

Efecto de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en las propiedades físico-químicas y sensoriales del yogur

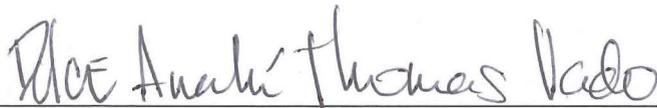
Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Dulce Anahí Thomas Vado

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2005

La autora concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.



Dulce Anahí Thomas Vado

DEDICATORIA

A Dios con eterno agradecimiento.

A mis padres, Guillermo y Herminia.

A mis hermanos Donald, Luis, Guillermo y Ana.

A Daniela, amigos y amigas en Nicaragua.

A mis asesores y docentes de la carrera de Agroindustria.

A Rigoberto Silva y todo el personal de la planta de Lácteos.

A mis amigos y compañeros zamoranos.

A mi país Nicaragua.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida, tranquilidad, sabiduría y paciencia estos años de mi vida.

A mis padres, por su ejemplo de amor, por su apoyo incondicional y sobre todo por darme la oportunidad de vivir y alcanzar mis sueños: con eterno amor, respeto, admiración y orgullo, gracias.

A mis hermanos por ser luz en mi camino, por ser más que hermanos, mis amigos. Por creer en mí desde el primer momento y apoyarme incondicionalmente.

A mi hermana, mi alma gemela, gracias por ser mi luna en las noches oscuras, por ser mi consejera y regalarme mucha de tu paciencia e inspiración.

A Daniela Cuadra, por no dejar que la distancia alejara esta inmensa amistad y por nunca dejar de compartir los sueños.

A mi asesor Dr. Luis Fernando Osorio, mi infinita gratitud por los grandes conocimientos compartidos, por la paciencia otorgada y por depositar en mí su confianza, sinceramente muchas gracias.

A mi asesor secundario Ing. Wilfredo Domínguez por todos los consejos, críticas constructivas y su gran paciencia.

A todo el personal de la planta de lácteos, en especial a Rigoberto Silva por compartir los conocimientos y por apoyarme en todo momento.

A todos mis amigos zamoranos en especial a Tania Toruño, Alba Ruiz, Millán Ludeña, Víctor Romero, Oriana Messuti, Diana Sabillón, Rosa Estévez, Elizabeth Buchelli, Carlos Montiel y Sergio Castellanos (t.a.) por ser mis compañeros de camino, alegría de mis días y mi apoyo incondicional en todo momento.

A todos aquellos que de alguna u otra forma llegaron a mi vida para regalarme momentos, compartir grandes recuerdos, conocimientos, experiencias y sueños; muchas gracias! ya que sin su gran aporte no tendría noción de lo que es la vida ni de lo hermosa que puede llegar a ser ésta.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

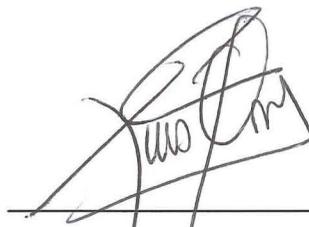
A mis padres mi eterna gratitud por que con su esfuerzo he podido vivir estos maravillosos años de grandes conocimientos y experiencias.

RESUMEN

Thomas, Dulce Anahí. 2005. Efecto de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en las propiedades físico-químicas y sensoriales del yogur. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 31p.

Los probióticos son microorganismos que aumentan la funcionalidad de los alimentos ayudando al organismo a protegerse de los patógenos. El principal objetivo del estudio fue evaluar las características físico-químicas y sensoriales de los cultivos probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en la mezcla para yogur de fresa de Zamorano. Con este fin se inocularon dos tipos de microorganismos probióticos en concentraciones de 10^6 UFC/ml y se analizaron posteriormente las características microbiológicas, sensoriales, físicas y químicas del producto obtenido. Estos análisis se realizaron a los cero, siete y treinta días de vida del producto. Como diseño experimental se usó el de Diseño de Bloques Completos al Azar donde cada repetición constituyó un bloque. La mezcla de yogur fue elaborada con las mismas condiciones para todos los tratamientos, variando únicamente el tipo de microorganismo probiótico a inocular y utilizando el yogur producido actualmente por la planta de lácteos como control. El crecimiento microbiológico, la acidez ATECAL, la viscosidad y el análisis sensorial exploratorio fueron evaluados. Los tratamientos con probióticos presentaron las mayores cargas microbianas iniciales, sin embargo el mayor aumento en la carga microbiana se obtuvo en el tratamiento control con un incremento logarítmico de 0.105 UFC/ml ($p < 0.05$). Los panelistas no capacitados, no determinaron diferencias sensoriales entre los tratamientos en cuanto a los atributos de sabor, textura, aroma y acidez. Sin embargo; el tratamiento que obtuvo mayor aceptación general fue el tratamiento con inoculación de *Lb. reuteri*, siendo este tratamiento el que presentó mayor acidez ATECAL, mayor viscosidad, y mayor carga microbiana final ($p < 0.05$). De acuerdo con los resultados anteriores se concluye que el consumidor prefiere un yogur con características más ácidas, en comparación con el actualmente producido.

Palabras clave: Acidez titulable, análisis sensorial, carga microbiana, probióticos, viscosidad.



Luis Fernando Osorio, Ph.D.

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Contenido.....	viii
	Índice de Cuadros.....	x
	Índice de Figuras.....	xi
	Índice de Anexos.....	xii
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LIMITES DEL ESTUDIO	2
1.2	ALCANCES	2
1.3	OBJETIVOS	2
1.3.1	Objetivo general.....	2
1.3.2	Objetivos específicos	2
2	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	HISTORIA Y ORIGEN DE LOS PROBIÓTICOS.....	3
2.2	DEFINICIÓN DE PROBIÓTICO.....	3
2.3	CARACTERÍSTICAS BENÉFICAS DE LOS PROBIÓTICOS	4
2.4	CLASIFICACIÓN	6
2.5	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE PROBIÓTICOS.....	7
2.6	<i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	8
2.7	<i>LACTOBACILLUS REUTERI</i>	9
2.8	TENDENCIAS DE CONSUMO DE PRODUCTOS PROBIÓTICOS.....	10
3	MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1	UBICACIÓN	11
3.2	MATERIALES Y EQUIPO	11
3.2.1	Materiales e Ingredientes para la elaboración de yogur probiótico.	11
3.2.2	Materiales e ingredientes para la elaboración de análisis.	11
3.3	DISEÑO EXPERIMENTAL	12
3.4	METODOLOGÍA	12

3.4.1	Manufactura del yogurt probiótico	12
3.5	MEDICIONES DURANTE EL PROCESO	15
3.5.1	Temperatura	15
3.5.2	Tiempo	15
3.5.3	Acidez titulable	15
3.5.3.1	Materiales	15
3.5.3.2	Equipo	15
3.5.3.3	Procedimiento	16
3.6	PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS	16
3.7	ANÁLISIS FÍSICO	16
3.8	ANÁLISIS SENSORIAL	16
3.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1	ESTUDIOS PRELIMINARES	18
4.2	CONTEO MICROBIOLÓGICO	18
4.3	VISCOSIDAD DEL PRODUCTO FINAL	19
4.4	ANÁLISIS DE ACIDEZ	20
4.5	ANÁLISIS EXPLORATORIO	21
4.5.1	Sabor	21
4.5.2	Textura	21
4.5.3	Aroma	22
4.5.4	Acidez	22
4.5.5	Aceptación general del yogur	23
5	CONCLUSIONES	24
6	RECOMENDACIONES	25
7	BIBLIOGRAFÍA	26
8	ANEXOS	29

INDICE DE CUADROS

Cuadro.

1. Microorganismos considerados como probióticos.....	6
2. Descripción de tratamientos.....	12
3. Diluciones de cultivos probióticos.....	18
4. Conteo inicial, final y aumento de la carga microbiana.....	19
5. Viscosidad del producto final.....	18
6. Evaluación de acidez inicial, final y el aumento de la acidez, expresada en ATECAL.....	19
7. Evaluación del sabor del yogur.....	21
8. Evaluación de la textura en el yogur.....	22
9. Evaluación del aroma en el yogur	22
10. Evaluación sensorial de la acidez en el yogur.....	23
11. Evaluación sensorial de aceptación general del yogur.....	23

INDICE DE FIGURAS

Figura

1. Diagrama de flujo de elaboración de yogur probiótico..... 14

INDICE DE ANEXOS

Anexo.

1. Fotos de microorganismos probióticos.....	30
2. Formato de evaluación sensorial.....	31
3. Cálculo de gramos de Cultivo Probiótico a inocular.....	32
4. Análisis de varianza del estudio.....	33
5. Reacción en cadena de polimerasa gel electroforesis de biopsia del intestino para el probiótico <i>Lactobacillus casei</i>	34
6. Fotografía de Gel Electroforesis del probiótico <i>Lactobacillus casei</i>	35
7. Reacción en cadena de polimerasa gel electroforesis de biopsia del intestino para el probiótico <i>Lactobacillus reuteri</i>	36
8. Fotografía de Gel Electroforesis del probiótico <i>Lactobacillus reuteri</i> ..	37
9. Resistencia a los antibióticos.....	38

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos que aumentan la funcionalidad de los alimentos ayudando al organismo a protegerse de los patógenos. Los alimentos probióticos además de aportar al cuerpo humano con los requerimientos nutricionales de carbohidratos, proteínas y vitaminas, tienen características benéficas al momento de consumirlos. En la flora intestinal humana existen más de 400 especies de microorganismos que conviven en armonía sintetizando vitaminas, sustancias beneficiosas, contribuyendo a la absorción de nutrientes, favoreciendo el metabolismo colónico de la fibra, mejorando la digestibilidad, neutralizando sustancias potencialmente patogénicas. El intestino ofrece substratos y las condiciones para su desarrollo permitiendo así que la flora lleve a cabo una mejor función intestinal (Gómez, 2003).

Los alimentos probióticos se han utilizado para fines terapéuticos como bajar el colesterol, aumentar la inmunidad, tratar la artritis reumatoide, prevenir el cáncer, disminuir la diarrea, la producción de vitaminas B2, B6 y biotina, la asimilación de oligoelementos y mejorar la intolerancia a la lactosa. Los probióticos pueden definirse como “microorganismos vivos que después de ser ingeridos en cierta cantidad, ejercen beneficios en la salud que superan a su nutrición básica inherente”, lo que significa que los probióticos pueden consumirse como componentes alimenticios o también como preparados no alimenticios (Guarner y Schaafsma, 1998).

Los estudios referentes a los probióticos son objeto de estudio y controversia, ya que difícilmente se pueden hacer alegaciones específicas sobre las acciones de estos en la salud. Sin embargo para que sea una bacteria considerada probiótica tiene que cumplir ciertos requisitos, entre ellos: habilidad de adherirse a las células, excluir o reducir la adherencia patógena, persistencia y multiplicidad, producir ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas antagonistas al crecimiento patógeno; ser segura y, por ende, no invasiva, no carcinogénica y no patogénica, coagregar y formar una flora balanceada.

El desarrollo de un estudio que demuestre la estabilidad de las bacterias probióticas en el yogur producido en la planta de lácteos de Zamorano es el objetivo principal de este estudio.

1.1 LIMITES DEL ESTUDIO

- No se evaluó vida en anaquel del producto terminado.
- No se analizó el empaque para el producto terminado.
- No se evaluaron otros tipos de cultivos probióticos.
- No se evaluaron las características del probiótico dentro del ser humano.
- No se analizó la aceptación del producto en el mercado.

1.2 ALCANCES

- Se evaluaron los conteos microbiológicos y sensoriales.
- Se evaluó la carga microbiana, acidez y viscosidad del producto terminado.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de dos cultivos probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en el yogur de fresa zamorano.

1.3.2 Objetivos específicos

- Análisis de la carga microbiana en la mezcla de yogur con microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri*.
- Evaluar las características sensoriales y físicas de la mezcla de yogur con los dos diferentes tipos de tratamiento de cultivos probióticos.
- Evaluar el efecto de los cultivos probióticos en el cambio de las propiedades químicas del producto.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 HISTORIA Y ORIGEN DE LOS PROBIÓTICOS

Los probióticos han estado con nosotros desde que los seres humanos comenzaron a tomar leche fermentada pero su relación con sus beneficios para la salud datan de principios del siglo XX cuando Metchnikoff llamó la atención sobre los efectos nocivos de la microflora intestinal en el anfitrión y sugirió que la ingestión de leche fermentada disminuye esta “autointoxicación”. Trabajos posteriores, basados en la asunción de que la colonización del intestino era esencial para un máximo efecto, utilizando cepas de bacterias intestinales como el *Lactobacillus acidophilus* en el tratamiento del estreñimiento. Científicos como los premios Nobel Elie Metchnikoff y Louis Pasteur fueron los primeros en contar con los medios necesarios para completar estudios sobre estos suplementos alimenticios beneficiosos (Leoviz, 2005).

Según Diplock (1991), Como fruto de nuevos estilos de vida y la preocupación por elevar la calidad de vida se, comenzaron a desarrollar nuevos conceptos en nutrición en la última década del siglo XX. La interrelación de disciplinas como la Biología Molecular y la Biotecnología, con la Nutrición y la Informática, entre otras, permite a las industrias alimentarias el desarrollo de nuevos productos con funciones adicionales a las del alimento original.

2.2 DEFINICIÓN DE PROBIÓTICO

Los probióticos son productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del cuerpo humano y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. Según la FAO (2002), los probióticos se definen como: “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas” (Taranto, 2005).

Los probióticos son microorganismos que ayudan a desarrollar efectivamente la microflora bacteriana del tracto gastrointestinal, aumentando las capacidades protectoras del intestino. Los probióticos son conocidos también como microorganismos bioterapéuticos, bioprotectores y bioprolifáticos. Son también utilizados en la prevención de enfermedades entéricas y gastrointestinales.

Según Leovitz (2005), el término probiótico, que significa literalmente por la vida, es utilizado para definir las diferentes cepas microbianas aplicadas a personas y animales que reportan un beneficio en la salud más allá del puramente nutricional. Son cultivos vivos activos que ayudan a mantener la flora intestinal y evitan la proliferación de bacterias nocivas.

Una microflora saludable deberá estar compuesta predominantemente por bacterias benéficas sobre las dañinas. Estas están representadas por las Bifidobacterias y los Lactobacilos, a las que se les atribuyen varias funciones promotoras de la salud, tales como una producción de ácidos grasos de cadena corta (que acidifican la composición del intestino), producción de un efecto inmunoestimulante e inhibitorio del crecimiento de bacterias patógenas (Rosado, 2004).

2.3 CARACTERÍSTICAS BENÉFICAS DE LOS PROBIÓTICOS

La creencia en los efectos beneficiosos del probiótico se basa en la certeza de que la microflora intestinal proporciona protección contra varias enfermedades. Su evidencia proviene de varias fuentes y es incuestionable (Leovitz, 2005).

Está ampliamente demostrado que los animales libres de gérmenes son más susceptibles a enfermedades que sus congéneres que llevan una flora intestinal completa. Esta diferencia se ha demostrado en infecciones causadas por *Salmonella enteritidis* y *Clostridium botulinum*. Por razones obvias esta clase de comparativa no puede ser realizada experimentalmente en humanos, sin embargo se asume que algunos de estos resultados se aplicarían también al hombre (Leovitz, 2005).

La propia definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos que lo integran durante todo el periodo de vida útil del producto, ya que esto condicionará su efectividad. Aunque todavía existe poca información sobre las dosis y la frecuencia de consumo necesaria para garantizar la efectividad de estos productos, en general, se considera necesario que diariamente entre 10^9 y 10^{10} UFC/ml organismos viables alcancen el intestino delgado. Por ello, se sugiere que estos productos mantengan unos valores de viables de 10^6 a 10^7 UFC/ml (Sanz, 2003).

Algunas bacterias conocidas como anaerobias facultativas y otras como anaeróbicas obligadas, pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal. Además por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedero. Está demostrada la eficacia de las bacterias vivas que se utilizan como fermentos lácticos en el tratamiento de los signos y síntomas que acompañan la intolerancia a la lactosa (Schiffin, 1997). Estas bacterias presentes en el yogur y otras leches fermentadas se caracterizan por transformar mediante la fermentación de algunos azúcares, principalmente la lactosa transformándose en ácidos orgánicos como el láctico y el acético (Condon, 1998).

La ingesta regular de leches fermentadas puede resultar beneficiosa para prevenir enfermedades infecciosas comunes por ingestión de patógenos. Se ha comprobado que algunos probióticos mejoran los síntomas de intolerancia a la lactosa. En un estudio en niños suplementados con *Lactobacillus casei* se observó un aumento de la IgA con una menor duración de la diarrea inducida por rotavirus (Kaila, 1998).

Otra función de los probióticos es la de disminuir la producción de enzimas como la β -glucuronidasa, la nitroreductasa y la ureasa. Estas enzimas participan en la activación metabólica de los mutágenos y carcinógenos (Torres, 1999).

Los probióticos pueden influir también en la biodisponibilidad de nutrientes al facilitar un rompimiento de proteínas de la leche entera, liberando calcio y magnesio en grandes cantidades a diferencia de cuando no se utilizan probióticos. Estos parecen estar involucrados también en la síntesis de vitaminas del complejo B, folatos y además, algunas cepas pueden ejercer un efecto estabilizador en la flora intestinal incrementando la resistencia a las infecciones, así como una prevención y tratamiento de diversas formas de diarreas (Gorbach, 1996).

Según Pattacini (2005), otros beneficios de los probióticos son:

- La producción y aumento en la biodisponibilidad de vitaminas B1, B2, B6, B12, niacina, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico.
- Mayor biodisponibilidad de minerales como el calcio, hierro, cobre, zinc, y magnesio en alimentos con adición de probióticos.
- Efectos mejoradores de los niveles de colesterol bueno (HDL).
- Se ha observado en estudios realizados en animales, una inhibición en el crecimiento tumoral, o una eliminación total, y la hipótesis plantea que esto se da a consecuencia de acciones sobre el sistema inmune.
- La producción de ácidos que provocan los probióticos estimulan el peristaltismo intestinal reduciendo el tiempo de tránsito de las heces, por lo tanto se consideran útiles para la profilaxis y tratamiento de disturbios intestinales.

2.4 CLASIFICACIÓN

Cuadro 1. Microorganismos considerados como probióticos

Especies de <i>Lactobacillus</i>	Especies de <i>Bifidobacterium</i>	Otras bacterias Acidolácticas.	Bacterias No Acidolácticas.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ³	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{1,2}
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ²
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> ³	<i>Saccharomyces boulardii</i> ²
<i>ssp. Bulgaricus</i> ³	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ¹	
<i>L. gallinarum</i> ¹	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> ³	
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

¹ Principal aplicación para animales.² Aplicado en preparaciones farmacéuticas.³ Se sabe muy poco acerca de las características probióticas o bien es un microorganismo no probiótico.

Fuente de cuadro: Adaptado de The American Journal of Clinical Nutrition (Holzapfel, 2001).

2.5 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE PROBIÓTICOS

Según Rosado (2004), los siguientes criterios deben ser reunidos por un probiótico antes de poder ser considerado como tal:

- Deberá ser capaz de ser producido en forma viable y en gran escala
- Durante su uso y almacenamiento, deberá permanecer viable y estable
- Deberá sobrevivir en el ecosistema intestinal
- El huésped animal deberá verse beneficiado por albergar al probiótico

Los Lactobacilos como *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. delbruekii* son empleados en la dieta humana ampliamente como probióticos, tanto como especies individuales como en cultivos mixtos. Otro género que también ha sido empleado, está caracterizado por las bifidobacterias como *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* y por estreptococos como *S. salivarius spp. thermophilus*, *S. lactis* (Rosado, 2004).

Según Modler (1990), la tecnología clásica más comúnmente empleada, está representada por la adición de lactobacilos o bífidobacterias, a los productos de leche fermentados ya que se ha propuesto que las bacterias exógenas alcanzan el intestino grueso en forma viable e intacta. En dicho proceso, las bacterias se enfrentan a obstáculos físicos y químicos que incluyen la presencia de ácidos gástricos y biliares (Pochart, 1992).

Según Biller (1995), existe un problema con los probióticos; éstos deben establecerse en el colon y volverse activos, deben adherirse al epitelio intestinal para sobreponerse a las condiciones de stress, con lo que se comprometen sus probabilidades por sobrevivir.

Dentro de los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad de las células se encuentran: el pH (condiciones de acidez derivadas del proceso de fermentación), el oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias), las interacciones antagónicas entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración final de azúcares (aumento de la presión osmótica), las prácticas de inoculación (es importante conocer el momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), la temperatura y duración de la fermentación, y las condiciones de almacenamiento del producto (Taranto, 2005).

Cepas de lactobacilos como *Lactobacillus GG*, parecen producir sustancias antimicrobianas que son activas en contra de diversas bacterias presentes en la microflora normal del intestino, como *E. coli*, *Streptococcus*, *Clostridium difficile* (Biller, 1995), *Bacteroides fragilis* y *Salmonella* (Gorbach, 1996).

2.6 LACTOBACILLUS CASEI

Hace más de 30 años que hay evidencia del efecto benéfico de estos microorganismos, sobre las defensas naturales, la eliminación de toxinas y microorganismos que ocasionan diarrea, como los rotavirus. También, se han estudiado mucho las cepas casei Shirota, que se descubrieron en Japón y que se comercializa en varios puntos del planeta desde hace décadas y la cepa casei DN114, generada en Francia. Recientes estudios en ratones demuestran que estas bacterias lácticas disminuyen el riesgo de padecer cáncer de colon, y de manera cada vez más insistente se acepta la eficacia de estos lactobacilos en la prevención y tratamiento de gastritis. También se ha observado su efectividad al reducir problemas de acidez estomacal en quienes siguen tratamiento con fármacos que irritan al estómago (Alimentación Sana, 2005).

Lactobacillus casei es un bacilos corto, las colonias presentan bordes enteros. Esta especie puede producir hasta 1,5 % de ácido en la leche, pero debido al crecimiento lento de la bacteria, solo coagula la leche después de 3 a 5 días. De los disacáridos prefiere la lactosa y en ausencia de azúcar puede utilizar los lactatos como fuente de carbono. *Lb. Casei* contienen muchas endozimas, que después de la muerte de la bacteria atacan la caseína y la pueden degradar en combinaciones solubles, por esta razón juega un papel importante en la maduración del queso (Castillo, 1997).

Lactobacillus casei spp. *Shirota* (LcS) es una bacteria probiótica utilizada en la producción de productos lácteos fermentados que se venden en la Argentina desde 1997. Este producto es de venta libre en supermercados y se ha registrado un aumento creciente en su indicación terapéutica por parte de profesionales de la salud. La administración de *Lactobacillus casei* activa el sistema celular inmune, disminuye la incidencia de tumores e inhibe la producción de IgE (anticuerpo relacionado con alergias y asma). Otros sugieren cierto efecto benéfico sobre los niveles de triglicéridos y colesterol sanguíneos. También se menciona la posibilidad de que actúe previniendo la artritis (Nutriinfo, 2000).

Se realizaron estudios en los cuales se analizó la cantidad de *Lb. casei* en la materia fecal de individuos que bebieron 125 ml de leche fermentada conteniendo 10^{10} UFC/ml *Lb. casei* vivas durante 3 días. La cantidad promedio encontrada fue aproximadamente de 10^7 UFC/ml bacterias vivas por gramo de heces, indicando que estas *Lb. casei* sobrevivieron el tránsito a través del tracto gastrointestinal luego de la ingestión de la leche fermentada (Yuki, 1999).

Un experimento desarrollado en Japón, consistió en alimentar ratones con un hidrato de carbono cancerígeno y observar las diferencias ocurridas entre los animales alimentados con *Lb. casei* y el grupo control. La alimentación oral de ratones con *Lb. casei* redujo la incidencia de tumores en forma significativa ($P < 0.05$). Estos resultados sugieren que la alimentación de ratones con *Lactobacillus casei* inhibe la tumorigénesis inducida modulando la respuesta inmune desestabilizada por la carcinogénesis (Takagi, 1999).

El *Lactobacillus casei*, es una bacteria ácido láctica que es utilizada para la elaboración de productos lácteos fermentados, conocida por tener excelentes efectos nutricionales, además de un sabor agradable, teniendo un efecto promotor de la salud, esto a través de la microflora intestinal y modulación del sistema inmune. La cepa de *Lactobacillus casei* ha demostrado tener efecto sobre los problemas gastrointestinales de niños de corta edad, demostrando la disminución de la presencia y frecuencia de diarrea, además de parásitos intestinales patógenos como la Giardia Lambia y sobre la flora intestinal (Conde, 2003).

Lactobacillus casei es gram positivos, anaerobios facultativos, no tienen motilidad y no forman esporas, el rango de tamaño de las células es = 0.7-1.1 x 2.0-4.0 micrómetros, son miembros de las industriales bacterias ácido lácticas. *L. casei* toleran los medios ácidos y posee un metabolismo estrictamente fermentativo con ácido láctico como el mayor producto de su metabolismo (Axelsson, 1998; Kandler y Weiss, 1986).

L. casei forman parte de los heterofermentativos facultativos, que producen ácido láctico de los azúcares de hexosas (Axelsson, 1998). El crecimiento de *L. casei* requiere riboflavina, ácido fólico, calcio y niacina en el medio (Kandler y Weiss, 1986).

2.7 LACTOBACILLUS REUTERI

Otro probiótico que ha sido recientemente reportado en la literatura, es el *Lactobacillus reuteri* que demostró tener efectos positivos en individuos con diarreas agudas causadas por rotavirus en niños y produce una sustancia antibacteriana llamada reuterin. *L. reuteri* es manufacturado bajo patentes por la empresa Biogaia de Suecia.

El suplemento diario con *L. reuteri* erradica totalmente la bacteria *Helicobacter pylori* en un 60 % de los pacientes con dispepsia y urea positiva en análisis de aliento, demostrado en un estudio realizado en Italia por el Profesor Saggiaro (Saggiaro, 2005).

En estudios clínicos comparativos es demostrado que el yogur con *L. reuteri* con respecto a otros microorganismos probióticos, es el único que elimina efectivamente la bacteria *Streptococcus mutans* causante de la caries en los dientes (Chichiyasu Dairy Co., 2004).

El probiótico *Lactobacillus reuteri* es naturalmente hallado en la flora intestinal humana incluyendo la leche materna. *L. reuteri* refuerza las defensas naturales del organismo y ayuda a mantener un equilibrio en el tracto gastrointestinal, ayudando al incremento de otros microorganismos. *L. reuteri* es una poderosa bacteria ya que solo 100 millones de microorganismos vivos al día son necesarios para poder obtener los mayores beneficios de ésta (Natures, 2002).

En estudios realizados con *Lactobacillus reuteri* se determinó que la administración este microorganismo produjo un aumento de la razón HDL con respecto al LDL de 18 y 12 %

en cada caso. Estos resultados son muy promisorios, ya que al presente ninguna droga alopática aumenta la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Taranto, 2005).

2.8 TENDENCIAS DE CONSUMO DE PRODUCTOS PROBIÓTICOS.

Japón representan el 50% del mercado, no obstante, los alimentos probióticos han hecho su aparición en Estados Unidos y Europa con una tasa de crecimiento anual en torno a un 15- 20%. De hecho, en Europa el volumen de negocio de los alimentos funcionales fue de unos 2.000 millones de euros en 1999 y, entre éstos, el 72% estuvo centrado en el sector lácteos (Sanz, 2003).

Con los yogures y otro tipo de productos fermentados existen considerables oportunidades de explotar las bacterias ácido lácticas como cultivos probióticos. El Mercado mundial para este tipo de productos continua incrementándose en respuesta a la demanda tan creciente de los consumidores concientes por la salud (EUFIC, 2005).

Los probióticos están incluidos en diversos productos lácteos, actualmente en el mercado, como los denominados bio-yogurts, leches fermentadas, quesos probióticos, leche BIO, entre otros. Estos productos son comercializados con el eslogan: "Mejoran el balance de la flora intestinal". También se los encuentra en preparados en forma de tabletas y polvos que incluyen un solo microorganismo o una mezcla de ellos, como Multibiota en Inglaterra y Protexin (Taranto, 2005).

Aunque todavía no existe una normativa sobre los requisitos que deben cumplir los probióticos que se incorporan a los alimentos, la FAO/WHO ha hecho unas recomendaciones acerca de los criterios de evaluación de éstos, incluyendo su identificación intraespecífica, pruebas in vitro e in vivo para constatar sus propiedades y efectividad, y guías sobre el etiquetado. Entre los productos probióticos, los derivados lácteos y especialmente las leches fermentadas son los más aceptados por constituir un buen vehículo para el aporte de bacterias viables y de nutrientes altamente biodisponibles (Sanz, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

La planta de Industria Lácteas de la Escuela Agrícola Panamericana “El Zamorano” se realizó la preparación de todas las unidades experimentales, los análisis químicos de las muestras y la caracterización de sus propiedades sensoriales respectivas. Los análisis físicos de viscosidad se realizaron en el Centro de Evaluación de Alimentos (CEA).

3.2 MATERIALES Y EQUIPO

3.2.1 Materiales e ingredientes para la elaboración de yogur probiótico.

Mezcla para 100 Kg de yogur:

- 80 Kg. de leche de vaca estandarizada al 2.5% de grasa y pasteurizada
- Cultivos Lácticos para yogur; *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. vulgaricus*; (YC-180, Christian Hansen)
- Cultivos probióticos: *Lactobacillus casei* cepa Q85 (0.168 g); *Lactobacillus reuteri* cepa 12002 (0.07 g)
- 8.5 Kg Azúcar
- 5.4 Kg Leche descremada en polvo
- 0.3 Kg Estabilizador para yogur
- 0.064 Kg de Sorbato de potasio
- 5.2 Kg de fruta (Natural Strawberry solid pack, Sensient)
- 120 ml de colorante (Cosco 8816)

3.2.2 Materiales, ingredientes y equipo para la elaboración de análisis.

- Agua destilada
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Fenolftaleína al 1%
- Pasteurizadora por tandas
- Recipientes con capacidad de 7 Kg de leche
- Tina para baño maría
- Balanza analítica
- Termómetro > 49 °C
- Pipeta de 9 ml
- Probeta de 1000 ml
- Envases para yogurt procesado 190 g de capacidad
- Incubadora 37 °C
- Viscosímetro de Brookfield modelo: RVDV-II+

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluó el efecto de dos tipos de probióticos en la mezcla para yogur, utilizando el mismo procedimiento de preparación de mezcla para todos los tratamientos, y variando el tipo de cultivo a inocular en la mezcla.

Cuadro 2. Descripción de tratamientos

Tratamientos	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<i>Lb. casei</i> + Cultivo láctico	TRT 1	TRT 1	TRT 1
<i>Lb. reuteri</i> + Cultivo láctico	TRT 2	TRT 2	TRT 2
Cultivo láctico	TRT 3	TRT 3	TRT 3

Nota: Para todos los tratamientos la preparación de la mezcla fue la misma.

Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar donde cada repetición constituyó un bloque. Cada probiótico y el cultivo de yogur solo, constituyeron un tratamiento distinto, según muestra el cuadro 2. Las variables evaluadas en el proyecto fueron: crecimiento microbiológico en el tiempo, acidez inicial y final, análisis de viscosidad y atributos sensoriales tales como: sabor, textura, aroma, acidez y aceptación general del producto, mediante un análisis sensorial.

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Manufactura del yogurt probiótico.

Tres tratamientos de yogur fueron elaborados, los tres contenían el cultivo láctico y dos de ellos los cultivos probióticos. La pasteurización y mezcla de ingredientes se hizo con el procedimiento convencional de la planta de lácteos haciendo uso de un pasteurizador por tandas, enfriador por placas y homogenizador. El probiótico fue inoculado al momento de separar los tratamientos. Cada tratamiento fue de 6.66 kg, tamaño óptimo para obtener 35 vasos de yogur con 190 g cada uno. Esto se hizo para que las muestras estuvieran intactas hasta el momento de realizar la prueba necesaria.

Luego de seccionar los tratamientos con 6.66 kg de mezcla cada uno, se inocularon los cultivos probióticos y el cultivo láctico respectivamente, se dejó fermentar a 49 °C por aproximadamente 3 horas, hasta que la acidez titulable alcanzó 0.6 ATECAL, acidez suficiente para que la mezcla coagule. Se utilizó 25 g de cultivo láctico para cada tratamiento, una concentración de 10^6 UFC/g *Lactobacillus casei* y 10^6 UFC/g de

Lactobacillus reuteri. El procedimiento para la elaboración de los tratamientos, adaptado de Revilla (1995), se resume en el diagrama de flujo (ver gráfico 1).

1. **Estandarizar:** La leche se estandariza a 2.5% de grasa.
2. **Pre calentamiento y mezcla de ingredientes:** Se precalienta la leche a 32 °C en el tanque pasteurizador, se agregan los ingredientes líquidos y luego se agregan los sólidos: leche en polvo, azúcar y el estabilizador.
3. **Pasteurización:** Se pasteuriza la leche a 85 °C por 30 minutos.
4. **Homogenización:** Se homogeniza la leche a 2000 psi.
5. **Enfriamiento:** enfriamiento por placas a 45°C
6. **Seccionamiento de los tratamientos:** Se coloca 6.6 Kg de mezcla en los 3 recipientes, para tres tratamientos.
7. **Inoculación:** Se inocula 25.33 g de cultivo láctico para yogur en todos los tratamientos y en dos de los tratamientos se inocula 10^6 UFC/g del probiótico, uno por tratamiento. Para una tanda de 6.6 Kg de mezcla se inocularon 0.011 g de *Lb. casei* y 0.0046 g de *Lb. reuteri* respectivamente.
8. **Baño María:** Los recipientes se colocan en baño María a 45°C.
9. **Incubación:** La acidez final deberá ser de 0.60 ATECAL (acidez titulable expresada como ácido láctico), tardando aproximadamente 3 horas en baño María, una vez alcanzada la acidez se trasladan los tratamientos al cuarto frío.
10. **Maduración:** La mezcla de yogur inoculado ya con las bacterias se deja reposar un día (24 hr) a 4°C. hasta que alcance una acidez ATECAL de 0.9 a 1.1.
11. **Fruta:** Se agrega la fruta al yogur y se mezcla hasta quedar homogéneo.
12. **Envasado:** El yogurt se envasa en frascos con 190 g de capacidad y se almacenan de inmediato en los cuartos fríos a 4°C.

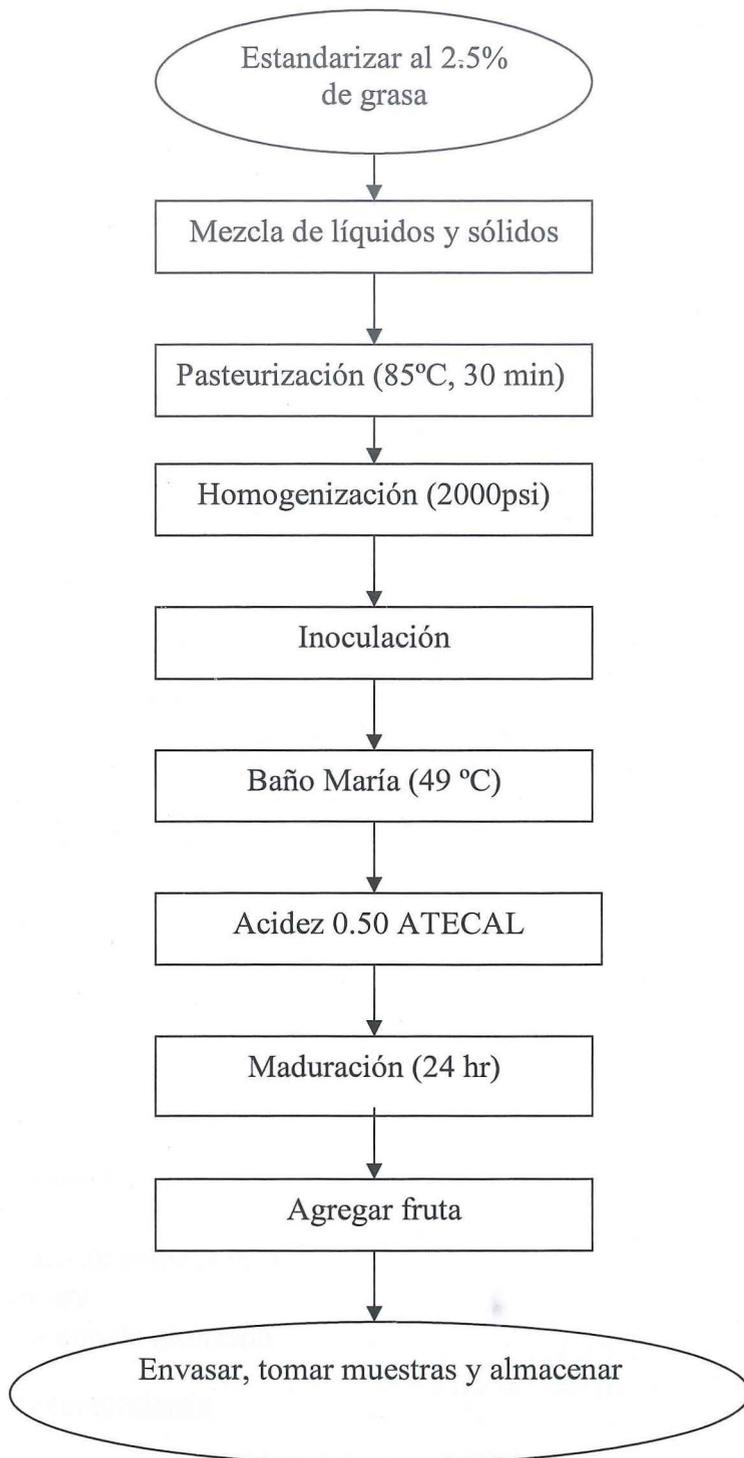


Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración de yogur probiótico, adaptado de Revilla, (2000).

3.5 MEDICIONES DURANTE EL PROCESO

3.5.1 Temperatura

La temperatura fue medida durante todo el proceso de elaboración. Las mediciones se realizaron con termómetro calibrado. Las mediciones se hicieron cada 15 minutos a manera de mantener constante las temperaturas de pasteurización y baño María.

3.5.2 Tiempo

El tiempo fue tomado como medida de estandarización entre repeticiones. Se determinó el tiempo de inoculación con relojes de mano, activándolo al momento de iniciar la incubación y desactivándolo al momento de retirar los recipientes del baño maría.

3.5.3 Acidez titulable

La acidez de la mezcla de yogur se determinó después de la inoculación, cuando esta alcanza una acidez titulable de 0.5ATECAL¹ y luego se almacena a una temperatura de 4°C. Las medidas de acidez se tomaron en el día cero y siete después de elaborado el producto, siguiendo el procedimiento detallado por el Programa de Soporte para la Implementación del Sistema APPCC de la Empresa Universitaria de Industrias Lácteas. Los resultados son expresados en equivalentes de ácido láctico. El procedimiento es detallado a continuación:

3.5.3.1 Materiales

- Leche
- Fenolftaleína (utilizado como indicador)
- NaOH al 0.1N

3.5.3.2 Equipo

- Taza de color blanco
- Pipeta
- Equipo de titulación

3.5.3.3 Procedimiento

1. Se colocan 9 ml de muestra en la taza blanca.
2. Se añaden 3 gotas de la solución alcohólica de fenolftaleína al 1%, como indicador.
3. Titular con una solución de 0.1 N de NaOH.

¹ Comunicación verbal, Información proporcionada por Dr. Osorio.

4. Agitar todo el tiempo mientras se titula, la solución alcalina deberá de dosificarse poco a poco hasta el que color rosado pase inadvertido, al primer cambio de color se deberá reportar el dato.
5. El volumen de NaOH determinado en el titulador, es la acidez titulable de la muestra.
6. De obtenerse un color rosado fuerte deberá repetirse la muestra.

3.6 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

Se hicieron conteos de microorganismos con medio PCA, haciendo muestreos del yogur en el día cero y en el día treinta. Estas placas se hicieron en el laboratorio de la Empresa de Industrias Lácteas, haciendo uso de equipo esterilizador, medios esterilizados, diluciones esterilizadas y siguiendo procedimientos de asepsia. Los platos una vez inoculados se incubaron a 37 °C por 24 hr y luego se hizo el conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Para la preparación de placas se utilizó la técnica de vertido (pour plate).

3.7 ANÁLISIS FÍSICO

El análisis físico de viscosidad se realizó con el viscosímetro de Brookfield, ubicado en el Centro de evaluación de alimentos, (CEA). Haciendo uso de los recipientes de 190 g de yogur intactos. Se utilizó el spindle o implemento número cinco para todas las muestras evaluadas.

Con los análisis de viscosidad se estableció las diferencias entre los tratamientos con inoculaciones de probióticos y el tratamiento control. Estos análisis de viscosidad se realizaron el séptimo día de haber elaborado los tratamientos.

3.8 ANÁLISIS SENSORIAL

Los análisis sensoriales se hicieron al séptimo día de elaborados los tratamientos, los panelistas fueron 12 personas no capacitadas, pero que habitualmente consumen yogur de la planta de Lácteas. Después de explicar a los panelistas no capacitadas, las características y los objetivos del proyecto, se procedió al análisis de las muestras y el llenado de encuestas que posteriormente fueron evaluadas estadísticamente.

Las encuestas presentaban 5 parámetros sensoriales a medir: sabor, textura, aroma, acidez y aceptación general del producto. Se hizo uso de una escala hedónica de 5 puntos (1 = me disgusta mucho; 5 = me gusta mucho). Se aseguró que las muestras estuvieran a la

misma temperatura con respecto a los cuartos fríos. Se utilizó agua como limpiador de paladar entre muestras.

El lugar de la prueba fue adaptado para realizar el análisis sensorial, posicionando en cada lugar tres recipientes con las muestras previamente enumeradas con tres dígitos al azar, un vaso de agua por panelista y las encuestas con instrucciones de llenado.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), y separación de medias (LSD) utilizando un modelo lineal general (GLM, por sus siglas en inglés) del programa estadístico SAS[®], (Statistical Analysis System, versión 8.0), fijando un nivel de significancia $P < 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIOS PRELIMINARES

Se realizó un estudio preliminar a los cultivos puros de las bacterias probióticas determinando la concentración de microorganismos, con el fin de establecer la dosis correspondiente a cada tratamiento, de manera que cada gramo de mezcla de yogur posea 10^6 UFC/ml del cultivo probiótico. Se realizaron siembras por duplicado de tres bacterias probióticas: *Lb. casei*, *Lb. reuteri* y *Lb. plantarum*. Obteniendo conteos aceptables de microorganismos en los dos primeros, seleccionándolos para el experimento (ver cuadro 3).

Los gramos a utilizar en el experimento se obtuvieron calculando el volumen de muestra a elaborar en cada tratamiento y la cantidad de 10^6 UFC/g de los microorganismos probióticos (ver cuadro 3 y anexo 3).

Cuadro 3. Diluciones de cultivos probióticos

Bacteria	UFC/gr.	gr. de cultivo para 6.6kg de mezcla
<i>Lb. casei</i>	$6 * 10^{11}$	0.011 g
<i>Lb. reuteri</i>	$1.4 * 10^{12}$	0.0046 g
<i>Lb. plantarum</i>	$>2.5 * 10^{13}$	-----

4.2 CONTEO MICROBIOLÓGICO

Los resultados referentes a la carga microbiana con respecto al tipo de probiótico utilizado en la mezcla, evidencian que la carga microbiana del yogur aumentó considerablemente desde que el producto fue elaborado (día cero) hasta la semana cuatro (treinta días después). El mayor incremento de la tasa de crecimiento microbiológico se observó en el control, que únicamente contenía cultivo láctico ($p < 0.05$). Sin embargo el tratamiento que presentó los conteos microbiológicos en valores absolutos más altos fue el tratamiento con *Lb. reuteri*.

Cuadro 4. Conteo inicial, final y aumento de la carga microbiana (Log₁₀ UFC/ml)

Tratamiento	Día cero	Día treinta	Diferencia Dia 30 – dia 0
Cultivo láctico + <i>Lb. casei</i>	9.34 ± 0.21	9.40 ± 0.21	0.054 _a
Cultivo láctico + <i>Lb. reuteri</i>	9.60 ± 0.26	9.68 ± 0.26	0.079 _b
Cultivo láctico	9.26 ± 0.23	9.36 ± 0.23	0.105 _c

* Diferente letra representan diferencias estadísticas (p<0.05).

El crecimiento microbiológico más alto se observó en el tratamiento control, inoculado únicamente con cultivo láctico (*Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. vulgaricus*), con un crecimiento microbiológico logarítmico de 0.105 UFC/ml. El mínimo crecimiento microbiano registrado, fue el del tratamiento con *Lb. casei*, indicando un crecimiento logarítmico de 0.054 UFC/ml. Sin embargo se puede mencionar que el conteo de UFC/ml inicial y final más alto se reportó en el tratamiento con *Lb. reuteri*, debido a una mejor adaptabilidad de este microorganismo a la mezcla del yogur Zamorano en comparación con el probiótico *Lb. casei*.

4.3 VISCOSIDAD DEL PRODUCTO FINAL

La viscosidad fue determinada tomando el primer dato reportado por el viscosímetro. Se procuró no agitar la muestra antes de la prueba, y se determinó la misma temperatura para todos los tratamientos.

Cuadro 5. Viscosidad del producto final

Tratamiento	Promedio Pa.s	Separación de medias
Cultivo láctico + <i>Lb. reuteri</i>	7.65 ± 0.37	A
Cultivo láctico + <i>Lb. casei</i>	7.24 ± 0.38	A
Cultivo láctico	6.13 ± 0.32	B

*Diferente letra representan diferencias estadísticas (p<0.05).

En el cuadro 5 se aprecia que el tratamiento con *Lb. reuteri*, fue el que obtuvo una mayor viscosidad pero no significativamente diferente al tratamiento con *Lb. casei* con un promedio de 7.65 Pa.s y 7.24 Pa.s respectivamente. Esta alta viscosidad que presentó el tratamiento con *Lb. reuteri* fue atribuida a la alta carga microbiana que este presentaba con respecto a los otros dos tratamientos.

El tratamiento que reportó significativamente la menor viscosidad fue el control, únicamente con cultivo láctico, la viscosidad de éste fue significativamente menor con respecto a los otros tratamientos ($p < 0.05$). Estos resultados pueden atribuirse a la baja carga microbiana inicial de dicho tratamiento y a la baja acidez final (ver cuadro 6) en comparación con los otros dos tratamientos. En el análisis sensorial de textura los panelistas no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

4.4 ANÁLISIS DE ACIDEZ

La acidez inicial y final de los tratamientos fue definida con el objetivo de determinar el aumento en acidez tanto de los tratamientos con inoculaciones de probióticos como del control. En el cuadro 6 se observa diferencias significativas entre tratamientos con *Lb. casei* y el control, con respecto al tratamiento con *Lb. reuteri*. La acidez más alta es reportada por el tratamiento con *Lb. reuteri*, demostrando un aumento de ATECAL de 0.377, seguido del tratamiento con *Lb. casei*, reportando un aumento de ATECAL de 0.317 y el dato más bajo es reportado por el tratamiento control aumentando únicamente 0.29 equivalentes de ácido láctico.

Comparando el cuadro 4 y el cuadro 6, se concluye que la acidez final, es directamente proporcional a la carga microbiana final del producto, ya que el tratamiento con *Lb. reuteri* reportó la carga microbiana más alta y se documentó como el tratamiento con ATECAL más alto, característica repetida en los tratamientos con *Lb. casei* y el tratamiento control, confirmando la comparación. En el análisis exploratorio no se reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con respecto al atributo sensorial de acidez, debido a que los panelistas tuvieron igual aceptación entre los tratamientos.

Cuadro 6. Evaluación de acidez inicial, final y el aumento de la acidez, expresada en ATECAL.

Tratamiento	Acidez inicial Dia 0	Acidez final Dia 7	Diferencia
Cultivo láctico	0.580 ± 0.010	0.870 ± 0.010	0.290 _a
Cultivo láctico + <i>Lb. casei</i>	0.563 ± 0.006	0.880 ± 0.010	0.317 _a
Cultivo láctico + <i>Lb. reuteri</i>	0.507 ± 0.021	0.883 ± 0.006	0.377 _b

*Diferente letra representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

4.5 ANÁLISIS EXPLORATORIO

4.5.1 Sabor

No se detectaron diferencias entre los tratamientos con respecto al sabor (ver cuadro 7) ya que los cultivos probióticos utilizados en el experimento no tuvieron mayor efecto en cuanto al atributo sensorial de sabor de acuerdo al panel sensorial. Este hecho es también atribuido a la inexperiencia del panel para determinar diferencias en sabor, entre los tratamientos. A partir de esto se concluye que el consumidor no rechazaría el producto por el factor sabor ya que este tiene la misma aceptación en sabor comparado al producto comercializado actualmente.

Cuadro 7. Evaluación del sabor del yogur.

Tratamiento	Calificación	Separación de medias
Cultivo Láctico + <i>Lb. reuteri</i>	4.361 ± 0.723	A
Cultivo Láctico + <i>Lb. casei</i>	4.194 ± 0.668	A
Cultivo Láctico	4.306 ± 0.951	A

***Diferente letra representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).**

4.5.2 Textura

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, en cuanto al atributo sensorial de textura debido a que los panelistas tuvieron una aceptación muy similar de todos los tratamientos. Se demostró que la textura de los tres tratamientos tuvo una alta aceptación entre panelistas ya que el rango de aceptabilidad se encuentra situado entre cuatro (me gusta) y cinco (me gusta mucho), siendo estas las mejores calificaciones.

Los análisis físicos de viscosidad demostraron que si hubo diferencias de viscosidad entre los tratamientos con *Lb casei* y el tratamiento con *Lb reuteri*, con respecto al tratamiento control. A partir de la alta aceptación del panel sensorial con respecto a los tratamientos con probióticos, se concluye que el mercado actual del yogur Zamorano es un mercado potencial del yogur con microorganismos probiótico.

Cuadro 8. Evaluación de la textura en el yogur.

Tratamiento	Calificación	Separación de medias (DMS $p < 0.05$)
Cultivo Láctico + <i>Lb. reuteri</i>	4.250 \pm 0.937	A
Cultivo Láctico	4.083 \pm 0.967	A
Cultivo Láctico + <i>Lb. casei</i>	4.056 \pm 0.955	A

***Diferente letra representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).**

4.5.3 Aroma

De acuerdo a la información presentada en el cuadro 9, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, en la variable sensorial de aroma. Esto se debe a la fruta con esencia natural que es utilizada como ingrediente en las mismas cantidades para los tres tratamientos, lo cual pudo distorsionar de manera considerable la percepción del aroma por los panelistas.

Cuadro 9. Evaluación del aroma en el yogur.

Tratamiento	Calificación	Separación de medias (DMS $p < 0.05$)
Cultivo Láctico + <i>Lb. reuteri</i>	4.278 \pm 0.779	A
Cultivo Láctico	4.083 \pm 0.806	A
Cultivo Láctico + <i>Lb. casei</i>	3.972 \pm 0.736	A

***Diferente letra representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).**

Los panelistas y consumidores potenciales no encuentran ninguna diferencia entre el aroma del tratamiento control y los tratamientos con inoculación de probióticos. Esta característica es relacionada positivamente con la similitud sensorial y con la potencial aceptación del producto en el mercado.

4.5.4 Acidez

Los panelistas no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la acidez del producto, fenómeno referido a la alta aceptación de la acidez de los tratamientos por los panelistas. Sin embargo pruebas químicas de acidez (ATECAL) demuestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos control y *Lb. casei* con respecto al tratamiento con *Lb. reuteri*, al séptimo día de elaboración, siendo este último el que presentó los valores mas altos de ATECAL (ver cuadro 6).

Cuadro 10. Evaluación sensorial de la acidez en el yogur

Tratamiento	Calificación	Separación de medias (DMS $p < 0.05$)
Cultivo Láctico + <i>Lb. reuteri</i>	4.389 ± 0.803	A
Cultivo Láctico	4.194 ± 0.786	A
Cultivo Láctico + <i>Lb. casei</i>	4.056 ± 0.924	A

*Diferente letra representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

4.5.5 Aceptación general del yogur

Como se pudo demostrar en los atributos anteriores, los panelistas obtuvieron como resultado una aceptación muy similar entre los tratamientos, sin encontrar diferencias significativas entre los mismos. Sin embargo al momento de determinar la aceptación general se puede observar claramente las preferencias de los panelistas por el tratamiento con *Lb. reuteri*.

En cuanto a la aceptación general del producto detallado en el cuadro 11, se observa que los panelistas encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con *Lb. reuteri* y el tratamiento con *Lb. casei*. Sin embargo la aceptación general de los probióticos no fue significativamente diferente con respecto al tratamiento control ($p < 0.05$).

El tratamiento más aceptado fue el tratamiento con *Lb. reuteri*, con un promedio de aceptación de 4.472, seguido del tratamiento control, con un promedio de 4.222 y el tratamiento menos aceptado fue el tratamiento con *Lb. casei*, reportando un promedio de aceptación de 4.083.

Cuadro 10. Evaluación sensorial de aceptación general del yogur

Tratamiento	Calificación	Separación de medias (DMS $p < 0.05$)
Cultivo Láctico + <i>Lb. reuteri</i>	4.472 ± 0.609	A
Cultivo Láctico	4.222 ± 0.760	AB
Cultivo Láctico + <i>Lb. casei</i>	4.083 ± 0.649	B

*Diferente letra representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Comparando los cuadros 11 y 5, podemos concluir que el tratamiento con *Lb. reuteri*, que tuvo mayor aceptación general en el análisis sensorial, fue también el tratamiento que reportó mayor acidez. Lo que indica que el consumidor potencial prefiere un yogur un poco más ácido en comparación con el que actualmente se comercializa.

5. CONCLUSIONES

- Los tratamientos inoculados con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri*, presentaron cargas microbianas más altas que la carga del control.
- Los tratamientos con inoculaciones de microorganismos probióticos, no demostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el análisis exploratorio, con respecto al control en los atributos sensoriales de: sabor, textura, aroma y acidez.
- Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la aceptación general del producto, demostrando que los panelistas prefirieron el tratamiento con inoculación de *Lb. reuteri*, siendo este tratamiento el que registró los análisis de acidez más altos.
- El mayor incremento de la carga microbiana fue reportado por el tratamiento control, con un aumento logarítmico de 0.105 UFC/ml Sin embargo el mayor conteo microbiológico final fue obtenido por el tratamiento con *Lb. reuteri*, con una carga final logarítmica de 9.68 UFC/ml.
- El tratamiento con mayor aceptación general, mayor acidez, mayor viscosidad, y mayor carga microbiana final fue el tratamiento con la inoculación del microorganismos probiótico *Lb. Reuteri*.

6. RECOMENDACIONES

- Efectuar un análisis detallado de vida útil del producto elaborado, que en literatura figura un aproximado de 28 días, sin embargo durante el proceso se mantuvieron las características sensoriales intactas durante un mes y una semana.
- Realizar un estudio de mercado para poder crear el envase de este producto, adaptándolo al mercado meta.
- Analizar mediante pruebas de compatibilidad, la convivencia de los cultivos probióticos con los cultivos lácticos originales del yogur.
- Realizar un estudio de mercado cuantificando la demanda y determinando la aceptación del producto en el mercado.
- Concretar un análisis de costos para justificar la producción de alimentos probióticos dentro de la planta de Industrias Lácteas de Zamorano.
- Adquirir cultivos probióticos con empresas especializadas y empezar a desarrollar nuevos productos en las líneas de quesos y helados.
- Controlar los parámetros de temperatura, tiempo y acidez en la producción de este tipo de productos, para la producción comercial.
- Continuar con este tipo de investigaciones, diferentes cantidades, y otro tipo de cultivos probióticos ya que son de gran interés actualmente en nuestro mercado centroamericano.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alimentación Sana. Los famosos lactobacilos. (en línea). Consultado el 10 de septiembre del 2005. Disponible en: <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/Lactobasilos.htm>

AXELSSON, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology, Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd ed. New York.

BILLER J, Katz A, Flores A, et al. 1995. Treatment of C. difficile colitis with Lactobacillus GG. J Pediatr Gastroenterol Nutr; 224-6p.

Chichiyasu Dairy Co. LTD, 2004. (en línea). Consultado el 12 de julio del 2005. Disponible en: <http://www.chichiyasu.com/e/reuteri/index.html>

Castillo J. 1997. Lactobacilos. (en línea). Consultado el 12 de julio del 2005. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos15/lactobacilos/lactobacilos.shtml#intro>

Conde A. 2003. Propagación de células del lactobacillus casei a escala de laboratorio para la elaboración de una bebida multifuncional probiótica. (en línea). Consultado el 10 de julio del 2005. Disponible en: <http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpyuZEuppERlPEujog.php>

Condon R. 1998. Yogurt: elaboración y valor nutritivo. Fundación española de la nutrición. Madrid.

DIPLOCK AT, 1991. Scientific concepts of functional foods in Europe consensus documents. Journal of Nutrition .81:S1.

EUFIC. 2005. Lactic acid bacteria - their uses in food. (en línea). Consultado el 9 de agosto del 2005. Disponible en: <http://www.eufic.org/gb/food/pag/food18/food184.htm>

Guarner F, Schaafsma GJ. 1998. Probiotics. Int Food Microbiolpgy. ;238p.

GORBACH, S. Efficacy of Lactobacillus in treatment of acute diarrhea. Nutrition Today 1996;31 (suppl 1):19S-23S.

Holzappel W. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American Journal of Clinical Nutrition. Suplemento. (en línea).

Consultado el 12 de julio del 2005. Disponible en:
<http://www.ajcn.org/cgi/content/full/73/2/365S#T1>

KANDLER, O., and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, 9 ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 1063-1065p.

Kaila M. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response on human diarrhea by a human lactobacillus strain. 32-141p.

Leoviz Distribuciones. 2005. Beneficios de los Probióticos. (en línea). Consultado el 11 de Agosto de 2005. Disponible en:
<http://www.probioticos.net/informacion/beneficios.php>

Modler HW, McKellar RC, Yaguchi M. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors-review. 29-41p.

Nature's Sunshine Products, Inc. 2002. *Lb. reuteri*. (en línea). Consultado el 12 de julio del 2005. Disponible en:
http://www.greatestherbsonearth.com/nsp/1_reuteri_lactobacillus.htm

Nutrinfo. 2000. *Lactobacillus casei* strain Shirota. (en línea). Consultado el 13 de agosto de 2005. Disponible en: <http://www.nutrinfo.com.ar/pagina/info/lactshir.html>

Pattacini A. 2005. Alimentos Funcionales: Probióticos. Nota científica. (en línea). Consultado el 10 agosto del 2005. Disponible en:
<http://www.nutrar.com/detalle.asp?ID=569>

POCHART P. 1992. Survival of Bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion; 78-80p.

REVILLA, A. 2000. *Tecnología de la leche*. 3a. Ed. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras, Centro América. 396 p.

Rosado J. y Ondarza M. 2004. Prebióticos y probióticos: efectos e implicaciones en la fisiología de la nutrición. Artículo científico. (en línea). Consultado el 13 de agosto de 2005. Disponible en: <http://www.nutrar.com/detalle.asp?ID=2358>

SAGGIORO A, et al. 2005. *Helicobacter pylori* eradication with *Lactobacillus reuteri*. A double-blind placebo-controlled study. 37p.

Sanz Y. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. (en línea). Consultado el 10 de septiembre del 2005. Disponible en: <http://www.gastroinf.com/PROBIOTICO.pdf>.

SCHIFFIN E.1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Journal Dairy Science* August. 515S-20S.

TORRES R. 1999. Flora intestinal, probióticos y salud. Guadalajara. Edit Gráfica Nueva, Yakult.

Taranto M. 2005. Alimentos funcionales probióticos. *Revista Química Viva* Número 1, año 4, Mayo. (en línea). Consultado el 8 de julio del 2005. Disponible en: quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

TAKAGI A, Matsuzaki T, Sato M, Nomoto K, Morotomi M, Yokokura T. 1999. Inhibitory effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice. 117p.

YUKI N, Watanabe K, Mike A, Tagami Y, Tanaka R, Ohwaki M, Morotomi M. 1999. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *Journal Food Microbiology*. 57p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Fotos de microorganismos probióticos.

Foto 1 *Lactobacillus casei*

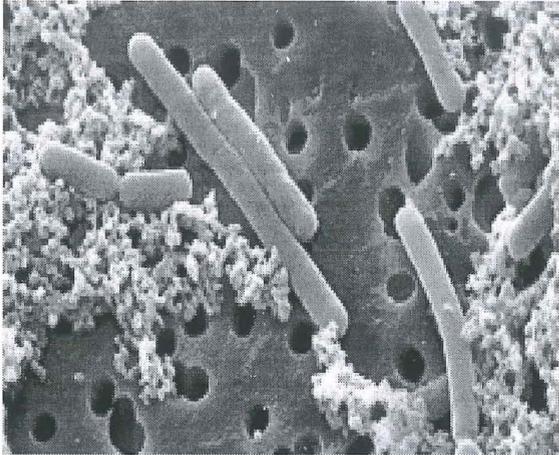
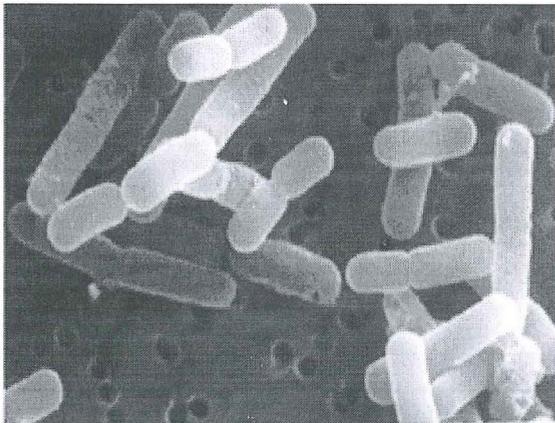


Photo courtesy of Jeff Broadbent,
Utah State University
Lactobacillus casei.

Foto 2 *Lactobacillus reuteri*



Chichiyasu Dairy Co., LTD, 2004
Lactobacillus reuteri

**Hoja de Evaluación Sensorial
Yogur Probiótico sabor a fresa.**

Nombre _____

Fecha: _____

Muestra No.: _____

Encierre en un círculo la evaluación que se merece cada muestra analizada en cada una de sus características.

Sabor	1 Me disgusta mucho	2 No me gusta	3 No me gusta ni me disgusta	4 Me gusta	5 Me gusta mucho
Textura	1 Me disgusta mucho	2 No me gusta	3 No me gusta ni me disgusta	4 Me gusta	5 Me gusta mucho
Aroma	1 Me disgusta mucho	2 No me gusta	3 No me gusta ni me disgusta	4 Me gusta	5 Me gusta mucho
Acidez	1 Me disgusta mucho	2 No me gusta	3 No me gusta ni me disgusta	4 Me gusta	5 Me gusta mucho
Aceptación general del producto	1 Me disgusta mucho	2 No me gusta	3 No me gusta ni me disgusta	4 Me gusta	5 Me gusta mucho

Comentarios:

Anexo 3. Cálculo de gramos de Cultivo probiótico a inocular.

Formula:

$$(\text{Concentración inicial}) (X \text{ g. de probiótico}) = (\text{Concentración final}) (\text{Gramos de yogur})$$

Ejemplo:

$$(6 \times 10^{11}) (X \text{ g}) = (1 \times 10^6) (6660\text{g})$$

$$X = 0.011\text{g de cultivo probiótico.}$$

Se tiene que inocular 0.011g de cultivo probiótico en 6660g de yogur para obtener una concentración final de 10^6 UFC/ml de probiótico.

Anexo 4. Análisis de varianza del estudio.

Variable	R-Square	Coeff Var (%)	Pr > F
Acidez ATECAL	0.87	5.18	0.0021
Viscosidad	0.82	5.13	0.0052
Microbiología	0.93	7.28	<.0001
Sabor	0.10	18.10	0.5111
Textura	0.06	22.59	0.6344
Aroma	0.09	18.36	0.2257
Acidez	0.09	19.38	0.2250
Aceptación general	0.08	15.77	0.0494

R-Square = Ajuste del modelo.

Coeff Var = Coeficiente de variación.

Pr > F = Significancia del modelo.

Anexo 5. Reacción en cadena de polimerasa gel electroforesis de biopsia del intestino para el probiótico *Lactobacillus casei*

Las tablas y geles a continuación son un estudio ejecutado durante la pasantía que realizó la autora de la tesis, realizada en The Royal Veterinary and Agricultural University, en Copenhagen, Dinamarca.

Las tablas demuestran el número de referencia del probiótico *Lb. casei* en el gel, este gel se realizó con fines científicos de demostrar la presencia de los microorganismos probióticos fijados en el intestino. Para esta comparación se utilizó un estándar del probiótico que fue ingerido por el paciente.. En esta tabla se puede apreciar que en su mayoría son *Lb. casei*, 16 de 28 muestras, queriendo decir que la fijación del microorganismo probiótico *Lb. casei* es de un 57.14%, porcentaje alto para solo haber sido consumido 1 g de esta bacteria diariamente por 10 días. Lo que nos indica que este microorganismo probiótico es altamente viable al momento de ser ingerido por el humano. Siendo esta la razón de preselección del microorganismo probiótico *Lb. casei* para el estudio de este proyecto.

No. Gel	Probiótico
0	Marcador
1	<i>Lb. casei</i>
2	<i>Lb. casei</i>
3	-----
4	<i>Lb. casei</i>
5	<i>Lb. casei</i>
6	<i>Lb. casei</i>
7	<i>Lb. casei</i>
8	<i>Lb. casei</i>
9	<i>Lb. casei</i>
10	<i>Lb. casei</i>
11	<i>Lb. casei</i>
12	<i>Lb. casei</i>
13	<i>Lb. casei</i>
14	<i>Lb. casei</i>

No. Gel	Probiótico
15	-----
16	<i>Lb. casei</i>
17	-----
18	-----
19	-----
20	<i>Lb. casei</i>
21	<i>Lb. casei</i>
22	-----
23	-----
24	-----
1	-----
2	-----
3	Standard <i>Lb. casei</i>
4	-----
5	Marcador

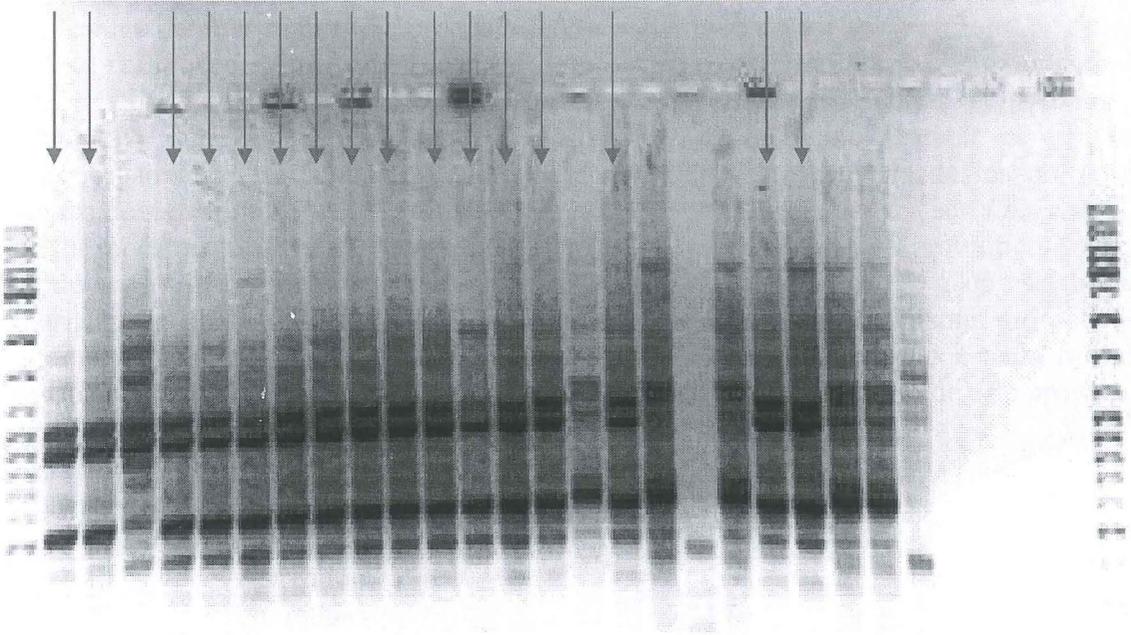
Anexo 6. Fotografía de Gel Electroforesis del probiótico *Lactobacillus casei*

Foto de gel : Biopsia de intestino ascendente y transverso del paciente, foto tomada por la autora en Dinamarca, Copenhagen, durante la pasantía. 2005.

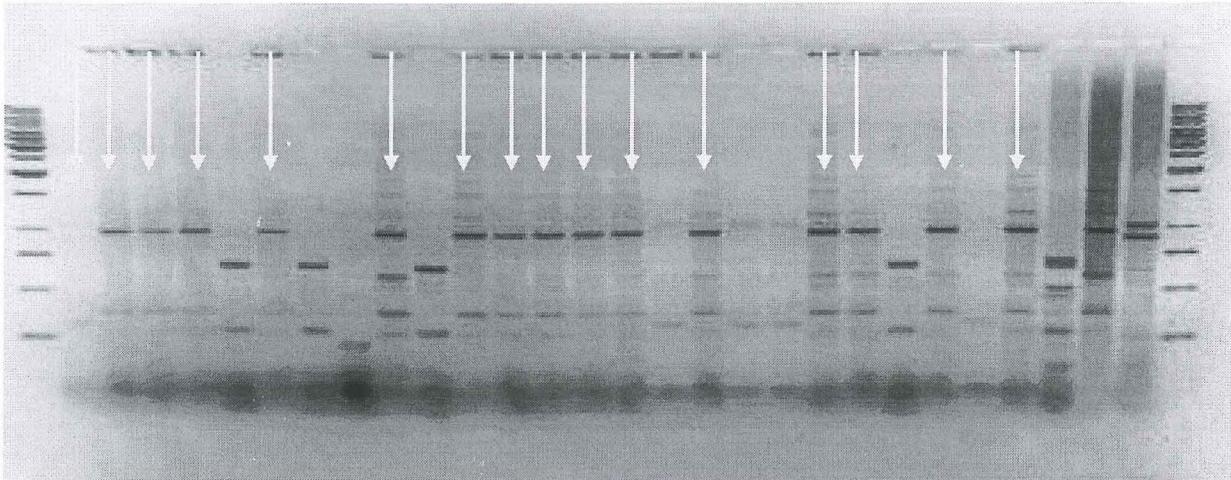
En la fotografía anterior se señalan las cadenas de ADN que corresponden a *Lactobacillus casei*, demostrando la alta capacidad de adherencia a la pared del intestino de este probiótico.

Anexo 7. Reacción en cadena de polimerasa gel electroforesis de biopsia del intestino para el probiótico *Lactobacillus reuteri*.

Las tablas demuestran el número de referencia del probiótico *Lb. reuteri* en el gel, este gel se realizó con fines científicos de demostrar la presencia de los microorganismos probióticos fijados en el intestino. Para esta comparación se utilizó un estándar del probiótico que fue ingerido por el paciente y al momento realizar el gel estos microorganismos son incluidos para poder determinar la presencia de los probióticos dentro del intestino. En esta tabla se puede apreciar que en su mayoría son *Lb. reuteri*, 16 de 28 muestras, queriendo decir que la fijación del microorganismo probiótico *Lb. casei* es de un 57.14%, porcentaje alto para solo haber sido consumido 1 g de esta bacteria diariamente por 10 días. Lo que nos indica que este microorganismo probiótico es altamente viable al momento de ser ingerido por el humano. Siendo esta la razón de preselección del microorganismo probiótico *Lb. reuteri* para el estudio de este proyecto.

1	Marcador
2	<i>Lb. reuteri</i>
3	<i>Lb. reuteri</i>
4	<i>Lb. reuteri</i>
5	<i>Lb. reuteri</i>
6	
7	<i>Lb. reuteri</i>
8	
9	-----
10	<i>Lb. reuteri</i>
11	
12	<i>Lb. reuteri</i>
13	<i>Lb. reuteri</i>
14	<i>Lb. reuteri</i>
15	<i>Lb. reuteri</i>

16	<i>Lb. reuteri</i>
17	-----
18	<i>Lb. reuteri</i>
19	-----
20	-----
21	<i>Lb. reuteri</i>
22	<i>Lb. reuteri</i>
23	
24	<i>Lb. reuteri</i>
25	-----
26	<i>Lb. reuteri</i>
27	
28	
29	
30	Marcador

Anexo 8. Fotografía de Gel Electroforesis del probiótico *Lactobacillus reuteri*.

Gel : Biopsia de intestino ascendente y transversal del paciente, foto tomada por la autora en Dinamarca, Copenhague, durante la pasantía. 2005.

En la fotografía anterior se señalan las cadenas de ADN que corresponden a *Lactobacillus reuteri*, demostrando la alta capacidad de adherencia a la pared del intestino de este probiótico, con un 57.14% de aparición.

Anexo 8. Resistencia a los antibióticos.

Bacteria probiótica	Ampicillina	Gentamina	Eritrocina	Tetraciclina	Vancomicina
<i>Lb. acidophilus.</i>		R			
<i>Bifidobacterium.</i>		R			
<i>Lb. rhamnosus.</i>		R			
<i>Lb rhamnosus I.</i>		R			R
<i>Lb reuteri.</i>		R	R		R
<i>B. longum.</i>					
<i>Lb. paracasei</i>					R
<i>Lb. rhamnosus.</i>		R			R
<i>Lb. Plantarum.</i>		R	R		R
<i>B. bifidum.</i>		R			
<i>Lb. casei.</i>					R
<i>Lb. casei I.</i>		R			R
<i>Lb. paraplantarum.</i>					R

La tabla de determinación de resistencia a los antibióticos fue realizada por la autora en The Royal Veterinary and Agricultural University, en Copenhagen, Dinamarca, durante la pasantía. 2005. La tabla anterior demuestra que los probióticos presentan resistencia a algunos antibióticos, y que ningún microorganismo probiótico presenta resistencias contra la ampicillina ni resistencias contra la tetraciclina. La resistencia de los probióticos a los antibióticos es una característica no deseada en estos microorganismos.

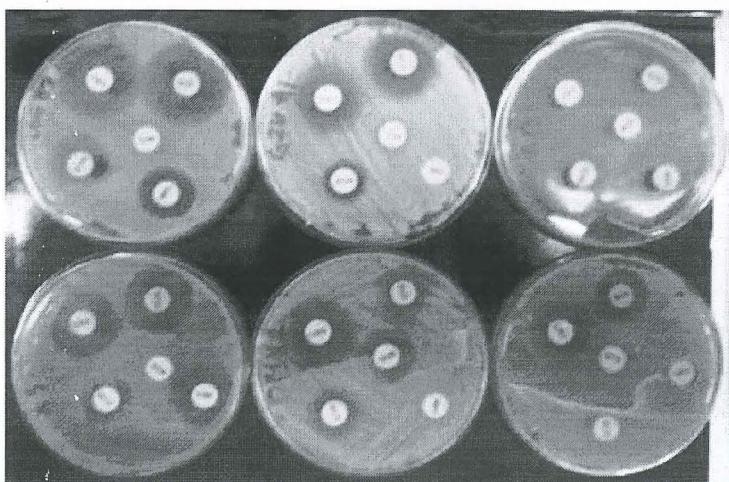


Foto de platos petri con inoculaciones de probióticos y con pastillas de antibióticos, tomada por la autora durante su pasantía.