2014).

Una alternativa para mejorar la estabilidad de estos microorganismos en este tipo de bebidas durante el almacenamiento es la micro-encapsulación mejorando la viabilidad de los probióticos en este tipo de bebidas tan agresivas por su pH y composición (Sheehan et al., 2007), adicionalmente pueden mejorar la supervivencia de las bacterias probióticas cuando se exponen a condiciones ácidas, sales biliares y a tratamientos térmicos leves (Tripathi & Giri, 2014). La micro-encapsulación con agentes prebióticos como la inulina puede ser tan bien útil, estudios de Montes, 2013 evidenciaron que el uso de prebióticos como agentes protectores (Inulina-FOS) durante el liofilizado y durante el almacenamiento favorecieron la supervivencia de los microorganismos *L. casei* y *L. rhamnosus*, al formar una fase amorfa en la superficie que favoreció su estabilidad (Montes Ramírez, 2013). El autor señala que el uso del material micro-encapsulado con este tipo de sustancias prebióticas (inulina), como ingrediente estaría condicionado al tipo de matriz alimenticia. En medios acuosos, la solubilidad de la cápsula podría poner en riesgo la supervivencia del microorganismo sino se trata de un alimento para consumo recién reconstituido, en matrices con características sólidas y baja actividad de agua muy probablemente la estabilidad del material encapsulado podría prolongarse (Montes Ramírez, 2013).

En referencia a la evaluación de los parámetros fisicoquímicos de los tratamientos de las bebidas durante el almacenamiento, el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ) durante el almacenamiento de la bebida de FR para las variables de pH y acidez, la estabilidad en estas propiedades, al no tener cambios significativos pudo deberse al metabolismo del microorganismo y a las condiciones de refrigeración (Tripathi & Giri, 2014). No se presentó la producción de ácido láctico en ninguno de los tratamientos evaluados durante el almacenamiento (Tabla 3-9), sin embargo, se encontró ácido cítrico en los tratamientos 2 (0,46% m/m) y en el 3 (0,48% m/m), autores como Mousavi et al. 2011 reportaron que el ácido láctico en el jugo de granada después de 72 horas de fermentación osciló entre 2 y 6 g / L para diferentes cepas de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* y *L. paracasei*), siendo el ácido cítrico la principal fuente de energía, debido al bajo contenido de azúcar en el jugo de granada. Igualmente, este autor con relación a los azúcares encontró resultados similares a este estudio, un rápido consumo de glucosa y fructosa presente en el jugo de granada, siendo metabolizada por todas las cepas evaluadas (Mousavi et al., 2011). En general se recomienda evitar la sobre acidificación del producto durante la vida útil para

prevenir efectos sensoriales adversos y la reducción drástica de los probióticos en dosis inferiores a las recomendadas ( $10^7$  UFC/mL) (Ross & Preedy, 2016; Tripathi & Giri, 2014). El pH final debe mantenerse por encima de 4,6 para evitar la disminución de las poblaciones de los microorganismos Probióticos (Ross & Preedy, 2016), el pH de la bebida en estudio fue inferior a esta recomendación debido a la naturaleza de las frutas utilizadas.

La composición química de la bebida pudo ser un factor crítico en la viabilidad de *L. casei* en los tratamientos evaluados durante el almacenamiento. Los frutos rojos como la fresa y la mora son ricos en polifenoles antioxidantes incluyendo ácidos fenólicos y flavonoles (Shahidi & Alasalvar, 2016), por ejemplo, se ha informado que el contenido total de fenoles y flavonoides de los polvos liofilizados a partir de jugo de fresa (sobrenadantes de fresa fresca) es de 20,9 y 0,87 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/ g de polvo liofilizado, respectivamente (Shahidi & Alasalvar, 2016).

El efecto de los fenoles en el crecimiento microbiano todavía se debate, ya que podrían actuar como antimicrobianos o como agentes protectores (Mariantonietta Succi et al., 2017). Los autores Succi et al., 2017 evaluaron la viabilidad de diferentes cepas probióticas liofilizadas de tipo comercial (Dicoflor<sup>®</sup>, Genefilus<sup>®</sup>, Enterolactis<sup>®</sup> y Reuterin<sup>®</sup>), en chocolate negro con un 80% de cacao y un alto contenido de fenoles totales (20,81 mg equivalentes ECE/ g). Los resultados mostraron que la capacidad de supervivencia de los probióticos en chocolate negro almacenado a 18 °C durante 90 días es un carácter dependiente de la cepa y está fuertemente influenciada por el modo de inóculo, mientras que los fenoles no parecen influir en la supervivencia (Mariantonietta Succi et al., 2017). Se ha mostrado que el crecimiento y la viabilidad de las bacterias del ácido lácticas, en particular *L. plantarum* es estable en los materiales vegetales donde abundan los compuestos polifenólicos (Di Cagno et al., 2008), sin embargo, estudios realizados por Di Cagno et al., 2011 en bebidas tipo smoothies de frutos rojos con adición de bacterias ácido lácticas como cultivos iniciadores el efecto dependió de la concentración y tipo de compuestos, la inhibición parcial del crecimiento sólo se observó con la concentración de compuestos polifenólicos totales por encima de 1 g/ kg (Di Cagno et al., 2011).

Los resultados también evidencian el efecto de la inulina al 1% sobre los sólidos solubles

totales en las bebidas de FR ( $p < 0,05$ ) en lo cual se encontró un aumento en el contenido de sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix) en las bebidas con FR con IN (tratamientos 1 y 3) respecto a las que no contenían el prebiótico (tratamientos 2 y 4) independiente del crecimiento de *L. casei*. Resultados similares se han observado en la formulación y caracterización de néctares de papaya con inulina (Orafti®P95) lo cual confiere una mayor aceptación sensorial (Braga & Conti-Silva, 2015) Estos resultados indican las principales fuentes de carbono y energía para *L. casei* fueron glucosa y fructosa, mientras que la inulina es fermentada (Tabla 2-1). En estudios realizados por Valero y Frutos, 2017 reportaron una disminución de los monosacáridos durante el tiempo de fermentación y los primeros ocho días de almacenamiento en una bebida tipo mezcla de zanahoria con naranja con inulina al 1% y 2 % y *Lactobacillus plantarum* CECT 220. Sin embargo, en el mismo período de almacenamiento, las muestras de control (sin inulina) mostraron una disminución en la concentración de glucosa y fructosa como única fuente de energía. Después de 15 días, la viabilidad de *L. plantarum* CECT 220 fue mayor para muestras con inulina (Valero-Cases & Frutos, 2017b).

Es importante señalar que jugos de frutas y hortalizas, la tolerancia a la acidez es particularmente importante. Estos jugos son ya naturalmente ácidos (Yoon et al., 2006). El proceso de fermentación aumenta la acidez. Yoon et al. 2006 han informado sobre la capacidad de *L. plantarum*, *L. delbrueckii* y *L. casei* para sobrevivir en el jugo de col. Se encontró que tres cepas de *L. plantarum* y *L. delbrueckii* son capaces de crecer y mantener buenos niveles de viabilidad durante varias semanas de almacenamiento, resistiendo al bajo pH, alta acidez, y al almacenamiento refrigerado a 4°C, con excepción de *L. casei*, que pierde su viabilidad después de 2 semanas de almacenamiento (Yoon et al., 2006).

Se determinó el color de las bebidas de FR durante el almacenamiento y el posible efecto sobre esta característica con relación a la adición de los probióticos (Tabla 3-10). El ojo humano cuando aprecia el color de un objeto no distingue separadamente la cantidad de “verde-rojo”, de “amarillo-azul” o de “claridad”, sino que percibe un color considerando integralmente la luminosidad, la pureza (croma) y el tono por ello, en muchos casos no resulta intuitivo analizar la evolución de los valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  por separado (Houhg & Fiszman, 2005). Así en los resultados obtenidos en este estudio, carece de sentido afirmar que después de un período de almacenamiento existe un aumento del “rojo” de la bebida porque se registró un aumento en los valores de  $a^*$ , cuando sensorialmente sólo se aprecia

un color más o menos típico de esta clase de bebidas de frutos rojos (Houhg & Fiszman, 2005). Por tal motivo para poder inferir sobre un cambio en la pigmentación roja debido a la inestabilidad de las antocianinas responsables de la coloración características de estas bebidas (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000), se calculó la diferencia del color ( $\Delta E$ ). Los resultados indicaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes tratamientos a través de los 21 días de almacenamiento de la bebida de frutos rojos. Se debe considerar que valores de  $\Delta E$  superiores a 2 pueden tener una diferencia visual susceptible al ojo humano (Lee & Coates, 2003), en este estudio se encontraron valores que indican cambios de color por la adición de probióticos y prebióticos, además se debe considerar el efecto de las condiciones de almacenamiento (empaquete) y de los procesos térmicos en la elaboración del producto (Chuchuca, Dick, & Peñafiel, 2012; Lee & Coates, 2003).

Estudios de Randazzo *et al*, 2013 en mermeladas de durazno con *L. rhamnosus* durante el almacenamiento a diferentes temperaturas encontraron que los cultivos probióticos añadidos al producto no cambiaron significativamente los parámetros de color; sin embargo, el metabolismo de lactobacilos causó cambios en el pH y en la composición de los azúcares (Randazzo & Pitino, 2013). Mientras que en estudios realizados por Pereira *et al*. 2011 en jugos de marañón con probióticos los valores de luminosidad, la intensidad del color (tonalidades amarillas) y cambio de color total aumentaron mientras el matiz (tonalidades rojizas) se redujeron a lo largo de los periodos de fermentación y almacenamiento en refrigeración. El producto también mostró buena aceptación en una evaluación sensorial preliminar (Pereira *et al.*, 2011).

En el desarrollo de smoothies funcionales con frutos rojos fermentados (sin prebióticos) con bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sp.* and *Lactobacillus pentosus*) aislados de las frutas (mora, ciruelas y pasas) encontrando que la diferencia de color  $dE^*_{ab}$  fue positivamente afectados por la fermentación con bacterias ácido lácticas, después de 30 días de almacenamiento (Di Cagno *et al.*, 2011).

Se ha reportado que en jugos comerciales de fresa los parámetros de color (CIELAB  $L^*$  a  $b^*$ ) de luminosidad ( $L^*$ ), enrojecimiento ( $a^*$ ) y ausencia de color ( $b^*$ ) fueron de 28, 44,8 y 33,7, respectivamente (Shahidi & Alasalvar, 2016) Sin embargo, el color del jugo de fresa, un indicador de calidad y grado de deterioro, es altamente inestable y muy susceptible a la

degradación (Shahidi & Alasalvar, 2016). La tasa de degradación del color del concentrado de fresa (65 °Brix) es mayor en comparación con las bebidas tipo jugo (8°Brix) (Shahidi & Alasalvar, 2016). La estabilidad del color es afectada por las condiciones de procesamiento incluyendo luz, pH, oxígeno, enzimas, tratamiento térmico, iones metálicos y otros componentes tales como productos de degradación de las antocianinas (Shahidi & Alasalvar, 2016). La alta cantidad de ácido ascórbico en jugo de fresa también puede contribuir a la degradación de las antocianinas (Shahidi & Alasalvar, 2016).

Finalmente el control de calidad del producto final fue satisfactorio, debido a las Buenas Prácticas de Manufactura y al proceso térmico de esterilización que elimina efectivamente la presencia de la mayoría de microorganismos presentes en las frutas (Ashurst & Hargitt, 2009; Shahidi & Alasalvar, 2016). Tampoco se encontró contaminación de hongos y levaduras. Los recuentos de mesófilos hacen referencia a las bebidas de FR que fueron inoculados con *L. casei*.

El pH de estas bebidas y el contenido de sustancias con posibles propiedades antimicrobianas (ácido benzoico) beneficia la protección contra posibles microorganismos contaminantes (Lewandowski, 2015; Shahidi & Alasalvar, 2016; Sheehan et al., 2007), además se ha reportado que *L. casei* en bebidas fermentadas de marañón puede controlar el crecimiento microbiano, evitando los costos con tratamiento de térmicos, así como sus efectos adversos, como las pérdidas nutricionales y el cambio sensorial (Pereira et al., 2011).

En conclusión, la bebida de FR puede considerarse un vehículo de inclusión de probióticos y prebióticos bajo condiciones de almacenamiento (regeneración 4°C), manteniendo la estabilidad microbiológica hasta el día 12 de almacenamiento (densidad celular óptima igual o superior a  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>). Sin embargo, se evidenció una estabilidad fisicoquímica sin cambios significativos en los parámetros fisicoquímicos y sin evidenciar según los análisis de HPLC presencia de ácido láctico. Estas condiciones pudieron deberse posiblemente tanto por el metabolismo del microorganismo (*L. casei*) como por las características de sustrato de la matriz (bebida de frutos rojos) que condicionaron el crecimiento del microorganismo. Es recomendable en próximos ensayos evaluar el contenido de fenoles de la bebida y su posible efecto sobre la viabilidad del microorganismo, los parámetros fisicoquímicos como: acidez, sólidos solubles, contenido de azúcares, pH y percepción sensorial del producto durante y al final del almacenamiento.

### 3.5 Conclusiones

- *L. casei* difiere en la supervivencia a sales biliares y al pH ácido respecto a las otras cepas, razón por la cual se seleccionó como cepa de trabajo.
- Se encontró que la inulina 1% ( $p < 0.05$ ) afectó significativamente la viabilidad del probiótico en la bebida de FR durante el tiempo de almacenamiento en condiciones de refrigeración (4°C).
- La bebida de Frutos rojos puede considerarse vehículo de inclusión de probiótico con la adición de inulina al 1% por periodo no mayor a 12 días, mostrando estabilidad tanto microbiológica como fisicoquímica bajo condiciones de refrigeración (4°C).
- No hubo producción de ácido láctico en el almacenamiento de la bebida de FR inoculada con *L. casei* independiente de la adición de inulina al 1%, la fuente principal de energía para los probióticos pudo ser la glucosa y la fructosa.
- La inclusión del probiótico *L. casei* en la bebida de Frutos rojos puede tener cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en el color de la bebida de FR ( $\Delta E$ ) durante el almacenamiento por un periodo de tres semanas (21 días) en condiciones de refrigeración (4°C).
- El almacenamiento y el pH de la bebida de FR pueden ejercer un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la capacidad probiótica de la cepa logrando una adaptación a condiciones más ácidas.

### 3.6 Bibliografía

Adebola, O. O., Corcoran, O., & Morgan, W. a. (2014). Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *Journal of Functional Foods*, 10, 75–84.

Angmo, K., Kumari, A., Savitri, & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 428–435.

Annunziata, A., & Vecchio, R. (2013). Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. *Food Quality and Preference*, 28(1), 348–355.

AOAC. (2012). Organic acids in fruit juices. In G. Latimer (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (19th Editi, pp. 14–15).

Ashurst, P. R., & Hargitt, R. (2009). *Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved*. Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved.

Bedani, R., Vieira, A. D. S., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2014). Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 436–443.

Bertazzoni Minelli, E., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Dellaglio, F. (2004). Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal*, 14, 723–736.

Braga, H. F., & Conti-Silva, A. C. (2015). Papaya nectar formulated with prebiotics: Chemical characterization and sensory acceptability. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 854–860.

Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41(5), 539–543.

Champagne, C. P., Raymond, Y., & Gagnon, R. (2008). Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. *Journal of Food Science*, 73(5), 221–226.

Chen, L. A., & Sears, C. L. (2014). 3 - Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edi). Elsevier Inc.

Chuchuca, G., Dick, A., & Peñafiel, J. (2012). Implementación y validación de una metodología económica para la medición de color aplicada en alimentos. Escuela superior Politécnica del litoral, Facultad de ingeniería.

Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192–1206.

Cramer, A. D., Rogers, E. R., Parker, J. W., & Lukes, R. J. (1973). The Giemsa stain for tissue sections: an improved method. *American Journal of Clinical Pathology*, 60(2), 148–156.

Das, P., Khowala, S., & Biswas, S. (2016). In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 383–390.

De Souza Oliveira, R. P., Perego, P., de Oliveira, M. N., & Converti, A. (2012). Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 358–363.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, a R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition* (Vol. 40).

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1–10.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28(5), 1062–71.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 220–228.

Drisko, J. a, Giles, C. K., & Bischoff, B. J. (2003). Probiotics in health maintenance and isease prevention. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 8(2), 143–55.

Fijalkowski, K., Peitler, D., Rakoczy, R., & Zywicka, A. (2016). Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 322–328.

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(S2), S35–S50.

García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44, 220–225.

Gomes, L. M. M., Petito, N., Costa, V. G., Falcao, D. Q., & De Lima Araújo, K. G. (2014). Inclusion complexes of red bell pepper pigments with cyclodextrin: Preparation, characterization and application as natural colorant in yogurt. *Food Chemistry*, 148, 428–436.

Guarner, F., Khan, A et al (2012). World Gastroenterology Organization Global Guidelines: probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(6), 36.

Hellström., M. P., Grybäck, P., & Jacobsson, H. (2006). The physiology of gastric emptying. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 20(3), 397–407.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E.

(2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.

Houhg, G., & Fiszman, S. (2005). *Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos* (Primera ed). Valencia, España.

Hui, Y. H. (2006). *Handbook of Food Products Manufacturing*. Handbook of Food Products Manufacturing (Vol. 1–2).

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730–739.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Icontec. (2012). NTC NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 5468: jugo (zumo), pulpa, néctar de frutas y concentrado. Bogotá, DC.

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. INVIMA. (1998). *Manual de técnicas de análisis para el control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano*. (D. G. Holguín M, Higuera M, Rubio B, Vargas M, Muñoz A, Ed. Bogotá, DC: INVIMA.

Karimi, R., Azizi, M. H., Ghasemlou, M., & Vaziri, M. (2015). Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119, 85–100.

Lee, H. S., & Coates, G. A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *LWT - Food Science and Technology*, 36(1), 153–156.

Lewandowski, C. M. (2015). *Advances in Fruit Processing Technologies*. The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference (Vol. 1).

Matsumoto, M., Ohishi, H., & Benno, Y. (2004). H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Bifidobacterium* with

special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 109–113.

Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Resolución 3929 de 2013 (2013). Colombia.

Montes Ramírez, L. M. (2013). efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469) Universidad Nacional de Colombia.

Mori, K., Yamazaki, K., Ishiyama, T., Katsumata, M., Kobayashi, K., Kawai, Y., Shinano, H. (1997). Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1), 54–7.

Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2011). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 123–128.

Nematollahi, A., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., & Jazaeri, S. (2016). Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 49–53.

Nithya, S., & Vasudevan, A. (2016). Effect of lactic acid bacteria in development of papaya juice using response Surface methodology. *International Journal of Biotechnonology and Biochemistry*, 12(1), 27-32.

Ohland, C. L., & Macnaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Gastrointestinal Liver Physiology*, 298(167), G807-819.

Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F., & Jespersen, L. (2015). Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. *BMC Microbiology*, 15, 261.

Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., & Zhao, Z. (2009). The acid, bile tolerance and

antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, 20(6), 598–602.

Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44(5), 1276–1283.

Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015). Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. *Beverages*, 1, 95–103.

Perricone, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Speranza, B., & Bevilacqua, A. (2014). Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. *Journal of Functional Foods*, 10, 421–426.

Pimentel, T. C., Madrona, G. S., Garcia, S., & Prudencio, H. (2015). Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT - Food Science and Technology*.

Rai, V., & Bai, J. (2015). Probiotics and Prebiotics in Fruits and Vegetables: Technological and Sensory Aspects. In *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods* (p. 20). Taylor & Francis Group.

Randazzo, C., & Pitino, I. (2013). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Science and Technology*, 33(4), 652–659.

Reale, A., Di, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., ... Coppola, R. (2014). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 1–8.

Renuka, B., Kulkarni, S. G., Vijayanand, P., & Prapulla, S. G. (2009). Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 1031–1033

Ross, R., & Preedy, V. (2016). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: BIOACTIVE FOODS IN

HEALTH PROMOTION. (R. Ross & V. Preedy, Eds.), *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 111). London UK: Elsevier Inc.

Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P., & Mättö, J. (2006). Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, 16(12), 1477–1482.

Savo Sardaro, M. L., Levante, A., Bernini, V., Gatti, M., Neviani, E., & Lazzi, C. (2016). The *spxB* gene as a target to identify *Lactobacillus casei* group species in cheese. *Food Microbiology*, 59, 57–65.

Serna, J. A. (2012). Elaboración de jugos de fruta con adición de bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico. Universidad de la Sabana.

Shahidi, F., & Alasalvar, C. (2016). *Handbook of Functional Beverages and Human Health*.

Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 279–284.

Shoaf, K., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., & Hutkins, R. W. (2006). Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 74(12), 6920–6928.

Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1–8.

Souza, C. H. B. de, Gioielli, L. A., & Saad, S. M. I. (2017). Inulin increases *Bifidobacterium animalis* Bb-12 *in vitro* gastrointestinal resistance in margarine. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 205–212.

Succi, M., Tremonte, P., Pannella, G., Tipaldi, L., Cozzolino, A., Coppola, R., & Sorrentino, E. (2017). Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static *in vitro* digestion model. *Journal of Functional*

Foods, 35, 60–67.

Succi, M., Tremonte, P., Reale, a., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., & Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 129–137.

Sutula, J., Coulthwaite, L., & Verran, J. (2012). Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. *Journal of Microbiological Methods*, 90(1), 65–71.

Todorov, S. D., Botes, M., Danova, S. T., & Dicks, L. M. T. (2007). Probiotic properties of *Lactococcus lactis ssp. lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *Journal of Applied Microbiology*, 103(3), 629–639.

Toscano, M., De Grandi, R., Pastorelli, L., Vecchi, M., & Drago, L. (2017). A Consumer's Guide for Probiotics: 10 Golden Rules for a Correct Use. *Digestive and Liver Disease, Digestive*.

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.

Tulumoğlu, Ş., Kaya, H. I., & Şimşek, Ö. (2014). Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. *Anaerobe*, 30, 120–125.

Tuo, Y., Zhang, W., Zhang, L., Ai, L., Zhang, Y., Han, X., & Yi, H. (2013). Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Anaerobe*, 21, 22–27.

Tymcyszyn, E., Gerbino, E., Illanes, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Cryobiology*, 62(2), 123–129

Valero-Cases, E., & Frutos, M. J. (2017). Effect of Inulin on the Viability of *L. plantarum* during Storage and *in Vitro* Digestion and on Composition Parameters of Vegetable Fermented

Juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1–7.

Vandenplas, Y., Huys, G., & Daube, G. (2015). Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria*, 91(1), 6–21.

Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6112–6124.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2006). Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97(12), 1427–30.

Zárate, P., Jiménez, C., Badillo, J., Garibay, C., & Oliver, M. (2009). Manual del laboratorio de biotecnología molecular. (I. P. Nacional & U. P. I. de B. L. de B. Molecular, Eds.).

Zoumpoulou, G., Pot, B., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (2016). Dairy probiotics: Beyond the role of

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

En los diferentes ensayos de capacidad probiótica *in vitro* se encontró que *L. casei* difiere en la resistencia a sales biliares (2%p/v) y al pH ácido (2,5) respecto a las otras cepas, razón por la cual se seleccionó como cepa de trabajo para la inclusión en la bebida de frutos rojos igualmente se determinó un efecto de la matriz (pH) sobre la capacidad probiótica en condiciones *in vitro* de *L. casei* permitiendo la adaptación en la bebida de frutos rojos, mejorando su capacidad de tolerar la acidez y manteniendo la tolerancia a las sales biliares.

Ninguna de las cepas comerciales en este estudio presentó funcionalidades específicas como capacidad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos debido a la pureza de los cultivos generando una baja presión ecológica para producir mecanismos de antagonismo. Igualmente, la resistencia a los antibióticos presentada por *L. casei* antes y después de ser inoculada en la bebida es un parámetro que debe ser determinado en pruebas con un listado mayor de antibióticos, verificando el efecto de la matriz al aumentar la resistencia.

Los resultados obtenidos en este estudio respecto a la adherencia intestinal mediante láminas de mucina humana en forma contraria a lo reportado por Serna, 2012, indican que la valoración por adherencia intestinal no puede realizarse por esta técnica posiblemente a que los mecanismos moleculares de los probióticos son desencadenados por interacciones entre las células microbianas y las células epiteliales en el sitio de aplicación. Se debe considerar que la adherencia se observa en las criptas del intestino

recubiertas por mucina donde se encuentran los sitios de competencia de espacio entre patógenos y microorganismos probióticos en condiciones *in vivo*.

La inclusión y viabilidad de un probiótico de tipo comercial (*Lactobacillus casei*) en una bebida de frutos rojos con una concentración de 35%p/v de fruta (mora y fresa) se logró a través de la adición de la papaya (5% p/v) como estabilizante natural del pH, la adaptación de la cepa (*L. casei*) por medio de la suplementación con la bebida de frutos rojos (10%) para la producción de inóculo y la adición prebióticos (inulina al 1%) que permitieron la viabilidad del microorganismo en condiciones de refrigeración (4°C) hasta un periodo de 12 días de almacenamiento manteniendo la calidad microbiológica del producto.

La formulación de la bebida de frutos rojos favorece las condiciones de sustrato para el microorganismo probiótico (*L. casei*) durante el almacenamiento, sin tener efectos significativos ( $p > 0,05$ ) sobre las características fisicoquímicas de la bebida (pH y acidez), a excepción de los sólidos solubles y el color. La adición de la inulina al 1% ejerció un efecto sinérgico como reserva energética de la cepa en condiciones fermentativas en la cinética de crecimiento y durante el almacenamiento a 4°C por un periodo de 12 días ( $7,15 \pm 0,19$  Log UFC mL<sup>-1</sup>).

## 4.2 Recomendaciones

- Verificación de la capacidad probiótica mediante pruebas *in vitro* y en simuladores gástricos de cepas comerciales y/o nativas antes y después de la inclusión de la matriz alimentaria con pruebas de capacidad antioxidante, inmunomodulación.
- Generación de trabajos a futuro sobre la evaluación del comportamiento de cultivos probióticos (comerciales y nativos) en productos como concentrados de frutos rojos (mermeladas, etc.).
- Es fundamental que la investigación sobre las formulaciones probióticas en bebidas de fruta se base en los microorganismos que muestran actividades sinérgicas y simbióticas *in vitro* para aumentar la posibilidad de proporcionar formulaciones funcionales más efectivas y justificar, de esta manera, el uso de este tipo productos.
- Es recomendable realizar análisis comparativo de la viabilidad de cultivos probióticos mediante citometría de flujo en la inclusión en productos de origen vegetal.

- Según los resultados de estudio la evaluación de la adherencia intestinal en condiciones *in vitro* es recomendable realizarla a través líneas celulares Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano y/o línea celular de carcinoma de colon humano (HT-29).
- Evaluar la microencapsulación de probióticos con agentes prebióticos para el desarrollo de productos a partir de frutos rojos permitiendo un aumento en la viabilidad microbiológica durante el almacenamiento y como barrera de protección frente al estrés gastrointestinal.



## Anexos

### A. Resultados Académicos

- Presentación de poster “**Evaluación del uso de Probióticos y Prebióticos en Bebidas y Concentrados de mora**”. *Autores:* Camila Andrea Bernal Castro y Consuelo Díaz -Moreno. Feria Académica del Jardín Botánico de Bogotá” José Celestino Mutis” en el marco de la convocatoria “Thomas Van Der Hammen”. Marzo de 2015. Bogotá- Colombia.
- Artículo corto aceptado en la Revista de Agronomía Colombiana: “**Avances en el desarrollo de bebidas de frutas tropicales con inclusión de probióticos: *in vitro***”. *Autores:* Camila Andrea Bernal Castro, Consuelo Díaz- Moreno, Pamela Camacho Barrera, Miguel Paramo Jiménez, Carolina Gutiérrez-Cortés. Presentación oral en el III Congreso Internacional de Investigación e Innovación en Ciencia y Tecnología de Alimentos IICTA2016. Noviembre 2 – 4, Bogotá, Colombia.
- Resumen de la presentación modalidad poster publicado en un número especial de la Revista AGRO SUR “**Efecto de la inclusión de prebióticos en la viabilidad de microorganismo probiótico en bebidas de frutos rojos**”. *Autores:* Camila Andrea Bernal Castro, Carolina Gutiérrez-Cortés y Consuelo Díaz- Moreno. “XXI Congreso Chileno de Ciencias y Tecnología de Alimentos SOCHITAL 2017” en la Universidad de los Andes en la ciudad de Santiago de Chile. Mayo 22 de 2017. Santiago de Chile- Chile.

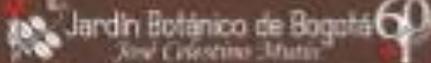
## Artículos sometidos

- Revista Chilena de Nutrición “*Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: avances en el desarrollo de bebidas de frutas*” Autores: Camila Andrea Bernal Castro, Carolina Gutiérrez-Cortés y Consuelo Díaz- Moreno. Marzo de 2017. Aceptado para publicación en agosto de 2017.
- Journal Food Science and Technology by the Association of Food Scientists and Technologists of India (AFSTI). Autores: Camila Andrea Bernal Castro, Carolina Gutiérrez-Cortés y Consuelo Díaz- Moreno. Julio de 2017. En el marco del Proyecto “Uso de bacterias ácido-lácticas para biopreservación y generación de nuevos productos con características probióticas” financiado por la Dirección de Investigación, Sede Bogotá–Universidad Nacional de Colombia



# ESTÍMULOS A LA INVESTIGACIÓN

Thomas van der Hammen




## Evaluación del uso de Probióticos y Prebióticos en Bebidas y Concentrados de mora

**CAROLINA ANDRÉS BARRACLOUGH**  
 Estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos – Universidad Nacional de Colombia  
 Dirección del trabajo de grado: Carolina Díaz Sáenz  
 Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, ICA, Universidad Nacional de Colombia  
 Colaboradora del trabajo de grado: Judith Figueroa  
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecia, Universidad Nacional de Colombia  
 Bogotá, 2017




**Resumen**

Colombia es un país considerado como un productor agrícola, debido a su ubicación geográfica. En Colombia se cultiva la mora de Castilla (Rubus glaucus Benth), nativo principalmente de la zona andina. Es importante tener la máxima aprovechabilidad de este fruto agro-industrial alternativo por medio de la generación de nuevos productos con el fin de satisfacer las demandas asociadas de los consumidores.

La investigación de nuevas formulaciones con características funcionales alternativas a los de origen animal, con acción probiótica es importante para satisfacer la creciente demanda del mercado y la obtención de nuevos productos, con mayor sostenibilidad más salud y con mayor potencial frente al sector farmacéutico.

La inclusión de cultivos probióticos de origen vegetal, ofrece ventajas, ya que los frutos son ricos en compuestos bioactivos como pigmentos, antioxidantes, vitaminas, minerales y fibra dietética entre otros.

El proyecto de investigación se encuentra centrado en la probabilidad de desarrollar productos con estos ingredientes mediante la inclusión de probióticos y añadir su cultivo con sustancias prebióticas como fibra y oligosacáridos en matrices de origen vegetal, en este caso en bebidas y concentrados a partir de la transformación tecnológica de la mora.

El objetivo de esta investigación es evaluar las condiciones de proceso, estabilidad y viabilidad de probióticos y prebióticos en bebidas y concentrados de mora.

**Materiales y métodos**

La metodología de esta investigación se encuentra clasificada en tres etapas:

- Evaluar la capacidad probiótica de los cultivos de origen vegetal y su capacidad de sobrevivir en la matriz.
- Desarrollar las condiciones de proceso para evaluar la viabilidad de probióticos y prebióticos en productos de origen vegetal.
- Evaluar la estabilidad microbiológica y fisicoquímica de productos derivados de mora durante el almacenamiento.

En el siguiente diagrama se describen los actividades involucradas en el proceso de la obtención de los probióticos y prebióticos en los productos derivados de la mora:

Selección de los cultivos probióticos de origen vegetal

Selección de los cultivos prebióticos de origen vegetal

Selección de la matriz vegetal para la obtención de los probióticos y prebióticos

Selección de las condiciones de proceso para la obtención de los probióticos y prebióticos en los productos derivados de la mora





**Resultados esperados**

- Obtención de las condiciones de proceso, estabilidad y viabilidad para la inclusión de probióticos y prebióticos en bebidas y concentrados de mora.
- Fijación de las condiciones de proceso.
- Obtención del modo de empleo en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia.

**Introducción**

Un alimento funcional con inclusión de probióticos es un producto que además de poseer características nutritivas también ofrece un efecto fisiológico en la salud del consumidor a través de los mecanismos de la microbiota digestiva.

La figura 1. muestra comparativa de los probióticos, prebióticos y simbióticos, según sus diferencias y características.

Probióticos	Prebióticos	Simbióticos
Microorganismos viables con actividad específica. Beneficia a la salud del consumidor.	Sustancias no digeribles que sirven como alimento para los microorganismos beneficiosos. Fuente: oligosacáridos, fibra, etc.	El alimento que contiene tanto probióticos como prebióticos.
Alimento de origen animal. Actúan en el intestino.	Alimento de origen vegetal. Actúan en el intestino.	Alimento de origen vegetal. Actúan en el intestino.
Sequencia de aminoácidos, ácidos grasos y vitaminas. Beneficia a la salud digestiva.	Polifenoles, oligosacáridos, etc. Beneficia a la salud digestiva.	Alimento de origen vegetal. Actúan en el intestino.
Beneficia al sistema digestivo.	Beneficia al sistema digestivo.	Beneficia al sistema digestivo.
Indica participación en matrices de origen animal.	En matrices de origen vegetal.	Desarrollados para la inclusión en matrices vegetales.

**Referencias**

Organización Mundial de Comercio. (2014). Comercio Internacional de Alimentos y Bebidas. Organización Mundial de Comercio. Ginebra, Suiza.

Organización Mundial de Comercio. (2014). Comercio Internacional de Alimentos y Bebidas. Organización Mundial de Comercio. Ginebra, Suiza.

Organización Mundial de Comercio. (2014). Comercio Internacional de Alimentos y Bebidas. Organización Mundial de Comercio. Ginebra, Suiza.

Organización Mundial de Comercio. (2014). Comercio Internacional de Alimentos y Bebidas. Organización Mundial de Comercio. Ginebra, Suiza.



XXI Congreso Chileno de Ciencias y Tecnología de Alimentos  
SOCHITAL 2017

Santiago, Abril de 2017

Estimados Autores

Junto con saludar el Comité Científico del XXI Congreso Chileno de Ciencias y Tecnología de Alimentos SOCHITAL 2017 se complace en informar que el trabajo titulado "EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE PREBIÓTICOS EN LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMO PROBIÓTICO EN BEBIDAS DE FRUTOS ROJOS", de los autores C. Bernal Castro; C. Gutiérrez-Cortés y C. Díaz-Moreno, ha sido aceptado para ser presentado en este congreso bajo la modalidad POSTER.

Su trabajo será incluido en el Programa Final una vez haya sido registrada su inscripción en el Congreso. Para ello recordamos que contamos con tarifas rebajadas en el costo de inscripción hasta el día 06 de Mayo del presente año.

Su trabajo ha sido identificado con el código MB8

Agradeciendo su interés en participar de este evento científico, le saludamos muy atentamente

Dr. Rommy Zuñiga P.  
Director Comité Científico  
SOCHITAL 2017

Dr. Javier Enríque C.  
Presidente  
SOCHITAL 2017

# B. Anexo: Anexo: Fichas técnicas de cepas probióticas comerciales



## BIO RHM

### TECHNICAL DATA SHEET Rev. 01/2022

**Culture Composition:** *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

**Form:** Freeze-dried DVS

**Applications:** Probiotics

**Packaging:** 10DU  
**Dosage:** 1 units/100-200 liters

**Primary packaging:** PET-ALU-PE  
**Storage conditions:** Store product in original packaging and unopened packages at 2-8°C

**Shelf-life and Best before date:** 12 months under storage conditions. BBD is printed on the label

### TECHNICAL SPECIFICATIONS

**Cell count concentration:**  $\geq 3000 \times 10^9$  cfu/10DU

### MICROBIAL SPECIFICATIONS

Salmonella spp	Absent /25g
Listeria monocytogenes	Absent /25g
Yeast and moulds	<10 cfu/g
Non-lactic acid bacteria	<500 cfu/g
Staphylococci coag. Positive	<10 cfu/g
Enterobacteriaceae	<10 cfu/g

Recommended analysis methods used for analysis of microbiological criteria are reported in Annex A of ISO 27205:2018, IDF 148:2010.

### OTHER INFORMATIONS

The supplied products are not and do not contain or consist of GMO; moreover they are not produced from GMO or do not contain ingredients produced from GMO, according to Regulation (EC) no. 1829/2003 and Regulation (EC) no. 1831/2003.

CULTURES DIVISION  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Página 1 de 2

Fecha de actualización: 21 de octubre de 2014



PRODUCT DESCRIPTION - PD 232784-3.0ES

Código del producto 1261967

## L. paracasei LYO 50 DCU-S

### Descripción

Un cultivo probiótico liofilizado en la forma de polvo para la aplicación de alimento (S= peso estandarizado)

### Instrucciones de uso

Desinfecte el sachet con sanífler apropiado antes de abrir.

Abra el sachet y agregue la cultura directamente al producto. Agite o mezcle para aproximadamente 30 minutos en la velocidad baja.

### Composición

Lactobacillus paracasei  
Soporte: dextrosa

### Especificaciones microbiológicas

Control de calidad Microbiológico-métodos y valores estándares.

Recuento celular:	$\geq 5.0E+12$ CFU/bolsa**
Bacteria no ácido láctico	< 500 CFU/g
Enterobacterias	< 10 CFU/g
Levaduras y Mohos	< 10 CFU/g
Enterococci	< 100 CFU/g
Coagulase-positivo staphylococci	< 10 CFU/g
Salmonella spp	neg. / 25 g
Listeria monocitogenes	neg. / 25 g

Los métodos analíticos están disponibles por la petición  
\*\* 1 DCU =  $1.2E+11$  CFU (Unidad Formadora de Colonias)

### Almacenamiento

Refrigere en recibo.

El período de conservación es 12 meses cuando almacenado (abajo de 4° C) en la paquete original y cerrado.

### Embalaje

folio laminado PE, PET Al

### Cantidad

Contenido  $\geq 50$  DCU / bolsa  
Este producto tiene el peso estandarizado de 50 g

### Pureza y legislación

L. paracasei LYO 50 DCU-S responde a las exigencias impuestas por la legislación de la Unión Europea.

Las regulaciones locales deben ser siempre consultadas en relación al estatus del producto, ya que la legislación sobre el uso del producto en alimentación puede variar de país en país.

### Seguridad y manipulación

La ficha de seguridad está disponible bajo petición.

### Certificación Kosher

Kosher lacteo

### Certificación Halal

certificado por Halal Food Council of Europe (HFCE)

Los datos que se incluyen en esta publicación son el resultado de nuestros propios trabajos de investigación y desarrollo y son válidos a nuestro mejor saber y entender. No obstante, los usuarios deben realizar sus propios ensayos para determinar la idoneidad de nuestros productos a sus objetivos comerciales y la situación legal para el uso previsto. La información aquí recogida no debe considerarse como garantía alguna, expresa o implícita, y no se acepta responsabilidad alguna por infracciones de terceros patentes.

CULTURES DIVISION  
www.danisco.com

Página 1 / 2

Fecha de actualización: 30 de noviembre de 2010



## PRODUCT DESCRIPTION - PD 225973-4.0ES

Código del producto 1250491

### HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU HOWARU® Premium Probiotic

#### Descripción

Cultivo concentrado liofilizado para inoculación directa en leche.

Cultivo mono-cepa

#### Instrucciones de uso

Desinfectar el área de abertura con etanol (aprox. 70 %) antes de abrir el envase. Cortar y adicionar el cultivo a la leche bajo condiciones asepticas. Hay que considerar que el total contenido del sobre tiene que aplicarse para asegurar la constante calidad del producto.

No aceptamos ninguna responsabilidad en caso de aplicaciones indebidas.

#### Composición

*Lactobacillus rhamnosus* HN001

#### Características

Después de la proyección de importantes propiedades in vitro, HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU ha sido seleccionada a partir de 2000 cepas. La cepa se ha demostrado en varios estudios con animales y humanos para fortalecer los aspectos importantes del sistema inmune. La seguridad de HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU para el consumo humano fue asegurada por varios estudios in vitro y en animales.

#### Especificaciones microbiológicas

Control de calidad Microbiológico-métodos y valores estándares.

Recuento celular	$\geq 4.0E+12$ CFU/bolsa**
Bacteria no ácido láctico	= 500 CFU/g
Enterobacterias	< 10 CFU/g
Levaduras y Mohos	< 10 CFU/g
Enterococi	< 100 CFU/g
Coagulasa-positivo staphylococci	< 10 CFU/g
Salmonella spp	neg. / 25 g
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g

Los métodos analíticos están disponibles por la petición.

\*\* 1 DCU =  $1.0E+11$  CFU (Unidad Formadora de Colonias)

#### Almacenamiento

18 meses desde la fecha de producción a  $+/-18^{\circ}\text{C}$   
6 meses de la fecha de envase a  $+4^{\circ}\text{C}$

#### Embalaje

folio laminado PE/PET/Al

#### Cantidad

Contenido  $\geq 40$  DCU / bolsa

#### Pureza y legislación

HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU responde a las exigencias impuestas por la legislación de la Unión Europea.

Las regulaciones locales deben ser siempre consultadas en relación al estatus del producto, ya que la legislación sobre el uso del producto en alimentación puede variar de país en país.

#### Seguridad y manipulación

La ficha de seguridad está disponible bajo petición.

Los datos que se incluyen en esta publicación son el resultado de nuestros propios trabajos de investigación y desarrollo y son fiables, a menos que se indique lo contrario. No obstante, los usuarios deberán realizar sus propios análisis para determinar la idoneidad de nuestros productos a sus distintos mercados y la situación legal para el uso previsto. La información aquí recogida no debe considerarse como garantía alguna, expresa o implícita, y no se acepta responsabilidad alguna por infracciones de ninguna patente.

# C. Anexo: Anexo: Fichas técnicas de cepas probióticas comerciales



## BIO RHM

### TECHNICAL DATA SHEET Rev. 01/03/2023

**Culture Composition:** *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

**Form:** Freeze-dried DVS

**Applications:** Probiotics

**Packaging:** 10DU  
**Dosage:** 3 units/100-200 liters

**Primary packaging:** PET-ALU-PE  
**Storage conditions:** Store product in original packaging and unopened packages at 2-8°C

**Shelf-life and Best before date:** 12 months under storage conditions. BBD is printed on the label

### TECHNICAL SPECIFICATIONS

**Cell count concentration:**  $\geq 3000 \times 10^9$  cfu/10DU

### MICROBIAL SPECIFICATIONS

Salmonella spp	Absent /25g
Listeria monocytogenes	Absent /25g
Yeast and moulds	<10 cfu/g
Non-lactic acid bacteria	<500 cfu/g
Stafilococchi coag. Positive	<10 cfu/g
Enterobacteriaceae	<10 cfu/g

Recommended analysis methods used for analysis of microbiological criteria are reported in Annex 4 of ISO 27285:2016, ISO 148:2010.

### OTHER INFORMATIONS

The supplied products are not and do not contain or consist of GMO; moreover they are not produced from GMO or do not contain ingredients produced from GMO, according to Regulation (EC) no. 1829/2003 and Regulation (EC) no. 1831/2003.

CULTURES DIVISION  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Página 1.2

Fecha de actualización: 21 de octubre de 2014



## PRODUCT DESCRIPTION - PD 232784-3.0ES

Código del producto 1261967

### L. paracasei LYO 50 DCU-S

#### Descripción

Un cultivo probiótico liofilizado en la forma de polvo para la aplicación de alimento (S= peso estandarizado)

#### Instrucciones de uso

Desinfecte el sachet con sanifzer apropiado antes de abrir.  
Abra el sachet y agregue la cultura directamente al producto. Agite o mezcle para aproximadamente 30 minutos en la velocidad baja.

#### Composición

Lactobacillus paracasei  
Soporte: dextrosa

#### Especificaciones microbiológicas

Control de calidad Microbiológico-métodos y valores estándares.

Recuento celular	>= 5.0E+12 CFU/bolsa**
Bacteria no ácido láctico	< 500 CFU/g
Enterobacterias	< 10 CFU/g
Levaduras y Moldes	< 10 CFU/g
Enterococi	< 100 CFU/g
Coagulasa-positiva staphylococci	< 10 CFU/g
Salmonella spp	neg. / 25 g
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g

Los métodos analíticos están disponibles por la petición  
\*\* 1 DCU = 1.2E+11 CFU (Unidad Formadora de Colonias)

#### Almacenamiento

Refrigere en recibo.

El periodo de conservación es 12 meses cuando almacenado (abajo de 4° C) en la paquete original y cerrado.

#### Embalaje

folio laminado PE, PET Al

#### Cantidad

Contenido >=50 DCU / bolsa  
Este producto tiene el peso estandarizado de 50 g

#### Pureza y legislación

L. paracasei LYO 50 DCU-S responde a las exigencias impuestas por la legislación de la Unión Europea

Las regulaciones locales deben ser siempre consultadas en relación al estatus del producto, ya que la legislación sobre el uso del producto en alimentación puede variar de país en país.

#### Seguridad y manipulación

La ficha de seguridad está disponible bajo petición.

#### Certificación Kosher

Kosher lacteo

#### Certificación Halal

certificado por Halal Food Council of Europe (HFCE)

Los datos que se reflejan en esta publicación son el resultado de nuestros propios trabajos de investigación y desarrollo y son válidos a nuestro más saber y entender. No obstante, los usuarios deben realizar sus propios estudios para determinar la idoneidad de nuestros productos a sus objetivos comerciales y la situación legal para el uso previsto. La información aquí recogida no debe considerarse como garantía alguna, expresa o implícita, y no se acepta responsabilidad alguna por infracciones de terceros patentes.

CULTURES DIVISION  
www.danisco.com

Página 1 / 2

Fecha de actualización: 30 de noviembre de 2010



## PRODUCT DESCRIPTION - PD 225973-4.0ES

Código del producto 1250491

### HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU HOWARU® Premium Probiotic

#### Descripción

Cultivo concentrado liofilizado para inoculación directa en línea.

Cultivo mono-cepas

#### Instrucciones de uso

Desinfectar el área de abertura con etanol (aprox. 70 %) antes de abrir el envase. Cortar y adicionar el cultivo a la leche bajo condiciones asepticas. Hay que considerar que el total contenido del sobre tiene que aplicarse para asegurar la constante calidad del producto.

No aceptamos ninguna responsabilidad en caso de aplicaciones indebidas.

#### Composición

Lactobacillus rhamnosus HN001

#### Características

Después de la proyección de importantes propiedades in vitro, HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU ha sido seleccionada a partir de 2000 cepas. La cepa se ha demostrado en varios estudios con animales y humanos para fortalecer los aspectos importantes del sistema inmune. La seguridad de HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU para el consumo humano fue asegurada por varios estudios in vitro y en animales.

#### Especificaciones microbiológicas

Control de calidad Microbiológico-métodos y valores estándar.

Recuento celular	$\geq 4.0E+12$ CFU/bolsa**
Bacteria no ácido láctico	= 500 CFU/g
Enterobacterias	< 10 CFU/g
Levaduras y Mohos	< 10 CFU/g
Enterococos	< 100 CFU/g
Coagulasa-positivo staphylococci	< 10 CFU/g
Salmonella spp	neg. / 25 g
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g

Los métodos analíticos están disponibles por la petición.

\*\* 1 DCU =  $1.0E+11$  CFU (Unidad Formadora de Colonias)

#### Almacenamiento

18 meses desde la fecha de producción a  $-18^{\circ}\text{C}$   
6 meses de la fecha de envasado a  $+4^{\circ}\text{C}$

#### Embalaje

folio laminado PE/PET/Al

#### Cantidad

Contenido  $\geq 40$  DCU / bolsa

#### Pureza y legislación

HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU responde a las exigencias impuestas por la legislación de la Unión Europea.

Las regulaciones locales deben ser siempre consultadas en relación al estatus del producto, ya que la legislación sobre el uso del producto en alimentación puede variar de país en país.

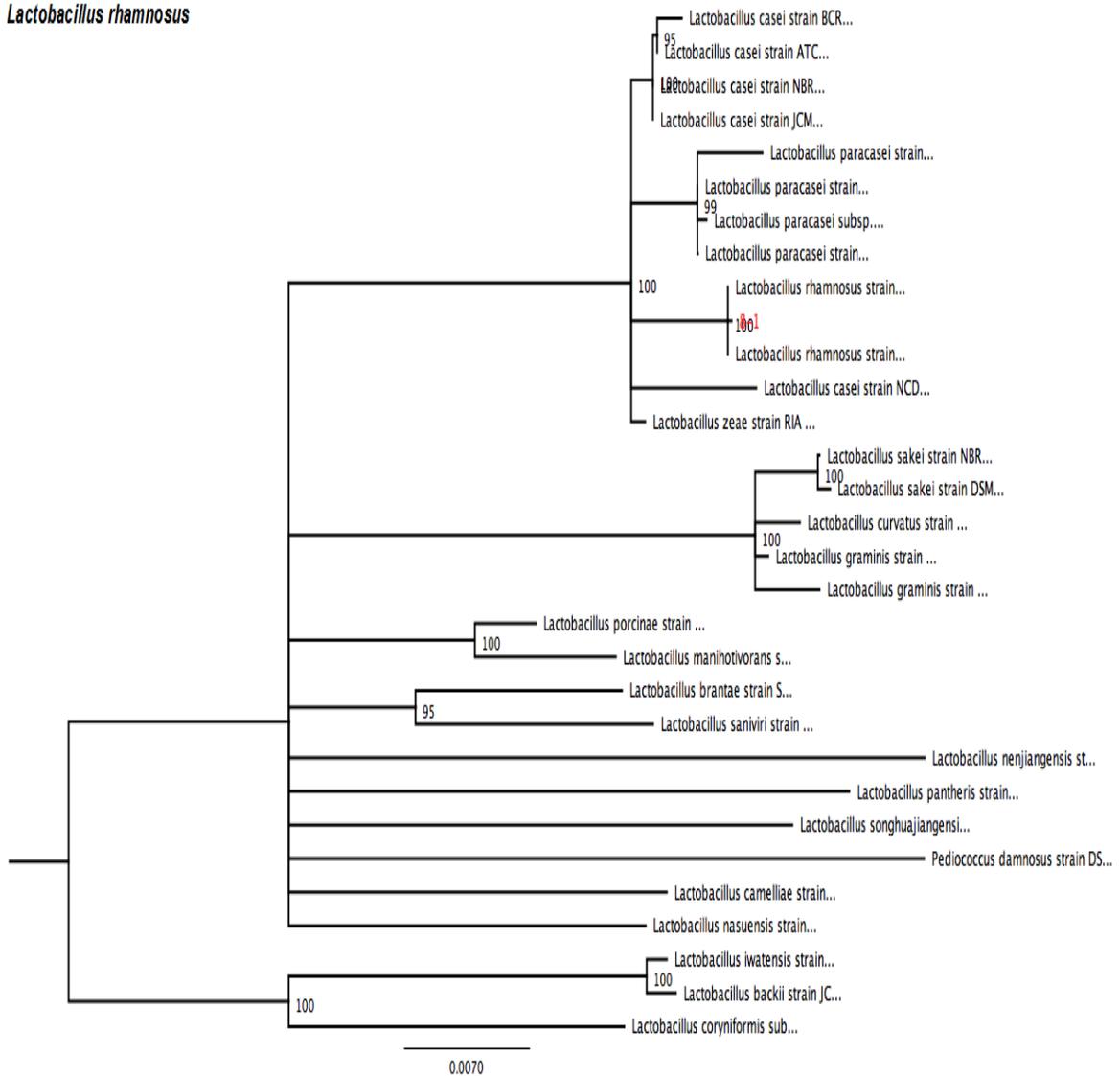
#### Seguridad y manipulación

La ficha de seguridad está disponible bajo petición.

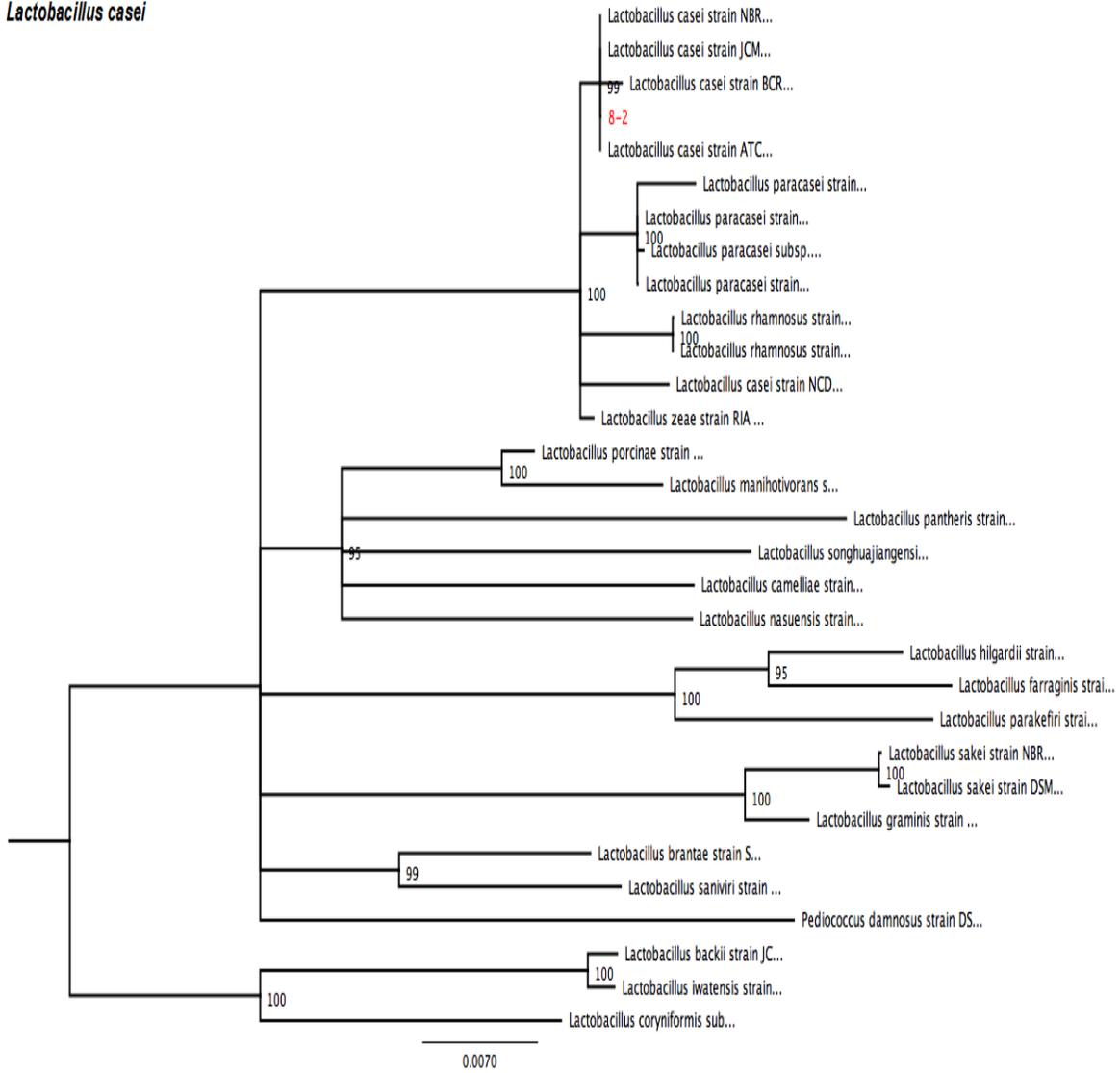
Los datos que se incluyen en esta publicación son el resultado de nuestros propios trabajos de investigación y desarrollo y son fiables, a menos que se indique lo contrario. No obstante, los usuarios deberán realizar sus propios análisis para determinar la adecuación de nuestros productos a sus requisitos comerciales y la situación legal para el uso previsto. La información aquí recogida no debe considerarse como garantía, opinión o invitación, y no se acepta responsabilidad alguna por infracciones de ningún género.

## D. Anexo: Árboles filogenéticos de las cepas probióticas comerciales

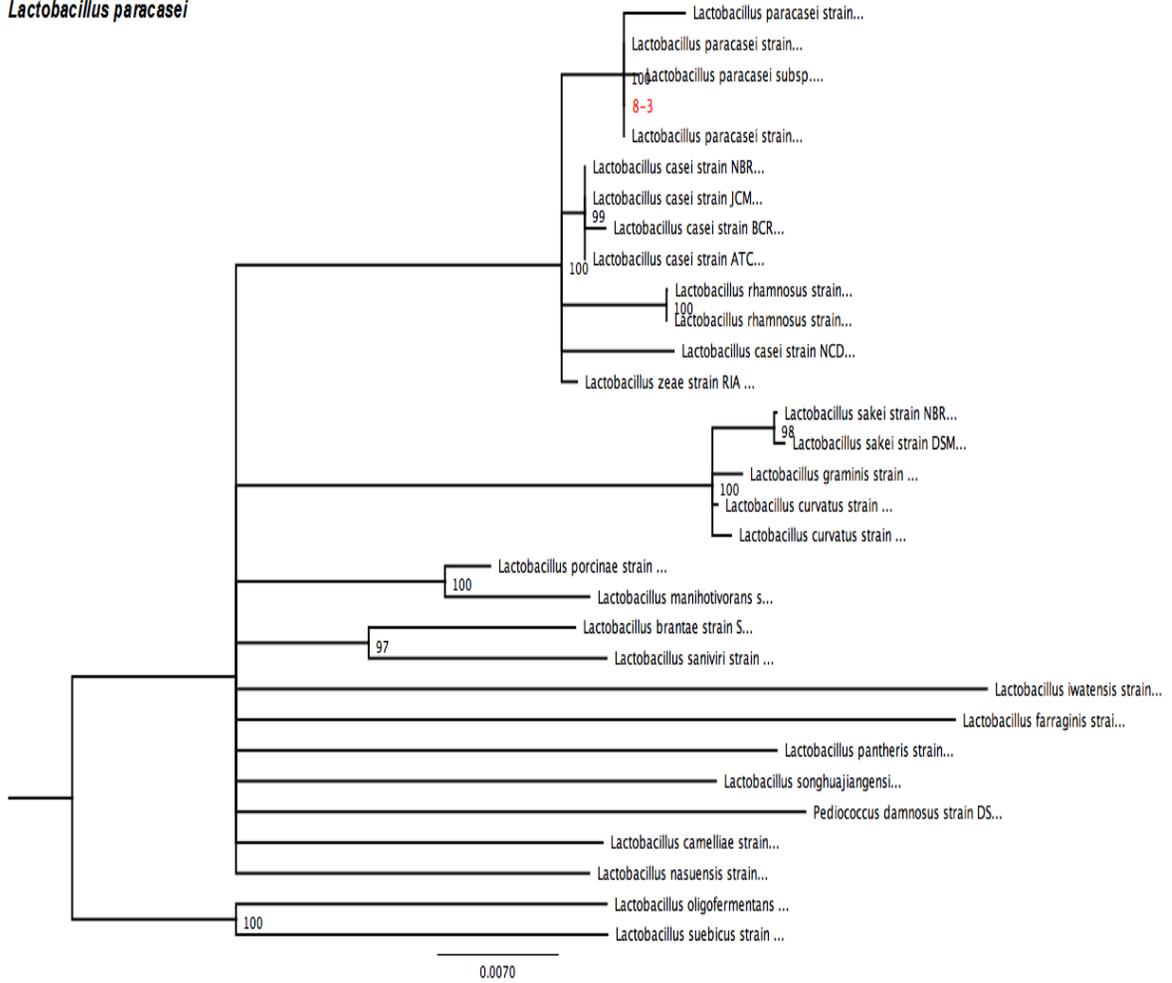
*Lactobacillus rhamnosus*



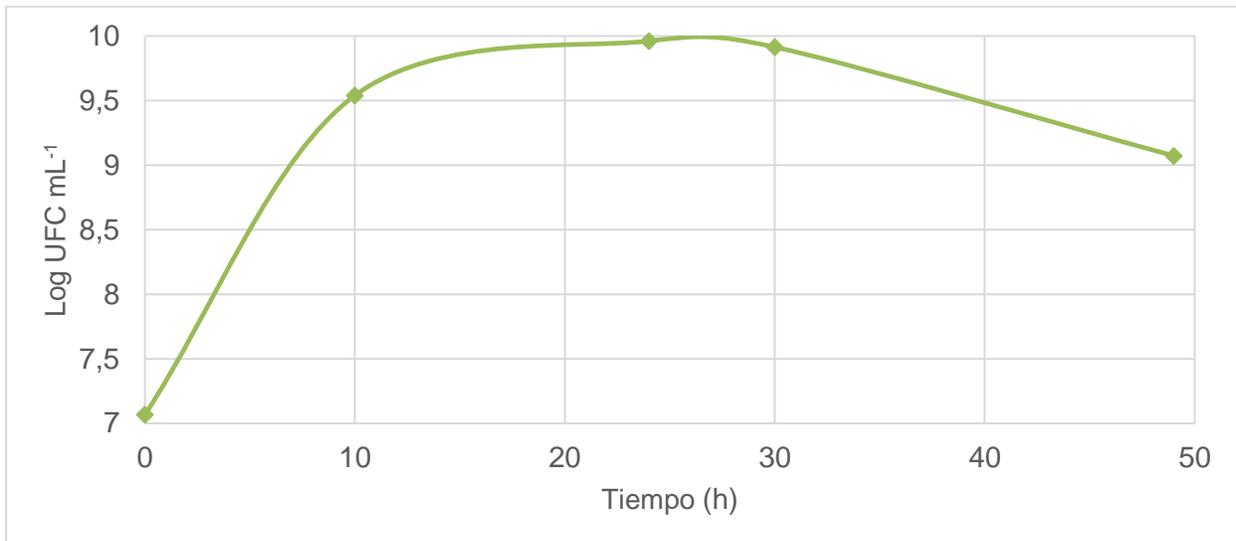
*Lactobacillus casei*



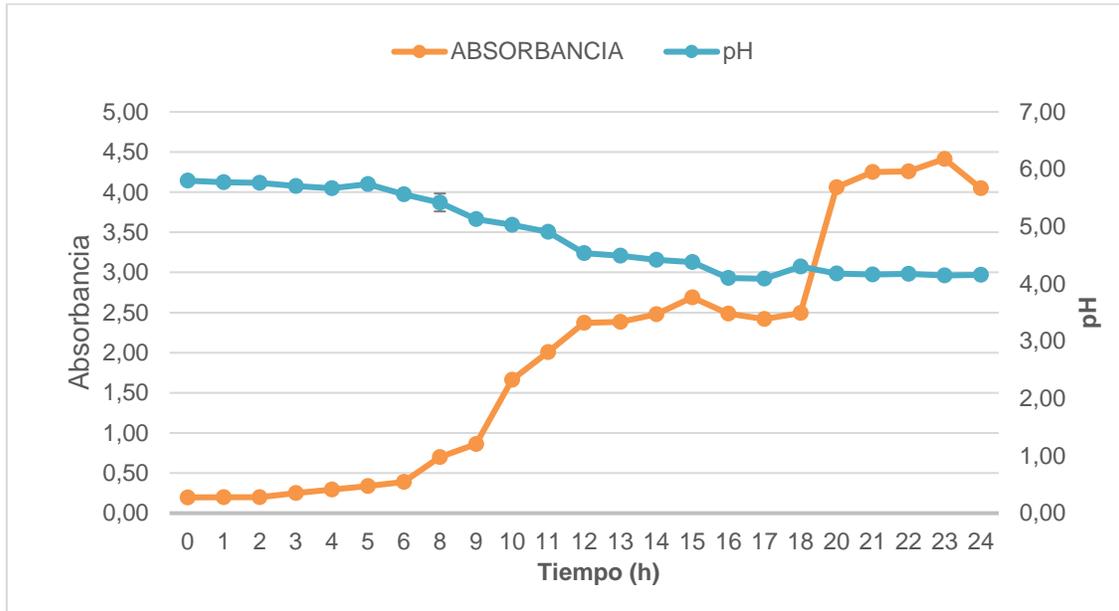
*Lactobacillus paracasei*



## E. Anexo: crecimiento de *L. casei* en medio sintético de FR.



## F.Anexo: Curva de calibración de *L. casei* en caldo MRS



## Bibliografía

Jiménez, D., Cock, J., Satizábal, H. F., Barreto S, M. a., Pérez-Uribe, A., Jarvis, A., & Van Damme, P. (2009). Analysis of Andean blackberry (*Rubus glaucus*) production models obtained by means of artificial neural networks exploiting information collected by small-scale growers in Colombia and publicly available meteorological data. *Computers and Electronics in Agriculture*, 69(2), 198–208.

Ministerio de agricultura y desarrollo rural. (2013). El cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) frutal de clima frío moderado, con propiedades curativas para la salud humana Cabe. Boletín Mensual INSUMOS Y FACTORES ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA, (17), 64.

Meret, M., Brat, P., Mertz, C., Lebrun, M., & Günata, Z. (2011). Contribution to aroma potential of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.). *Food Research International*, 44(1), 54–60.

Mintel. Data-base. Agencia de mercadeo inteligente (2016). “Non-Alcoholic Drink Market Research”.

Rodríguez-Roque M. J., B. de Ancos, C. Sánchez-Moreno, M. P. Cano, P. Elez-Martínez, O. M.-B. (2015). “Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages” *Journal of Functional Foods*, 14, 33–43.

Serna, J. A. (2012). Elaboración de jugos de fruta con adición de bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico. Universidad de la Sabana.

Serpa Guerra, A. M., Barajas Gamboa, Jaime Alejandro Velásquez Cock, J. A., Vélez Acosta, L. M., & Zuluaga Gallego, R. (2016). Desarrollo de un refresco a partir de la mezcla de fresa, mora, gulupa y uchuva fortificada con hierro dirigido a niños en edad preescolar. *Congreso Internacional de Alimentación Y Nutrición Humana*, 17(2), 151–163.

Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 279–284.