

**ELABORACIÓN DE JUGOS DE FRUTA CON ADICIÓN DE BACTERIAS
ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO**

JOHANNA ANDREA SERNA JIMÉNEZ

**Trabajo de grado para optar por el título de
Maestría en Diseño y Gestión de Procesos
en énfasis de Bioprocesos**

**Universidad de La Sabana
Facultad de Ingeniería**

Chía

2012

**ELABORACIÓN DE JUGOS DE FRUTA CON ADICIÓN DE BACTERIAS
ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO**

JOHANNA ANDREA SERNA JIMÉNEZ

BERNADETTE KLOTZ CEBERIO
Director, Ph.D

CATALINA AGUILAR RIVERA
Director, M.Sc

Universidad de La Sabana
Facultad de Ingeniería

Chía

2012

“La ciencia es una de las formas más elevadas del quehacer espiritual pues está ligada a la actividad creadora del intelecto, forma suprema de nuestra condición humana.”

René Gerónimo Favaloro

A Dios por permitirme llegar a este momento, por darme la oportunidad de vivir las cosas maravillosas que me ha dado. A mis padres Luis Saúl Serna y Nancy Jiménez por su amor, apoyo, entrega. A todos los que más quiero.

AGRADECIMIENTOS

Al fondo de investigación de la Universidad de la Sabana y Colciencias por apoyar y financiar este proyecto.

A la Doctora Bernadette Klotz y a la Candidata a Doctor Catalina Aguilar por su apoyo incondicional, por haber creído en mí, por guiarme e incentivar mi interés por la investigación; sin eso este proyecto no sería lo que es hoy.

A todos los que hacen parte del grupo de Nuevas Tecnologías: Angélica Mejía, Francisco Garcés, Javier Melo. Porque a pesar de las adversidades, salimos adelante y demostramos que somos un equipo.

A mis amigas del alma Annamaria Filomena, Nancy Córdoba, Maria Angélica Uribe por animarme, apoyarme, aconsejarme, por estar siempre ahí y sentir esta tesis propia; las quiero con toda el alma.

A los auxiliares de laboratorio Martica, Pilar, Carolina por su colaboración y en especial a Jorge Rodríguez por toda su apoyo.

A Luis Eduardo Díaz, por enseñarme y guiarme en la identificación molecular, ser mi amigo y apoyo.

Las opiniones expresadas en este documento son las de sus autores, no reflejan necesariamente los puntos de vista de la Universidad de la Sabana.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	177
2. OBJETIVOS	199
2.1. OBJETIVO GENERAL	199
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	199
3. MARCO TEÓRICO	20
3.1. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS	20
3.2. ALIMENTOS FUNCIONALES	24
3.3. PROBIÓTICOS	26
3.3.1. Criterios de selección para cepas probióticas	27
3.3.2. Identificación macroscópica y microscópica	29
3.3.3. Identificación bioquímica	30
3.3.4. Identificación molecular	30
3.3.5. Pruebas in vitro para evaluación del potencial probiótico de cepas	311
3.3.6. Pruebas in vivo para evaluación del potencial probiótico de cepas	321
3.3.7. Efectos sobre la salud y mecanismos de acción de los probióticos	322
3.3.8. Seguridad de los probióticos	344
3.3.9. Etiquetado	355
3.3.10. Mercado de probióticos	355
3.4. TRACTO GASTROINTESTINAL, PROBIÓTICOS Y MICROBIOTA NATIVA	366
3.4.1. Estómago	388
3.4.2. El intestino	388
3.5. JUGOS	399
3.5.1. Composición	399
3.5.2. Proceso de elaboración	40
3.5.3. Normatividad para jugos de fruta	411
3.5.4. Mercado de los jugos	422
4. ESTADO DEL ARTE	466
4.1. PROBIÓTICOS Y ALIMENTOS FUNCIONALES	466

4.2.	CEPAS AISLADAS DE ALIMENTOS	488
4.3.	SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS	511
4.4.	APLICACIÓN DE PROBIÓTICOS EN JUGOS	555
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	588
5.1.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS	588
5.1.1.	Aislamiento y caracterización de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) a partir de alimentos autóctonos	588
5.1.2.	Identificación bioquímica	599
5.1.3.	Identificación molecular	599
5.2.	EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO	622
5.2.1.	Resistencia a pH ácido	622
5.2.2.	Sensibilidad a antibióticos	644
5.2.3.	Actividad antimicrobiana	644
5.2.4.	Resistencia a sales biliares	655
5.2.5.	Adhesión a células de la mucosa intestinal	666
5.2.6.	Cálculo del potencial probiótico	68
5.3.	VIABILIDAD DE LAS CEPAS EN JUGOS DE FRUTA	699
5.3.1.	Preparación de jugos	699
5.3.2.	Preparación del inóculo	70
5.3.3.	Evaluación de la viabilidad de la BAL en jugos	70
5.4.	PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS JUGOS	71
5.4.1.	Acidez	71
5.4.2.	pH	72
5.4.3.	°Brix	72
5.4.4.	Evaluación sensorial	72
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	733
6.1.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	733
6.1.1.	Identificación molecular	766
6.2.	EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO	799
6.2.1.	Resistencia a pH ácido	799
6.2.2.	Sensibilidad a antibióticos	83
6.2.3.	Actividad antimicrobiana	855

6.2.4.	Resistencia a sales biliares	888
6.2.5.	Adhesión a células de la mucosa intestinal	91
6.2.6.	Discusión de los resultados del potencial probiótico	955
6.3.	ADICIÓN DE BAL JUGOS DE FRUTA	100
6.3.1.	Evaluación microbiológica	100
6.3.2.	Evaluación fisicoquímica	102
6.3.3.	Evaluación sensorial	1077
7.	CONCLUSIONES	11111
8.	RECOMENDACIONES	11313
9.	BIBLIOGRAFÍA	11515
10.	ANEXOS	12424

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas	222
Tabla 2. Ejemplos de alimentos fermentados de consumo mundial	233
Tabla 3. Tipos de alimentos funcionales	25
Tabla 4. Criterios de selección para microorganismos probióticos.	288
Tabla 5. Identificación morfológica microscópica de las cepas aisladas.	299
Tabla 6. Algunos ejemplos de productos probióticos	366
Tabla 7. Propiedades físico químicas de jugos de fruta	422
Tabla 8. Requerimientos microbiológicos para jugos de fruta	422
Tabla 9. Microorganismos probióticos	466
Tabla 10. Cepas comerciales probióticas	47
Tabla 11. Microorganismos aislados de alimentos tradicionales	48
Tabla 12. Resumen técnicas in vitro reportadas por algunos autores	522
Tabla 13. Lista de alimentos de los que se realizaron los aislamientos	59
Tabla 14. Clasificación de la inhibición de acuerdo con el tamaño de los halos	65
Tabla 15. Asignación de puntajes para el cálculo de potencial probiótico	68
Tabla 16. Condiciones estándares de las pulpas de fruta	69
Tabla 17. Clasificación de la aceptabilidad de jugos de fruta en pruebas sensoriales	72
Tabla 18. Alimentos de los que se aislaron las cepas	73
Tabla 19. Resultados de la identificación bioquímica	75
Tabla 20. Resultados con porcentaje de resistencia de las cepas a pH de 2,0	82
Tabla 21. Resultados de antibiogramas.	83
Tabla 22. Resultados de la actividad antimicrobiana	86

Tabla 23. Porcentaje de resistencia de las cepas a una concentración sales biliares al 2,0%	90
Tabla 24. Resumen de los resultados obtenidos en el potencial probiótico.	96
Tabla 25. Cálculos del potencial probiótico	97
Tabla 26. Cuadro comparativo de los requerimientos de la FAO-OMS (2002) en la evaluación de probióticos y las pruebas realizadas con los aislamientos	99

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Rutas metabólicas usadas por las bacterias ácido lácticas	21
Figura 2. Proceso de selección y evaluación de microorganismos probióticos	27
Figura 3. Imagen de la galería API usada en la identificación bioquímica	30
Figura 4. Resumen de los efectos de los probióticos sobre la salud	34
Figura 5. Composición flora gastrointestinal humana	37
Figura 6. Gráfica de la distribución del volumen de ventas	43
Figura 7. Evolución de las ventas en la industria hortofrutícola	44
Figura 8. Consumo per cápita de jugos, año 2000	45
Figura 9. Protocolo usado en el termociclador para PCR	60
Figura 10. Conservación del material genético	61
Figura 11. Activación de cepas	62
Figura 12. Resistencia a pH ácido	63
Figura 13. Pozos para medir la inhibición	65
Figura 14. Procedimiento para medir la resistencia a sales biliares	65
Figura 15. Activación de cepas	67
Figura 16. Preparación del inóculo	70
Figura 17. Esquema de los ensayos de la evaluación microbiológica	71
Figura 18. Electroforesis	77
Figura 19. Cartas de control 3 sigma para evaluación de la viabilidad de las cepas bacterianas a pH ácido	80
Figura 20. Resistencia de las BAL en estudio a diferentes valores de pH después de 24 horas	82
Figura 21. Porcentaje de sensibilidad a los antibióticos por parte de las BAL	84
Figura 22. Fotografía de ensayos de actividad antimicrobiana	86

Figura 23. Cartas de control 3 sigma para evaluación de la viabilidad de las cepas bacterianas en sales biliares	88
Figura 24. Microfotografías de controles negativos en ensayo de adhesión celular	92
Figura 25. Microfotografías controles positivos en ensayo de adhesión celular	93
Figura 26. Microfotografías bacterias ácido lácticas en ensayo de adhesión celular	94
Figura 27. Potencial probiótico de los aislamientos	98
Figura 28. Evaluación de la viabilidad de la cepa No.7 (<i>L. plantarum</i>) en jugos de fruta	101
Figura 29. Resultados de las pruebas de acidez en jugos	103
Figura 30. Resultados de las pruebas de pH en jugos	105
Figura 31. Resultados de las pruebas de grados Brix en jugos	106
Figura 32. Resultados generales de las pruebas sensoriales por jugos	108
Figura 33. Resultados de las pruebas sensoriales en jugos por atributos	110

LISTA DE ANEXOS

	Pág
ANEXO 1. Caracterización de los alimentos utilizados como fuente de aislamiento de las BAL	124
ANEXO 2. Formato usado para la evaluación sensorial de los jugos de fruta	125
ANEXO 3. Resultados estadísticas para las pruebas físico químicas	126

RESUMEN

En este proyecto se evaluó *in vitro* el potencial probiótico de cuatro bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos. Para la identificación de las cepas, se procesaron muestras de DNA mediante PCR (amplificación del gen 16s), obteniéndose amplímeros de aproximadamente 420bp. Los productos de PCR se secuenciaron y a través de bioinformática se identificaron las siguientes especies: dos *L. plantarum* (aisladas de coliflor y harina de maíz) y dos *L. fermentum* (aisladas de pera y queso crema). El potencial probiótico de estas cepas se evaluó midiendo: su resistencia a pH ácido, sales biliares y antibióticos, su actividad antimicrobiana y su capacidad de adherencia. Los resultados de las pruebas *in vitro* mostraron que: (1) a pH 2,5, las cepas se mantuvieron en concentraciones celulares por encima de 7,0 log UFC/mL; (2) presentaron un porcentaje de sensibilidad antibiótica por encima del 78,0%, frente a 23 antibióticos de uso común; (3) mediante la técnica de difusión en placa, se encontró que las cuatro cepas presentaron actividad antimicrobiana significativa frente a seis patógenos de importancia en salud pública; (4) las dos cepas de *L. plantarum*, presentaron 81,0% y 72,0% de resistencia a sales biliares (2,0% de concentración) respectivamente, y (5) presentaron adhesión significativa a células de la mucosa intestinal humana (Mucine-Tissue-Trol™). Se realizaron cálculos para establecer el potencial probiótico en términos de porcentaje para las cuatro cepas estudiadas. Se encontró que la cepa *L. plantarum* aislada de coliflor presentó un potencial probiótico del 100,0%, seguida por la otra cepa de *L. plantarum* (aislada de harina de maíz) con un 87,5% de potencial probiótico. Los resultados obtenidos muestran que las cepas de *L. plantarum* poseen resistencia a las condiciones gastrointestinales, potencial para establecerse en el intestino del hospedero y ejercer efectos probióticos antimicrobianos, por lo que, podrían también ser buenas candidatas para la producción de alimentos funcionales. Adicionalmente, con la cepa de *L. plantarum* que presentó mayor potencial probiótico *in vitro*, se realizó un estudio de viabilidad, sobre jugos de fruta estandarizados de sabor a mango (*Mangifera indica*), lulo (*Solanum quitense*) y fresa (*Fragaria vesca*) y almacenados a condiciones de refrigeración a 8,0°C. Los resultados obtenidos mostraron una alta tolerancia de la cepa en estudio a las condiciones fisicoquímicas de los tres jugos estandarizados y a la temperatura de refrigeración evaluada. Luego de haber inoculado los jugos con concentraciones celulares aproximadas de 10¹⁰ UFC/mL, se observó para los tres jugos, que después de 30 días de almacenamiento, la cepas solo disminuyeron su concentración celular en dos ciclos logarítmicos, obteniendo poblaciones finales cercanas a 10⁸ UFC/mL. Por otro lado, se presentaron diferencias significativas (p<0,05) entre las propiedades fisicoquímicas de acidez y pH de los jugos inoculados con *L. plantarum* y los jugos control mientras que en °Brix no se presentaron diferencias significativas. Los resultados del análisis

sensorial mostraron que en el caso de los jugos inoculados con la BAL, el porcentaje de aceptabilidad fue muy alto y fue comparable con los resultados obtenidos con los controles, lo que indica que estos jugos pueden llegar a ser matrices efectivas en la elaboración de jugos funcionales adicionados con microorganismos.

ABSTRACT

In this study, the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Colombian foods was evaluated *in vitro*. The bacterial species were identified by molecular methods based on the analysis of 16S rDNA sequences. PCR-primers yielded amplicons of approximately 420bp that were sequenced and used for the identification through bioinformatics of the following species: two *Lactobacillus plantarum* (isolated from cauliflower and corn flour) and two *Lactobacillus fermentum* (isolated from pear and cream cheese). The probiotic potential of the *Lactobacillus* strains was evaluated through different assays that include survival in conditions that resemble those existing in the gastrointestinal tract (low pH values and presence of bile salts), antimicrobial activity, adherence to intestinal mucin, and pattern of antibiotic sensitivity. The results of the *in vitro* tests showed that the strains maintained cell concentrations above 7,0 log CFU / mL at pH 2,5 and had an antibiotic sensitivity above 78,0% (tested against 23 commonly used antibiotics). Four strains showed significant antimicrobial activity against six pathogens of public health importance (plate diffusion method) and the two strains of *L. plantarum* showed 81,0% and 72,0% resistance to bile salts (2,0% concentration) respectively and significant adhesion to intestinal mucosal cells (human mucin-Tissue-Trol™). The probiotic potential was calculated for the four studied strains and the reference strain. *L. plantarum* isolated from cauliflower had a probiotic potential of 100,0% followed by the *L. plantarum* strain isolated from corn flour with 87,5%. Both strains showed promising properties to be used for the production of functional foods, such as probiotic juices. The next part of the study involved the evaluation of the viability of the *L. plantarum* strain with the best performance in mango (*Mangifera indica*), lulo (*Solanum quitense*) and strawberry (*Fragaria vesca*) juices at 8,0°C. The *L. plantarum* strain showed high viability: in the three juices the bacterial cell concentration decreased from 10¹⁰ UFC / mL to 10⁸ UFC / mL in 30 days at refrigeration temperatures. The inoculated juices and the controls (non-inoculated juices) showed significant differences in acidity and pH (p < 0,05), but not in °Brix. The inoculated juices scored high acceptability in the sensorial analysis. The overall results suggest potential applications of the selected *L. plantarum* strain in the production of probiotic juices.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se percibe por parte de los consumidores un marcado interés por la adopción de dietas saludables que generen beneficios en cuanto al tratamiento y prevención de enfermedades. Consecuentemente la comunidad científica y la industria de alimentos realizan importantes esfuerzos por el desarrollo de alimentos funcionales, especialmente productos probióticos, prebióticos y simbióticos con reconocido efecto benéfico sobre la salud de quienes los consumen en la debida cantidad. El mercado mundial de ingredientes probióticos, suplementos y alimentos fue de US\$16 mil millones en 2008 y se estima que para el 2013 tenga ventas por US\$19.6 mil millones con un crecimiento anual del 4,3%, lo que, convierte los probióticos en una nueva opción rentable para el desarrollo tanto en el sector de alimentos como farmacéutico (Granato *et al.*, 2010).

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en dosis adecuadas generan beneficios para la salud del hospedero; dentro de esos beneficios se encuentran el manejo y prevención de trastornos del tracto gastrointestinal, cardiovascular, urogenital, inmunomodulación (FAO- OMS 2002). Estos microorganismos influyen de manera positiva sobre el balance de la microbiota intestinal generando bienestar y actuando como bioterapéuticos. Luego de ser ingeridos y tolerar las diferentes barreras del tracto gastrointestinal, los probióticos se alojan en el intestino, donde ejercen su principal actividad, aportando diferentes beneficios para el hospedero (FAO- OMS, 2002).

Dentro de los probióticos, el género *Lactobacillus* ha sido reconocido por su capacidad de tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal y conferir beneficios a la salud como: inmunomodulación, manejo diarrea por virus y bacterias patógenas, alergia e intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia, vaginosis bacteriana, estreñimiento, infección por *Helicobacter pylori*, síndrome de colón irritable, afecciones dermatológicas, entre otras (Aureli *et al.*, 2011; FAO- OMS, 2002); en el 2007 el genero *Lactobacillus* representó el 61,9% de las ventas totales para el mercado de probióticos (Granato *et al.*, 2010); Estas bacterias además de ser reconocidas como GRAS (generally recognized as safe), producir ácido láctico y otro tipo de metabolitos con actividad antimicrobiana, se caracterizan por estar presentes en diferentes tipos de sustratos naturales y son responsables de fermentaciones en matrices lácteas, vegetales y cárnicas. Es por esto en gran medida, que la mayoría de los alimentos probióticos disponibles en el mercado han sido desarrollados en matrices lácteas. Sin embargo, para muchos consumidores este tipo de productos con base láctea no son permitidos, aceptados o asequibles; Las razones las comprenden alergias a componentes de la leche, intolerancia a la lactosa, contenido de colesterol, vegetarianismo y falta de recursos económicos. El uso de jugos de frutas, en un país con diversidad y abundancia en frutas como Colombia, representa un gran impacto sobre la industria de alimentos y los consumidores, aun más cuando se piensa en

la introducción de cepas autóctonas que aseguran, a menor costo que las importadas, un mejor desempeño de estos microorganismos sobre la salud de la población colombiana y un efecto de bioconservación sobre los jugos. Las propiedades funcionales de probióticos desarrollados a partir de poblaciones y condiciones muy diferentes a la nuestra, no pueden extrapolarse de manera simple y por lo tanto se hace imperativa la obtención de probióticos propios. Con la obtención de probióticos autóctonos se podrán desarrollar alimentos funcionales y productos bioterapéuticos más eficaces y adaptados a las condiciones de la población Colombiana y similar. Por tal razón, con miras a desarrollar a futuro un probiótico en jugos de fruta, se propuso mediante este proyecto evaluar invitro el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos y determinar la estabilidad y la viabilidad de estas cepas en jugos de fruta. El desarrollo de jugos funcionales con probióticos autóctonos, tendrá un gran impacto sobre la industria nacional, generando mayor competitividad y crecimiento tecnológico; sobre el consumidor, aumentaría la oferta de probióticos con opciones más económicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos para utilizar sus cultivos como aditivo en la elaboración de jugos de fruta.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y caracterizar las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos.
- Evaluar in vitro el potencial probiótico básico de las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas.
- Determinar la viabilidad de las cepas con potencial probiótico seleccionadas, en tres jugos de fruta estandarizados: fresa (*Fragaria vesca*), mango (*Mangifera indica*) y lulo (*Solanum quitense*).
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los jugos de fruta adicionados con cultivos microbianos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos de morfología cocoide o bacilar, no esporulados, microaerófilicos o anaerobios facultativos que carecen de citocromos, Gram positivas, no patógenas ni toxigénicas. En su metabolismo, utilizan azúcares no complejos y llevan a cabo procesos de fermentación al consumir los azúcares presentes en el medio, produciendo ácido láctico. A la gran mayoría de este tipo de bacterias se les confiere características probióticas. Comprenden microorganismos de los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulun*, *enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Se localizan en hábitats con alto contenido de nutrientes, con presencia de carbohidratos solubles, productos de la degradación de proteínas y vitaminas; por ejemplo productos lácteos, productos cárnicos, vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, pescado (Monroy *et al.*, 2009).

Debido a sus características fermentativas y antagónicas, las BAL han adquirido recientemente un fuerte interés por parte de la industria alimentaria, por su aplicación en procesos de bioconservación (Rolfe, 2000) y por el estatus conferido como GRAS (Generally Recognized and Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety), en donde son consideradas como microorganismos seguros para la salud debido a que, tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos por innumerables generaciones sin que hubiera efectos adversos sobre la población (Monroy *et al.*, 2009).

Dentro de las BAL, existen varios microorganismos reconocidos como probióticos, pero no todos causan los mismos efectos y ejercen los mismos mecanismos de acción. La gran mayoría son pertenecientes al género *Lactobacillus*. Slover y Danziger (2008) reportaron su aplicación exitosa en gran variedad de enfermedades gastrointestinales como diarrea infecciosa y síndrome de colon irritable por la producción de ácido láctico, propiónico y acético que disminuye el pH intestinal inhibiendo potencialmente el crecimiento de bacterias patógenas. Sablon *et al.*, (2000) reportó la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* mediante la producción de sustancias de bajo peso molecular, también conocidas como bacteriocinas en el tracto gastrointestinal.

Las rutas metabólicas usadas por las BAL se clasifican en dos grupos, homofermentativas y heterofermentativas (Figura 1). El grupo de homofermentativas como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunos *Lactobacillus* que utilizan la ruta Embden-Meyerhof para generar dos moles de lactato por los de glucosa. Las heterofermentativas como *Weisella*, *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* que producen cantidades equimolares de

lactato, CO₂ y etanol a partir de glucosa por la ruta de la pentosa (Caplice y Fitzgerald, 1999).

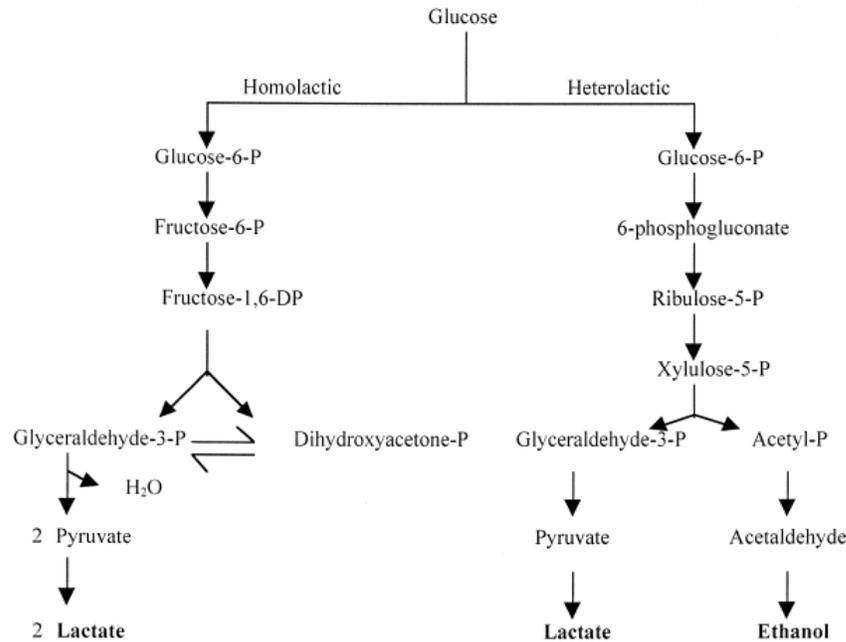


Figura 1. Rutas metabólicas usadas por las bacterias ácido lácticas (Caplice y Fitzgerald, 1999)

Dentro del metabolismo de las BAL, está, la producción de sustancias con capacidad de biopreservación que incluye; la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono, diacetil y producción de bacteriocinas. (Caplice y Fitzgerald, 1999).

- **Ácidos orgánicos, acetaldehído y etanol:** El efecto antagónico es el resultado de la acción de los ácidos en la membrana citoplasmática, interfiriendo con el mantenimiento de la membrana e inhibiendo el transporte activo (Caplice y Fitzgerald, 1999).
- **Peróxido de hidrogeno:** La inhibición se efectúa por una fuerte oxidación de los lípidos presentes en la membrana y las proteínas celulares.
- **Dióxido de carbono:** El dióxido de carbono es formado por una fermentación heteroláctica que puede crear un ambiente anaeróbico que se convierte en mortal para algunos microorganismos al perder la habilidad de reducir el pH interno y externo (Caplice y Fitzgerald, 1999).
- **Diacetil:** Este compuesto es producto de metabolismo del citrato por la fermentación de las hexosas. Las bacterias Gram-negativas y levaduras son

sensibles al diacetyl ya que, genera una interfeerencia en la utilización de la arginina. (Caplice y Fitzgerald,1999)

• **Bacteriocinas:** Son péptidos de síntesis ribosomal segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores. De acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas han sido clasificadas principalmente en bacteriocinas de Clase I, II, III, IV y V (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas (Caplice y Fitzgerald, 1999; Monroy et al., 2009)

Clase	Subclase	Descripción	Ejemplo
I		Lantibióticos- pequeños (<5,0KDa), estables a temperatura, con aa ¹ modificados.	<i>Nisina</i>
	IA	Péptidos elongados y catiónicos que actúan en membrana	
	IB	Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos	
II		Pequeños (<10,0KDa), termoestables, actúan a nivel de membrana plasmática. no L-antibióticos	
	Ila	Péptidos activos contra la <i>Listeria</i> .	<i>Pediocina, Sakacina</i>
	Ilb	Bacteriocinas de dos péptidos para la formación de poros.	<i>Plantaricina, Lactacina</i>
	Ilc	Péptidos pequeños, termoestables, no modificados y se transportan mediante peptidos líder.	<i>Divergicina</i>
III		Pesados (>30,0KDa), termolábiles.	<i>Helveticina</i>
IV		Bacteriocinas complejas formadas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas necesarias para su actividad. glicoproteínas y lipoproteínas	<i>Lactocina S, Mesenterocina</i>
V		Estructura circular	<i>Gasericina A</i>

¹ aa: aminoácidos

El mecanismo de acción de las bacteriocinas se desarrolla por la composición de la membrana plasmática. Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por tener un alto contenido de lípidos aniónicos en la membrana por lo que las bacteriocinas hacen una unión inicial por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga positiva localizada en uno de los extremos, después se produce una inserción en la bicapa lipídica formando poros y permeabilizando la membrana por lo que la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia, produciendo la muerte bacteriana. Otro mecanismo secundario de estos péptidos es la inhibición de la biosíntesis del ADN (Monroy *et al.*, 2009).

A lo largo de la historia, el hombre ha utilizado las fermentaciones como mecanismo de preparación y conservación de alimentos; diversas han sido las fuentes de las que se ha valido para desarrollar alimentos con características especiales de sabor, textura y aroma. Las bacterias ácido lácticas (BAL) han tenido un rol dominante en la producción de alimentos fermentados, siendo las encargadas de la mayoría de estos procesos. La preservación de alimentos por fermentación depende principalmente de la oxidación de los carbohidratos; en la Tabla 2 están algunos ejemplos de las preparaciones en las que se utilizan fermentaciones.

Tabla 2. Ejemplos de alimentos fermentados de consumo mundial (Caplice y Fitzgerald, 1999)

Producto	País	Microorganismo	Sustrato
Pan	Internacional	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , otras levaduras, BAL	Trigo, centeno y otros granos
Bongkrek	Indonesia	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Torta de coco
Gari	Oeste de África	<i>Corynebacterium manihot</i> , otras levaduras, <i>L. plantarum</i> y <i>Streptococcus</i> spp.	Yuca
Idli	Sur de India	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Candida</i> , <i>Trichosporon pullulans</i>	Arroz negro y Dhal
Kenkey	Ghana	Desconocidos	Maíz
Kimchi	Korea	BAL*	Col, vegetales, comida de mar y nueces
Mahewu	Sur África	BAL*	Maíz
Ogi	Nigeria	BAL*, <i>Cephalosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Saccharomyces</i>	Maíz

		<i>cerevisiae, Candida mycoderma, C. valida, C. vini</i>	
Oncom	Indonesia	<i>Neurospora intermedia</i> o <i>Rhizopus oligosporus</i>	Torta de maní
Salsa soya	Oriente	<i>Aspergillus oryzae</i> o <i>A. soyae, Lactobacillus, Zygosaccharomyces rouxii</i>	Soya y trigo
Tempeh	Indonesia, Surinam	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Soya
Nan	India	<i>Saccharomyces cerevisiae, BAL.</i>	Harina de trigo
Queso	Internacional	<i>L. lactis, S. thermophilus, L. shermanii, Penicillium spp.</i>	Leche
Yogurth	Internacional	<i>S. thermophilus, L. bulgaricus</i>	Leche
Salchichas fermentadas	Centro y sur de Europa, Estados unidos	<i>Lactobacillus, Pediococcus, S. carnosus, S. xylosus, M. varians, algunas levaduras</i>	Carne de cerdo o de pollo.
Sauerkraut	Internacional	<i>L. mesenteroides, L. brevis, L. plantarum, L. curvatus, L. sake</i>	Col
Coles	Internacional	<i>P. cerevisiae, L. plantarum</i>	Pepino
Olivas	Mediterránea	<i>L. mesenteroides, L. plantarum</i>	Olivas verdes

*BAL: Bacterias ácido lácticas

3.2. ALIMENTOS FUNCIONALES

El concepto de alimento funcional fue usado por primera vez en 1984 por científicos Japoneses que estudiaron las relaciones que existen entre nutrición y satisfacción, fortificación y modulación de los sistemas fisiológicos. Los alimentos funcionales son entonces definidos como “alimentos que proveen de bienestar y salud, más allá de la nutrición básica” (Siró *et al.*, 2008).

En el desarrollo de un alimento funcional se necesitan recursos aparte de los financieros; como el Know-How, nutrición, investigación y tecnología, ensayos clínicos, estudios epidemiológicos, que son requisitos de la certificación científica y medición de la eficacia en este tipo de alimentos. Toda esta inversión excede lo que normalmente se utiliza para el desarrollo de alimentos tradicionales, sin embargo; los precios de los funcionales son más altos por el valor agregado que tienen conteniendo mayor margen de ganancia.

Debido al creciente interés por nutracéuticos y funcionales no solo multinacionales de alimentos si no que farmacéuticas han incursionado en este mercado por medio de la investigación y desarrollo de nuevos productos que atiendan las necesidades de la población y de los diferentes mercados emergentes (Siró *et al.*, 2008).

Los alimentos funcionales han sido clasificados en: alimentos fortificados, alimentos enriquecidos, alimentos alterados y alimentos mejorados (Tabla 3). Los primeros en desarrollarse fueron los alimentos fortificados con vitaminas y/o minerales (vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinc, hierro y calcio); posteriormente, la atención se centró en los alimentos fortificados con micronutrientes (omega-3, ácidos grasos, fitoesteroles y fibra soluble) y actualmente las tendencias se centran en el desarrollo de alimentos que ofrezcan múltiples beneficios para la salud en un solo producto, como son los probióticos.

Tabla 3. Tipos de alimentos funcionales (Siró *et al.*, 2008)

Tipo de alimento funcional	Definición	Ejemplo
Alimentos fortificados	Un alimento fortificado con adición de nutrientes.	Jugos de fruta fortificados con vitamina C.
Alimentos enriquecidos	Un alimento con adición de nutrientes nuevos o componentes que no se encuentran normalmente en el alimento.	Margarina con ésteres de esteroles, probióticos, prebióticos
Alimentos alterados	Un alimento en el que hay deterioro de sus componentes o estos han sido removidos, reducidos reemplazados por otras sustancias con efectos benéficos.	Fibras como liberadoras de grasa en helados o embutidos.
Alimentos mejorados	Alimentos en el que uno de sus componentes ha sido mejorado mediante la manipulación genética o condiciones especiales.	Huevos con mayor contenido de omega-3 debido a la alimentación.

Se ha estimado que el mercado de los alimentos funcionales es de 47,6 billones de dolares¹, siendo Estados Unidos el de mayor representación con un 50,0% de participación. Esto se debe a que, los requerimientos y normatividad americana favorecen

¹ para el año 2000-2002

el desarrollo y la comercialización de este tipo de productos (Siró *et al.*, 2008). Por otro lado, el mercado europeo de alimentos funcionales se estimó entre 4,0 y 8,0 mil millones de dólares en 2003, con un incremento alrededor de 15,0 millones de dólares para el 2006. Alemania, Francia, Reino Unido y Países Bajos representan el segmento más importante y aunque hay mercados en crecimiento, el desarrollo de nuevos productos junto con el creciente interés por este tipo de alimentos, los convierten en zonas con alto potencial. En general, el interés de los consumidores en el centro y norte de Europa es mayor que en los países mediterráneos, donde los consumidores aprecian más los alimentos naturales y frescos. Lo que convierte a Europa en un mercado muy heterogéneo y con grandes diferencias regionales en el uso y aceptación de alimentos funcionales (Siró *et al.*, 2008).

3.3. PROBIÓTICOS

Según la FAO, son: “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso sobre el hospedero”. La palabra probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales (FAO- OMS 2002). El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell y a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el hospedador, adicional al proporcionado por un alimento (OMG, 2008).

La mayoría de cepas usadas como probióticos, son especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*; sin embargo también se han utilizado cepas de levaduras como “ingredientes probióticos” en los alimentos. Desde la antigüedad se han empleado bacterias del género *Lactobacillus* como agentes fermentadores que le otorgan propiedades únicas a los alimentos y sirviendo de igual manera como agentes conservantes ya que al producir ácido láctico, generan un descenso en el pH del medio provocando un ambiente desfavorable para algunos patógenos.

Actualmente, los desarrollos realizados en el campo de alimentos probióticos, se enfocan en la adición de prebióticos a las fórmulas. Los prebióticos, son compuestos o ingredientes no digeribles, que estimulan de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de una o de un grupo determinado de bacterias residentes en el colon. Su consumo potencializa la acción de los alimentos probióticos, mejora las funciones de la microbiota intestinal y aumenta significativamente el número de bifidobacterias presentes en el organismo. Dentro de estos compuestos, que son por lo general de tipo vegetal, se encuentran principalmente los fructo-ligosacáridos (FOS) y galacto-olisacáridos (GOS),

que han sido asociados también a procesos de fortalecimiento de mucosa intestinal, prevención de enfermedades inflamatorias gastrointestinales, entre otros beneficios.

Es por esto, que la producción de alimentos probióticos combinados con prebióticos (simbióticos), se ha convertido en la nueva tendencia en el campo de los funcionales, ya que este tipo de combinación favorece la supervivencia de las bacterias probióticas durante el tránsito por el tracto digestivo superior y representa beneficios adicionales para el consumidor (Granato *et al.*, 2010).

3.3.1. Criterios de selección para cepas probióticas

La FAO y OMS, incluyen dentro de sus publicaciones, la metodología y los parámetros que se deben tener en cuenta para el desarrollo de probióticos, así como la identificación, evaluación de seguridad y caracterización funcional de las cepas probióticas (Figura 2).

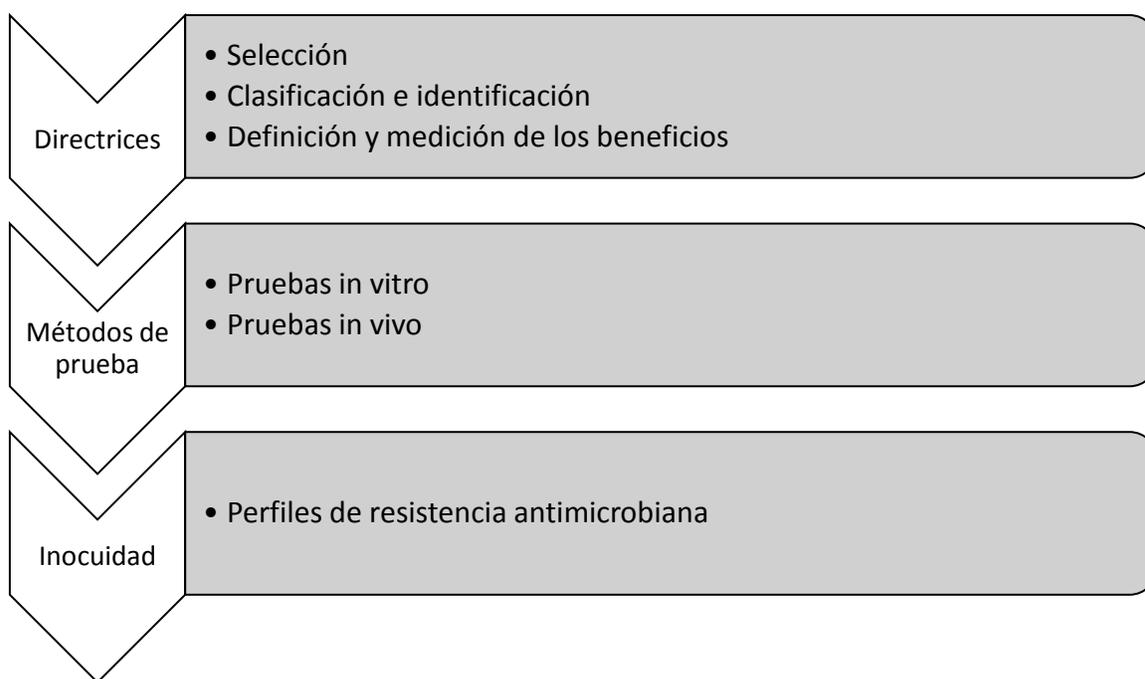


Figura 2. Proceso de selección y evaluación de microorganismos probióticos

Para que un organismo sea definido como probiótico debe reunir algunas características (Tabla 4) como son, no ser patógeno ni toxigénico, sobrevivir al medio ácido del estómago y al efecto de la bilis en el duodeno, tener la capacidad de adhesión a células epiteliales, adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente, producir sustancias antimicrobianas y tener capacidad para aumentar de modo positivo las funciones inmunes y las actividades metabólicas (Isolauri, 2004; Mishra y

Prasad, 2005). Luego de cumplir con todos los requisitos mencionados anteriormente se puede decir que se tiene una bacteria con potencial probiótico.

Para la exclusión de patógenos y el control de microorganismos oportunistas; los probióticos, producen sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, que reducen el número de células viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas de otros microorganismos. Adicionalmente, los probióticos aumentan la resistencia a la colonización de patógenos, al competir por los sitios de adhesión en la superficie del epitelio intestinal (Reid, 2008).

Tabla 4. Criterios de selección para microorganismos probióticos. Modificado de (Ouwehand *et al.*, 1999)

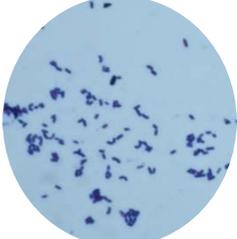
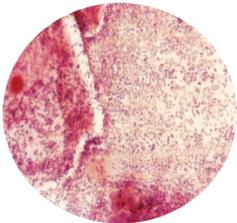
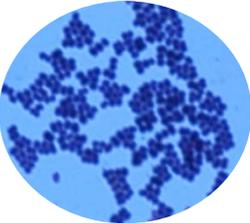
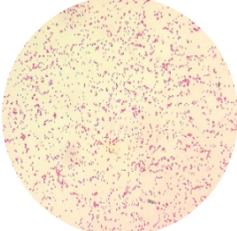
Carcaterísticas de la cepa probiótica	Comentarios
Estabilidad en ácidos y sales biliares	<ul style="list-style-type: none"> • Importante para la administración oral, pero puede no ser relevante para otras aplicaciones. • Para la supervivencia de probióticos en el intestino es importante para mantener su integridad celular, adhesividad y actividad metabólica. • No es necesario para la microencapsulación.
Adhesión a las superficie de la mucosa	<ul style="list-style-type: none"> • Modulación inmune, exclusión competitiva, colonización transitoria e interacción.
Seguridad para uso clínico y alimentario	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación y caracterización de la cepa. • Documentación de seguridad. • No deben generar degradación de la mucosa intestinal, invasión ni transferencia de genes de virulencia, ni resistencia a antibióticos.
Efectos sobre la salud validados y documentados	<ul style="list-style-type: none"> • Dosis mínima efectiva para cada cepa en particular. • Ensayos clínicos con doble ciego, controlados con placebo y aleatorizados.
Dosis y cantidades	<ul style="list-style-type: none"> • Las dosis de probióticos ingeridos debe ser la necesaria para modular y estabilizar la composición de la microbiota, confiriendo efectos inmunomoduladores (Aureli <i>et al.</i>, 2011).
Propiedades tecnológicas	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad de la cepa, resistencia a los fagos, supervivencia en productos, producción a gran escala. • Actividad metabólica no debe afectar las propiedades fisicoquímicas del producto. • Buena interacción con prebióticos y otros probióticos (Saarela <i>et al.</i>, 2000).
Respuesta immune	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulación del sistema inmunológico.

Motilidad intestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Alivio del estreñimiento y prevención o tratamiento de enfermedad intestinal por la interacción con los receptores del tejido epitelial (Reiff y Denise, 2010). • Reducción de la duración/incidencia de diarrea por bacterias patógenas.
Producción de sustancias antimicrobianas	<ul style="list-style-type: none"> • Inactivación de patógenos, exclusión competitiva.

3.3.2. Identificación macroscópica y microscópica

Dentro de los procesos de evaluación del potencial probiótico de microorganismos, la identificación es el primer paso que se debe realizar para garantizar los antecedentes en cuanto a su uso, naturaleza y metabolismo del microorganismo. Dentro de los procesos de identificación, el análisis macroscópico permite conocer el tipo de colonia que generan los microorganismos, su tamaño, color y textura, mientras que el análisis microscópico permite la identificación de la morfología celular y el tipo de pared que tiene el microorganismo (Tabla 5). Este tipo de análisis que se realiza con tinción y observación bajo microscopio para conocer si se trata de bacilos, cocos, levaduras, esporas y si es un microorganismo Gram negativo o Gram positivo.

Tabla 5. Identificación morfológica microscópica de las cepas aisladas

Morfología	Gram positivos	Gram negativos
Bacilos		
Cocos		

3.3.3. Identificación bioquímica

La identificación bioquímica consiste en la evaluación del metabolismo de los azúcares. Existen galerías y medios que ayudan a constituir un perfil bioquímico por medio de la observación en el viraje de color producido por el cambio en el pH debido al catabolismo de los glúcidos; con posterior análisis de la información, arroja como resultado, una identificación de posibles especies en un rango de porcentaje. Sin embargo, es una prueba muy subjetiva y no hay diferenciación clara entre algunas especies (Figura 3).



Figura 3. Imagen de la Galería API usada en la identificación bioquímica

Por otro lado, la prueba de catalasa es una herramienta de selección preliminar, ya que, los lactobacilos son catalasa negativos porque no presentan la enzima capaz de degradar el peróxido de hidrógeno. Este tipo de herramientas de identificación son preliminares y se deben realizar para el descarte de microorganismos. Sin embargo, existen otro tipo de herramientas, como las moleculares, que permiten conocer el género y especie y así poder establecer con certeza la identificación de una cepa.

3.3.4. Identificación molecular

Para la identificación bacteriana se puede utilizar la información contenida en los ribosomas; constituida, por dos subunidades, una pequeña (30S) y una grande (50S). La subunidad menor consta de un ARNr 16S y 21 proteínas. El extremo 3' de la región 16S es la zona que más se utiliza en la identificación molecular porque contiene información genética específica y conservada para las especies bacterianas.

Una de las técnicas más rápidas y sencillas para la identificación molecular de cepas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por Mullis y Faloona, Narbad (1987), basada en la propiedad de las ADN polimerasas para replicar ADN. La técnica consiste en una desnaturalización del ADN por medio de altas temperaturas y luego con ayuda de la ADN polimerasa se inicia la síntesis de ADN con un oligonucleótido (primer) que anilla a la hebra de ADN produciéndose de 3' a 5' y de 5' a 3'. Para que la reacción se lleve a cabo se necesitan: cuatro desoxirribonucleosidos-trifosfato (dNTP) que polimerizan el nuevo ADN, primers que son nucleótidos complementarios a las hebras de ADN y se enlazan con sus complementarios para producir ADN, iones divalentes (Mg^{2+}) que actúan como cofactores de la polimerasa, iones monovalentes, solución buffer para mantener el pH y funcionamiento de la ADN polimerasa, ADN polimerasa, ADN que contenga la región que se va a amplificar y termociclador.

Dentro de la PCR se llevan a cabo varios ciclos: ciclo de inicio (para una activación de la polimerasa a altas temperaturas), ciclo de desnaturalización (separación de las hebras de ADN por temperatura), ciclo de alineamiento (se desciende la temperatura para facilitar la unión del primer con el ADN facilitando la formación de los puentes de hidrógeno), ciclo de elongación (efecto de la polimerasa para formación de 3' a 5' y 5' a 3'), y conservación (baja temperatura para conservar la reacción). Finalmente, el material obtenido es enviado a secuenciación, donde se obtiene la secuencia de bases nitrogenadas que con ayuda de bioinformática permiten realizar la identificación.

3.3.5. Pruebas in vitro para evaluación del potencial probiótico de cepas

Los métodos in vitro son aptos para la evaluación de los criterios antes mencionados. Sin embargo, es importante señalar que los resultados de tales estudios no pueden ser predictivos de la situación in vivo. Por ejemplo, la supervivencia de los microorganismos a pH bajo o en la presencia de bilis en tubos de ensayo no es un reflejo de las interacciones en el estómago y el intestino, donde existen condiciones fisiológicas complejas (Holzapfel *et al.*, 1998). Las metodologías de los ensayos deben someter los microorganismos a las condiciones menos favorables del tracto gastrointestinal; por ejemplo, en el estómago el pH es la peor condición y en el duodeno son las sales biliares. Por esta razón, es necesario evaluar la tasa de supervivencia de las bacterias presentes en estas condiciones durante un tiempo determinado, simulando las condiciones in vivo.

Las diferentes pruebas utilizadas para la evaluación de los probióticos que simulan el tracto gastrointestinal incluyen: pruebas in vitro por separado para cada uno de los criterios de selección de cepas, simulaciones continuas que lentamente liberan sustancias y ajustan las condiciones del tracto gastrointestinal a través del tiempo, diseño y construcción de reactores y fermentadores que por medio de bombas, válvulas y mezcladores simulan la fisiología del tracto gastrointestinal.

Este tipo de modelos deben satisfacer dos requisitos básicos: (1) disponibilidad y facilidad de manejo de alto rendimiento para las pruebas y (2) buena capacidad de predicción, para que los datos obtenidos puedan apoyar la interpretación de los resultados en la fase in vivo (Cencič y Langerholc, 2010).

3.3.6. Pruebas in vivo para evaluación del potencial probiótico de cepas

Según la (FAO-OMS 2002), este tipo de estudios están destinados a demostrar la eficacia de los probióticos en animales y mostrar el efecto que tienen al mejorar significativa, estadística y biológicamente; la condición, síntomas, bienestar o calidad de vida, reducción del riesgo de enfermedad o aumento del tiempo de recurrencia. En pocas palabras, cada beneficio debería tener una probada correlación con el probiótico de interés.

Esta es de las fases más importantes en el desarrollo de probióticos, ya que, permite evidenciar los resultados que se obtengan de forma *in vitro*, demostrando los efectos que se le puedan adjudicar a un microorganismo.

3.3.7. Efectos sobre la salud y mecanismos de acción de los probióticos

La disbiosis es un desequilibrio en la ecología de la microflora bacteriana presente en el tracto gastrointestinal. Este desequilibrio causa que patógenos aprovechen esa condición y ataquen el sistema inmune causando un sin número de enfermedades. Estudios clínicos han demostrado que el tratamiento con probióticos ayuda a regular el sistema inmune controlando los receptores de las cascadas metabólicas de procesos infecciosos y degenerativos (Iannitti y Palmieri, 2010).

Según la Organización Mundial de Gastroenterología (2008), los beneficios conferidos por los probióticos pueden ser inmunológicos y no inmunológicos. Dentro de los beneficios inmunológicos se encuentran: activación de los macrófagos locales para aumentar la presentación de los antígenos a los linfocitos B; aumento en la producción de inmunoglobulina A (IgA) tanto local como sistémicamente; modulación de los perfiles de citoquinas e inducción de la disminución de la respuesta inmune a los antígenos de los alimentos. Dentro de los mecanismos no inmunológicos de los probióticos están: exclusión competitiva, modificación del pH local creando un ambiente hostil para bacterias patógenas, producción de bacteriocinas que generan inhibición a patógenos, fagocitosis de radicales superóxidos, estimulación de la producción epitelial de mucina y aumento de la función de barrera intestinal, entre otros.

A continuación se describen algunos de los efectos benéficos de los probióticos sobre diferentes enfermedades y/o condiciones del organismo:

• Enfermedades de piel y alergias

La piel es el órgano más extenso que cumple funciones como barrera, homeostasis, termorregulación, neurosensoras, metabólicas e inmunológicas. Se ha demostrado la habilidad de *L. plantarum* para inhibir la colonización de *Pseudomonas aureginosa*. Las formulaciones con probióticos han mostrado efectividad en el tratamiento de dermatitis atópica (eczema) y alergias (Iannitti y Palmieri, 2010).

• Cirugías

Iannitti y Palmieri (2010) han reportado varias investigaciones clínicas en las que se ha suministrado probióticos antes y después de cirugías del sistema gastro intestinal reduciendo el número de pacientes con infecciones y mejorando la respuesta inmune.

• Infecciones urogenitales

La flora normal del tracto urogenital de la mujer son lactobacilos encargados de mantener las condiciones para que bacterias patógenas y levaduras no utilicen esas condiciones favorables para causar un desequilibrio y desencadenar infecciones vaginales. Varios estudios revisados por Iannitti y Palmieri (2010) han permitido concluir que el uso de probióticos vía vaginal y oral mejora la flora ayudando a reducir y tratar los cuadros de infección vaginal causados por *Gardenella vaginalis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

• Enfermedad diverticular

Esta es una enfermedad de las paredes del colon y algunas veces presente también en el ileón y el duodeno, causando protusiones de la mucosa acompañadas de dolor e infecciones, y en el peor de los casos la muerte por sepsis. Tursi *et al.*, (2008) demostraron que de 75 pacientes con diverticulitis, el 88,0% no mostró síntomas de la enfermedad durante los 24 meses siguientes al tratamiento con mesalazine adicionado con *L. casei*, indicando la eficiencia de esta cepa probiótica para controlar la enfermedad.

• Control de *Helicobacter pylori*

Es una bacteria presente en la mayoría de pacientes con gastritis asociada a ulceración duodenal, gastritis crónica y cáncer gástrico. Kim *et al.* (2008) demostraron la efectividad de *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. longmun* y *S. thermophilus* en el control de *H. pylori*.

• Carcinogénesis

Se han encontrado efectos entre el cáncer de colon y la microflora intestinal por lo que la ingesta de probióticos controla el crecimiento y colonización de bacterias patógenas relacionadas con mutagénesis.- Los probióticos previenen la actividad de la β - glucuronidasa y nitroreductasa, interactúan con las células del colon formando

ácido linoleico (propiedades antiinflamatorias) que puede inhibir el desarrollo de las células cancerosas. (Iannitti y Palmieri, 2010).

En la Figura 4, se presenta un resumen de algunos de los efectos clínicos que tienen los probióticos sobre la salud.



Figura 4. Resumen de los efectos de los probióticos sobre la salud (Prado et al., 2008)

3.3.8. Seguridad de los probióticos

La mayoría de cepas y especies usadas en el desarrollo de probióticos son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que han sido reconocidas como comensales humanos y aplicados históricamente de forma segura en la fermentación de alimentos. Igualmente han sido reconocidas como GRAS (Generally Recognized as Safe) que pueden teóricamente garantizar su inocuidad. Sin embargo se deben realizar pruebas de resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles; actividades

metabólicas perjudiciales; estudios epidemiológicos; producción de toxinas y actividad hemolítica, entre otras pruebas.

3.3.9. Etiquetado

Dentro de un producto funcional y que contenga probióticos, la FAO-OMS (2002) ha recomendado que la etiqueta contenga información completa, entre la que se encuentra: género, especie y nombre de la cepa para no generar confusiones en el consumidor; así como el número viable mínimo de cada cepa probiótica, la cantidad de alimento sugerida que debe proveer una dosis efectiva del probiótico relacionada con la declaración de propiedades saludables y condiciones adecuadas de almacenamiento.

3.3.10. Mercado de probióticos

Esta categoría de los funcionales ha mostrado un crecimiento importante en los últimos años con alrededor de 379 productos para el año 2005 (Tabla 6). La gran mayoría de los alimentos funcionales que se encuentran disponibles en el mercado, han sido desarrollados sobre matrices lácteas debido a la facilidad que presenta su producción y comercialización. Sin embargo, en los últimos años se han empezado a explorar nuevas matrices que atiendan a los diferentes sectores de la población. Los jugos han entrado al panorama como nueva opción para probióticos al ser una bebida saludable, que se consume con frecuencia y de menor costo. Recientemente en Japón y Europa, el mercado de los alimentos funcionales, es dominado por productos que promuevan el bienestar del tracto gastrointestinal. Este sector reportó ventas cercanas a 1,35 billones de dólares para el 1999 y 31,1 mil millones de dólares en ventas mundiales para el 2004 (Siró *et al.*, 2008).

Tabla 6. Algunos ejemplos de productos probióticos y simbióticos (Siró *et al.*, 2008)

Marca/ nombre del producto	Descripción	Productor
Actimel	Yogurt probiótico con <i>L. casei</i> <i>Imunitass®</i>	Danone, Francia
Activia	Yogurt cremoso con <i>Bifidus</i> <i>ActiRegularis®</i>	Danone, Francia
Gefilus	Amplia gama de <i>Lactobacillus</i> GG	Valio, Finlandia
Hellus	Productos lácteos con <i>L. fermentum</i> <i>ME-3</i> .	Tallinna Piiööstuse AS, Estonia
Jovita Probiotisch	Mezcla de cereales, fruta y yogurt probiótico	H&J Bruggen, Alemania
Pohadka	Yogurt con cepas probióticas	Valšské Meziříčí Dairy, Republica Checa
ProViva	Refresco de fruta natural y yogur en diferentes sabores que contienen <i>L. plantarum</i>	Skåne mejerier, Suiza
Rela	Yogures, leches cultivadas y jugos con <i>L. reuteri</i>	Ingman Food, Finlandia
Revital Active	Yogurt con probiótico	Olma, República Checa
SOYosa	Gama de productos a base de soya y avena, e incluye una bebida refrescante y un producto probiótico como yogur de soya avena	Bioferne, Finlandia
Soytreat	Tipo de Kefir con 6 probióticos	Lifeway, USA
Yakult	Bebida láctea con <i>L. casei</i> Shirota	Yakult, Japón.
Yosa	Yogur de avena con sabor a frutas naturales y las bayas que contienen bacterias probióticas (<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>)	Bioferne, Finlandia
Vitality	Yogurt con pre- y probióticos y omega-3	Müller, Alemania
Vifit	Yogurt con LGG (<i>L.rhamnosus</i>), vitaminas y minerales.	Campina, Holanda

3.4. TRACTO GASTROINTESTINAL, PROBIOTICOS Y MICROBIOTA NATIVA

El tracto gastro intestinal (GI) empieza en la boca, incluye el esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso (ciego, colon y recto) y termina en el ano. Cumple funciones de ingestión, digestión, absorción y defecación (Iannitti y Palmieri, 2010). El tracto GI de un adulto es de aproximadamente 150-200m² y la microflora presente está en concentraciones de aproximadamente 10¹⁴ UFC/mL (Figura 5). Normalmente existe un equilibrio de la microflora gastro intestinal entre los simbiotes,

comensales y patobiontes; pero cuando dicho equilibrio se altera ocurre la disbiosis, que constituye un factor importante para el desencadenamiento de enfermedades.

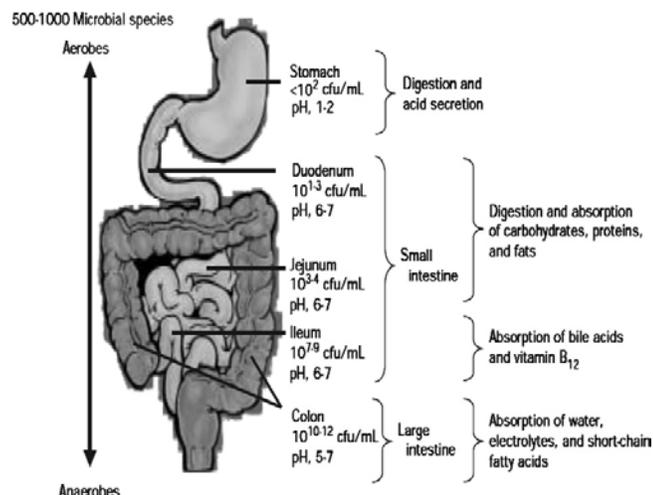


Figura 5. Composición flora gastrointestinal humana (Iannitti y Palmieri, 2010)

Después de la ingestión, los probióticos producen beneficios terapéuticos al colonizar el intestino en las cantidades suficientes y necesarias para conferir dichos beneficios. Sin embargo, para que se lleve a cabo ese proceso, los microorganismos deben tolerar dos barreras biológicas importantes: la acidez del estómago y los jugos biliares secretados en el duodeno. Para garantizar la supervivencia durante el paso por el tracto gastrointestinal, a los aislamientos con potencial probiótico se les debe realizar una exploración de resistencia a pH ácido y sales biliares.

La supervivencia de las cepas probióticas en el tracto GI ha sido evaluada en diferentes estudios y se ha comprobado que las bacterias muestran diferentes niveles de tolerancia, dependiendo de su naturaleza y de su exposición previa a condiciones similares a las del tracto GI (Gueimonde y Salminen, 2006). En las fases del tránsito digestivo, el pH bajo (ácido en el estómago), la secreción enzimática, la bilis, los movimientos peristálticos, entre otros; son algunos de los factores fisiológicos que más afectan la viabilidad de las cepas. Sin embargo, algunos microorganismos desarrollan mecanismos *in situ* para sobrevivir a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal.

Para el uso de cepas probióticas en alimentos y para el desarrollo de nuevos productos, existen criterios importantes relacionados no solo con la capacidad de las cepas para sobrevivir al paso por el tracto digestivo, sino que también, tengan la capacidad de proliferar en el intestino grueso, teniendo en cuenta que la parte terminal del íleon y del colon parecen ser los sitios en los que se llevan a cabo los procesos de colonización de este tipo de microorganismos (Charteris *et al.*, 1998; Pineiro y Stanton, 2007).

3.4.1. Estómago

Consiste en un compartimiento con la capacidad de almacenar cantidades de alimento durante la fase de ingestión y liberación al duodeno. La velocidad del vaciado gástrico, que es de cuatro horas aproximadamente, es un proceso complejo y regulado por factores como el tamaño de las partículas, la viscosidad, osmolaridad, contenido de azúcares, fibra y proteína (Bjerring *et al.*, 2008; Hur *et al.*, 2011). Las condiciones en el estómago son adversas para algunos microorganismos debido a los procesos que se desarrollan al liberar los ácidos gástricos con lo que el pH es cercano a 2,0. Este órgano aloja un número muy bajo de microorganismos $<10^3$ UFC/mL, fundamentalmente lactobacilos y estreptococos, ya que además, la actividad motriz propulsiva fásica impide una colonización estable (OMG, 2008).

3.4.2. El intestino

El intestino es un importante órgano donde existe el ambiente necesario para que se lleven a cabo una serie de procesos que cumplen con la finalidad de nutrir y proteger al cuerpo. El intestino delgado es la sección más larga del tubo digestivo y consta de segmentos que forman un pasaje desde el píloro al intestino grueso: duodeno y yeyuno (Cencič y Langerholc, 2010). El número de bacterias en este punto aumenta progresivamente de aproximadamente 10^4 células en el yeyuno a 10^7 células por gramo de contenido al final de esta región. El intestino grueso es la penúltima porción del tubo digestivo formada por el ciego, colón, recto y ano. La simulación de este paso es un criterio muy importante para el diseño de los ensayos *in vitro*: composición y porcentaje de las sales biliares, la adhesión e interacción con bacterias patógenas.

La adhesión es un factor importante dentro de la selección de probióticos, ya que éste, es el mecanismo de interacción con el intestino, y como lo reportan algunos autores, existen muchas teorías en cuanto a los mecanismos involucrados en el contacto de la bacteria con la superficie del tejido. Muchas de estas teorías, entre las que se encuentran las fuerzas pasivas, interacciones electrostáticas, hidrofobicidad, fuerzas estéricas y componentes específicos de la superficie celular, solo han sido comprobadas en modelos *in vitro* (Moussavi y Adams, 2010) y no se han establecido asociaciones puntuales, entre éstos mecanismos y la funcionalidad de los probióticos. Es así como también, muchas otras cepas que carecen de capacidad de adhesión (según las pruebas *in vitro*), poseen potencial probiótico comprobado, son capaces de modular la respuesta inmune y pueden antagonizar bacterias patógenas (Wohlgemuth *et al.*, 2010; Ivanov y Littman, 2011; Cencič y Langerholc, 2010; Cani y Delzenne, 2011).

3.5. JUGOS

Según el *Códex Alimentarius* stan 247 (FAO, 2005), jugo es “El líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha...”.

3.5.1. Composición

Dentro de la composición de los jugos se encuentran los siguientes componentes:

- **Fruta**

Son alimentos de origen natural, bajos en calorías, grasas y sodio; son buena fuente de fibra, folato, potasio, vitamina A, vitamina C y otros antioxidantes. Se les confiere a su consumo cotidiano beneficios sobre la salud tanto en la prevención como en el manejo de algunas enfermedades (Vicente *et al.*, 2009).

- **Agua**

Es el componente más abundante dentro de las frutas y vegetales con valores cercanos en algunas frutas del 90,0% del total en masa. Debido a la variedad en contenido de agua con las diferentes frutas, las condiciones de transformación y manejo son diferentes (Vicente *et al.*, 2009).

- **Ácidos orgánicos**

Hay dos tipos de ácidos orgánicos: alifáticos y aromáticos. El más abundante en frutas y vegetales es el ácido cítrico y málico (alifáticos). La cantidad de ácido generalmente disminuye durante la maduración. Los ácidos orgánicos juegan un papel importante en la dinámica de los azúcares en la fruta afectando de esta manera el aroma y sabor (Vicente *et al.*, 2009).

- **Proteínas**

Representan menos del 1,0% de la masa en fresco. Las proteínas en frutas se forman a partir de aminoácidos y compuestos nitrogenados. Los tejidos de las frutas muy maduras contienen proporciones altas de nitrógeno no proteico (Vicente *et al.*, 2009).

- **Fibra dietaria**

Ha sido definida como el conjunto de carbohidratos no digeribles que se encuentran presentes en un alimento, como la lignina que es intrínseca al tejido de las plantas. La fibra dietaria, que equivale aproximadamente al 2,0% de la fruta, incluye diversas macromoléculas con diferentes propiedades físico-químicas, entre

las que se encuentran la celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina, y oligo-sácaridos no digeribles (Vicente *et al.*, 2009).

• **Lípidos y ácidos grasos**

En los vegetales, los lípidos representan un grupo muy amplio de compuestos que varían entre los productos. En general los productos de post-cosecha tienen porcentajes muy bajos de lípidos totales (suele ser inferior al 1,0%) (Vicente *et al.*, 2009).

• **Carbohidratos**

Después del agua, es el componente más abundante en las frutas, representando el 50,0 y 80,0% del peso seco total. Las funciones incluyen, almacenamiento de reservas energéticas, composición estructural de las células. Dentro de los productos de la fotosíntesis están los carbohidratos simples como glucosa y fructosa que confieren atributos sensoriales especiales a cada tipo de fruta. Algunas presentan trazas de otros azúcares mono y disacáridos como xilosa, arabinosa, galactosa y maltosa (Vicente *et al.*, 2009)

• **Vitaminas**

Son moléculas orgánicas que no son sintetizadas en cantidades suficientes por el organismo, por lo que deben ser suministradas dentro de una dieta saludable, siendo las frutas una de las principales fuentes de vitaminas. La composición y tipo de vitaminas varía de acuerdo a la naturaleza de cada fruta. Las vitaminas más importantes dentro de una dieta son la vitamina A, B, C, D, K, E, responsables de funciones metabólicas y vitales dentro del organismo (Vicente *et al.*, 2009).

• **Antioxidantes**

Dentro de las frutas es el compuesto que más ha cobrado importancia debido a su efecto para capturar los radicales libres producidos en la respiración celular y procesos metabólicos. Los radicales libres tienden a generar desorganización en la membrana celular, daño celular causando deterioro y modificaciones en el metabolismo llevando a enfermedades y desordenes celulares, por lo que el consumo de antioxidantes permite reducir el efecto de estos radicales. Dentro de las frutas, los carotenoides, ácido ascórbico, tocoferoles y componentes fenólicos, representan un alto porcentaje de antioxidantes y permiten con su consumo regular, mitigar el posible daño causado por los radicales libres (Vicente *et al.*, 2009).

3.5.2. Proceso de elaboración

Dentro del proceso de elaboración de los jugos, se pueden considerar una serie de operaciones que se describen a continuación:

- **Limpieza:** se debe hacer una remoción de la tierra, insectos, residuos y cuerpos extraños adheridos. Este proceso se realiza por aspersion, flotación e inmersión en soluciones.
- **Selección:** se efectúa una clasificación según las condiciones agronómicas requeridas para cada producto en cuanto a peso, tamaño, madurez, calidad.
- **Trozado, deshuesado o cortado:** en algunos casos es necesario cortar las materias primas en tamaños específicos.
- **Pelado:** esta operación consiste en la remoción de la cáscara y puede ser de forma manual, mecánica o química.
- **Extracción:** dependiendo de la fruta, se llevan a cabo diferentes operaciones como exprimido o prensado acompañado de un tamizado para realizar la separación de semillas, cáscaras o cuerpos de gran tamaño.
- **Mezcla:** en este punto se ajustan las condiciones de grados Brix.

3.5.3. Normatividad para jugos de fruta

Dentro de la normatividad para jugos, se tiene a nivel internacional el CODEX *Alimentarius Stan 247* y para Colombia la Resolución 7992 de 1991 en las que se reglamenta la elaboración, conservación y comercialización de Jugos. Las características que deben cumplir según la normatividad son:

3.5.3.1. Características organolépticas de los jugos de fruta

Deben estar libres de materias extrañas, admitiéndose una separación en fases y la presencia mínima de trozos, partículas oscuras propias de la fruta utilizada. Color y olor semejante al de la fruta de la cual se ha extraído (Ministerio de Salud de Colombia, 1991).

3.5.3.2. Características físico-químicas de los jugos de fruta

Dentro de las propiedades físicas y químicas que deben cumplir los jugos, las más importantes que están directamente relacionadas con la calidad del jugo son: acidez y grados Brix, Los valores para cada una de estas características está relacionada con la naturaleza y tipo de fruta con la que se va a realizar el jugo (Tabla 7).

Tabla 7. Propiedades físico- químicas de jugos de fruta

Fruta	Porcentaje mínimo de sólidos solubles a 20,0°C (°Brix)	Acidez titulable expresada como Ácido cítrico anhidro %m/m mínimo
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	12,5	0,3
Lulo (<i>Solanum quítense</i>)	6,0	1,0
Fresa (<i>Fragaria vesca</i>)	7,0	0,65

Las técnicas para hacer la evaluación de las propiedades físico químicas son: porcentaje de sólidos solubles AOAC 983.17 por el principio refractométrico, acidez titulable AOAC 942.15B por volumetría y valores de pH con el método conductivimétrico.

3.5.3.3. Características microbiológicas de los jugos de fruta

Según el Ministerio de Salud de Colombia (1991), dentro de los requisitos microbiológicos que deben cumplir los jugos y pulpas de fruta congeladas y comercializadas en el país se encuentran las descritas en la Tabla 8.

Tabla 8. Requerimientos microbiológicos jugos de fruta

	n	M	M
Recuento de microorganismos mesofílicos/gramo	3	20000	50000
NMP coliformes totales/ gramo	3	9	29
NMP coliformes fecales/ gramo	3	< 3	-
Recuento esporas clostridium-sulfito reductor / gramo	3	< 10	-
Recuento de hongos y levaduras/ gramo	3	1000	3000

n= Número de muestras a examinar

m= Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad

M= Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad

3.5.4. Mercado de los jugos

Dentro del mercado de los jugos de fruta se encuentran el mercado nacional e internacional:

3.5.4.1. Mercado nacional

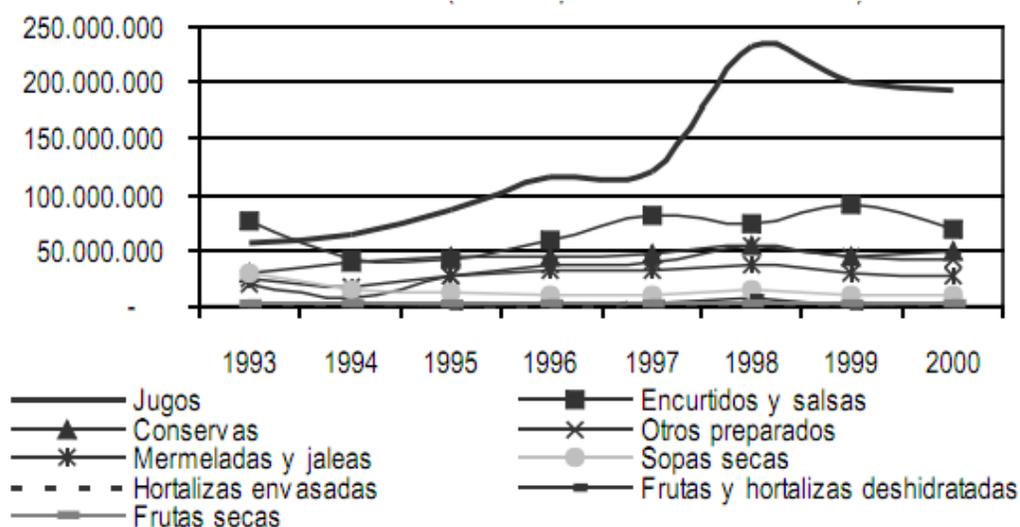
Por la ubicación geográfica privilegiada y las condiciones térmicas y agronómicas propias de la región, Colombia se ha destacado por ser un país con altos niveles de diversidad en cuanto a producción frutas, por lo que se puede dar respuesta a los requerimientos de los diferentes mercados, siendo también de gran importancia, la industria de procesamiento y transformación de frutas, entre las que se destacan la producción de conservas, pulpas y jugos.

Según un estudio de Agrocadenas y de acuerdo con cifras de la Corporación Colombia Internacional (CCI), los jugos de fruta, representaron el 65,6% del total de ventas del sector hortofrutícola en el año 2000 (Figura 6) (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Inter American Institute for Cooperation on Agriculture, 2000). Así mismo, la evolución de las ventas a través del tiempo, muestra un crecimiento del 40,7% en la industria nacional de jugos entre el año 1993 y el año 2000 (Figura 7).



Fuente: EAM-DANE. Cálculos Observatorio Agrocadenas.

Figura 6. Distribución del volumen de ventas de la industria hortofrutícola para el año 2000



Fuente: DANE-EAM. Cálculos Observatorio Agrocalendas.

Figura 7. Evolución de las ventas en la industria hortofrutícola. (Miles de pesos por año) 1993-2000

Igualmente, la evolución del consumo de fruta per cápita ha mostrado un crecimiento importante en Colombia. En 1994, el consumo anual era de un litro por persona mientras que en el año 2000, el consumo alcanzó cinco litros por persona. Se destaca la importancia del consumo de jugos envasados fuera del hogar, que corresponde a las dos terceras partes del total de lo consumido. Este aumento en el consumo de jugos envasados, puede deberse en gran medida a las estrategias publicitarias, cambio en mentalidad del consumidor y nuevos productos que atienden las necesidades de más segmentos del mercado.

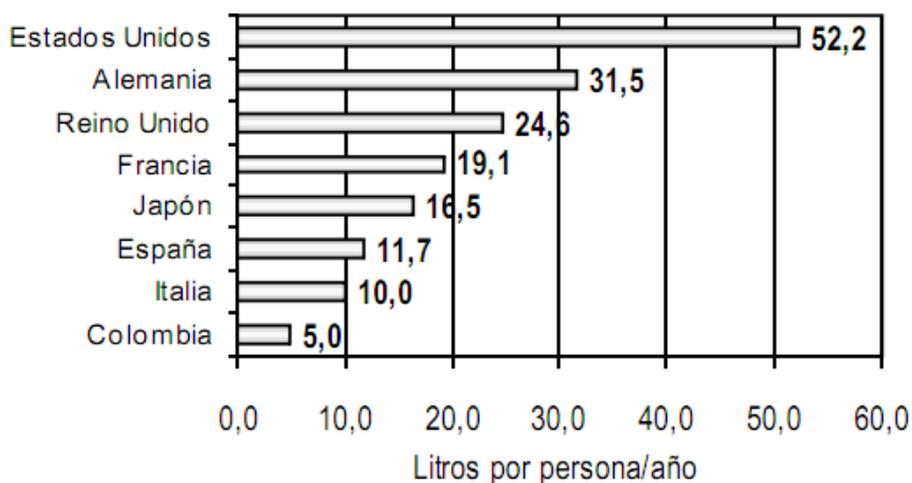
3.5.4.2. Mercado internacional de los Jugos

La industria internacional está apuntando a la comercialización y desarrollo de bebidas mínimamente procesadas, diferenciándose de aquellos que son preparados a partir de concentrados. El consumidor está dispuesto a pagar un mayor valor por este tipo de productos, al considerarlos como *Premium*. Es por esto, que se tiene el desafío de atender estos nuevos mercados, y Colombia, con el potencial que tiene en la industria hortifrutícola, podría enfocarse en la producción de jugos de frutas tropicales y jugos funcionales, siendo necesario entonces crear canales claros de abastecimiento, producción y distribución.

El consumo per cápita a nivel mundial para el año 2000 (figura 8) muestra un alto consumo en países industrializados y como se mencionó anteriormente donde se ha

cambiado la mentalidad y se ha trasladado el interés de consumo a bebidas naturales que ejerzan un efecto benéfico y aporte nutricional superior (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Inter American Institute for Cooperation on Agriculture 2000).

El consumo de jugos en la Unión Europea crece a una tasa de 5,2% siendo los sabores preferidos piña, mango, maracuyá, guayaba y guanábana. Por las condiciones agroecológicas de estos países, tienen la necesidad de importar materias primas o jugos de frutas tropicales (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Inter American Institute for Cooperation on Agriculture 2000). Por otro lado, el mercado de jugos en Estados Unidos es el de mayor crecimiento dentro del renglón de bebidas, debido al aumento en la conciencia de los consumidores, siendo el país, con el consumo per cápita más alto del mundo. Igual que en Europa, en Estados Unidos, se han desplazado los sabores tradicionales como naranja, manzana y uva por sabores tropicales, debido al desarrollo de nuevos productos fortificados y funcionales, a las estrategias publicitarias, a la diversidad de sabores, a eficientes canales de distribución, entre otros (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Inter American Institute for Cooperation on Agriculture 2000).



Fuente: ASOJUGOS.Fruit Processing.

Figura 8. Consumo per cápita de jugos, año 2000

4. ESTADO DEL ARTE

4.1. PROBIOTICOS Y ALIMENTOS FUNCIONALES

Las tendencias de los consumidores están cambiando hacia a la elección de alimentos funcionales debido al creciente interés por una dieta más sana y balanceada. Como respuesta a estas necesidades, los probióticos, en particular, son cada vez más utilizados como suplementos alimenticios debido a la creciente evidencia científica que apoya el concepto de que el mantenimiento de una microflora intestinal sana puede proporcionar protección contra los trastornos gastrointestinales, como las infecciones y los síndromes inflamatorios del intestino. Dentro de los probioticos, las bacterias mas usadas en fines comerciales son las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tradicionalmente agregadas a la leche para producir distintos productos (Sheehan *et al.*, 2007).

A lo largo de la historia los lactobacilos han sido reconocidos por ser usados en alimentos para realzar aromas y sabores, modificar texturas, aumentar el valor nutricional y cumplir funciones de preservación. Son microorganismos comensales, no patógenos, que se encuentran normalmente dentro de las cavidades orales, vagina y a lo largo del tracto gastrointestinal. Sin embargo, algunas especies se han asociado con infecciones oportunistas (Szabo *et al.*, 2011). Por todas estas cualidades han sido implementados en alimentos o en preparaciones terapeuticas después de evaluar la viabilidad y supervivencia de las mismas al paso por el tracto gastrointestinal y los efectos y beneficios que presentan con su consumo. Dentro de los micoorganismos reconocidos como probióticos se encuentran los reportados por Prado *et al.*, 2008 (Tabla 9).

Tabla 9. Microorganismos probióticos (Prado *et al.*, 2008)

Especies de <i>Lactobacillus</i>	Especies de <i>Bifidobacterium</i>	Otras
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. Animalis</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. Breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. Bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i> sp. <i>rhamnosus</i>	<i>B. Infantis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. Lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i>
<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. Longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>Lactis</i>
<i>L. fermentum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>Dextranicum</i>

<i>L. gasseri</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. lactis</i>		<i>Streptococcus salivarius</i> sp. <i>thermophilus</i>
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		

El desarrollo de los probióticos en las últimas dos décadas ha dado señales de un avance importante en la industria. El desarrollo de alimentos funcionales va en aumento con la exploración de nuevas matrices y microorganismos; todo esto respaldado por publicaciones científicas que muestran la evolución que ha tenido esta temática desde la identificación y aislamiento hasta el uso de herramientas moleculares para evaluación de las propiedades clínicas de las cepas (Iannitti y Palmieri, 2010; Prado *et al.*, 2008). La industria está interesada cada vez más en desarrollar productos que atiendan necesidades generales y específicas, algunas de las cepas que han sido reconocidas como probióticas y que se encuentran disponibles actualmente en el mercado se describen en esta Tabla 10.

Se produce una variación considerable entre las cepas con respecto a su comportamiento en condiciones industriales y su efecto global sobre la calidad del producto. Estos cultivos no deben tener efectos adversos en el sabor o el aroma del producto y no deben aumentar la acidificación durante la vida útil del producto (Prado *et al.*, 2008).

Tabla 10. Cepas comerciales probióticas (Saxelin *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2008)

Microorganismo	Origen
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult, Japón
<i>L. crispatus</i> CTV05	Gynelogix, USA
<i>L. reuteri</i> MM53	BioGaia, Suecia
<i>L. casei</i> F19	Arla Foods, Dinamarca/Suecia
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	Danisco, Francia
<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio, Finlandia
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> spp. <i>shermani</i> JS	
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Rhodia, USA
<i>L. acidophilus</i> NCFB 1748	
<i>L. johnsonii</i> LA1 (NCC 533)	Nestlé, Suiza
<i>L. acidophilus</i> LA10 (NCC 90)	
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex, Canada
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	
<i>L. casei</i> DN-114 001	Danone, Francia
<i>B. Animalis</i> DN-173 010	
<i>L. plantarum</i> 229v	Probi AB, Suecia

<i>L. rhamnosus</i> 271	Chr. Hansen, USA
<i>L. casei</i> CRL 431	
<i>B. lactis</i> BB-12	
<i>L. acidophilus</i> LA-5	
<i>L. bulgaricus</i> LBY27	
<i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31	

4.2. CEPAS AISLADAS DE ALIMENTOS

La comida tradicional fermentada es el producto de un proceso biotecnológico. Es producida por el aprovechamiento de la flora natural asociada con sustratos presentes en los alimentos; es una técnica usada para conservar y mejorar la calidad organoléptica y nutricional de los alimentos en fresco. Los alimentos tradicionales fermentados son una abundante fuente de microorganismos, presentando algunos características probióticas debido a su resistencia a las condiciones gastrointestinales, adhesión al tejido intestinal y la exclusión que ejercen sobre bacterias patógenas, adhesión al epitelio intestinal de acogida y la prevención del crecimiento o la invasión de bacterias patógenas en el intestino de los animales (Chiu *et al.*, 2007). En algunos casos estos microorganismos presentes en alimentos presentan condiciones de resistencia y adaptabilidad superior a los microorganismos comerciales (Liu *et al.*, 2011; Klayraung *et al.*, 2010).

La investigación de este tipo de fuentes para la obtención de nuevos probióticos es escasa en comparación con la de productos lácteos. Existe poca información acerca de los microorganismos y sus mecanismos de supervivencia en estas matrices (Rivera y Gallardo, 2010). En la Tabla 11 se presentan algunos de los microorganismos aislados de alimentos tradicionales a los que se les han realizado pruebas para evaluar su potencial probiótico.

Tabla 11. Microorganismos aislados de alimentos tradicionales (Rivera y Gallardo, 2010)

MICROORGANISMO	SUSTRATO	REFERENCIA
<i>L. plantarum</i>	<i>Kung-som</i>	Hwanhlem <i>et al.</i> , (2009)
<i>L. fermentum</i>	Preparados lácteos tradicionales del Tibet, Mongolia, "Yun Nan"	Yan <i>et al.</i> (2010))
<i>P. acidilactici</i> , <i>E. faecium</i> .	Salchichas fermentadas.	Ruiz <i>et al.</i> , (2008)
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei shirota</i> .	"Kule naoto"	Mathara <i>et al.</i> (2008)
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> ,	Quesos	Maragkoudakis <i>et</i>

<i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Lactopacillus</i> Sp.		<i>al.</i> , (2006)
<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>P. petosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Leuconostos</i> spp., <i>E. durans</i> .	Vegetales fermentados	Tamang <i>et al.</i> (2009)
<i>L. fermentum</i>	“Nham” y “Miang” : carne de cerdo fermenada, pescado frmentado, escabeche de ajo, hojas de té fermentadas.	Klayraung <i>et al.</i> ,(2010)
<i>L. helveticus</i> , <i>L. paracasei</i>	Yogurt y “kimchi”	Song <i>et al.</i> (2010)
<i>L. casei</i> Zhang	“Koumiss”	Guo <i>et al.</i> , (2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melaza de caña	Ortiz <i>et al.</i> (2008)
BAL	“Adai” cereales y leguminosas	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	“Agbelina” mandioca	Rivera y Gallardo,(2010)
BAL	“Atole” maíz	Rivera y Gallardo,(2010)
BAL	“Been-saalga” granos de bjara	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	“Boza” cereales	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i>	“Dosa”arroz y garbanzo	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>Leuc. mesenteroides</i> , BAL y levaduras	“Idli” cereales y leguminosas	Rivera y Gallardo,(2010)
BAL	“Ilambazi lokubilisa” maíz	Rivera y Gallardo,(2010)
BAL	“Kecap” trigo y frijol	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>L. casei</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. casei</i> , levaduras	“Kenkey” maíz	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sake</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	“Kimchi” vegetales	Rivera y Gallardo,(2010)
BAL	“Kishk” cereal y leche	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. brevis</i>	“Kisra” sorgo	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>L. fermentum</i> , <i>L. salivarius</i>	“Koko” bjara	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. brevis</i>	“Mahewu” maíz	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i>	“Mawe” maíz	Rivera y Gallardo,(2010)

<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. fructosus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> , <i>L. plantarum</i>	“Ngari” pescado	Rivera y Gallardo,(2010))
<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Sacch.cerevisiae</i>	“Ogi” maíz	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>BAL</i>	“Sauerkraut” col	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>BAL</i>	“Som-fug” pescado	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i>	“Tarhana” harina de trigo y yogurt	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>LAB</i> , <i>L. plantarum</i>	“Tempeh” Soya	Rivera y Gallardo,(2010)
<i>BAL</i>	“Uji” maíz, sorgo	Rivera y Gallardo,(2010)

Guo *et al.*, (2009) compararon el potencial probiótico (resistencia a pH y sales biliares) de una cepa de *L. casei* aislada de Koumiss, con el de dos cepas comerciales y reconocidas como probióticas y encontraron que la cepa nativa tuvo un comportamiento similar al presentado por las cepas comerciales.

Song *et al.* (2010) aislaron BAL del producto fermentado Kimchi (Tabla 11) e hicieron evaluación in vitro de su potencial probiótico. Comparando los resultados obtenidos, con el comportamiento de otras BAL aisladas de yogures probióticos, encontraron que las BAL aisladas del Kimchi presentaron mayor resistencia a las condiciones gastrointestinales y tuvieron mayor producción de sustancias antimicrobianas.

Klayraung *et al.* (2010) reportaron alta resistencia a las condiciones gastrointestinales de tres *L. fermentum* aislados de comida tradicional fermentada Thai.

Tamang *et al.* (2009) realizaron la evaluación de 94 cepas BAL, aisladas de vegetales fermentados típicos del Himalaya y encontraron una alta capacidad probiotica de al menos siete de los aislamientos.

Ortiz A., *et al.* (2008) realizaron una evaluación in vitro del potencial probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de una fermento de melaza de caña y encontraron que la cepa tiene propiedades probióticas in vitro semejantes a una cepa comercial.

Mathara *et al.*, (2008) evaluaron las características funcionales de 23 cepas de *Lactobacillus* aisladas de leche fermentada tradicional “Kule Naoto”. Se encontró que cepas de *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei* asociadas a este alimento presentaron potencial probiótico significativo y buena capacidad de resistencia a las condiciones del tracto GI.

Maragkoudakis *et al.*(2006) aislaron 29 cepas de alimentos tradicionales fermentados de origen lácteo y evaluaron in vitro su potencial probiótico. Como resultado encontraron que cepas de *L. casei* Shirota, *L. plantarum* y *L. paracasei* presentaron propiedades probióticas.

Ruiz *et al.* (2008) evaluaron cepas aisladas de embutidos secos fermentados, heces de humanos y de cerdos y encontraron que cepas de *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. animalis*, *L. murinus*, *L. vaginalis*, *Pediococcus acidilactici* y *Enterococcus faecium*, presentaron potencial probiótico y alta capacidad tecnológica para ser usadas en embutidos fermentados.

Yan *et al.* (2010) obtuvieron aislamientos de *L. fermentum* a partir de diferentes productos lácteos tradicionales. Al evaluar su potencial probiótico, se encontró que una de las cepas mostró un alto potencial probiótico con marcada tolerancia al jugo gastrointestinal, las sales biliares y presentó una significativa actividad antibacteriana.

Hwanhlem *et al.*(2009) aislaron BAL del producto fermentado Kung-Som (Tabla 11) durante períodos de fermentación diferentes. Diez de las cepas aisladas, identificadas como *L. plantarum* mostraron supervivencia a las condiciones gastrointestinales por encima del 50,0%.

Existe entonces un gran potencial de los microorganismos aislados de alimentos fermentados para ser usados como aditivos en el desarrollo de alimentos funcionales.

4.3. SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS

Debido a la complejidad, diversidad de respuestas, interacciones y efectos del tracto gastrointestinal, se hace difícil realizar estudios de efectividad de probióticos in vivo. Por esto, se han generado pruebas in vitro que aporten la mayor información posible acerca del comportamiento e interacciones de las bacterias con el tracto gastrointestinal. Existen diversos sistemas in vitro entre los que están fermentadores que simulan las condiciones gastrointestinales (Sumeri *et al.*, 2010) o a escala de laboratorio, donde también son simuladas las condiciones críticas del paso por el tracto GI (pH, sales biliares, antibióticos, adhesión). Este tipo de pruebas se realizan con el fin de comprobar la eficiencia o no de los microorganismos para ser usados como probióticos.

Para hacer un apropiado modelo in vitro se deben seleccionar cuidadosamente los rangos y tiempos de exposición en cada prueba, porque en algunos casos estas pruebas resultan ser muy drásticas, al no contemplar procesos de adaptación de los microorganismos (Gueimonde y Salminen, 2006). Algunas de las técnicas usadas y reportadas por varios autores se relacionan en la Tabla 12.

Tabla 12. Resumen técnicas in vitro reportadas por algunos autores

PRUEBA IN VITRO	MEDICIÓN	MICROORGANISMO	REFERENCIA
Tolerancia a sales biliares	Exposición por un tiempo determinado a diferentes concentraciones de sales y posterior recuento en placa para cuantificación de sobrevivientes.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>L. casei</i> spp., <i>L. plantarum</i> y <i>L. casei</i> . <i>L. acidophilus</i> y <i>L. fermentum</i> . <i>L. salivarius</i> <i>Lactococcus</i> spp. y <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. plantarum</i> BL011, <i>Enterococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. y <i>Bifidobacterium</i> spp.	(Ortiz <i>et al.</i> 2008) (Mishra y Prasad, 2005) (Charteris <i>et al.</i> , 1998) (Rondón <i>et al.</i> , 2008) (Ripamonti <i>et al.</i> , 2007) (Mathara <i>et al.</i> , 2008) (Taheri <i>et al.</i> , 2009) (Brinques y Ayub, 2011) (Nuevo-Palop y Narbad, 2011)
	Exposición por un tiempo determinado a diferentes concentraciones de sales y posterior lectura de la densidad óptica en longitudes de onda de entre 600,0 y 650,0nm.	<i>L. fermentum</i> , <i>L. casei</i> Zhang, <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> y <i>L. casei</i> Shirota. <i>L. reuteri</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> spp.	(Lin <i>et al.</i> , 2007) (Yan <i>et al.</i> , 2010) (Guo <i>et al.</i> , 2009) (Klayraung <i>et al.</i> , 2010) (Izquierdo <i>et al.</i> , 2008) (Guo <i>et al.</i> , 2010) (Vinderola y Reinheimer, 2003)
	Reactor simulador del tracto gastrointestinal.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , y <i>L. fermentum</i> . <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. animalis</i> . <i>L. acidophilus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. kefi</i> y <i>L. kefirgranum</i> . <i>L. mesenteroides</i> y <i>L. plantarum</i> .	(Sumeri <i>et al.</i> , 2010) (Mainville <i>et al.</i> , 2005) (Gbassi <i>et al.</i> , 2011)
	Simulación de condiciones gastrointestinales con liberación paso a paso de diferentes sustancias y medición de población mediante recuento en placa.	<i>L. reuteri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> <i>L. casei</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> .	(Martín <i>et al.</i> , 2009) (Ziarno y Zaręba, 2010) (Nuevo-Palop y Narbad 2011)
	Modelo dinámico de 4,0 compartimientos que simulan el estómago, duodeno, yeyuno e ileón. Las bacterias viables se miden con técnica de recuento en placa.	<i>B. lactis</i> , <i>L. rhamnosus</i> .	(Khalf <i>et al.</i> , 2010)
Sensibilidad a pH	Diluciones y conteo en placa.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. herlveticus</i> , <i>L. paracasei</i> ,	(Ortiz <i>et al.</i> 2008) (Mishra y Prasad, 2005) (Yan <i>et al.</i> , 2010) (Rondón <i>et al.</i> 2008) (Song <i>et al.</i> , 2010) (Klayraung <i>et al.</i> , 2010)

		<i>B. longum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i> .	(Izquierdo <i>et al.</i> , 2008) (Hwanhlem <i>et al.</i> , 2009) (Taheri <i>et al.</i> , 2009) (Guo <i>et al.</i> , 2010)
	Inoculación, incubación y lectura de la densidad óptica en longitudes de onda entre 580,0 y 650,0nm.	<i>L. fermentum</i> <i>L. rhamnosu</i> y <i>L. acidophilus</i> .	(Yan <i>et al.</i> , 2010) (Mathara <i>et al.</i> , 2008)
Resistencia a jugos gástricos	Jugo gástrico artificial con inoculación e incubación para posterior toma de muestras y medición de población mediante conteo en placa.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>L. casei</i> Zhang, <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. animalis</i> y <i>L. casei</i> Shirota. <i>L. plantarum</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosu</i> y <i>B. longum</i> .	(Ortiz <i>et al.</i> 2008) (Charteris <i>et al.</i> , 1998) (Ripamonti <i>et al.</i> , 2007) (Guo <i>et al.</i> , 2009) (Hwanhlem <i>et al.</i> , 2009) (Brinques y Ayub, 2011) (Vinderola y Reinheimer, 2003) (Arboleya <i>et al.</i> , 2010)
	Obtención de jugo gástrico de pollos y exposición de las BAL para posterior conteo en placa.	<i>L. fermentum</i> .	(Lin <i>et al.</i> , 2007)
Reducción de colesterol	Exposición a sales biliares y medida de la resistencia celular por medio de absorbancia.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> .	(Ortiz <i>et al.</i> 2008) (Mishra y Prasad, 2005) (Mathara <i>et al.</i> , 2008)
Adhesión a células intestinales	Células Caco-2 con inmersión en BAL e incubación para posterior coloración y conteo en microscopio.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>L. herlveticus</i> , <i>L. paracasei</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> . <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 y <i>B. lactis</i> Bb12.	(Ortiz <i>et al.</i> 2008) (Song <i>et al.</i> , 2010) (Nuevo-Palop y Narbad, 2011) (Moussavi y Adams, 2010)
	Láminas de acero inoxidable se inoculan y fijan para luego ser examinadas por microscopia electrónica de barrido.	<i>L. casei</i> .	(Mishra y Prasad, 2005)
	Tejido del tracto gastro intestinal de pollos y cerdos con exposición a BAL y posterior coloración y observación bajo microscopio.	<i>L. fermentum</i> .	(Lin <i>et al.</i> , 2007)
	En líneas celulares embrionarias se realiza la inoculación, fijación y tinción para luego observar	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp. y <i>Bifidobacterium</i> spp.	(Ripamonti, <i>et al.</i> 2007)

	con microscopía.		
	Celulas HT29 son usadas para evaluar la adhesión de las cepas.	<i>L. rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> . <i>B. longum</i> .	(Mathara <i>et al.</i> , 2008) (Arboleya <i>et al.</i> , 2010)
	La adhesión se realiza en porciones crudas del tracto gastrointestinal de cerdos.	<i>B. longum</i> . <i>L. reuteri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. brevis</i> y <i>Weissella paramesenteroides</i> .	(Izquierdo <i>et al.</i> , 2008) (Martín <i>et al.</i> , 2009)
	Mucus humano	<i>B. longum</i> .	(Arboleya <i>et al.</i> , 2010)
Actividad antimicrobiana	Pozos y halos de inhibición	<i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>L. sake</i> . <i>L. helveticus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>L. paraplantarum</i> . <i>L. brevis</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i> <i>B. longum</i> y <i>Enterococcus</i> spp.	(Mishra y Prasad, 2005) (Lin <i>et al.</i> , 2007) (Yan <i>et al.</i> , 2010) (Zamudio y Zavaleta, 2003) (Schillinger y Lücke, 1989) (Song <i>et al.</i> , 2010) (Mathara <i>et al.</i> 2008) (Klayraung <i>et al.</i> , 2010) (Martín <i>et al.</i> , 2009) (Taheri <i>et al.</i> , 2009) (Guo <i>et al.</i> , 2010) (Arboleya <i>et al.</i> , 2010) (Audisio <i>et al.</i> , 2011)
	Con cromatografía se observa la producción de etanol; ácido butírico, propiónico, acético y láctico.	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp. y <i>Bifidobacterium</i> spp.	(Ripamonti <i>et al.</i> , 2007)
	Inhibición de la adhesión de patógenos a moco infantil.	<i>B. longum</i> .	(Arboleya <i>et al.</i> , 2010)
	Determinantes de virulencia	Exploración de los factores de virulencia por PCR.	<i>Enterococcus faecalis</i> .
Producción de bacteriocinas	Uso de PCR para detectar los genes estructurales correspondientes a la producción de bacteriocinas.	<i>L. reuteri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. brevis</i> y <i>Weissella paramesenteroides</i> .	(Martín <i>et al.</i> , 2009)
Desconjugación de sales biliares	Actividad de la hidrolasa por zonas de precipitación.	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>L. reuteri</i> . <i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> spp.	(Mathara <i>et al.</i> , 2008) (Guo <i>et al.</i> , 2010) (Vinderola y Reinheimer 2003)

Susceptibilidad a antibióticos	Halos de inhibición y concentración mínima inhibitoria.	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>B. longum</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> .	(Mathara <i>et al.</i> , 2008) (Klayraung <i>et al.</i> , 2010) (Martin <i>et al.</i> , 2009) (Taheri <i>et al.</i> , 2009) (Arboleya <i>et al.</i> , 2010) (Nueno-Palop y Narbad, 2011)
--------------------------------	---	--	---

4.4. APLICACIÓN DE PROBIÓTICOS EN JUGOS

Los probióticos han sido ampliamente desarrollados e incorporados en matrices lácteas. Sin embargo, las personas con intolerancia y alergia a la lactosa, vegetarianos e hipercolesterolémicos, no pueden ingerir este tipo de productos, surgiendo así la necesidad de desarrollar nuevos productos como bebidas no lácteas y suplementos en comprimidos (Prado *et al.*, 2008)

Las frutas y verduras son una parte esencial de la nutrición humana. En particular, son ricas en agua, vitaminas (vitamina C y vitaminas del grupo B), provitamina A, fitoesteroles, muestran una gran variedad de minerales y fitoquímicos. (DiCagno *et al.*, 2011). Por todo esto se convierten en una nueva opción para el desarrollo de alimentos funcionales probióticos. En los últimos años se han realizado varias investigaciones en diferentes frutas, tipos de preparaciones y microorganismos para el desarrollo de jugos funcionales:

Sheehan *et al.* (2007) evaluaron la supervivencia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en jugo de naranja, piña y jugo de arándano. Los resultados mostraron diferencias entre las cepas y su nivel de resistencia a acidez. Todas las cepas sobrevivieron por más tiempo en el jugo de naranja y piña; mientras que *L. casei* DN-114 001, *L. rhamnosus* GG y *L. paracasei* NFBC43338 mostraron el mayor crecimiento por encima de 10^6 UFC/mL al cabo de 12 semanas en los jugos de naranja y piña.

Saarela *et al.*, (2011) evaluaron el potencial de mutagénesis UV para generar una cepa ácido resistente de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Esta cepa, al someterla a almacenamiento en jugo de manzana (pH 3,5), mejoró su estabilidad en jugo de bajo pH.

Yoon *et al.*, (2006) evaluaron jugo de col como matriz en jugos con adición de *L. plantarum* C3, *L. casei* y *L. delbrueckii* D7. Después de 4 semanas de almacenamiento en frío a 4,0°C, los recuentos de células viables de *L. plantarum* y *L. delbrueckii* fueron de $4,1 \times 10^7$ y $4,5 \times 10^5$ UFC/mL. Mientras que *L. casei* no sobrevivió al pH bajo y a las condiciones de la matriz.

Champagne y Gardner (2008) evaluaron la capacidad de supervivencia de nueve cepas de lactobacilos (*L. acidophilus* LB2, LB3 y LB45, *L. brevis* LB6, *L. rhamnosus* LB11 y LB24, *L. fermentum* LB32, *L. plantarum* LB42 y *L. reuteri* LB38) inoculados en una bebida de frutas comercial (Oasis Health Break: piña, manzana, naranja, pera, uva, maracuyá y limón; purés: melocotón, fresa, mango y kiwi) almacenada a 4,0°C durante un máximo de 80 días. El inóculo inicial fue de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Las especies con mayor capacidad de supervivencia fueron *L. plantarum* LB42, *L. reuteri* LB38, *L. fermentum* LB32 y *L. rhamnosus* LB11 con poblaciones por encima de 10^6 UFC/mL al cabo de los 80 días.

Shah *et al.* (2010) determinaron la supervivencia de las bacterias probióticas (*L. rhamnosus* HN00, *B. lactis* HN001 y *L. paracasei* LPC 37), en un sistema modelo de jugo de frutas. Las bacterias probióticas fueron inoculadas en jugo con varias vitaminas y antioxidantes a una concentración celular de aproximadamente 10^8 UFC/mL por 6 semanas. Los resultados mostraron el efecto de los antioxidantes en la supervivencia de las BAL con poblaciones de 10^7 UFC/mL, al cabo de las 6 semanas.

Nualkaekul y Charalampopoulos (2011) estudiaron la supervivencia de *L. plantarum* NCIMB8826 en varios tipos de jugos, como naranja, pomelo, grosella negra, piña, granada, arándano y jugo de limón; desarrollando un modelo matemático que describe la dependencia de pH, ácido cítrico y ácido ascórbico. La concentración celular inicial fue de aproximadamente 10^8 UFC/mL y las soluciones preparadas fueron almacenadas a 4,0°C durante 6 semanas. El modelo obtenido predijo la supervivencia de las células en naranja, grosella negra y piña; sin embargo, no lo hizo en toronja y granada. Teniendo en cuenta los resultados de los análisis de la composición de los zumos y el modelo desarrollado, los autores dedujeron que en ciertos jugos, otros compuestos parecen proteger a las células durante el almacenamiento, siendo probablemente las proteínas y fibra dietética, las principalmente asociadas.

Moussavi y Adams, (2010) inocularon en jugo de granada, cuatro cepas de bacterias lácticas: *L. plantarum*, *L. delbruekii*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*. La fermentación se realizó a 30,0°C durante 72 horas. Variables como concentración de la población, pH, acidez titulable, azúcar y metabolismo de los ácidos orgánicos se midieron durante el periodo de fermentación y la viabilidad de todas las cepas se determinó durante el tiempo de almacenamiento a 4,0 °C en 4 semanas. Los resultados indicaron *L. plantarum* y *L. delbruekii* mostraron mayor viabilidad durante el tiempo de almacenamiento. Las células viables se mantuvieron en concentraciones aproximadas de 10^8 UFC/mL por 2 semanas, pero dicha concentración disminuyó drásticamente después de 4 semanas.

Pereira *et al.*,(2011) evaluaron la fermentación de jugo de manzana por *L. casei* NRRL B-442 y determinaron la cantidad de inóculo adecuado y el tiempo de fermentación. Posterior a esto, midieron la viabilidad en el jugo durante 42 días a 4,0°C. Las condiciones

óptimas para la producción de jugo de manzana fueron: pH inicial de 6,4, la temperatura de fermentación de 30,0° C, el nivel inoculación de 10^7 UFC/mL y 16 horas de fermentación. Durante el almacenamiento refrigerado, el conteo celular fue superior a 10^8 UFC /mL.

DiCagno *et al.* (2011) evaluaron el efecto de *W. cibaria*, *L. plantarum*, *L. sp.* y *L. pentosus* sobre las propiedades de batidos de fruta (rojo y verde). Aislaron e identificaron las bacterias de mora, ciruela, kiwi, papaya e hinojo. El batido rojo fue preparado a partir de cerezas, tomate, moras y ciruelas pasas; para el verde utilizaron kiwi, hinojo, espinaca y papaya. La inoculación se realizó con poblaciones cercanas a 10^9 UFC/mL manteniéndose por 30 días a 4,0°C. En el trabajo, se obtuvieron poblaciones finales cercanas a 10^9 UFC/mL en los dos batidos luego de los 30 días de almacenamiento.

Czyzowska *et al.* (2006) evaluaron la influencia de la fermentación láctica de *L. paracasei* 0916-0923-0920, *L. plantarum* 0858, *L. delbrueckii* 0854, *L. brevis* 0944 en la estabilidad de los colorantes presentes en el jugo de remolacha roja. Como resultado obtuvieron que la fermentación láctica influyó tanto sobre el pigmento rojo como en el amarillo y observaron un aumento de betanidina en los jugos fermentados.

Saarela *et al.* (2009) evaluaron el efecto de la fermentación y la estabilidad de almacenamiento de *L. rhamnosus* sobre jugo de manzana con ácidos y sales biliares. La inoculación en los jugos de manzana a pH 3,6, 3,4 y 3,2 se realizó con poblaciones de aproximadamente 10^7 UFC/mL almacenándose durante 6 semanas a 4,0°C. Como resultado obtuvieron que al cabo de las 6 semanas, el jugo que presentó mejor comportamiento en cuanto a la viabilidad celular fue el de pH de 3,6. También se encontró que las células fueron más sensibles al ácido málico en comparación con HCl. Según los autores, la exposición al ácido málico puede resultar útil para evaluar a largo plazo la estabilidad de los preparados probióticos en el jugo de manzana y podría aumentar la estabilidad del microorganismo en el jugo.

Luckow *et al.* (2006) evaluaron el efecto de *L. paracasei* spp. *paracasei* NFBC 43338 sobre la calidad sensorial y la aceptación de un jugo de naranja. Adicionalmente evaluaron si había algún efecto sobre el mismo jugo de naranja pero mezclado con piña, mango y maracuyá. Como resultado se encontró que el jugo de naranja con adición de la cepa probiótica, presentó un sabor característico a “medicamento”. Sin embargo, al cabo de 7 días de almacenamiento, en los jugos mezclados con frutas tropicales se enmascaró el sabor asociado con ingredientes probióticos y tuvo buena aceptación por parte de los consumidores.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

5.1.1. Aislamiento y caracterización de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) a partir de alimentos autóctonos.

La selección de los alimentos a fermentar para la obtención de aislamientos de bacterias ácido lácticas (BAL), se llevó a cabo teniendo en cuenta que los alimentos fueran de diferentes fuentes: vegetal, animal, harinas, precocido, fresco, etc y adicionalmente que fueran comunes o típicos en Colombia. La finalidad al seleccionar alimentos de distintas fuentes es aprovechar lo que sucede en el deterioro de la materia orgánica en la cual pueden intervenir microorganismos que llegan a tener propiedades probióticas (Liu *et al.*, 2011).

Con el fin de aislar diferentes tipos de BAL, se evaluaron más de 20 alimentos; entre frutas, hortalizas, harinas y derivados lácteos. Para esto, se utilizó el método de muestreo para alimentos del *Bacteriological Analytical Manual* (Food and Drug Administration U.S., 2009). A los alimentos no lácteos, se les realizó una fermentación previa en agua peptonada al 0,1% a 37,0°C durante 48 horas, con el fin de acelerar su deterioro y favorecer la recuperación de este tipo de cepas (Klayraung *et al.*, 2010; Rivera y Gallardo, 2010).

Diluciones seriadas, obtenidas a partir de las muestras de los alimentos se sembraron en agar Man Rogosa Sharpe (MRS: Scharlau, ref. 01-135) a 37,0°C por 24 horas en aerobiosis y las colonias resultantes se analizaron macro y microscópicamente. Tinción de Gram y prueba de catalasa, se utilizaron como preliminares para la selección inicial de las cepas de interés.

En la Tabla 13 se presentan los alimentos que fueron analizados y en el Anexo 1 se presentan las características de los alimentos utilizados como fuente de los aislamientos.

- **Caracterización morfológica macroscópica**

La caracterización macroscópica de las colonias se realizó bajo los siguientes criterios:

Tamaño: muy pequeñas (colonias menores a 2,0 mm de diámetro), pequeñas (entre 2,0 y 5,0 mm) y grandes (mayores a 5,0 mm).

Color: blanco, amarillo, beige, etc.

Opacidad: transparente, opaca, etc.

Consistencia: cremosa, pastosa, dura, etc.

- **Caracterización microscópica**

La caracterización microscópica se hizo con tinción de Gram y prueba de catalasa. Para la selección preliminar de las cepas de trabajo se preseleccionaron las que cepas Gram positivas y catalasa negativas.

Tabla 13. Lista de alimentos de los que se realizaron los aislamientos

Fuente de aislamiento
Queso fresco
Suero costeño
<i>Achiras</i>
Repollo " <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> "
Brocoli " <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i> "
Coliflor " <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i> "
Totumo " <i>Crescentia cujetes</i> "
Arroz " <i>Oryza sativa</i> "
Queso Paipa
Queso crema
harina de maíz
Tomate de árbol " <i>Solanum betaceum</i> "
galleta de "cuca"
Almojabana
Pera " <i>Pyrus communis</i> L."
Manzana " <i>Malus sylvestris</i> Mill."
Sidra " <i>Cucurbita ficifolia</i> "
papa criolla " <i>Solanum phureja</i> "
Guanábana " <i>Annona muricata</i> "

5.1.2. Identificación bioquímica

Las cepas Gram positivas y catalasa negativas, se analizaron bioquímicamente mediante pruebas de azúcares reductores utilizando las galerías que vienen en los kits para identificación bacteriana API 50CHL y API 50CHB de Biomereux®.

5.1.3. Identificación Molecular

Mediante las pruebas de identificación bioquímica, se obtuvieron cuatro posibles BAL de las especies: *L. plantarum* (1cepa), *L. brevis* (2 cepas) y *L. delbrueckii* (1cepa). Estas cuatro cepas fueron identificadas molecularmente mediante secuenciación. Para el proceso de identificación se llevaron a cabo las siguientes actividades: (1) diseño de *primers* para las tres especies en estudio, (2) desarrollo de PCR (reacción en cadena de

la polimerasa) para amplificación de fragmentos de DNA seleccionados (3) verificación de amplímeros para secuenciación mediante electroforesis y (4) secuenciación genómica. Como control del proceso se utilizó la cepa *L.delbrueckii* ATCC 12315, que sirvió para verificar la especificidad de los primers.

5.1.3.1. Diseño de Primers

Para el diseño de los *primers* se seleccionó una secuencia de DNA con anillamiento en los tres genomas bacterianos, lo cual se verificó en la base de datos de *European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk/). Se seleccionó un fragmento de la región 16S zona V6 con alto nivel de conservación entre especies, pero que a la vez presentará diferencias puntuales en la secuencia de nucleótidos para cumplir con el algoritmo de identificación.

5.1.3.2. Extracción de ADN

El DNA que sirvió de muestra para la PCR se obtuvo a partir de los cultivos bacterianos de las cepas en estudio en fase estacionaria y se utilizó para su extracción el kit MoBio®.

5.1.3.3. Desarrollo de PCR

Se realizó una PCR bajo las siguientes condiciones de amplificación: 30,0 segundos a 95,0°C para separación de hebras, 45,0 segundos a 55,0°C para anillamiento con los *primers* y 45,0 segundos a 72,0°C para la elongación. Este ciclo se repitió 30 veces y al final se realizó un proceso de refrigeración a 4,0°C (Figura 9.).

Para realizar la PCR se utilizó un termociclador cuyo ciclo fue el siguiente:

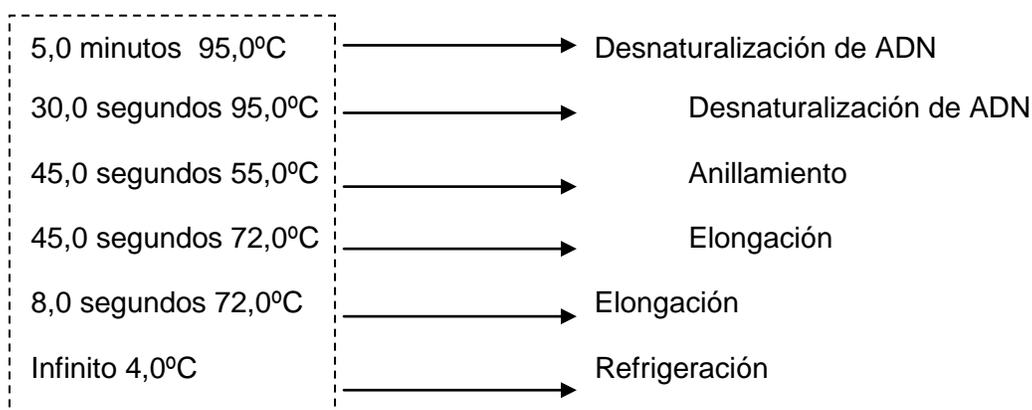


Figura 9. Protocolo usado en el termociclador para PCR

5.1.3.4. Electroforesis

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3,0% (90 voltios por 45 minutos) para evidenciar la obtención de fragmentos amplificados del DNA de cada uno de los cultivos. Como agente fluorescente para la cámara de UV se utilizó Sybergreen (Invitrogen®) al 1,5% y como marcador de peso molecular se utilizó Hyperladder IV de Bioline® (100 a 1000bp).

Los resultados del corrido electroforético demostraron que las muestras procesadas contenían amplímeros de DNA entre 400 y 500bp correspondientes al tamaño del fragmento diseñado, con lo cual se comprobó la eficiencia de los *primers* y la calidad de las muestras para la siguiente fase de secuenciación.

5.1.3.5. Secuenciación y análisis

Las muestras de DNA obtenidas a partir de los cultivos de las cuatro cepas de BAL estudiadas: *L. plantarum* (1), *L. brevis* (2), *L. delbrueckii* (1) y la cepa de referencia seleccionada, se llevaron a secuenciación. Los electroforetogramas recibidos como resultado de la secuenciación, fueron editados con ayuda del programa Chromas Lite® usando las secuencias “reverse” y “forward” para construir una nueva secuencia completa. Esta nueva secuencia se comparó con los fragmentos del genoma con ayuda de la herramienta Clustal Wallis® (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Con las secuencias obtenidas se llevó a cabo el proceso de identificación. Luego de tener las secuencias editadas se realizó su reconocimiento con ayuda de la base de datos *European Bioinformatics Institute (EBI)* (www.ebi.ac.uk/) y pruebas comparativas entre los resultados usando ClustalW2 del EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Estos análisis sirvieron para ver las diferencias y similitudes entre las secuencias obtenidas y de esta forma se obtuvo la identificación final de cada cepa.

5.1.3.6. Conservación de las cepas

Para la conservación del material biológico se utilizaron cryoviales (CRYOBANK®) en los que se almacenaron los microorganismos a -20,0°C (figura 10).

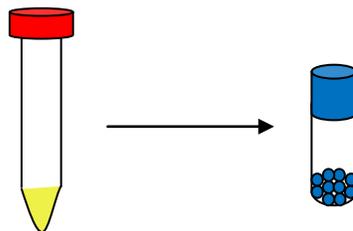


Figura 10. Conservación del material genético

5.2. EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO

Según la Organización Mundial de la Salud (FAO-OMS, 2002), dentro de las pruebas *in vitro* para evaluar el potencial probiótico de alguna cepa se encuentran: resistencia a pH ácido, sensibilidad a antibióticos, acción antimicrobiana, adherencia y resistencia a sales biliares. Adicionalmente, la OMS considera que para que un microorganismo sea denominado probiótico, se debe demostrar que las bacterias son capaces de sobrevivir al paso por el tracto gastro intestinal y llegar al intestino grueso en poblaciones entre $10^6 - 10^7$ UFC/mL con capacidad de aumentar la población dentro del mismo. Teniendo en cuenta estos criterios se diseñó la metodología para la evaluación in vitro del potencial probiótico de las cepas seleccionadas. Se realizaron las siguientes pruebas: resistencia a pH bajo, sensibilidad a antibióticos, actividad antimicrobiana, resistencia a sales biliares y adhesión a células de la mucosa intestinal.

Como cepa de referencia, se trabajó con *L. acidophilus* ATCC 4356, aislada del tracto gastrointestinal humano y reportada con actividad probiótica (Lan-Szu y Bart, 1998; Baele *et al.*, 2002; Annuk *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2007).

Para cada una de las pruebas descritas anteriormente, se realizaron tres ensayos independientes, cada uno con tres réplicas.

5.2.1. Resistencia a pH ácido

Para realizar la evaluación de resistencia a pH ácido fue necesario realizar primero una activación de las cepas:

- **Activación de las cepas**

Los lactobacilos fueron activados inoculando dos perlas de los crioviales de almacenamiento, sobre 5,0mL de caldo MRS (Man Rogosa y Sharpe) con incubación a 37,0°C en aerobiosis por 24 horas. Pasadas las 24 horas el cultivo se homogenizó con vórtex y se transfirieron 300,0μL del cultivo a un nuevo tubo con caldo MRS que se incubó bajo las mismas condiciones iniciales. Concluidas las 24 horas, las cepas quedan activadas para poder realizar las diferentes pruebas programadas (Figura 11)

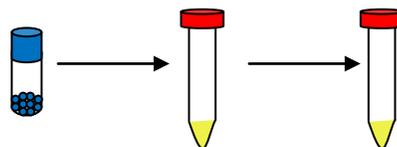


Figura 11. Activación de cepas

Para la evaluación de la resistencia a pH ácido, se trabajó sobre caldo MRS (Man Rogosa y Sharpe) con valores de pH ajustados a 3,0, 2,5 y 2,0 con ácido clorhídrico 0,1N mediante método conductivimétrico. La resistencia de las cepas a estas condiciones de crecimiento fue cuantificada determinando su concentración celular mediante recuento en placa por periodos de 0,0, 2,0 y 4,0 horas a 37,0°C (Figura 12). Las condiciones evaluadas se establecieron de acuerdo con lo planteado por Hellström *et al.* (2006), quienes evaluaron la fisiología del vaciado gástrico, encontrando que el tiempo promedio que tarda el alimento en el estómago es de 4,0 horas aproximadamente. Sin embargo, como prueba adicional y para simular condiciones ambientales extremas, se evaluó el crecimiento de las BAL a diferentes valores de pH en un tiempo de 24 horas. Se realizaron tres ensayos independientes con tres repeticiones cada uno.

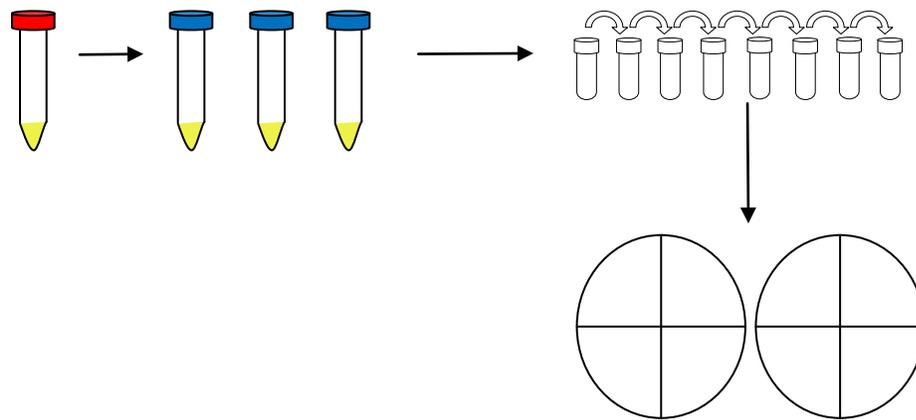


Figura 12. Resistencia a pH ácido

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante cartas de control 3 sigma, observando que los datos se mantuvieran dentro de los límites superior e inferior calculados, usando para ello la desviación estándar de los datos tomados en las pruebas control. Igualmente se halló el porcentaje de resistencia de las cepas con la ecuación reportada por Yan *et al.* (2010), en donde se compara la concentración celular de las cepas en el tiempo 1 (al inicio del ensayo), frente a la a concentración observada después del periodo de incubación (tiempo 2):

$$Resistencia = \frac{UFC/mL_{tiempo\ 1} * 100\%}{UFC/mL_{tiempo\ 2}}$$

5.2.2. Sensibilidad a antibióticos

Para evaluar la sensibilidad de las cepas a los antibióticos, se utilizó la técnica de difusión en placa sobre agar MRS, previamente inoculado de manera independiente y controlada con los cultivos activos (10^8 UFC/mL) de las cuatro cepas BAL seleccionadas y la cepa referencia. Cuando el medio se solidificó, se colocaron los discos que contenían los antibióticos a evaluar, que para este caso fueron 23: amoxicilina/ácido clavulónico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, cafazolina, ceftriaxona, clindamicina, cloramfenicol, daptomicina, eritromicina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, linezolid, meropenem, moxifloxacina, oxacilina, penicilina, rifampicina, synergid, tetraciclina, trimetropin/ sulfam y vancomicina. Luego de incubar las placas a $37,0^{\circ}\text{C}$ por 24 horas se midieron los halos de inhibición generados. Por este método de antibiograma se midió la sensibilidad y la concentración mínima inhibitoria para las cinco bacterias de interés y finalmente se obtuvieron los porcentajes de sensibilidad antibiótica de las cepas en estudio.

5.2.3. Actividad antimicrobiana

La actividad antagónica de las cepas se evaluó mediante difusión en placa de acuerdo con el protocolo reportado por (Aguilar y Klotz, 2007). Para esto, se retaron los sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares de las BAL, frente a diferentes cepas patógenas de importancia en alimentos.

A partir de cultivos celulares de las BAL con poblaciones entre 10^8 y 10^9 UFC/mL se obtuvieron sobrenadantes libres de células, para lo cual, los cultivos se centrifugaron 9000rpm por 5,0 minutos a $4,0^{\circ}\text{C}$ (microcentrífuga Hettich Mikro 200R) y filtraron a través de membrana de $0,25\mu\text{m}$. Los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron con hidróxido de sodio (NaOH 0,1N) hasta ajustar su pH a 6,5.

Los microorganismos patógenos se activaron como se mencionó anteriormente (numeral 5.2.1), pero utilizando para ello caldo tripticosa soya (TSB) en lugar de caldo MRS. Posteriormente los cultivos se inocularon de manera independiente y controlada en Agar MRS antes de su solidificación, para realizar la prueba de difusión en placa.

Para el ensayo se utilizaron seis cepas patógenas (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* ATCC 9290 y *Staphylococcus aureus* pertenecientes a la colección de cepas de la Universidad de la Sabana). Al agar solidificado e inoculado con las cepas patógenas se le hicieron pozos de 10,0mm de diámetro, en éstos se vertieron 100,0 μL de cada uno de los sobrenadantes obtenidos anteriormente. Las placas se llevaron a incubación por 24 horas a $37,0^{\circ}\text{C}$ (Figura 13). El diámetro de los halos de inhibición que se generaron en el medio sirvió para determinar el nivel de antagonismo de

las cepas. Para el análisis de resultados, se diseñó una tabla de clasificación, de acuerdo con el tamaño de los halos que se generaron (Tabla 14).

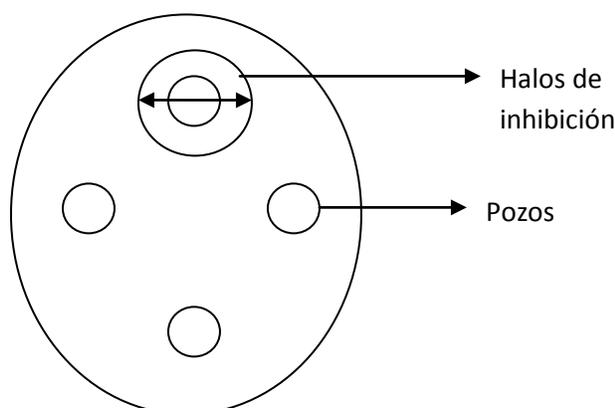


Figura 13. Pozos para medir la inhibición

Tabla 14. Clasificación de la inhibición de acuerdo con el tamaño de los halos

Diámetro del halo de inhibición	Clasificación
<3,0 mm	+
entre 3,0 y 6,0 mm	++
>6,0 mm	+++

5.2.4. Resistencia a sales biliares

Para la evaluación de la resistencia de las cepas a sales biliares, se trabajó sobre caldos MRS con adición de sales biliares Fluka (*Sigma Aldrich®*) ajustadas al 1,0, 1,5 y 2,0%, según lo recomendado por algunos autores (Zago *et al.*, 2011; Mishra y Prasad, 2005). La resistencia de las cepas a estas concentraciones de sales biliares se determinó, cuantificando su concentración celular mediante recuento en placa, luego de ser incubadas por periodos de 0, 2 y 4 horas a 37,0°C. Como prueba adicional y para simular condiciones ambientales extremas, se evaluó el crecimiento de las BAL a diferentes valores de pH en un tiempo de 24 horas (Figura 14).

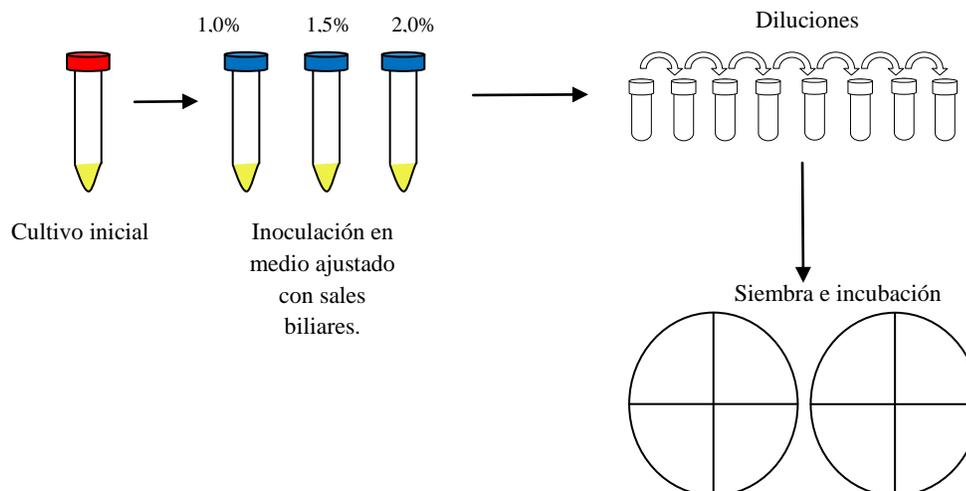


Figura 14. Procedimiento para medir la resistencia a sales biliares

En total se realizaron tres ensayos independientes con tres repeticiones cada uno. Como control, se utilizó el mismo medio de cultivo sin ninguna adición de sales biliares (0,0%). Los resultados obtenidos fueron analizados al igual que como los de resistencia a pH bajo (numeral 5.2.1), utilizando para ello cartas de control 3 sigma. Igualmente se halló el porcentaje de resistencia de las cepas con la ecuación reportada por Yan *et al.* (2010):

$$\text{Resistencia} = \frac{\text{UFC/mL}_{\text{tiempo 1}} * 100\%}{\text{UFC/mL}_{\text{tiempo 2}}}$$

5.2.5. Adhesión a células de la mucosa intestinal

Para medir la adhesión de las bacterias ácido lácticas a las células de la mucosa intestinal de forma cualitativa, se utilizaron láminas con tejido de mucina humana Sigma-Aldrich (Mucin Tissue – Trol TM, AR-Med LTD- Runnymed Malthouse- TW20 9BD U.K) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Las bacterias empleadas como controles positivos de adhesión fueron *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Escherichia coli*. El procedimiento utilizado para la evaluación de la capacidad de adhesión se presenta a continuación:

a. Activación de cepas

La activación de *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* se realizó en caldo Trypticasa de Soya (TSB), tomando una perla del criovial de almacenamiento y sembrándola en 5,0mL del caldo. El cultivo se incubó a 37,0°C por 24 horas. Para una segunda activación, se transfirieron 100,0µl del caldo anterior a 5,0mL de un nuevo caldo TSB (Figura 15). De esta manera se alcanzaron concentraciones celulares de aproximadamente 10^8 - 10^9 UFC/mL que fueron verificadas mediante

recuento en placa. Para las BAL en estudio y la cepa de referencia, se realizó el mismo procedimiento anterior pero el medio utilizado fue el caldo MRS.

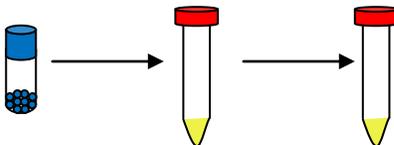


Figura 15. Activación de cepas

b. Obtención y purificación de células

La obtención y purificación de las células bacterianas se llevó a cabo por centrifugación a 9055,0g por 10 minutos a 4,0°C. Posteriormente se extrajo el sobrenadante generado, y al pellet recuperado se le adicionó 1,0mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) para diluir la muestra.

c. Preparación de muestras

Para verificar la concentración celular de las muestras, se tomaron 80,0μL de la muestra y se fijaron con mechero a una lámina portaobjetos. La lámina se incubó a 37,0°C por 30 minutos y posteriormente se coloreó con cristal violeta filtrado (1,0 minuto). La lámina se enjuagó con PBS y se llevó al microscopio para conteo en 10 campos y verificación de la pureza.

d. 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 secar a 37,0°C por 30 minutos y luego se incubaron en cámara húmeda 24 horas a 37,0°C. Después de la incubación las láminas se lavaron con PBS, para retirar las bacterias que no se unieron a las células de la mucosa adheridas a las láminas. Luego se colorearon con cristal violeta filtrado por 1,0 minuto y se lavaron nuevamente con PBS. Finalmente las láminas se observaron en el microscopio para analizar si las células bacterianas se adhirieron al tejido intestinal. Este procedimiento se repitió para las bacterias control (*Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*) y para las BAL y la cepa de referencia estudiadas. Como controles negativos se utilizaron las láminas (Sigma-Aldrich) teñidas con cristal violeta pero sin adición de células bacterianas.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante comparación de las microfotografías obtenidas de los controles positivos, los controles negativos y las microfotografías obtenidas de las cepas evaluadas. Los resultados se clasificaron de acuerdo con el tipo de adhesión obtenida: se consideró como adhesión negativa, cuando no se observaron células bacterianas en las láminas, igual que lo ocurrido en los controles negativos; y se consideró como adhesión positiva cuando los resultados obtenidos fueron similares a los presentados en los controles positivos (alto porcentaje de células bacterianas en las láminas).

5.2.6. Cálculo del potencial probiótico

Adicional a los análisis descritos anteriormente, para cada una de las cepas estudiadas se realizó un cálculo del potencial probiótico total expresado en porcentaje, utilizando para ello la fórmula reportada por Tambekar y Bhutada (2010). Para realizar el cálculo, a cada una de las pruebas in vitro realizadas se les asignó un puntaje máximo posible y dependiendo del desempeño de cada cepa, se estableció el nivel de cumplimiento de cada prueba. En la Tabla 15 se presentan los puntajes que se asignaron en cada caso.

Tabla 15. Asignación de puntajes para cálculo de potencial probiótico. Modificado de Tambekar y Bhutada (2010)

Característica probiótica	Indicación	Puntaje	Puntaje máximo posible
Tolerancia a pH bajo	Sensible	0	1
	Resistente	1	
Tolerancia a sales biliares	Sensible	0	1
	Resistente	1	
Susceptibilidad a antibióticos	Sensible	0	1
	Resistente	1	
Actividad antimicrobiana	<3,0mm	1	3
	3,0-6,0mm	2	
	>6,0 mm	3	
Adherencia a células intestinales	-	0	2
	+	1	
	++	2	
Potencial probiótico total			8

Como se muestra en la tabla anterior, para la tolerancia a pH bajo, se asignó un puntaje máximo posible de 1. Características como tolerancia a sales biliares y susceptibilidad a antibióticos, también fueron catalogadas con un puntaje máximo de 1, mientras que a la adherencia a células intestinales y a la actividad antimicrobiana, características más

especializadas y de mayor trascendencia dentro de los procesos biológicos como lo reportan Tambekar y Bhutada (2010), se les asignó un puntaje máximo posible de 2 y 3, respectivamente. De acuerdo con esta asignación, el puntaje máximo posible para el potencial probiótico total fue de 8.

Con estos puntajes, se aplicó la fórmula reportada por Tambekar y Bhutada (2010) y de esta manera se obtuvo el potencial probiótico de cada cepa en términos de porcentaje. A continuación se presenta la fórmula aplicada:

$$\text{Potencial probiótico (\%)} = \frac{\text{Puntaje observado para cada cepa}}{\text{Puntaje máximo posible}} \times 100\%$$

5.3. VIABILIDAD DE LAS CEPAS BACTERIANAS EN JUGOS DE FRUTA

5.3.1. Preparación de jugos

Para la preparación de los jugos se utilizaron como base pulpas de tres frutas diferentes: mango (*Mangifera indica*), fresa (*Fragaria vesca*) y lulo (*Solanum quitense*) de una marca comercial. La preparación de los jugos se realizó teniendo en cuenta la normatividad vigente para jugos y pulpas de fruta (codex stan 247 de 2005 y Resolución 7992 de 1991 del Ministerio de Salud Colombiano) y se tuvieron en cuenta los requerimientos y estándares estipulados para este tipo de productos en cuanto a acidez, pH y grados Brix (Tabla 16). Para ajustar los grados Brix se utilizó azúcar blanca y el agua de preparación fue previamente esterilizada para disminuir la carga bacteriana inicial. No se llevaron a cabo procesos de pasteurización en los jugos para no alterar sus propiedades fisicoquímicas y observar de esta manera el comportamiento de las BAL y sus posibles interacciones con flora acompañante.

Tabla 16. Condiciones estándares de las pulpas de fruta (Codex alimentarius stan 247 de 2005)

Fruta	°Brix	Acidez	pH
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	13,0-17,0	0,3-0,4	3,8-4,2
Fresa (<i>Fragaria vesca</i>)	6,5-7,0	0,7-0,9	3,4-3,5
Lulo (<i>Solanum quitense</i>)	6,0-7,0	1,0-2,5	3,0-3,2

5.3.2. Preparación del inóculo

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación del potencial probiótico, se seleccionó una de las BAL con mayor potencial para evaluar su viabilidad en jugos de fruta. Para la preparación del inóculo, que fue utilizado en los jugos, inicialmente se realizó la activación de las cepas (numeral 5.2.1) y se verificó la concentración celular alcanzada, que en todos los casos se mantuvo entre 10^9 y 10^{10} UFC/mL. El cultivo obtenido después de la activación, se centrifugó en una centrifuga refrigerada Hettich 32R® a 9000rpm, a 4,0 °C durante 10 minutos para concentrar las células. Con jeringa estéril se extrajo el sobrenadante y el pellet obtenido se inoculó en 5,0 mL del jugo de fruta previamente preparado. Mediante recuento en placa se verificó la concentración inicial de las bacterias en cada jugo, que en todos los casos estuvo entre 10^9 y 10^{11} UFC/mL.



Figura 16. Preparación del inóculo

5.3.3. Evaluación de la viabilidad de la BAL en jugos

Los jugos inoculados se almacenaron durante 30 días a 8,0°C y se les realizó un seguimiento a través del tiempo para evaluar la viabilidad de la BAL. Como controles se utilizaron jugos de fruta sin adición de la cepa. La evaluación microbiológica de los jugos se realizó tomando muestras cada tres días y mediante recuento en placa sobre agar MRS se determinó su concentración a lo largo del ensayo. Las placas se incubaron a 37,0°C en aerobiosis durante 48 horas y con las colonias resultantes se construyeron las gráficas de viabilidad. En total, se realizaron tres ensayos independientes con tres repeticiones. En la Figura 17 se presenta el esquema del ensayo realizado.

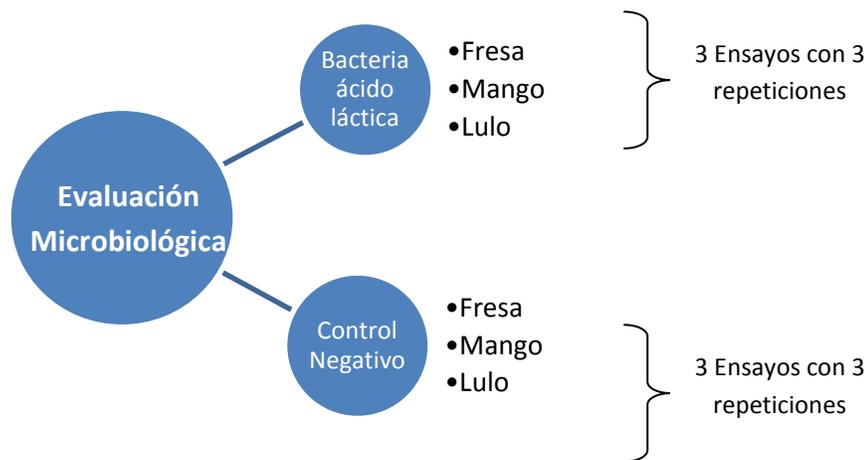


Figura 17. Esquema de los ensayos de la evaluación microbiológica

5.4. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS JUGOS

Las propiedades fisicoquímicas de los jugos adicionados con la BAL y las de los jugos control se evaluaron a partir de muestras recolectadas cada tres días. Para cada jugo se determinó el porcentaje de acidez, el pH y los grados Brix, a través del tiempo, y también se realizó un análisis sensorial para establecer cambios organolépticos en los jugos. En total se realizaron tres ensayos independientes, cada uno con tres réplicas. A continuación se describe el procedimiento que se llevó a cabo para cada prueba:

5.4.1. Acidez

La acidez de los jugos se midió con un titulador Methrom Titrino (modelo 702 SM®) ajustado con hidróxido de sodio en una normalidad de 0,1N. Los resultados fueron expresados como porcentaje de acidez aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez: } \frac{V * C * F * 100}{M}$$

Donde,

F: factor para el ácido cítrico=0,064

V: volumen de hidróxido de sodio (NaOH), expresado en mL

C: concentración del NaOH

M: peso del analito expresado en gramos

Los resultados se gráfcaron con respecto al tiempo para observar el comportamiento de esta variable en los jugos refrigerados y adicionados con la BAL y se compararon con los ocurrido en los jugos control.

5.4.2. pH

El pH se evaluó con el titulador Methrom Titrino (modelo 702SM®), sumergiendo el electrodo en la muestra y registrando el valor del pH. Estos resultados también fueron gráfcaros con respecto al tiempo.

5.4.3. °Brix

Los grados brix fueron medidos con un refractómetro óptico marca Polsky®. Las muestras de jugo se colocaron en el lente y se registraron grados obtenidos. Con los resultados se construyeron gráficas para analizar el comportamiento de esta variable a través del tiempo.

5.4.4. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial se realizó utilizando una escala hedónica en pruebas duo-trio con consumidores potenciales. La población en la que se realizaron las pruebas fueron personas sin entrenamiento entre 20 y 30 años. Los participantes tomaron 30,0 mL de jugo en una copa de 40,0 mL identificada con un código alfa-numérico de cuatro caracteres y en un formato evaluaron el sabor, apariencia y olor de las muestras. En el Anexo 2 se presenta el formato utilizado para la evaluación sensorial. La escala hedónica para medir el grado de aceptabilidad del jugo se presenta en la Tabla 17.

Tabla 17. Clasificación de la aceptabilidad de jugos de fruta en pruebas sensoriales

Muy buena	4
Buena	3
Mala	2
Muy mala	1

La evaluación sensorial se realizó a lo largo de 12 días y se recolectaron muestras de los jugos el día 0, el día 6 y el día 12. Para cada uno de los jugos se realizaron tres ensayos independientes, con tres réplicas cada ensayo.

A los resultados obtenidos, se les halló el porcentaje de aceptabilidad en cada escala y se graficaron. Finalmente se establecieron las diferencias entre los jugos y las características evaluadas para sugerir cual de ellos podría ser la matriz apropiada para garantizar la viabilidad de la BAL con potencial probiótico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Los resultados de la caracterización macroscópica y microscópica, así como las pruebas preliminares, realizadas a las cepas autóctonas aisladas de alimentos autóctonos, permitieron hacer una preselección de cepas, donde se descartaron las bacterias Gram negativas y con prueba de catalasa positiva. Esto debido a que las bacterias ácido lácticas carecen de la enzima catalasa y son Gram positivas (Boone, 2001).

Los resultados de identificación preliminar y de la caracterización morfológica (macroscópica y microscópica) realizada a los aislamientos se presentan en la Tabla 18. Se observó que de los 20 aislamientos 19 tuvieron un comportamiento macroscópico y microscópico aparentemente similar al de las bacterias ácido lácticas (Boone, 2001). La cepa número 20, aislada de guanábana, presentó un comportamiento diferente al resto de las cepas, al presentar un crecimiento típico de levadura, por lo que no se incluyó en la siguiente fase de análisis. Como resultado del proceso de fermentación realizado a los alimentos, es normal encontrar levaduras asociadas también a su proceso deteriorativo; sin embargo, de todos los alimentos evaluados, solo se presentó un aislamiento de este tipo.

Tabla 18. Aislamientos bacterianos obtenidos a partir de alimentos en su mayoría autóctonos

Aislamiento	Fuente de aislamiento	Morfología microscópica	Gram	Crecimiento aeróbico en agar MRS, 37°C, 24H	Catalasa
1	Queso fresco	Bacilos	(+)	Colonias blancas, cremosas y pequeñas.	(-)
2	<i>Suero costeño</i>	Cocos	(+)	Colonias blancas, translúcidas y muy pequeñas.	(-)
3	<i>Suero costeño</i>	Bacilos	(+)	Colonias transparentes, translúcidas y muy pequeñas.	(-)

4	<i>Achiras</i>	Bacilos	(+)	Colonias blancas, cremosas y muy pequeñas.	(-)
5	Repollo	Bacilos	(+)	Colonias blancas, translúcidas y pequeñas.	(-)
6	Brócoli	Cocos	(+)	Colonias blancas, translúcidas y muy pequeñas.	(-)
7	Coliflor	Bacilos	(+)	Colonias blancas, cremosas y muy pequeñas.	(-)
8	Totumo	Bacilos	(+)	Colonias blancas, cremosas y pequeñas.	(-)
9	Arroz	Bacilos	(+)	Colonias transparentes, translúcidas y muy pequeñas.	(-)
10	Queso <i>Paipa</i>	Cocos	(+)	Colonias, blancas, translúcidas, pastosas y pequeñas.	(-)
11	Queso crema	Bacilos	(+)	Colonias blancas cremosas y grandes.	(-)
12	Harina de maíz	Bacilos	(+)	Colonias blancas, cremosas y pequeñas.	(-)
13	Tomate de árbol	Bacilos	(+)	Colonias beige, cremosas y muy pequeñas.	(-)
14	Galleta de <i>cuca</i>	Bacilos	(+)	Colonias blancas, translúcidas y muy pequeñas.	(+)
15	Almojábana	Bacilos	(+)	Colonias transparentes, cremosas y muy pequeñas.	(-)

16	Pera común	Bacilos	(+)	Colonias, blancas, traslúcidas, pastosas y pequeñas.	(-)
17	Manzana común	Bacilos	(+)	Colonias blancas, cremosas y muy pequeñas.	(-)
18	Sidra	Bacilos	(+)	Colonias blancas, cremosas y muy pequeñas.	(-)
19	Papa <i>criolla</i>	Bacilos	(+)	Colonias blancas, cremosas y muy pequeñas.	(-)
20	Guanábana	Levaduras	(+)	Colonias blancas, cremosas, muy grandes, con bordes dentados	(+)

A las 18 cepas seleccionadas, se les realizaron pruebas bioquímicas para establecer su identificación preliminar. Los resultados de la identificación a través de API (Biomereux®) se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. Resultados de la identificación bioquímica

No. de aislamiento	Fuente de aislamiento	Identificación bioquímica por API Biomereux®	% de confianza
7	Coliflor	<i>L. plantarum</i>	95,0%
11	Queso crema	<i>L. brevis</i>	96,5%
12	Harina de maíz	<i>L. delbrueckii</i>	97,3%
16	Pera	<i>L. brevis</i>	99,9%

Los resultados del perfil de fermentación de carbohidratos, permitieron la identificación de cuatro cepas: (1) la cepa No. 7 aislada de coliflor, fue identificada como *L. plantarum* con un porcentaje de confianza del 95,0%; (2) la cepa No. 11 aislada de queso crema, identificada como *L. brevis* con un porcentaje de confianza del 96,5%; (3) la cepa No. 12

aislada de harina de maíz, identificada como *L. delbrueckii* con un porcentaje de confianza del 97,3% y (4) la cepa No.16 aislada de pera, identificada como *L. brevis* con un porcentaje de confianza del 99,9%. Estos resultados se verificaron mediante ruebas moleculares.

6.1.1. Identificación Molecular

6.1.1.1. Diseño de Primers

Los fragmentos usados para la identificación y diferenciación entre especies fué de 420 pares de bases (bp). Los primers diseñados fueron de 17bp, anillando para las tres especies, así:

```

16s
CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment
brevis      GGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCAGAAGCAGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCT 60
plantarum   GGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCT 60
fermentum   GGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGACAACTTTGGAAACAGATGCT 60
delbrueckii GGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCCTTGGAAACAGGTGCT 60
*****. ** ** *****.:***. **** *. ** *****.***

brevis      AATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGTTGAAAGGTGGCTTCG-GCTATCA 119
plantarum   AATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCG-GCTATCA 119
fermentum   AATACCGCATAACAACGTTGTTGCGATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCA 120
delbrueckii AATACCGGATAACAACATGAATCGCATGATTCAGTTTGAAAGGCGGCGTAA-GCTGTCA 119
***** ***** :. : *****.: * ** .****. *** *. ***.***

brevis      CTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAGGCCACCACAGACGAT 179
plantarum   CTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAAT 179
fermentum   CTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGAT 180
delbrueckii CTTTAGGATGAGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGCCCTACCAGGCAAT 179
*** :*****. ** **** * ***** *.:*****.*****.*** *****.:**.*

brevis      GATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC 239
plantarum   GATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC 239
fermentum   GATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCAACT 240
delbrueckii GATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC 239
**.*.***** *****. *.*****.*****.*****.*****.*****

brevis      CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGC 299
plantarum   CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGC 299
fermentum   CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACAC 300
delbrueckii CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGC 299
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

brevis      CGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTG 359
plantarum   CGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTG 359
fermentum   CGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGATA 360
delbrueckii CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAG 359
*****.*****.*****.*****.*****.*****.:*****. :. :

brevis      AGAGTAACCTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG 420
plantarum   AGAGTAACCTGTTCAAGGATTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG 420
fermentum   AGAGTAACCTGTTCACTACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTACGGCTAACTACGTGCCAG 421
delbrueckii GCAGTAACCTGGTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTACGGCTAACTACGTGCCAG 420
. ***** **.: *****.:* ***** *****.*****.*****

```

Mediante el análisis bioinformático se encontraron las siguientes diferencias:

Diferencias entre las cuatro (4) especies = 78,0%
Diferencias entre *L. brevis* y *L. delbrueckii* = 15,0%
Diferencias entre *L. brevis* y *L. plantarum* = 9,0%
Diferencias entre *L. delbrueckii* y *L. plantarum* =15,0%
Diferencias entre *L. fermentum* y *L. plantarum* =13,0%
Diferencias entre *L. brevis* y *L. fermentum* =14,0%
Diferencias entre *L. delbrueckii* y *L. fermentum* =16,0%

Utilizando estas diferencias entre especies se realizó la identificación de las cepas. Varios artículos reportan el diseño de *primers* para la identificación de lactobacilos (Tilsala y Alatossava, 1997; Kwon *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2000), sin embargo, para este caso no se usó ninguno de estos *primers* porque no anillaban para las cuatro posibles especies.

6.1.1.2. Electroforesis

El resultado del corrido electroforético se presenta en la figura 18, donde se comprueba el tamaño del amplímero con el que se diseñaron los *primers* (400 y 500bp). Con esta prueba se comprobó la eficiencia de los *primers* y la calidad de las muestras para la siguiente fase de secuenciación.

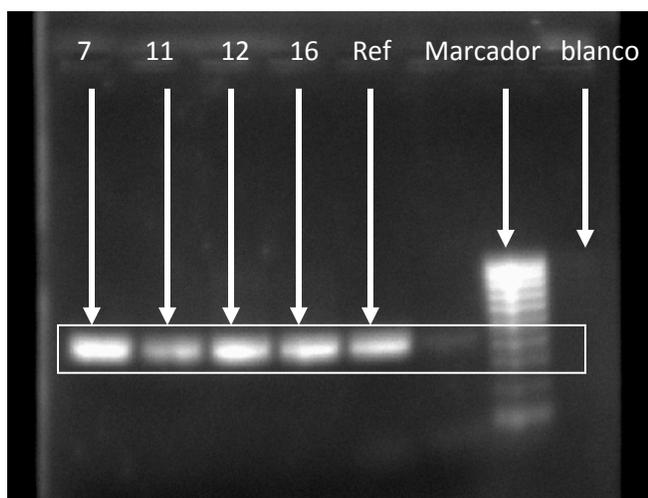


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 3% para fragmentos de DNA de las cepas en estudio. **Carril No.1:** Cepa No. 7 (*L. plantarum*). **Carril No.2:** Cepa No. 11 (*L. fermentum*). **Carril No.3:** Cepa No. 12 (*L. delbrueckii*). **Carril No.4:** Cepa No. 16 (*L. fermentum*). **Carril No.5:** *L. delbrueckii* ATCC 12315. **Carril No.6:** Marcador de peso molecular Hyperladder IV de Bioline® 100-1000pb. **Carril No.7:** Blanco.

6.1.1.3. Secuenciación

Después de analizar los resultados de secuenciación editados con el programa Clustal Wallis® (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.htmlref>) se estableció la identificación molecular para las cuatro cepas estudiadas:

Cepa No.7

Con la secuencia obtenida y analizada, se confirmó que la cepa No. 7 identificada mediante pruebas bioquímicas como *L. plantarum*, efectivamente correspondía a esta especie, con un nivel de confianza del 99,0%.

Cepa No.11

Los resultados obtenidos a partir del análisis bioinformático permitieron comprobar que la cepa No. 11", aislada de queso crema corresponde a *L. fermentum* con un porcentaje de confianza del 97,0%, resultado que no coincidió con las pruebas de identificación bioquímica que caracterizaron esta cepa como *L. brevis*.

Cepa No.12

La secuencia editada y analizada, permitió identificar esta cepa, aislada de harina de maíz fermentada, como *L. plantarum* con un nivel de confianza de 99,0%, resultado que coincidió con la identificación bioquímica realizada previamente.

Cepa No. 16

Al igual que lo ocurrido con la cepa No. 11, los resultados obtenidos a través de la secuenciación mostraron que esta cepa identificada inicialmente como *L. brevis* mediante pruebas bioquímicas, fue identificada molecularmente como *L. fermentum* con un porcentaje de confianza del 97,0%.

Los resultados obtenidos a partir de la identificación de las cepas aisladas de alimentos autóctonos coinciden con lo reportado por diferentes autores. En su artículo de revisión, Liu *et al.* (2011) publicaron un listado de las principales fuentes de aislamiento de BAL con potencial probiótico, entre las que se encontraban con mayor frecuencia los alimentos autóctonos fermentados. Así mismo, alimentos a base de carne, leche, frijol y soya, también fueron reportados como importante fuente de BAL. Entre las especies de *Lactobacillus* aisladas con mayor frecuencia de estos alimentos se encontraron: *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. lactis sp. lactis*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*.

Por otro lado, son muchos los estudios que demuestran las propiedades probióticas de las dos especies de lactobacilos aisladas en este proyecto (*L. plantarum* y *L. fermentum*). Muchos autores han comprobado el potencial probiótico a nivel *in vitro* de *L. plantarum*, Mathara *et al.* (2008); Maragkoudakis *et al.*, (2006); Prado *et al.* (2008); Gbassi *et al.* (2011); Brinques y Ayub (2011); Zago *et al.* (2011); Liu *et al.* (2011); Hwanhlem *et al.* (2009); Saxelin *et al.* (2005); Moussavi y Adams, (2010); Aysun y Güarakan (2003); Chung-Yi *et al.* (2010); Jin *et al.* (2001); y así mismo, para *L. fermentum*, se ha reportado el mismo potencial Klayraung *et al.* (2010); Yan *et al.* (2010); Ruiz *et al.* (2008); Mathara *et al.* (2008); Sumeri *et al.* (2010); Lin *et al.* (2007); Chung-Yi, *et al.* (2010); Jin *et al.* (2001). Estos estudios sugieren que las cepas aisladas de alimentos colombianos a

través de este trabajo, podrían tener un potencial probiótico importante, por lo que se realizaron pruebas in vitro para evaluar su desempeño.

6.2. EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO

6.2.1. Resistencia a pH ácido

Los resultados obtenidos mostraron diferencias en el comportamiento de las cepas estudiadas, evidenciando que el pH y el tiempo de incubación sobre medios ácidos influyeron en la viabilidad de las bacterias. Se observó que algunas fueron más resistentes y lograron sobrevivir en pH ácidos, mientras que otras no fueron capaces de adaptarse, disminuyendo su población significativamente. En la figura 19, Se presenta la viabilidad de las cepas estudiadas (las cuatro BAL aisladas y la cepa de referencia) a diferentes valores de pH. El análisis se realizó a través de cartas de control 3 sigma que permitieron establecer los límites críticos para determinar la resistencia de las cepas a pH ácido.

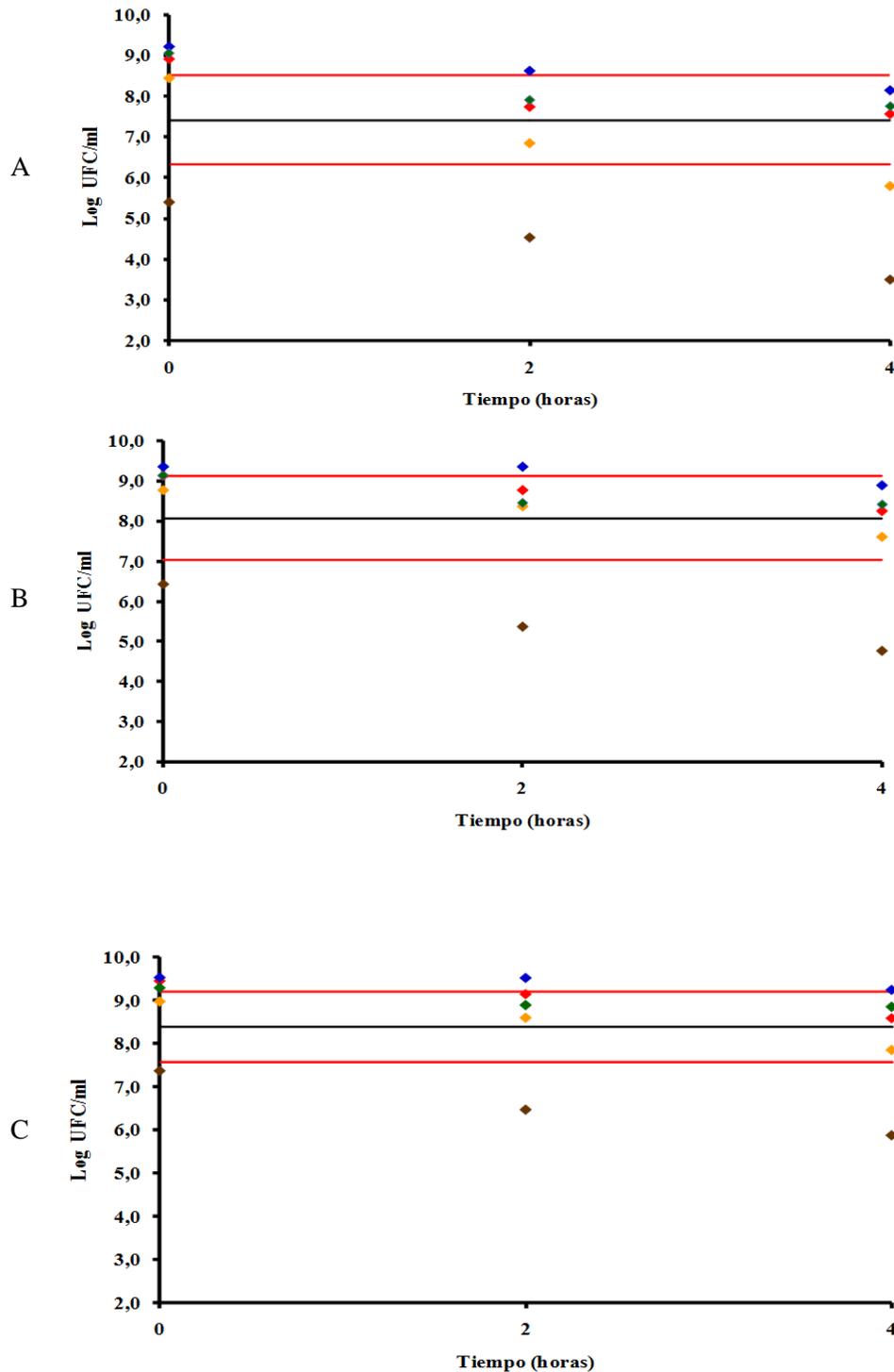


Figura 19. Cartas de control 3 sigma para evaluación de la viabilidad de las cepas bacterianas a pH ácido. A: pH 2,0. B: pH 2,5. C: pH 3,0. ♦: Cepa No. 7 (*L. plantarum*). ◆: Cepa No. 11 (*L. fermentum*). ◇: Cepa No. 12 (*L. plantarum*). ◆: Cepa No.16 (*L. fermentum*). ◆: *L. acidophilus* ATCC 4356. Ls: Límite superior. Li: Límite inferior. x: Promedio.

En las cartas de control 3 sigma, los límites críticos calculados fueron: para el pH 2,0 el límite superior fue 8,51, el inferior 6,32 y la media 7,41; para el pH 2,5 el límite superior fue 9,11, el inferior 7,03 y la media 8,07; para el pH 3,0 el límite superior fue 9,19, el inferior 7,58 y la media 8,38.

En la Figura 19A se muestra el comportamiento de las BAL después de dos y cuatro horas de incubación en el medio ajustado a pH 2,0. Las cepas que mostraron mayor resistencia por su viabilidad en un tiempo de cuatro horas sin disminuir su población significativamente fueron la cepa No. 7 (*L. plantarum*), la No. 12 (*L. plantarum*) y la No. 16 (*L. fermentum*). Mientras que la cepa No. 11 (*L. fermentum*) solo se mantuvo en altas concentraciones luego de dos horas de exposición a pH 2,0, pues fue evidente que luego de cuatro horas, su población celular disminuyó significativamente casi 4,0 ciclos logarítmicos. Por otro lado, diferente a lo que se esperaba, la cepa de referencia (*L. acidophilus* ATCC 4356) no soportó las condiciones de acidez del medio y desde el tiempo cero de incubación comenzó a disminuir significativamente su concentración, por fuera de los límites de resistencia sugeridos en la literatura.

Los ensayos realizados a pH 2,5 (Figura 19B), mostraron una tendencia muy similar en el comportamiento bacteriano descrito para el pH 2,0. En este caso, las cuatro cepas de interés (7, 11, 12 y 16) se mantuvieron dentro de los límites de resistencia establecidos, destacándose el comportamiento de la cepa No. 12 (*L. plantarum*) que no se afectó en gran medida por la acidez del medio. La cepa referencia al igual que en el caso anterior fue la más sensible a la acidez y estuvo también por fuera de los límites de resistencia establecidos. Resultados casi iguales se obtuvieron a partir de los ensayos realizados a pH 3,0 (Figura 19 C).

Por otro lado, los resultados obtenidos del ensayo realizado a 24 horas (Figura 20) confirmaron los hallazgos encontrados en los ensayos anteriores. El perfil de resistencia a diferentes valores de pH (6,5; 4,0; 5,0; 3,0; 2,5 y 2,0) evidenció que las cepas más sensibles al medio ácido fueron la de referencia (*L. acidophilus* ATCC 4356) y la cepa No.11 (*L. fermentum*), mientras que las otras tres cepas se mantuvieron viables a concentraciones por encima de 6,0 ciclos log luego de 24 horas a pH 2,0.

Figura 20. Resistencia de las BAL en estudio a diferentes valores de pH después de 24 horas. : **Cepa No. 7 (*L. plantarum*).** : **Cepa No. 11 (*L. fermentum*).** **Cepa No. 12 (*L. delbruekii*)** : **Cepa No.16 (*L. fermentum*).** : ***L. acidophilus* ATCC 4356.**

Estos resultados sugieren que estas tres cepas podrían tolerar adecuadamente las condiciones de pH ácido del estómago, y que sus poblaciones celulares podrían mantenerse viables y en altas concentraciones al llegar a nivel intestinal donde efectuarían su función biológica.

Tabla 20. Resultados con porcentaje de resistencia de las cepas a pH de 2

A
l

a
p
l
i
c
a

Los resultados obtenidos (Tabla 20) en cuanto a la resistencia a pH ácido de las especies identificadas como *L. plantarum*, son acordes a investigaciones realizadas por autores como Zago *et al.* (2011), Martín *et al.* (2009), Charteris *et al.* (1998), Brinques y Ayub

(2011) y Hwanhlem *et al.* (2009), quienes evaluaron la resistencia de la BAL en medios con valores de pH entre 2,0 y 2,5 y observaron que la mayoría de las cepas estudiadas presentaron una resistencia por encima del 60,0%. Autores como Klayraung *et al.* (2010), Mathara *et al.* (2008), Ruiz *et al.* (2008), Yan *et al.*, (2010), Lin *et al.* (2007) y Charteris *et al.* (1998), evaluaron la resistencia de diferentes cepas de *L. fermentum* a medios con valores de pH entre 2,0 y 2,5. Aunque no se reportan porcentajes de resistencia como tal, sí encontraron una alta viabilidad de las cepas a estas condiciones de acidez. Sin embargo, en muchos casos, también se encontró que dicha resistencia fue menor a la encontrada en cepas de *L. plantarum*, como lo ocurrido en este trabajo.

6.2.2. Sensibilidad a antibióticos

Los resultados de los antibiogramas mostraron el nivel de sensibilidad y la resistencia de las cepas a los 23 antibióticos de uso común evaluados (Tabla 21) y el porcentaje total de sensibilidad se presenta en la Figura 21.

Tabla 21. Resultados de antibiogramas

Antibiótico	Cepa No. 7 (<i>L. plantarum</i>)		Cepa No. 11 (<i>L. fermentum</i>)		Cepa No. 12 (<i>L. plantarum</i>)		Cepa No. 16 (<i>L. fermentum</i>)		<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	
	CMI µg/mL	=	CMI µg/mL	=	CMI µg/mL	=	CMI µg/mL	=	CMI µg/mL	=
Amox/ A clavulónico	≤4/2	S	≤4/2	S	≤4/2	S	≤4/2	S	≤4/2	S
Amp/ subctam	≤8/4	S	≤8/4	S	≤8/4	S	≤8/4	S	≤8/4	S
Ampicilina	≤2,0	BLAC	≤2,0	N/R	≤2,0	N/R	≤2,0	N/R	≤2,0	N/R
Cafazolina	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S
Ceftriaxona	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S
Clindamicina	2,0	I	2,0	I	4,0	R	≤0,5	R	≤0,5	S
Cloramfenicol	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S	≤8,0	S
Daptomicina	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S
Eritromicina	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S
Gentamicina	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S
Imipenem	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S
Levofloxacin	≤2,0	S	≤2,0	S	≤2,0	S	≤2,0	S	≤2,0	S
Linezolid	2,0	S	2,0	S	≤1,0	S	2,0	S	≤1,0	S
Meropenem	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S
Moxifloxacin	≤2,0	S	≤2,0	S	≤2,0	S	≤2,0	S	≤2,0	S
Oxacilina	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S	≤0,25	S
Penicilina	0,25	BLAC	≤0,03	S	0,12	S	0,12	S	≤0,03	S
Rifampicina	≤1,0	S	≤1,0	S	≤1,0	S	≤1,0	S	≤1,0	S
Synercid	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S	≤0,5	S
Tetraciclina	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S	≤4,0	S
Trimet/ sulfa	≤2/38	R	≤2/38	R	≤2/38	S	≤2/38	R	≤0,5/9,5	TFG
Vancomicina	0,5	S	0,5	S	0,5	S	1,0	S	≤0,25	S

CMI: Concentración mínima inhibitoria, =: resultado, S: sensible, I: intermedio, R: resistente, N/R: no informado, TFG: cepa timidin dependiente, BLAC: betalactamasa positivo.

La cepa No. 7 (*L. plantarum*) presentó sensibilidad al 78,0% de los antibióticos y al único antibiótico que mostró resistencia fue al trimetropin sulfa. Sin embargo, los resultados mostraron que esta cepa es betalactamasa positiva para la ampicilina y la penicilina, lo que indica que es resistente al producir enzimas que causan hidrólisis a la porción del anillo betalactámico presente en estos antibióticos, evitando así que el antibiótico actúe sobre su pared celular. Esta resistencia a la ampicilina y penicilina, es comúnmente encontrada dentro del género de *Lactobacillus* (Klayraung *et al.* 2010).

Los resultados para la cepa No. 11 (*L. fermentum*) mostraron una sensibilidad al 83,0% de los antibióticos, presentando resistencia al trimetropin sulfa, al igual que la cepa No. 16 (*L. fermentum*). Mientras que la cepa No.12 (*L. plantarum*) y la cepa de referencia, presentaron una sensibilidad al 87,0% del total de los antibióticos. El trimetropin, antibiótico que presentó una resistencia común entre diferentes cepas, ejerce efecto inhibitorio en la síntesis del ácido fólico, que es necesario, para la síntesis de purinas, esenciales para el ácido nucleico bacteriano (Klayraung *et al.* 2010). Al tener esta resistencia, las bacterias impiden que dicho antibiótico ejerza algún efecto sobre su membrana. Como este medicamento es comúnmente usado para el manejo de infecciones gastrointestinales, podría ser necesario revisar el perfil de transferencia de genes de resistencia de las cepas, ya que, las BAL presentan una predisposición y en algún momento se puede transferir esta resistencia a las bacterias que hacen parte de la microbiota intestinal.

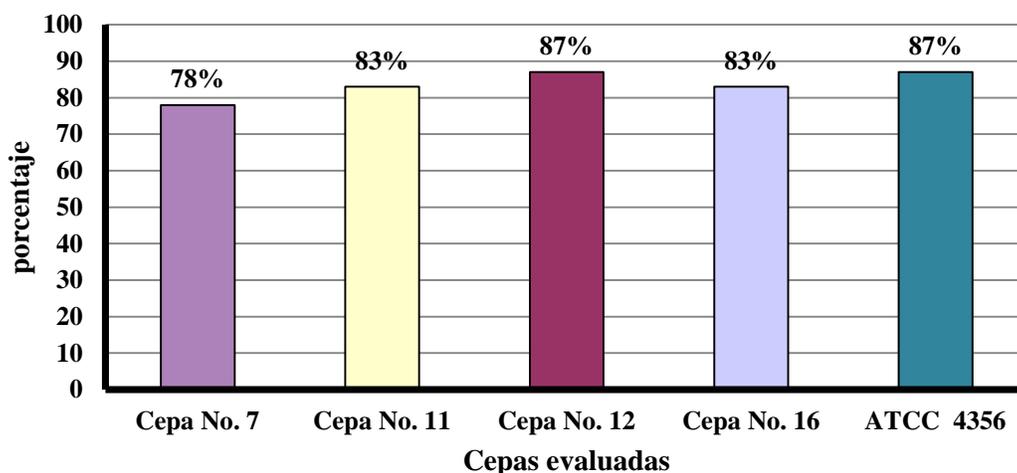


Figura 21. Porcentaje de sensibilidad a los antibióticos por parte de las BAL. ■: Cepa No. 7 (*L. plantarum*). □: Cepa No. 11 (*L. fermentum*). ■: Cepa No. 12 (*L. delbruekii*). □: Cepa No.16 (*L. fermentum*). ■: *L. acidophilus* ATCC 4356.

En cuanto a los resultados obtenidos, autores como Brinques y Ayub (2011) y Zago *et al.* (2011), han reportado alta sensibilidad de cepas de *L. plantarum* frente a diferentes tipos

de antibióticos y han comprobado su calificación como GRAS (Generally Regarded as Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety) que garantiza su inocuidad y seguridad en alimentos. En otro estudio, Klayraung *et al.* (2010) evaluaron las propiedades probióticas de diferentes lactobacilos; Los resultados mostraron que las diferencias observadas a nivel del grado de susceptibilidad y/o resistencia de cepas de la misma especie, pueden deberse principalmente a la naturaleza de las fuentes de aislamiento de las cepas. Se ha encontrado que las bacterias aisladas de muestras clínicas presentan mayor nivel de resistencia a los antibióticos que las aisladas de alimentos.

En general, los resultados obtenidos indican que las cinco bacterias evaluadas presentaron un alto porcentaje de sensibilidad antibiótica (Figura 21), lo que resulta positivo para este estudio, ya que de acuerdo con la FAO-OMS (2002), las cepas con potencial probiótico no deben tener una resistencia antibiótica significativa para evitar que dicha resistencia se transmita a bacterias patógenas por medio de plásmidos y/o transposones. Se ha establecido, que aunque las cepas utilizadas como probióticos no presenten patogenicidad, es necesario que no contengan genes de resistencia antibiótica, sobretodo porque la transferencia horizontal de genes a través de plásmidos y/o transposones, podría afectar también a los miembros menos inocuos de la microbiota intestinal, lo que evidentemente causaría disbiosis, favoreciendo las infecciones oportunistas.

6.2.3. Actividad antimicrobiana

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas presentaron actividad antimicrobiana frente a los patógenos evaluados (Tabla 22). La cepa No. 7 (*L. plantarum*) fue la que presentó mayor actividad antagónica generando halos de inhibición de mayor diámetro (>6,0mm), seguida por las cepas No. 12 (*L. plantarum*), 16 (*L. fermentum*) y 11 (*L. fermentum*); que también inhibieron el crecimiento de las seis cepas patógenas retadas. Por otro lado, aunque la cepa de referencia (*L. acidophilus* ATCC 4356) también inhibió a las seis cepas patógenas, los halos que se generaron fueron de un diámetro menor a lo presentado por el resto de las cepas.

Tabla 22. Resultados de la actividad antimicrobiana

Cepas patógenas	Cepa No. 7 (<i>L. plantarum</i>)	Cepa No. 11 (<i>L. fermentum</i>)	Cepa No. 12 (<i>L. plantarum</i>)	Cepa No. 16 (<i>L. fermentum</i>)	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	+	+	+	++
<i>Listeria innocua</i>	+++	+++	++	++	++
<i>Salmonella enteritidis</i>	+++	++	++	+++	++
<i>Escherichia coli</i>	+++	+	+++	+++	+
<i>Shigella sonnei</i>	+++	++	+++	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+++	++	++	++

Diámetro de halos: +: <3,0mm; ++: 3,0-6,0mm; +++: >6,0mm

En la Figura 22, se presenta una fotografía de los ensayos de actividad antimicrobiana donde se observan algunos de los halos de inhibición que se generaron al retar los sobrenadantes de las BAL frente a *Shigella sonnei*.

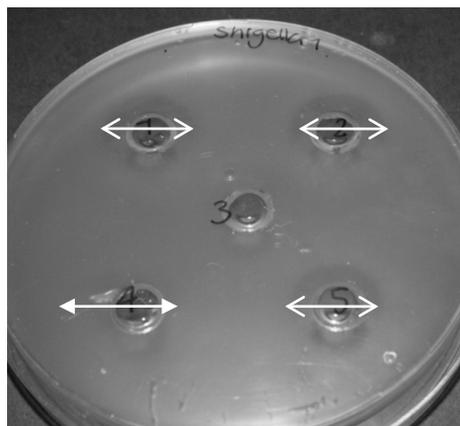


Figura 22. Fotografía de ensayos de actividad antimicrobiana mediante técnica de difusión en placa.

Estos resultados sugieren que todas las cepas evaluadas, en especial, las No. 7,12 y 16, pueden inhibir efectivamente el crecimiento de diferentes tipos de patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos, lo cual es importante por el efecto que estas cepas BAL

podrían tener a nivel del tracto gastrointestinal, evitando la colonización de patógenos y participando en los procesos de defensa del organismo.

Uno de los factores que podría estar involucrado en la actividad antagonica observada de las BAL, podría ser la producción de sustancias tipo bacteriocinas. Las bacteriocinas, que son péptidos de síntesis ribosomal con actividad antimicrobiana, son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Monroy *et al.* 2009). En el caso de *L. plantarum*, se ha reportado que esta especie produce plantaricina teniendo un gran espectro de inhibición frente a otros microorganismos. Su mecanismo de acción consiste básicamente en la unión del péptido a la membrana bacteriana por atracción electrostática, y posteriormente se da una inserción a la bicapa lipídica formando poros y permeabilizando la membrana. Debido a esto, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales, generándose también en muchos casos una inhibición de la biosíntesis del ADN, lo que finalmente conlleva a la muerte celular (Wohlgemuth *et al.*, 2010; Monroy *et al.*, 2009).

A nivel biológico, además de la producción de bacteriocinas, la exclusión competitiva y la disminución del pH, podrían también estar involucradas en los procesos de antagonismo. Dentro del metabolismo de las bacterias ácido lácticas (BAL), la producción de ácido láctico y ácidos orgánicos que disminuyen el pH del medio, tienen también un efecto importante para inhibir el crecimiento de bacterias sensibles a la acidez, y a su vez pueden generar el permeado de la membrana de algunas bacterias Gram negativas (Wohlgemuth *et al.*, 2010).

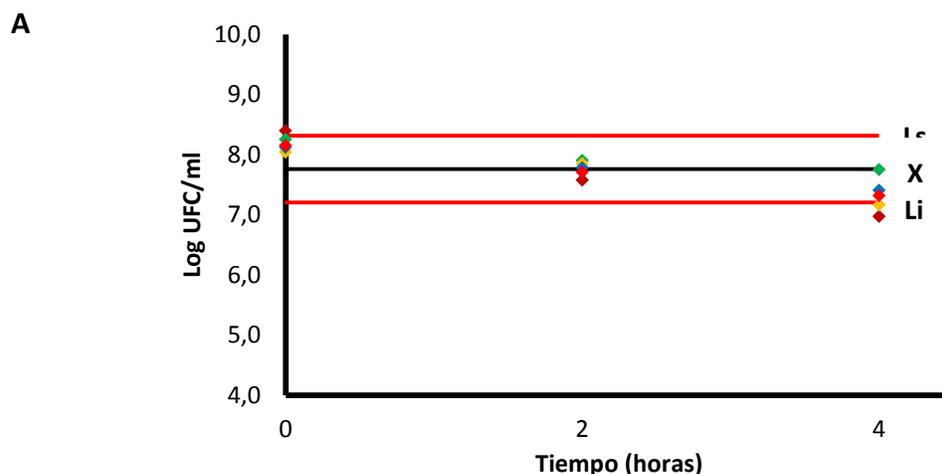
Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo encontrado por autores como Yan *et al.* (2010), Klayraung *et al.* (2010), Lin *et al.* (2007), Martín *et al.* (2009) y Annuk *et al.*, (2003), quienes reportan que bacterias como *L. fermentum* y *L. plantarum* poseen una actividad antagonica significativa frente a patógenos de importancia clínica, con amplios espectros de inhibición que incluyen tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas. Sin embargo, aunque la mayoría de autores reportan que el nivel de inhibición es mayor contra bacterias Gram positivas, que contra las Gram negativas, debido a las diferencias en su pared celular. En este caso, a nivel general, no se observaron diferencias marcadas entre estos dos tipos de bacterias, encontrándose además, que el menor nivel de inhibición fue para *Listeria monocytogenes*, contrario a lo comunmente publicado. Para este caso, es importante destacar el efecto inhibitorio de las BAL sobre bacterias Gram negativas patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella sonnei*, ya que estas bacterias han sido asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos y generan cuadros de gastroenteritis, deshidratación aguda y en algunos casos la muerte (Yingchun *et al.*, 2011).

Estos resultados sugieren que las cepas evaluadas podrían ser efectivas en procesos de biopreservación a nivel de industria de alimentos y podrían también utilizarse para el

control de patógenos a nivel del tracto gastrointestinal. Sin embargo, hacen falta otro tipo de pruebas para garantizar la seguridad de estas cepas para consumo humano.

6.2.4. Resistencia a sales biliares

Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de las sales evaluadas afectaron significativamente la capacidad de supervivencia de las BAL y que a mayor concentración de sal, la resistencia de las cepas fue menor. En la Figura 23 se presentan los resultados obtenidos a través de cartas de control 3 sigma, donde también, se pudo observar que a mayor tiempo de incubación bajo condiciones adversas, la resistencia de las cepas fue menor y por eso disminuyeron su concentración celular significativamente; después de cuatro horas de incubación. En la Figura 23A, se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad de las cepas a una concentración de sales biliares del 1,0%. Para este caso, los límites críticos calculados fueron: 8,31 Log UFC/mL para el límite superior y 7,20 Log UFC/mL para el límite inferior, con una media de 7,76 Log UFC/mL. En la gráfica se observa que la cepa con el mejor comportamiento, al disminuir su población celular en menor proporción y moverse dentro del límite superior y la media, fue la No.7 (*L. plantarum*), que luego de 4 horas disminuyó concentración en menos de un ciclo logarítmico. Las cepas No.12 (*L. plantarum*) y No.16 (*L. fermentum*) estuvieron dentro de los límites críticos establecidos pero con concentraciones un poco más bajas que la cepa No. 7, ya que después de las cuatro horas de incubación disminuyeron su concentración 1,12 y 1,20 Log UFC/mL respectivamente. Luego de dos horas de incubación, las cepas No.11 (*L. fermentum*) y referencia (*L. acidophilus*) se mantuvieron con una población celular dentro de los límites críticos, pero al cabo de las 4 horas quedaron por debajo del límite inferior con reducciones totales en su concentración celular de 1,35 y 1,42 ciclos logarítmicos respectivamente.



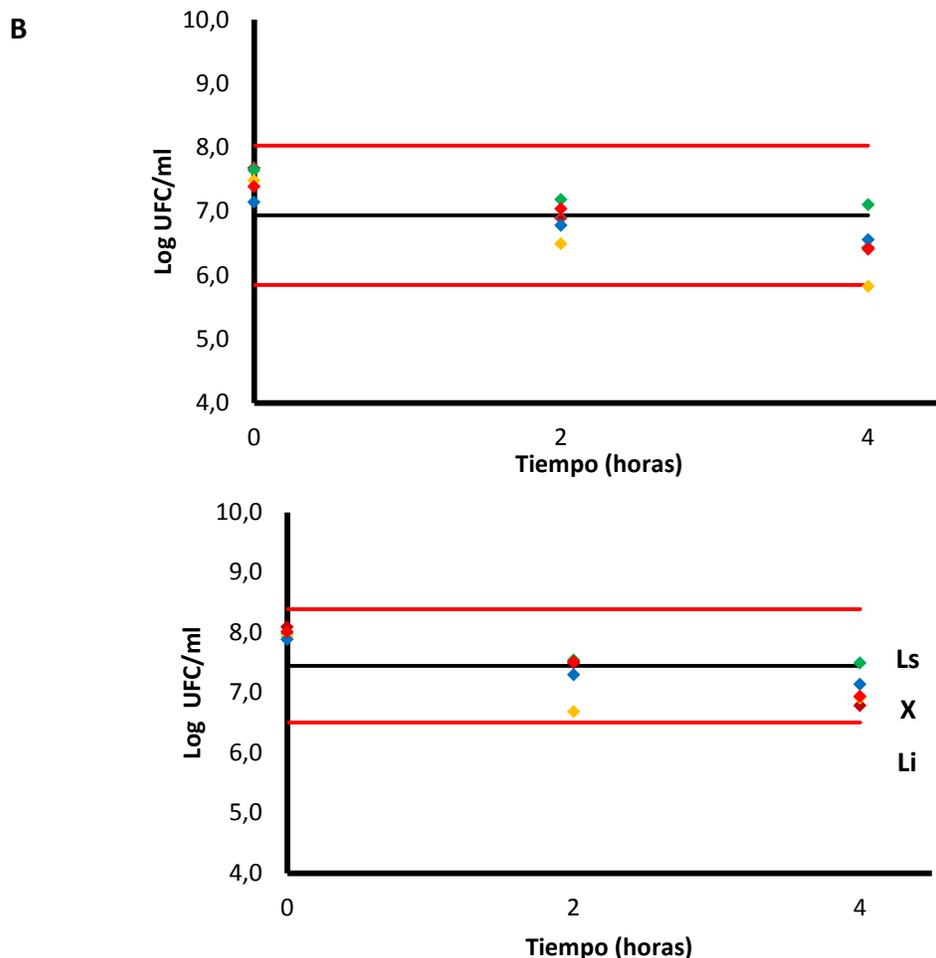


Figura 23. Cartas de control 3 sigma para evaluación de la viabilidad de las cepas bacterianas en sales biliares. A: 1,0%. B: 1,5% C: 2,0% . **♦: Ceba No. 7 (*L. plantarum*).** **♦: Ceba No. 11 (*L. fermentum*).** **♦: Ceba No. 12 (*L. plantarum*)** **♦: Ceba No.16 (*L. fermentum*).** **♦: *L. acidophilus* ATCC 4356.** Ls: Límite superior. Li: Límite inferior. x: Promedio.

Por otro lado, para la evaluar la viabilidad de las cepas a concentración de sales biliares de 1,5% se establecieron los siguientes límites críticos: el límite superior fue 8,38 Log UFC/mL, el inferior fue de 6,50 Log UFC/mL y la media fue de 7,44 Log UFC/mL (Figura 23B). Se observó que en este caso todas las cepas se mantuvieron dentro de los rangos establecidos, tanto a las dos, como a las cuatro horas de incubación, siendo nuevamente la cepa No. 7 la que presentó mayor resistencia a las sales biliares con reducciones totales de solo 0,61 ciclos logarítmicos en su concentración celular. A esta concentración de sales la cepa No. 11 fue la que presentó mayor sensibilidad, con reducciones finales de casi dos ciclos logarítmicos.

En el otro ensayo, cuando se evaluó la resistencia de las BAL a concentraciones del 2,0% de sales biliares, todas las cepas se mantuvieron dentro de los límites críticos establecidos, que para este caso fueron los siguientes: 8,02 Log UFC/mL para el límite

superior; 5,84 para el inferior con una media de 6,93 Log UFC/mL (Figura 23C). En la gráfica se presenta el comportamiento de las cepas al ser sometidas a una concentración alta de sales, simulando el peor escenario o condiciones fisiológicas normales que podrían presentarse a nivel in vivo. En este caso también se observó que la cepa con mayor capacidad de adaptación y resistencia a las sales biliares fue la cepa No.7, seguida esta vez por la No.12, la No.16, la de referencia y la No.11. Como era de esperarse, a esta concentración se produjeron las mayores reducciones en la concentración celular, pero en ninguno de los casos dichas reducciones estuvieron por encima de los dos ciclos logarítmicos.

Utilizando la fórmula reportada por Yan *et al.* (2010), se halló el porcentaje de resistencia de las cepas a la concentración de sales biliares más alta, que en este caso fue la del 2,0%. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 23 .

Tabla 23. Porcentaje de resistencia de las cepas a una concentración sales biliares al 2,0%

Cepas	% de resistencia al 2,0% de sales biliares por 4 horas
Cepa No. 7 (<i>L. plantarum</i>)	86,0 %
Cepa No. 11 (<i>L. fermentum</i>)	72,0 %
Cepa No. 12 (<i>L. plantarum</i>)	81,0 %
Cepa No. 16 (<i>L. fermentum</i>)	79,0 %
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	77,0 %

Los resultados mostraron que tanto las cuatro BAL estudiadas, como la cepa de referencia, presentaron porcentajes de resistencia altos, por encima del 70,0%. Como se había indicado anteriormente, la cepa No. 7 fue la más resistente de todas con un porcentaje del 86%, seguida por la No. 12 con un 81,0%. Ambas cepas pertenecen a la misma especie y posiblemente esta podría ser una razón para que mantengan patrones de comportamiento similares. Por otro lado, la cepa No. 16 y la cepa de referencia, tuvieron porcentajes de resistencia cercanos a las anteriores, del 79,0% y del 77,0% respectivamente. Mientras que la cepa No. 11, fue la que presentó un porcentaje menor de resistencia (72,0%).

Autores como Klayraung *et al.* (2010), Lin *et al.* (2007), Rondón *et al.* (2008) y Yan *et al.* (2010), también reportaron una alta resistencia a las sales biliares en especies de *L. fermentum* aisladas de comida tradicional Thai, carne de cerdo y pollo, tracto gastrointestinal de pollos y lácteos tradicionales. Para la especie de *L. plantarum* autores como Zago *et al.* (2011), Aysun y Güarakan (2003), Chung-Yi *et al.* (2010), Jin *et al.* (2001) y Hwanhlem *et al.* (2009), han reportado una resistencia por encima del 50% a altas concentraciones de sal, siendo las cepas aisladas de heces de niños sanos, más resistentes que las aisladas de vegetales fermentados, quesos artesanales y comida tradicional China, por lo que la fuente de aislamiento podría jugar un papel importante en el perfil de resistencia de las cepas.

Los resultados obtenidos sugieren que todas las cepas estudiadas presentaron un alto porcentaje de adaptabilidad y resistencia a altas concentraciones de sales biliares, lo que podría significar un alto potencial de tolerancia a las condiciones fisiológicas del intestino delgado, lo que favorecería su viabilidad a nivel del tracto gastrointestinal como lo plantea en sus lineamientos la FAO- OMS (2002). Adicionalmente, la alta resistencia presentada por las BAL a las sales biliares, sugiere que podrían ser capaces de desconjugar este tipo de sustancias y que podrían tener potencial en los procesos de regulación del colesterol como lo reportan Ooi y Liong (2010); sin embargo, hacen falta más estudios para comprobar este tipo de propiedades en las cepas.

6.2.5. Adhesión a células de la mucosa intestinal

En los ensayos realizados para evaluar la capacidad de adhesión de las cepas aisladas, frente a células de la mucosa intestinal humana, se comprobó inicialmente la calidad de los controles negativos y positivos utilizados para desarrollar la prueba. En la figura 24, se presentan varias microfotografías obtenidas a partir de muestras correspondientes al control negativo. El control negativo utilizado fue la lámina con células de mucosa intestinal humana (*Mucin Tissue-Trol SIGMA-ALDRICH*), teñida con cristal violeta de acuerdo con el protocolo planteado en materiales y métodos, y sin adición de ningún tipo de cultivo. En las fotos se pudo identificar el tejido de mucina adherido a la lámina, en donde no se observaron microorganismos adheridos y solamente se apreciaron las estructuras celulares que conforman dicho tejido. Con estas características se comprobó la pureza de las láminas y la calidad de los controles negativos.

Por otro lado, también se verificó la calidad de los controles positivos utilizados, en los que células de *E. coli* y *Salmoenella* ssp., aisladas de muestras clínicas, sirvieron para comprobar la efectividad de la técnica utilizada para evaluar la capacidad de adhesión de las bacterias. En la Figura 25 se presentan varias microfotografías obtenidas a partir de las muestras de las láminas de tejido, con adición independiente de las dos cepas patógenas, reconocidas por su capacidad de colonización y adherencia a la mucosa intestinal en procesos infecciosos.

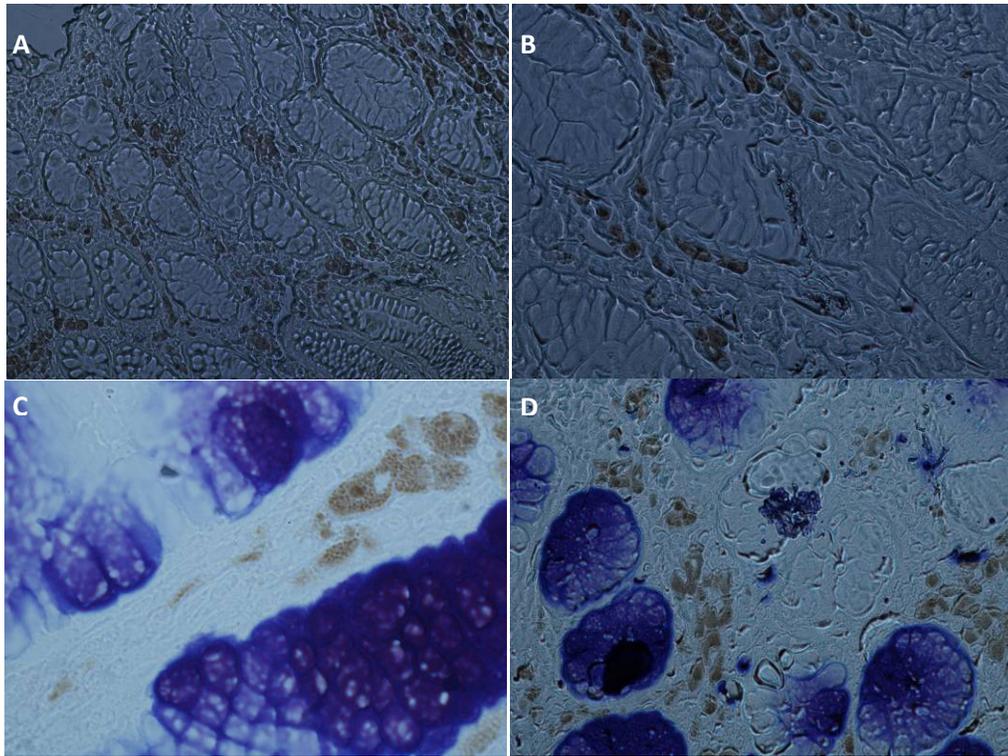


Figura 24. Microfotografía control negativo en ensato de adhesión celular.
 A: **Microfotografía 40x.** Control negativo. B: **Microfotografía 100x.** Control negativo.
 C: **Microfotografía 20x.** Control negativo. D: **Microfotografía 40x.** Control negativo.

En la Figura 25 A y 25B se observa el tejido intestinal humano con presencia de células de *Salmonella* spp. que lograron adherirse a este tejido después de aplicar el protocolo planteado. Las fofografías muestran dos campos de observación microscópica diferentes, en los que se puede observar una alta concentración de bacterias en la muestra.

En las Figuras 25C y 25D se presenta las microfotografías obtenidas de las muestras del tejido intestinal humano con adición de células de *E. coli*, en las que se muestran dos campos de observación diferentes. En este caso también se comprobó la capacidad del patógeno para adherirse a la lámina con el tejido intestinal, y fue evidente también que en este caso, se presentó un nivel de adhesión un poco menor al presentado por las células de *Salmonella* ssp.

Con estos resultados se comprobó que el protocolo propuesto fue efectivo para evaluar la capacidad de adhesión de células bacterianas a tejido de la mucosa intestinal humana. Adicionalmente, el patrón observado en los controles positivos sirvió de base para comparar los resultados obtenidos con las muestras de las cepas BAL estudiadas.

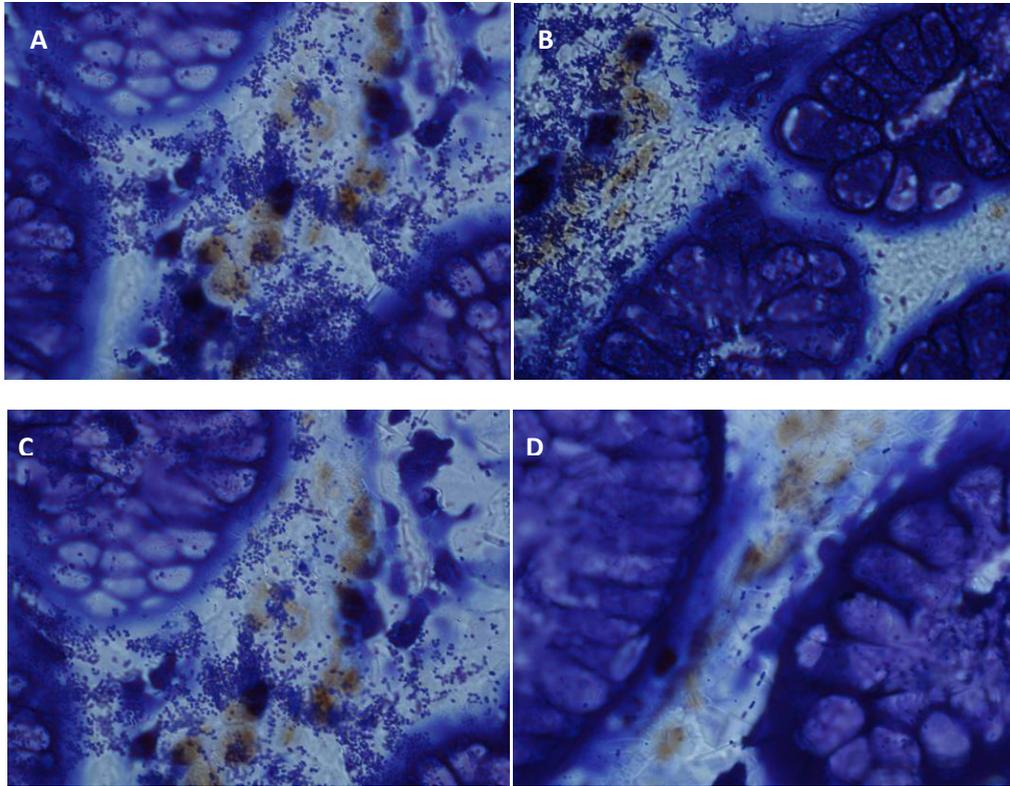


Figura 25. Microfotografía control positivo en ensayo de adhesión celular.
A) y B) Microfotografías (100x) de células de mucosa intestinal (*Mucin Tissue-Trol SIGMA-ALDRICH*) más adición de células de *Salmonella* spp. **C) y D)** Microfotografías (100x) de células de mucosa intestinal (*Mucin Tissue-Trol SIGMA-ALDRICH*) más adición de células de *E. coli*.

Los resultados de las pruebas de adhesión para las cuatro cepas BAL de interés, así como para la cepa de referencia, se presentan en la Figura 26. En las microfotografías (100x) se pudo observar que la cepa No.7 (*L. plantarum*) y la cepa No.12 (*L. plantarum*) presentaron un nivel de adhesión alto, similar a lo observado en los controles positivos. En las fotografías se ve claramente el gran número de células bacterianas adheridas al tejido intestinal (Figuras 26A y 26C), lo cual difiere con lo ocurrido en los otros tres casos.

Los ensayos realizados con la cepa No. 16 (*L. fermentum*), mostraron también capacidad de adhesión de la cepa, pero en menor proporción que lo observado con las cepas de *L. plantarum*. En la Figura 26D se observa la presencia de algunas células bacterianas adheridas al tejido intestinal, pero si ésta se compara con las fotografías de controles positivos (Figura 25), es evidente que esta cepa de *L. fermentum* no tuvo el mismo nivel

de adhesión. Por otro lado, tanto la cepa No. 11 (*L. fermentum*), como la cepa de referencia (*L. acidophilus* ATCC 4356), no presentaron ningún tipo de adhesión ya que en las láminas no se encontraron células bacterianas (Figuras 26B y 26E) y por el contrario, se observó un resultado muy similar al de los controles negativos (Figura 24).

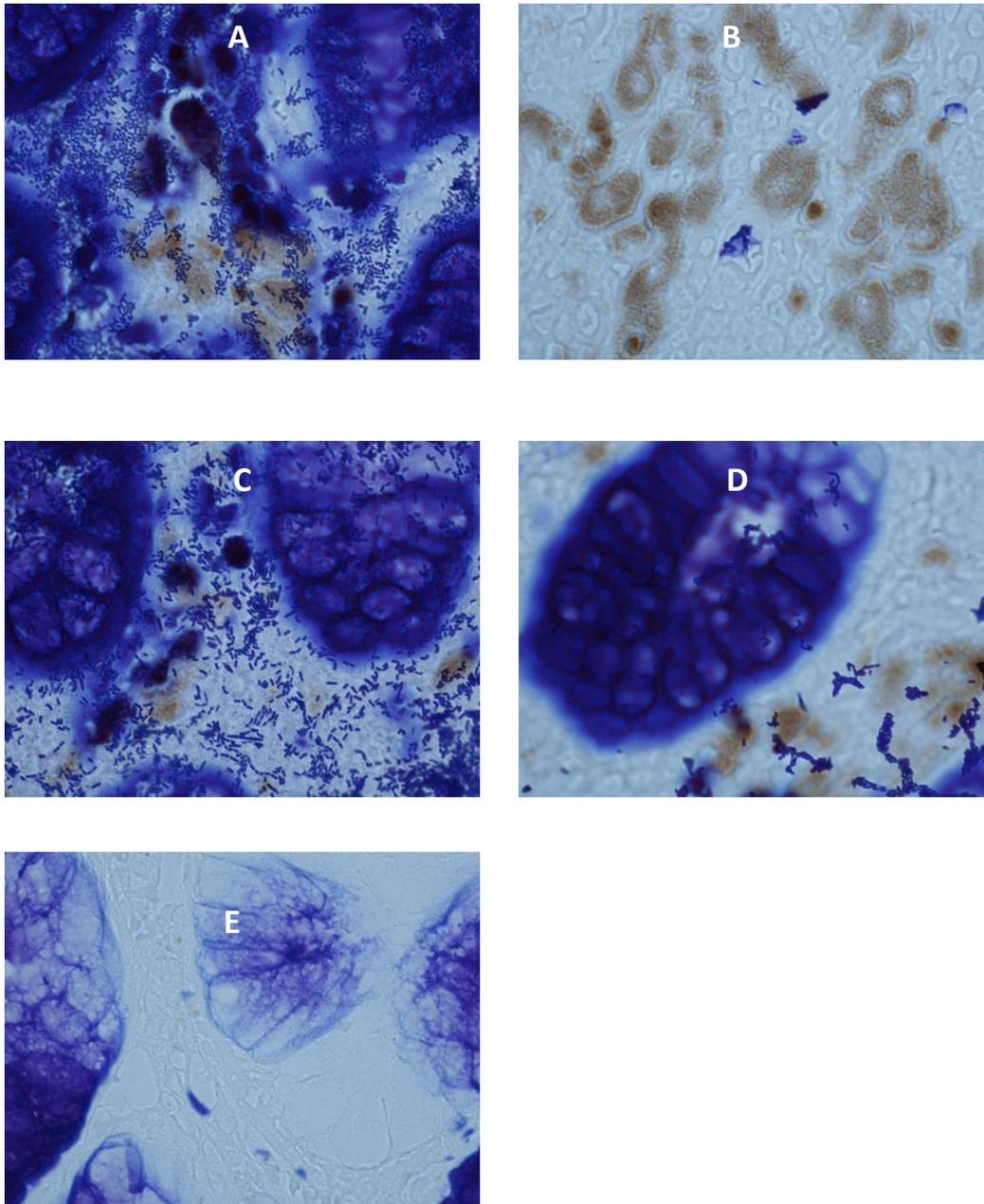


Figura 26. Microfotografía bacterias ácido lácticas en ensayo de adhesión celular. Microfotografías (100x) de células de mucosa intestinal (*Mucin Tissue-Trol SIGMA-ALDRICH*) con adición de células bacterianas de: **A)** cepa No.7 (*L. plantarum*). **B)** cepa No. 11 (*L. fermentum*). **C)** cepa No. 12 (*L. plantarum*). **D)** cepa No. 16 (*L. fermentum*). **E)** cepa de referencia (*L. acidophilus* ATCC 4356).

Según Lin *et al.*, (2007), dentro del tracto gastrointestinal de humanos y animales, una de las especies comúnmente encontrada es *L. fermentum*. En una investigación publicada por estos mismos autores, se evaluó la capacidad de adhesión de varias cepas de *L. fermentum* aisladas de carne de cerdo y de pollo. Las pruebas que se realizaron sobre tejido gastrointestinal de animales, mostraron que esta especie presentó una buena capacidad de adherencia, pero al mismo tiempo revelaron diferencias significativas entre el nivel de adhesión de cepas de la misma especie pero aisladas de diferente fuente. Aunque en este trabajo no se realizó una cuantificación de la adhesión presentada, sí fueron evidentes las diferencias presentadas entre las cepas de *L. fermentum*, ya que la cepa No. 16 presentó un nivel de adhesión medio (comparado con los controles positivos) y la cepa No. 11 no presentó ningún tipo de adhesión con el protocolo aplicado.

En otro estudio, Jin *et al.* (2001), encontraron cepas de *L. fermentum* y *L. plantarum* (aisladas de heces de niños sanos y de lechugas fermentadas) con alta capacidad de adhesión a células de la mucosa intestinal animal. Estos resultados fueron comparados con la capacidad de adhesión de una cepa de referencia (*L. plantarum* L2209v) y encontraron niveles de adhesión muy similares entre todas las cepas. Estos hallazgos difieren con lo observado en los ensayos realizados en este proyecto, ya que la cepa de referencia (aislada de muestras clínicas), no presentó ningún tipo de adhesión, contrario a lo que se esperaba.

La capacidad de adhesión es uno de los parámetros más importantes ya que es el punto final al que llegan las bacterias después de sobrevivir y tolerar a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal, por lo que, en el intestino se deben efectuar los procesos de colonización, exclusión competitiva y aumento de la población bacteriana para ejercer un efecto benéfico (Jin *et al.*, 2001; Samot *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la capacidad de adhesión de una cepa no es determinante para medir su potencial probiótico ya que dentro de la microbiota intestinal existen consorcios de bacterias que ejercen actividades de defensa relevantes y no se encuentran adheridas al epitelio, sino que permanecen activas a nivel del lumen intestinal, ayudando en los procesos de evacuación de desechos y de neutralización de toxinas y patógenos.

6.2.6. Discusión de los resultados obtenidos a partir de la evaluación del potencial probiótico

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación in vitro del potencial probiótico de las cepas estudiadas se resume en la Tabla 24 . Es importante tener en cuenta que todas las cepas trabajadas fueron aisladas de fuentes distintas, lo que podría explicar las diferencias que se presentaron entre el comportamiento de cada una de ellas.

Como es sabido, las BAL tienen predilección por medios y matrices ricos en carbohidratos, ya que su diversidad de rutas metabólicas, les permiten degradarlos y

llevar a cabo diferentes procesos fermentativos. Este hecho, sumado a su permante interacción con otro tipo de microorganismos y con su capacidad de tolerar condiciones adversas como el bajo pH, hace de las BAL aisladas de alimentos, microorganismos con alta nivel de adaptación. Es así, como al crecer en medios hostiles crean resistencia a cambios de temperatura, pH ácido, altas concentraciones de sal y altas presiones atmosféricas (Liu *et al.*, 2011). Estas mismas cualidades podrían favorecer la alta capacidad de tolerancia de las cepas a las condiciones gastrointestinales, como lo observado en este trabajo.

Tabla 24. Resumen de los resultados obtenidos en el potencial probiótico.

Cepas	Especie	pH ¹	Antibióticos % sensibilidad	Actividad antimicrobiana ²	Sales Biliares ³	Adherencia ⁴
7	<i>L. plantarum</i>	76,8%	78,0%	+++	86,0%	++
11	<i>L. fermentum</i>	68,7%	83,0%	+	72,0%	-
12	<i>L. plantarum</i>	89,7%	87,0%	++	81,0%	++
16	<i>L. fermentum</i>	81,8%	83,0%	++	79,0%	+
Referencia	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	37,8%	87,0%	+	77,0%	-

¹ Porcentaje de resistencia de las cepas a un pH de 2,0

² Número de cruces de acuerdo a los diámetros en halos de inhibición generados

³ Porcentaje de resistencia a una concentración de sales biliares del 2,0%

⁴ Capacidad de adhesión de las cepas (++ adhesión similar a control positivo, + adhesión no comparable con controles positivos, - ausencia de adhesión)

En cuanto a la resistencia a pH bajo (2,0), no todas las cepas presentaron un buen nivel de resistencia. Aunque las cuatro BAL aisladas de alimentos autóctonos presentaron porcentajes por encima del 68,7%, la cepa de referencia utilizada, solo alcanzó un 37,8%. En este caso, la cepa de mejor desempeño fue la No. 12 (*L. plantarum*) con un porcentaje de resistencia del 89,8%, porque fue la que menos disminuyó su concentración celular durante estas pruebas.

En las pruebas con antibióticos, todas las cepas mostraron un porcentaje de sensibilidad por encima del 78,0%, siendo nuevamente la cepa No. 12 (*L. plantarum*), la de mayor sensibilidad junto con la cepa de referencia.

A nivel de actividad antimicrobiana, la cepa con mayor espectro de inhibición y que generó halos de mayor diámetro fue la No. 7 (*L. plantarum*), siendo la cepa No. 11 y la de referencia las de menor actividad observada contra los patógenos evaluados.

En los ensayos de resistencia a sales biliares, se encontró de nuevo, que la cepa No. 7 (*L. plantarum*) fue la más resistente a las altas concentraciones de sal evaluadas con un

porcentaje de resistencia del 86,0%. Sin embargo, el resto de las cepas también presentó un buen nivel de resistencia por encima del 72,0%.

En los ensayos de adhesión se encontró que las cepas de *L. plantarum* (cepas No. 7 y No.12) fueron las que presentaron mayor capacidad de adhesión a tejido intestinal humano. Mientras que la cepa No. 11 y la cepa de referencia no presentaron ningún tipo de adhesión.

Los resultados del cálculo del potencial probiótico para cada una de las cepas, se presentan en la Tabla 25. Con respecto a la tolerancia a pH ácido, se observó que las cuatro cepas BAL nativas aisladas de alimentos presentaron resistencia a esta condición por lo que obtuvieron un puntaje de 1, mientras que la cepa de referencia (*L. acidophilus* ATCC 4356) no obtuvo ningún puntaje en esta prueba por su alta sensibilidad a la acidez del medio. En cuanto a la susceptibilidad a antibióticos, todas las cepas evaluadas, incluyendo la de referencia, fueron altamente sensibles a los antibióticos por lo que obtuvieron el máximo puntaje posible para esta prueba. Lo mismo ocurrió con la prueba de tolerancia a altas concentraciones de sales biliares, en donde todas las cepas que se evaluaron fueron resistentes a las sales y por eso obtuvieron el puntaje de 1. Por otro lado, la actividad antimicrobiana de la cepa No. 7 fue la que obtuvo el mayor puntaje (puntaje de 3), porque en las pruebas realizadas esta cepa fue la que generó halos de inhibición de mayor diámetro.

En las pruebas realizadas para evaluar la capacidad de adherencia a la mucosa intestinal, las cepas que presentaron mayor puntaje, por presentar un mejor desempeño fueron las cepas No. 7 y No. 12 con puntaje de 2 que correspondió al máximo posible para esta prueba. Mientras que la cepa No. 11 (*L. fermentum*) y la de referencia, obtuvieron un puntaje de cero por no presentar ningún tipo de adherencia con los procedimientos realizados.

Tabla 25. Cálculos del potencial probiótico (%)

Cepas	pH	Susceptibilidad a antibióticos	Actividad antimicrobiana	Sales Biliares	Adherencia	Puntaje total observado	Potencial probiótico (%)
7	1	1	3	1	2	8	100,0 %
11	1	1	1	1	0	4	50,0 %
12	1	1	2	1	2	7	87,5 %
16	1	1	2	1	1	6	75,0 %
Ref	0	1	1	1	0	3	37,5 %

Los resultados obtenidos al aplicar la fórmula descrita anteriormente mostraron que la cepa No.7 (*L. plantarum*) fue la que presentó el potencial probiótico más alto, con un porcentaje de cumplimiento del 100,0% (Tabla 25). La cepa No. 12 (*L. plantarum*) también presentó un buen potencial probiótico con un porcentaje total del 87,5%. La cepa No. 16 y la cepa No. 11 presentaron porcentajes intermedios con un 75% y un 50%, respectivamente, mientras que la cepa de referencia fue la que presentó un menor

potencial con un 35%, de acuerdo con los parámetros utilizados para calcular el desempeño de las cepas (Figura 27).

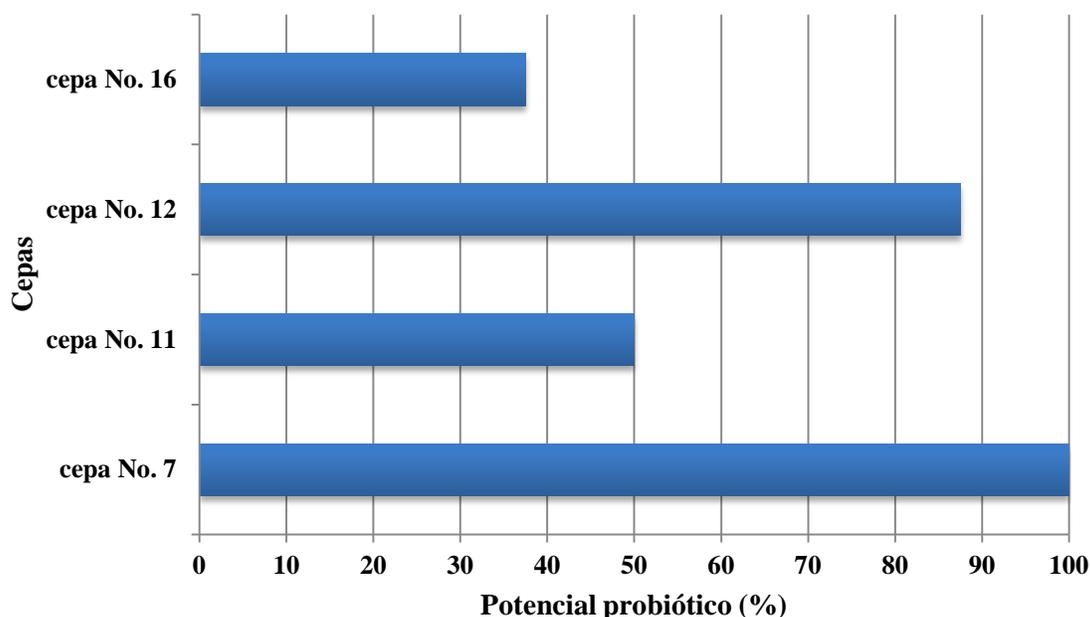


Figura 27. Potencial probiótico de los aislamientos.

Los resultados mostraron que, en términos generales, las cepas de *L. plantarum* (No. 7 y No.12) fueron las que presentaron mayor potencial probiótico al resistir las condiciones experimentales aplicadas y al cumplir de mejor manera con los lineamientos planteados por la FAO-OMS (2002), para la evaluación de cepas probióticas. Adicionalmente fue evidente que las cuatro cepas aisladas de alimentos, presentaron un mejor desempeño que la cepa de referencia utilizada en los ensayos, que aunque fue aislada de muestras clínicas, no presentó un nivel de resistencia igual al presentado por las demás cepas.

Varios autores han reportado el aislamiento de BAL en alimentos tradicionales y cómo dichas cepas llegan a tener mejores características probióticas que cepas comerciales. Klayraung *et al.* (2010), realizaron varios aislamientos de *L. fermentum* a partir de comida tradicional Thai y observaron que las BAL aisladas de hojas de té fermentadas, presentaron alta resistencia al pH y a las sales biliares, por encima de lo encontrado con cepas comerciales. Liu *et al.* (2011) en su artículo hacen una compilación de un gran número de BAL encontradas en comida tradicional China y del alto potencial de estas cepas como candidatas a probióticos. Hwanhlem, *et al.* (2009) aislaron cepas de *Kung-Som*, un alimento fermentado tradicional de Tailandia y encontraron cepas *L. plantarum* con altas cualidades de resistencia a condiciones de acidez y actividad probiótica. De igual forma, Zago *et al.* (2011), reportaron cepas de *L. plantarum* aisladas de quesos artesanales argentinos e italianos con alto potencial probiótico y con mayor desempeño que las cepas comerciales.

Estos resultados sugieren que los alimentos tradicionales, autóctonos y/o fermentados, representan una opción interesante para encontrar nuevas cepas probióticas con altas cualidades tecnológicas, por lo que el trabajo realizado a través de esta investigación y los resultados obtenidos, abren un panorama importante en cuanto al potencial de los microorganismos que circulan en nuestra región.

Finalmente, se puede decir, que con la realización de estas pruebas in vitro, se cumplió con los lineamientos establecidos por la FAO-OMS (2002), para la evaluación preliminar de cepas con potencial probiótico (Tabla 26). Con estas pruebas se pudo comprobar que dos de las cepas evaluadas (Cepa No. 7 y cepa No. 12) podrían ser buenas candidatas para el desarrollo de alimentos funcionales.

Tabla 26. Cuadro comparativo de los requerimientos de la (FAO-OMS, 2006) en la evaluación de probióticos y las pruebas realizadas con los aislamientos

Requerimientos FAO	Pruebas Realizadas
Identificación taxonómica	Identificación molecular ARN 16`S
Resistencia a la acidez gástrica	Simulación de las condiciones gastrointestinales a pH 2,0 por 4,0 horas
Resistencia a los ácidos biliares	Exposición a altas concentraciones de sales biliares por 4 horas
La adhesión a la mucosa o a las células epiteliales humanas y líneas celulares	Adhesión en tejido intestinal humano (<i>Mucin Tissue-Trol SIGMA-ALDRICH</i>).
Actividad antimicrobiana frente a bacterias potencialmente patógenas	Actividad antimicrobiana mediante difusión en placa frente a seis patógenos de importancia en salud pública.
Determinación de la resistencia a antibióticos	Evaluación de la sensibilidad antibiótica frente a 23 antibióticos diferentes.

6.3. ADICIÓN DE BAL A JUGOS DE FRUTA

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la actividad probiótica, se seleccionó la cepa No.7 (*L. plantarum*), por ser la de mejor desempeño y la que presentó mayor potencial probiótico, para ser adicionada a jugos de fruta, como prueba preliminar para el desarrollo a futuro de bebidas funcionales.

6.3.1. Evaluación microbiológica

En los estudios de viabilidad realizados con la BAL en jugos de lulo (*Solanum quitense*), mango (*Mangifera indica*) y fresa (*Fragaria vesca*) a 8,0°C, se observó un patrón de comportamiento similar de la cepa en los tres tipos de matrices (Figura 28A).

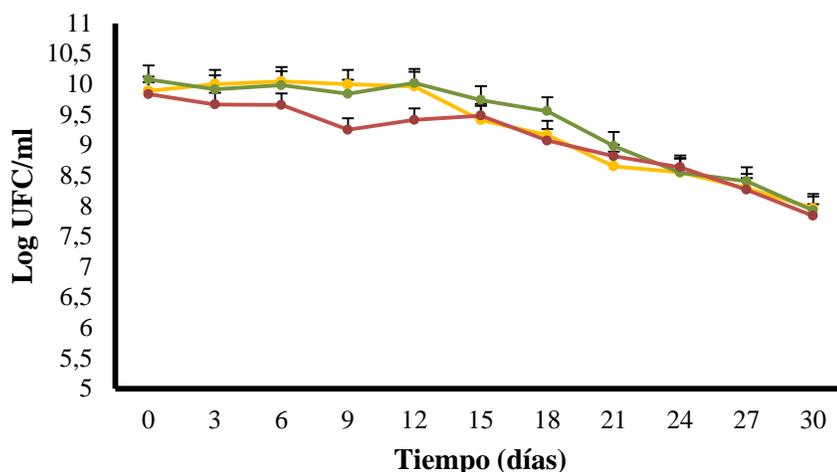
En todos los casos y durante los 30 días de almacenamiento, las concentraciones celulares de la bacteria se mantuvieron por encima de 8,0 Log UFC/mL, lo que sugiere la buena capacidad de la cepa para sobrevivir a los factores intrínsecos y extrínsecos asociados a este tipo de productos.

Los resultados obtenidos muestran una alta tolerancia de la cepa en estudio a las condiciones fisicoquímicas de los tres jugos estandarizados y a la temperatura de refrigeración evaluada. Luego de haber inoculado los jugos con concentraciones celulares aproximadas de 10^{10} UFC/mL, se observó para los tres jugos, que después de 30 días de almacenamiento, la cepas solo disminuyeron su concentración celular en dos ciclos logarítmicos, obteniendo poblaciones finales cercanas a 10^8 UFC/mL. Se ha reportado, que microorganismos obtenidos de procesos fermentativos como el de este caso, han presentado alta tolerancia a condiciones de acidez, bajo pH y stress celular, por lo que se convierten en una buena opción para el desarrollo de bebidas y alimentos funcionales (Yoon *et al.*, 2006). Igualmente, el uso de frutas y vegetales como matrices y medios de crecimiento, confiere beneficios al microorganismo probiótico por los diferentes componentes que contienen, ya que sustancias como los antioxidantes, la fibra y las vitaminas, podrían llegar a tener efecto protector para el microorganismo (Pereira *et al.*, 2011).

Por otro lado, en los ensayos realizados con los controles negativos (jugos de fruta sin adición de BAL), se observó la presencia de flora acompañante, que fue caracterizada como levaduras (Figura 28B). Esta población celular, que estuvo presente en los jugos durante los 30 días de almacenamiento, presentó una concentración celular aproximada de 10^3 UFC/mL, que fue incrementándose hasta alcanzar concentraciones cercanas a 10^5 UFC/mL hacia el noveno día del ensayo. Sin embargo, similar a lo ocurrido con la cepa No.7, esta población de levaduras comenzó a disminuir hacia el día 18, probablemente

por agotamiento de nutrientes en el medio y por aumento de la acidez en los jugos como se mostrará en el siguiente numeral. Estos resultados son similares a los reportados por DiCagno *et al.* (2011), quienes reportaron la presencia de flora acompañante en batidos mixtos de fruta (rojos: cerezas, tomate, moras y ciruelas pasas; verdes: kiwi, hinojo, espinaca y papaya) almacenados a 8,0°C. En el estudio, también se encontró que después de 15 días de almacenamiento, dicha población que había llegado a una concentración aproximada de 10^5 UFC/mL, se redujo significativamente hasta llegar a concentraciones de 10^3 UFC/mL.

A



B

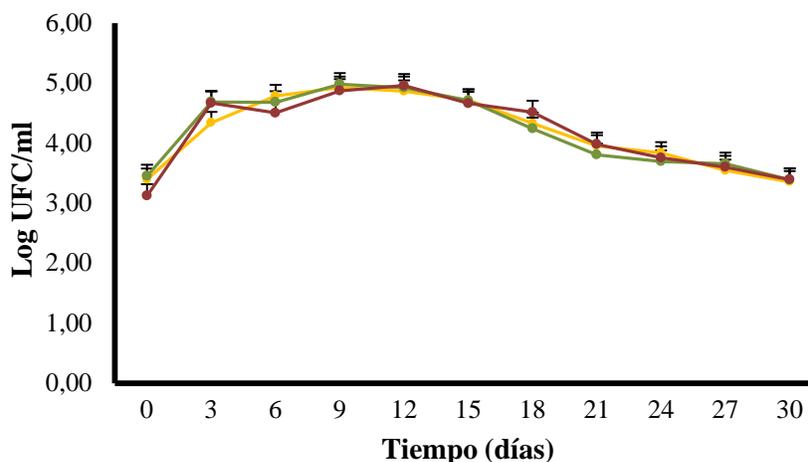


Figura 28. Evaluación de la viabilidad de la cepa No.7 (*L. plantarum*) en jugos de fruta. A) Jugos adicionados con la BAL. B) Jugos control con presencia de flora acompañante. ●: Jugo de fresa ●: Jugo de lulo ●: Jugo de mango

La viabilidad y supervivencia de este tipo de microorganismos ácido lácticos en matrices no lácteas, ha sido reportada también por otros autores: Moussavi y Adams, (2010)

reportaron alto nivel de resistencia de especies de *L. plantarum* a condiciones de acidez, bajo pH y almacenamiento a 4,0°C en jugos de fruta. Champagne y Gardner (2008) reportaron una concentración final de *L. plantarum*, de 10⁷ UFC/mL luego de 80 días de almacenamiento a 4,0°C en una bebida a base de frutas. Yoon *et al.*, (2006) encontraron al cabo de cuatro semanas de almacenamiento en refrigeración a 8,0°C, una concentración celular de 10⁷UFC/mL de *L. plantarum* en jugo de col. Nualkaekul y Charalampopoulos (2011) reportaron poblaciones de 10⁷-10⁸ UFC/mL en una cepa BAL almacenada durante seis semanas a 8,0°C en jugos de naranja, uva, grosella y piña.

Por otro lado, en los jugos adicionados con la BAL, solo se presentó la flora acompañante (10³ UFC/mL) al inicio del ensayo, pero a partir del tercer día de muestreo, las levaduras fueron indetectables por el método de recuento en placa. Esta reducción en el crecimiento de las levaduras puede deberse a los cambios fisicoquímicos en los jugos generados por el crecimiento de las BAL. Esta inhibición de flora acompañante que también ha sido reportada por otros autores (Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger y Lücke., 1989, Savadogo *et al.*, 2004), comprueba el potencial de las BAL para controlar patógenos y microorganismos deteriorativos en alimentos dentro del contexto del biocontrol.

Otro de los puntos importantes en el momento de la selección y evaluación de la actividad probiótica de cepas, es la dosis efectiva, para que puedan darse de manera adecuada los procesos de colonización en el organismo. Aureli *et al.*, (2011) reportaron que según la AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), la dosis del probiótico a ingerir es un factor importante para obtener altas concentraciones microbianas en varios compartimientos del tracto gastrointestinal. En ese mismo estudio se planteó también, que en el intestino delgado debe haber al menos 10⁶ UFC/mL de las bacterias ingeridas y en el colon aproximadamente 10⁸ UFC/mL. Por esta razón es fundamental garantizar la viabilidad de las cepas durante todos los ensayos y el hecho de que la cepa No.7 se haya mantenido en altas poblaciones celulares en las matrices alimentarias evaluadas, sugiere que esta cepa podría ser aplicada para el desarrollo de bebidas de fruta funcionales, por su nivel de viabilidad y por su resistencia a condiciones adversas como ya se reportó en los numerales anteriores.

6.3.2. Evaluación fisicoquímica

A partir de los análisis fisicoquímicos de los jugos adicionados con la BAL y almacenados a 8,0°C durante 30 días, se pudo establecer el efecto del microorganismo sobre cada una de las variables medidas, que para este caso fueron: acidez, pH y °Brix.

A nivel de acidez, se observó que el valor de esta variable aumentó significativamente ($p < 0,05$) a través del tiempo en los tres tipos de jugos evaluados, siendo el de lulo (*Solanum quitense*) el que presentó mayor acidez desde el inicio (Figura 29). Sin embargo, fue el jugo de mango (*Mangifera indica*), el que presentó un mayor incremento

de acidez a lo largo del almacenamiento. Adicionalmente, fue evidente que los jugos inoculados con la BAL presentaron valores de acidez significativamente mayores que los controles (Anexo 3), debido posiblemente, a la actividad metabólica de la bacteria y por ende, a la producción de ácido láctico y otros metabolitos.

Después de 30 días de almacenamiento, se observó para el jugo de lulo (*Solanum quitense*) adicionado con la BAL, un aumento del 18,67% en el porcentaje de acidez, mientras que en el jugo control, este aumento fue de tan solo el 4,76%.

En el jugo de fresa (*Fragaria vesca*) también se presentó un comportamiento similar, ya que la acidez del jugo adicionado con la BAL, tuvo un incremento del 15,87%, mientras que en el jugo control, el incremento después de los 30 días del ensayo fue del 9,2%.

El incremento de la acidez a lo largo del tiempo, fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el jugo de mango (*Mangifera indica*), ya que en el jugo adicionado con la BAL se observó un aumento en la acidez del 48,57% y en el jugo control fue del 36,11%.

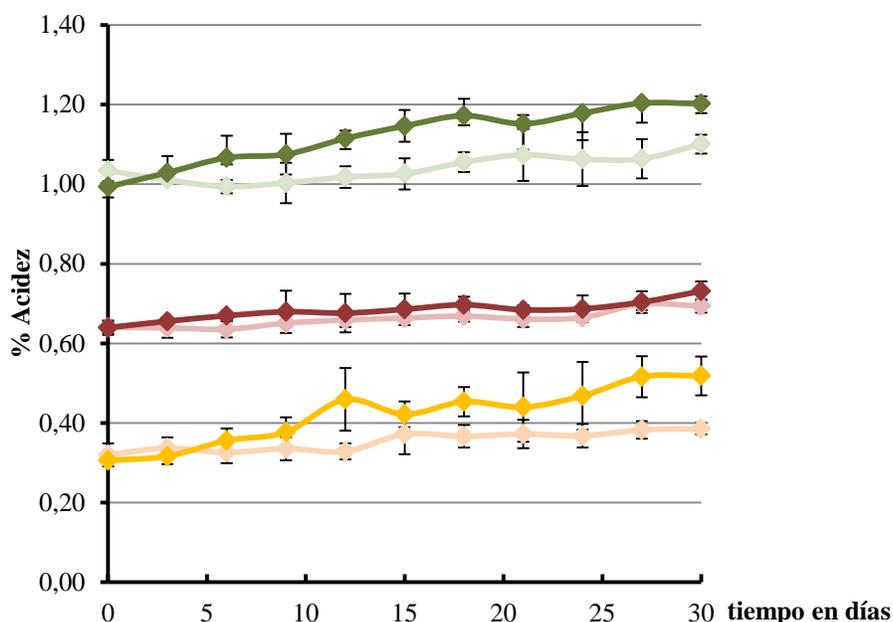


Figura 29. Resultados de las pruebas de acidez en jugos ■ : Jugo de mango con adición de *L. plantarum*. □ : Jugo de mango sin adición de BAL (control). ● : Jugo de fresa con adición de *L. plantarum*. ▲ : Jugo de fresa sin adición de BAL (control).■ : Jugo de lulo con adición de *L. plantarum*. ● : Jugo de lulo sin adición de BAL (control).

Por otro lado, al evaluar el pH de los jugos durante el almacenamiento a 8,0°C, se encontró que la relación entre acidez y pH fue inversamente proporcional en todos los casos, como era de esperarse. En todos los jugos se observó un decrecimiento

significativo ($p < 0,05$) del pH a través del tiempo y al igual que lo ocurrido con la acidez, los jugos inoculados con la BAL presentaron un pH significativamente menor ($p < 0,05$) que los controles (Anexo 3). En la Figura 30 se presentan los resultados obtenidos para esta variable.

Entre los jugos adicionados con la BAL, el jugo de mango (*Mangifera indica*) fue la bebida que presentó un mayor porcentaje de disminución del pH a lo largo de los 30 días (13,19%), seguido del jugo de fresa (*Fragaria vesca*) (11,76%) y el jugo de lulo (*Solanum quitense*) (8,66%). Por otro lado, en los jugos control, se observó que el jugo de lulo (*Solanum quitense*) y el jugo de mango (*Mangifera indica*) fueron los que presentaron mayor estabilidad a nivel de pH, con un porcentaje de disminución para esta variable del 2,62% y del 2,77%, respectivamente. El jugo de fresa (*Fragaria vesca*) disminuyó en 6,32% el valor del pH, después de los 30 días.

El seguimiento realizado a las propiedades físicoquímicas de este tipo de matrices mostraron el efecto que ejerce el microorganismo sobre ellas y cómo su metabolismo puede afectar variables como la acidez y el pH, llegando a ser indicadores de la calidad y deterioro de los jugos. En un estudio publicado por Nualkaekul y Charalampopoulos (2011), se generó un modelo matemático para predecir la dependencia de variables como pH, ácido cítrico y ascórbico sobre la población de *L. plantarum* inoculada en jugos de piña, grosella, naranja, uva, limón, arándano y granada. Se encontró que a mayor concentración celular, se produjo mayor concentración de ácidos y que el pH de los jugos disminuyó significativamente con el paso del tiempo, como se encontró en los ensayos realizados en este proyecto. Así mismo, Yoon *et al.*, (2006), realizaron una medición del ácido láctico producido durante la fermentación de jugos de col y encontraron un aumento significativo en la producción del ácido a lo largo del tiempo, resultado del metabolismo del microorganismo, y a su vez se relacionó con el aumento de la acidez y la disminución del pH en los jugos evaluados.

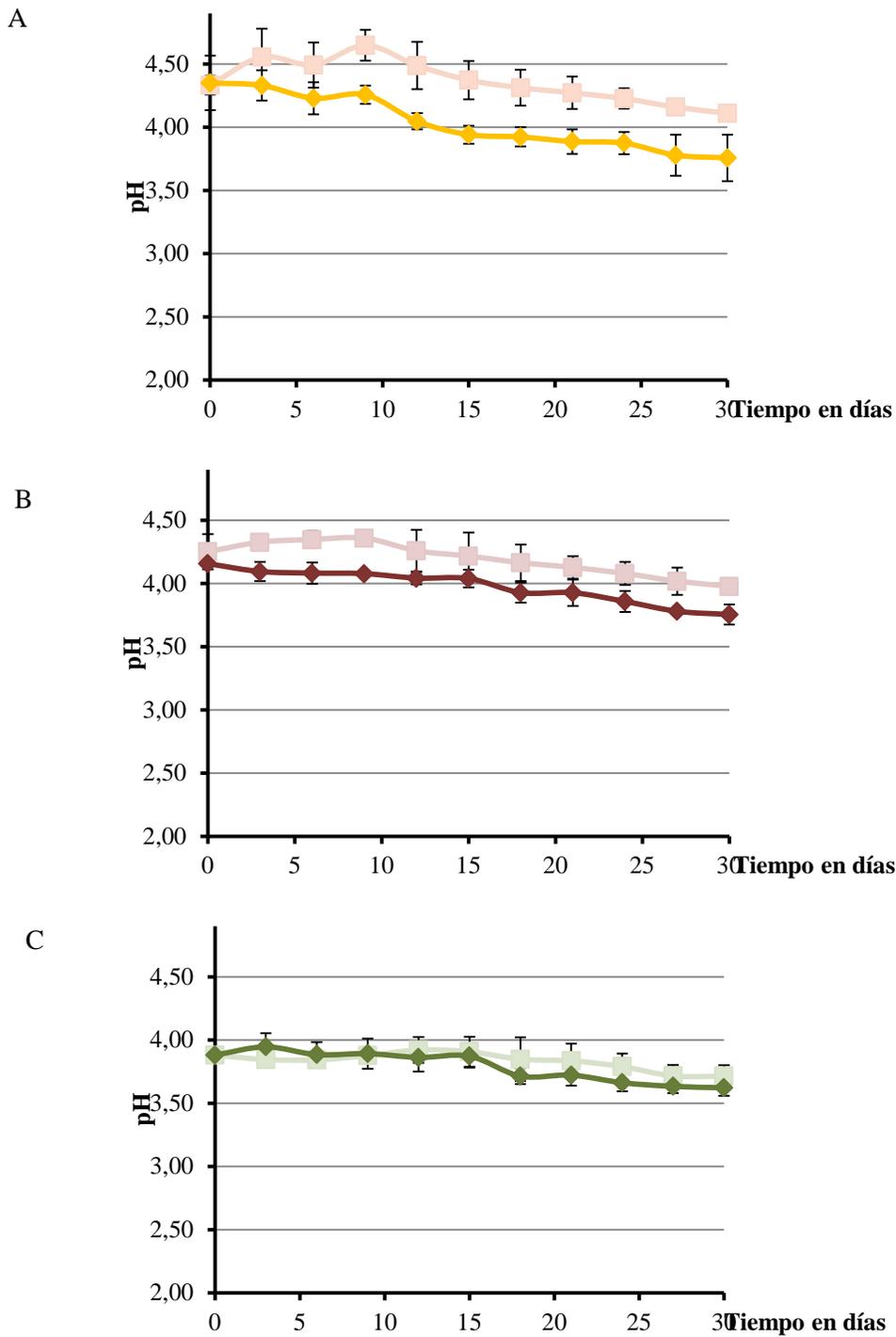


Figura 30. Resultados de las pruebas de pH en jugos. **A** ■ : Jugo de mango con adición de *L. plantarum*. ■ : Jugo de mango sin adición de BAL (control). **B** ■ : Jugo de fresa con adición de *L. plantarum*. ■ : Jugo de fresa sin adición de BAL (control). **C** ■ : Jugo de lulo con adición de *L. plantarum*. ■ : Jugo de lulo sin adición de BAL (control).

Otra de las variables a las que se les hizo seguimiento dentro de este trabajo, fueron los °Brix. En la Figura 31 se presentan los resultados obtenidos para los jugos adicionados con la BAL y para los jugos control, durante los 30 días de refrigeración a 8,0°C.

La evaluación en el tiempo de los grados Brix mostró un descenso significativo para esta variable en los tres jugos. Posiblemente este efecto se deba al consumo de los azúcares presentes en los jugos por parte de los microorganismos o por los procesos degenerativos normales de este tipo de matrices. Contrario a lo ocurrido en las otras dos variables medidas, en este caso no se presentaron diferencias significativas entre los jugos adicionados con la BAL y los jugos control (Anexo 3), lo cual puede deberse también a la presencia de flora acompañante en los jugos control, que también participaron en el consumo de azúcares.

El porcentaje total de disminución de °Brix, después de los 30 días de almacenamiento fue de aproximadamente el 17,96% para el jugo de mango (*Mangifera indica*), 24,90% para jugo de fresa (*Fragaria vesca*) y 23,87% para jugo de lulo (*Solanum quitense*).

Los resultados obtenidos son comparables a los reportados por Shah *et al.* (2010), quienes también encontraron una disminución significativa de °Brix en jugos de fruta adicionados con *L. rhamnosus*, *L. paracasei* y *B. lactis*. En el estudio, los jugos que se almacenaron por seis semanas, también presentaron un aumento significativo en la acidez y un descenso marcado en el pH a través del tiempo.

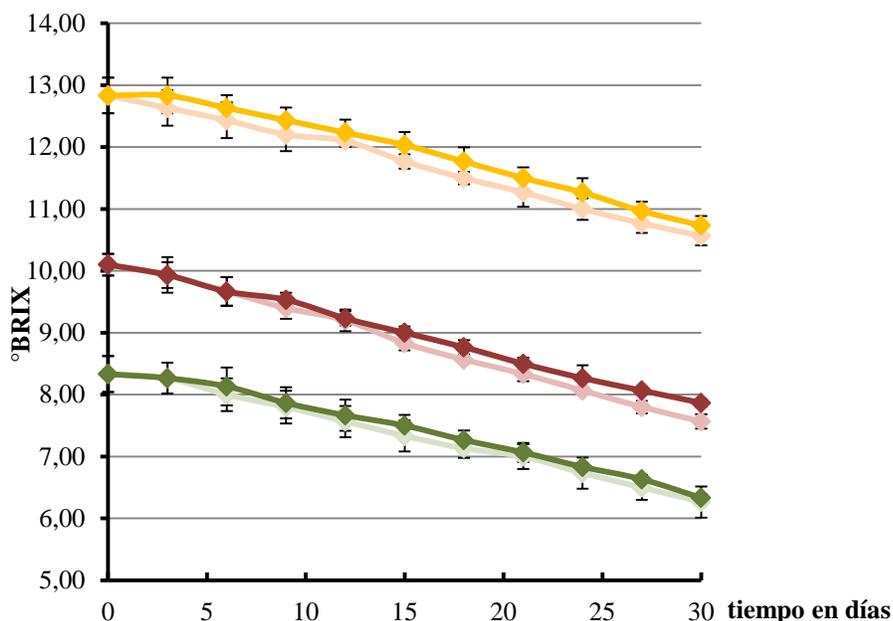


Figura 31. Resultados de las pruebas de °Brix en jugos. ■: Jugo de mango con adición de *L. plantarum*. ■ : Jugo de mango sin adición de BAL (control). ■: Jugo de fresa con adición de *L. plantarum*. ■ : Jugo de fresa sin adición de BAL (control).■: Jugo de lulo con adición de *L. plantarum*. ■ : Jugo de lulo sin adición de BAL (control).

6.3.3. Evaluación sensorial

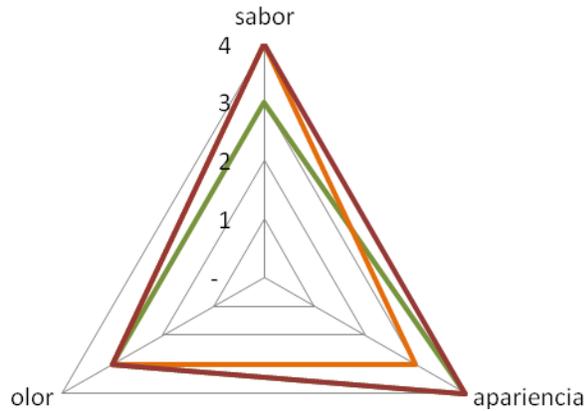
Los resultados de la evaluación sensorial se tabularon y gráfcaron para ver analizar el efecto de la adición de la BAL sobre los tres atributos evaluados en los jugos (olor, apariencia y sabor), como se presenta en la figura 32. Así mismo se categorizaron los resultados para realizar un análisis global (figura 33), en el que se determinó que no se presentaron efectos significativos por parte de los microorganismos en los jugos, para ninguno de los atributos evaluados, según el concepto de los consumidores.

Se observó para los jugos inoculados con la BAL, que de los tres atributos analizados, el que se percibió mas alterado fue el olor. Sin embargo, en promedio, este atributo fue concebido como tolerable y quedó clasificado dentro del rango de “bueno” en los tres tipos de jugo, siendo comparable también con los resultados obtenidos para los controles. Este cambio en el olor de los jugos adicionados con la BAL, puede explicarse debido a que dentro del metabolismo de este tipo de microorganismos ocurre la producción normal de una serie de metabolitos que tienen olores y sabores característicos.

En cuanto al sabor de los jugos, no hubo diferencias entre los adicionados con la BAL y los jugos control. Pero es importante señalar, que los jugos de fresa (*Fragaria vesca*) inoculados con el microorganismo presentaron una mejor calificación (“muy buena”) que los jugos control (“buena”). Aparentemente en este caso, el proceso fermentativo del microorganismo, generó cambios en el sabor del jugo que fueron agradables para los consumidores.

A nivel de apariencia, tampoco se presentaron diferencias significativas entre los dos tipos de jugo (adicionados con la BAL y controles), clasificándose esta variable entre los rangos de “muy buena” y “buena”.

A.



B.

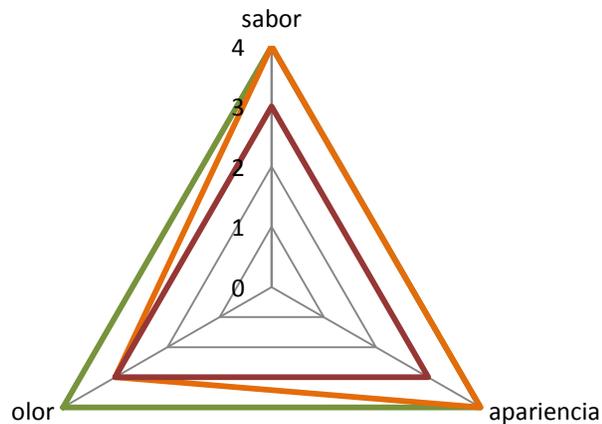


Figura 32. Gráficos resultados sensoriales. A: Jugos con adición de BAL. B. Jugos Control.

●: Jugo de fresa ●: Jugo de lulo ●: Jugo de mango. 4: muy bueno, 3: bueno, 2:malo, 1: muy malo

En términos generales, los resultados del análisis sensorial mostraron que en el caso de los jugos inoculados con la BAL, el porcentaje de aceptabilidad fue muy alto ya que solo se encontraron calificaciones de "muy malo" a nivel de olor para lulo (*Solanum quitense*) del 1,0%, para mango (*Mangifera indica*) del 4,0% y para fresa (*Fragaria vesca*) del 2,0% (Figura 32). La aceptabilidad de los jugos adicionados con *L. plantarum* en cuanto a sus atributos sensoriales, es comparable con los resultados obtenidos con los controles, lo

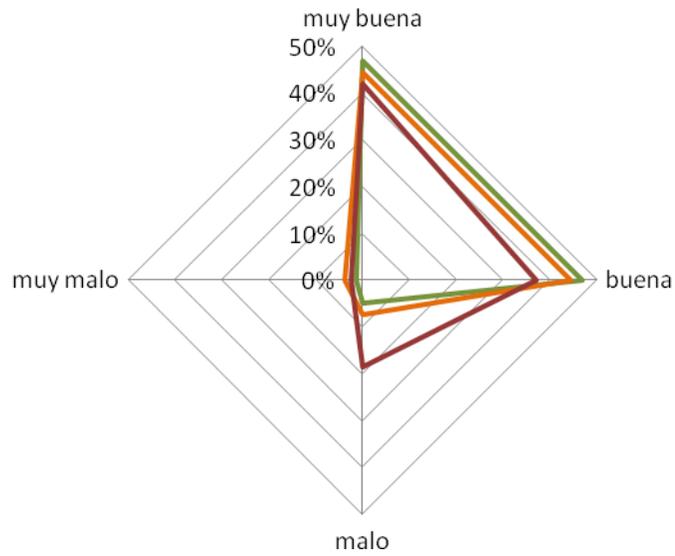
que indica que pueden llegar a ser matrices efectivas en la elaboración de jugos funcionales adicionados con microorganismos.

Según el resumen de los resultados globales, se observó que el jugo adicionado con BAL, que conservó mejor las propiedades organolépticas durante todo el estudio fue el de lulo (*Solanum quitense*), que presentó un mayor porcentaje de aceptabilidad en cuanto a sabor, apariencia y olor. A nivel general, este jugo fue calificado como “muy bueno” en un 47,0% y en “bueno” en un mismo porcentaje, lo cual fue similar a la calificación recibida para el jugo de lulo (*Solanum quitense*) control que fue calificado como “muy bueno” en un 54,0% y como “bueno” en un 38,0% (Figura 33). Por otro lado, el jugo de mango (*Mangifera indica*) presentó un comportamiento similar al jugo de lulo (*Solanum quitense*), seguido del jugo de fresa, que fue el de menor aceptabilidad por parte de los consumidores (tanto el adicionado con la BAL, como el jugo control).

Los resultados obtenidos sugieren que las tres frutas trabajadas podrían ser una buena opción para el desarrollo de bebidas funcionales ya que sus características sensoriales no se afectan significativamente con la adición de la BAL.

Varios autores reportan y recomiendan el uso de frutas tropicales en la elaboración de jugos ya que, por sus aromas y sabores fuertes permiten que se enmascaren los sabores y olores característicos de los metabolitos producidos por las bacterias ácido lácticas usadas como probióticos. Luckow *et al.*, (2006) recomiendan el uso de jugos de frutas como piña, mango, maracuyá, como vehículos para probióticos, ya en encuestas a consumidores se logró establecer que dichas frutas atenuaron los cambios producidos por la fermentación bacteriana. Así mismo, Do Espírito-Santo *et al.*, (2011) reportan la nueva tendencia en el consumo de bebidas a base de frutas exóticas y su potencial en la elaboración de alimentos funcionales, así como su efecto protector hacia los microorganismos benéficos. Pereira *et al.*,(2011) también sugieren que el empleo de frutas y vegetales como matrices de probióticos le amplían la oferta a los consumidores por nuevos y diferentes sabores.

A.



B.

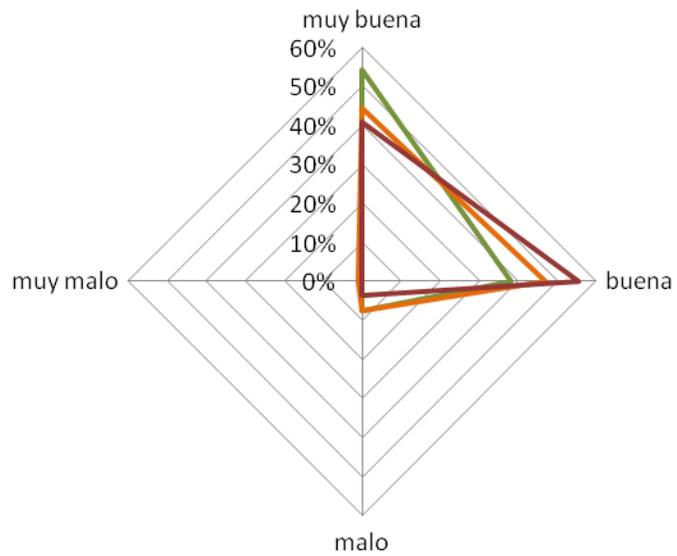


Figura 33. Gráficos resultados sensoriales. A: Jugos con adición de BAL. B. Jugos Control

●: Jugo de fresa ●: Jugo de lulo ●: Jugo de mango. 4: muy bueno, 3: bueno, 2:malo, 1: muy malo

7. CONCLUSIONES

- Se comprobó, que dentro de los procesos fermentativos y deteriorativos de los alimentos, se pueden crear las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de microorganismos ácido lácticos, con características importantes de tolerancia y adaptabilidad a medios hostiles, lo que hace que los microorganismos que se recuperen de estos procesos, tengan propiedades tecnológicas para ser usadas como eventuales aditivos en la industria de alimentos funcionales.
- Alimentos de diferente naturaleza, así como vegetales y frutas fermentadas, representan una importante fuente de aislamiento de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. La adopción de este tipo de alimentos a nivel de bioprospección, podría ser el inicio de procesos de innovación, para generación de productos novedosos y con alto valor agregado.
- Mediante secuenciación genómica se lograron identificar dos tipos de especies diferentes en las cuatro cepas aisladas de alimentos autóctonos. Se confirmó la presencia de dos cepas de *L. plantarum* y dos de *L. fermentum*.
- Con las pruebas in vitro realizadas para evaluar el potencial probiótico de las cepas aisladas de alimentos, se comprobó que cuatro de ellas, pertenecientes a las especies *L. plantarum* y *L. fermentum*, cumplieron con los requisitos establecidos por la FAO para la identificación de bacterias con potencial probiótico.
- A través de los ensayos in vitro se comprobó que todas las cepas nativas evaluadas presentaron un porcentaje de resistencia a pH 2,0 por encima del 68,7%, un porcentaje de resistencia a sales biliares (2,0%) por encima del 72,0% y una sensibilidad antibiótica superior al 78,0%.
- Se comprobó también que todas las cepas evaluadas producen sustancias con capacidad antimicrobiana con amplio espectro de inhibición tanto para bacterias patógenas Gram-positivas como para bacterias Gram-negativas.
- El procedimiento implementado para evaluar la capacidad de adhesión de las cepas BAL a células intestinales humanas fue efectivo y logró comprobar que las cepas de *L. plantarum* aisladas, poseen una alta capacidad de adhesión la este tipo de tejidos lo que sugiere procesos de colonización in vivo importantes.
- Los resultados obtenidos demostraron que las cepas nativas aisladas de alimentos, tienen gran potencial dentro del desarrollo de nuevos probióticos, al tener procesos efectivos de adaptación y resistencia a condiciones simuladas del

tracto gastrointestinal. Este potencial fue mucho mayor en estas cepas que lo observado con la cepa de referencia utilizada en el estudio.

- Igualmente se comprobó que existen diferencias significativas en cuanto al perfil de resistencia de las condiciones gastrointestinales entre cepas de la misma especie, debido posiblemente, a que el ambiente usado para el aislamiento, genera capacidad de resistencia y adaptabilidad diferente.
- Con la cepa de *L. plantarum* seleccionada para realizar las pruebas en jugos de fruta, se logró comprobar que su concentración celular no se afectó significativamente por las condiciones extrínsecas e intrínsecas de los jugos evaluados y se mantuvo viable en concentraciones por encima de 10^8 UFC/mL, después de 30 días de almacenamiento a 8,0°C.
- La adición de la BAL a los jugos de fruta generó cambios significativos en los factores fisicoquímicos de los jugos, luego de 30 días de almacenamiento. En todos los casos se generó un aumento en el porcentaje de acidez, una disminución en el valor de pH y un descenso en los °Brix, asociados a la actividad metabólica de la bacteria. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos del análisis sensorial, estos cambios no afectaron la aceptabilidad de los jugos por parte de los consumidores.
- El uso de frutas tropicales como matrices en la elaboración de jugos adicionados con bacterias ácido lácticas permite que se enmascaren los sabores y olores característicos de este tipo de productos favoreciendo la aceptabilidad por parte de consumidores potenciales.
- Los resultados obtenidos representan una gran oportunidad para el desarrollo a futuro de alimentos probióticos a partir de medios no lácticos y son un aporte importante para la biotecnología de la región, al utilizar cepas BAL para la producción de alimentos funcionales.

8. RECOMENDACIONES

- De acuerdo con varios autores, una marcada resistencia a altas concentraciones de sales biliares, por parte de BAL, podría estar asociada a desconjugación de este tipo de sustancias y descenso en los niveles de colesterol en el organismo. Por esta razón, y teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos con las cepas aisladas en este trabajo, se recomienda que se realicen más estudios para probar la capacidad de estas cepas como mediadoras de este tipo de procesos metabólicos.
- Por los inconvenientes ocurridos en las instalaciones y laboratorios de la Universidad, no se pudieron realizar pruebas con los jugos de las otras dos cepas BAL con potencial en los jugos. Por esto, se recomienda se realice esta evaluación para determinar cual tiene mejores cualidades tecnológicas.
- Se debe continuar con la evaluación de las cepas a nivel in vivo para poder comprobar de manera efectiva el efecto benéfico de este tipo de microorganismos sobre la salud. Por esta razón se recomienda primero realizar ensayos en modelos animales, para posteriormente realizar ensayos de intervención en humanos.
- Se recomienda realizar estudios que permitan conocer más a fondo las propiedades tecnológicas de las cepas aisladas, en especial de la cepa No.7 (*L. plantarum*), a la que ya se le evaluó su viabilidad en jugos de fruta. Propiedades como producción en masa, efecto de la refrigeración, liofilización, vida útil, etc., podrían ser de interés industrial.
- Podría ser interesante evaluar el efecto de los compuestos presentes en los jugos de fruta sobre la viabilidad de los microorganismos. Estudiar la relación de los antioxidantes y la fibra presente en los jugos, sobre la población microbiana, podría permitir la optimización de los procesos de desarrollo de bebidas funcionales y podrían establecerse también algunos efectos prebióticos.
- Dentro de los resultados de los antibiogramas, se observó resistencia por parte de algunas cepas a diferentes antibióticos. Por lo tanto, se recomienda realizar estudios más específicos en este tema, que permitan detectar la presencia de plásmidos y genes relacionados con transferencia de resistencia, en las cepas aisladas. Este punto es importante para darle continuidad a los estudios de potencial probiótico de las BAL.

- Los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos de las BAL aisladas en este trabajo, mostraron una importante actividad antimicrobiana contra diferentes tipos de bacterias patógenas. Por esta razón se recomienda realizar ensayos de biopreservación de alimentos, utilizando estos sobrenadantes. Así mismo, se podrían caracterizar dichas sustancias, para establecer la presencia de bacteriocinas en las muestras y así complementar la discusión acerca de los mecanismos de acción de las bacterias con potencial probiótico y de antagonismo microbiano.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C. y Klotz, B. 2007. Producción de sustancias BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances): una alternativa de biocontrol en la industria alimentaria. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 282-284.
- Annuk, H., Shchepetova J., Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M., y Mikelsaar M. 2003. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*, 403-412.
- Arbolea, S., Ruas- Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de los Reyes-Gavilan, C. y Gueimonde, M. 2010. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk." *International Journal of Food Microbiology*, 1-9.
- Audisio, M. C., Torresa, M. J., Sabaté, D.C., Ibarguren, C. y Apella M.C. 2011. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*, 1-13.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F. y Zuccotti, G.V. 2011. Probiotics and Health: An evidence- based review. *Pharmacological Research*, 1-11.
- Aysun, C. y Güarakan C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, 511-518.
- Boone, D. R. 2001. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edición. Vol 1: 1208-1234.
- Baele, M., Vaneechoutte, M., Verhelst, R., Vancanneyt, M., Devriese, L. A., y Haesebrouck, F. 2002. Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 263-271
- Bjerring, A. S., Allan D. y Chwalibog A. 2008. A dynamic model of digestion and absorption in pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 328-371.
- Brinques, G. B. y Ayub M.A. 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of food engineering*, 123-128.
- Cani, P.D. y Delzenne N.M. 2011. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology & Therapeutics*, 1-11.

- Caplice, E. y Fitzgerald F.G. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 131-149.
- Cencič, A. y Langerholc T. 2010. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 4-14.
- Champagne, C. P. y Gardner, N.J. 2008. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 539-543.
- Charteris, WP., Kelly, P.M., Morelli, L. y Collins, J.K. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 759-768.
- Chiu, H.H., Tsai, C.C., Hsieh, H.Y. y Tsen, H.Y. 2007. Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the Salmonella invasion in mice. *Journal Applied of Microbiology*, 605-612.
- Chung-Yi, W., Pei-Rong, L., Chang-Chai, N. y Yuan-Tay, S. 2010. Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 578-585.
- Czyzowska, A., Klewicka, E. y Libudzisz, Z. 2006. The influence of lactic acid fermentation process of red beet juice on the stability of biologically active colorants. *European Food Research Technology*, 110-116.
- DiCagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., Angelis, M. y Gobbetti, M. 2011. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 1062-1071.
- Do Espírito-Santo, A. P., Perego, P., Converti, A., y Oliveira, M. N. 2011. Influence of food matrices in probiotic viability- A review focusing in the fruity bases. *Food Science & Technology*, 1-9.
- FAO. 2005. CODEX STAN 247.
- FAO- OMS. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *Report of a Joint FAO/OMS Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, 1-52.
- Food and Drug Administration U.S. 2009. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 1. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Yolou, F.S. y Marchioni, E. 2011. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model." *International Dairy Journal*, 97-102.
- Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G. y Faria, J.A. 2010. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 292-302.
- Gueimonde, M. y Salminen S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, S242-S247.
- Guo, X.H., Kim, J.M., Nam, H.M., Park, S.Y. y Kim J.M. 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 1-6.
- Guo, Z., Wang, J. Yan, L., Chen, W., Liu, X.m. y Zhang, H.P. 2009. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT- Food Science and Technology*, 1640-1646.
- Hellström, P. M., Grybäck, P. y Jacobsson, H. 2006. The physiology of gastric emptying. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 397-407.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, S. y Jos H.J. 1998. Overview of gut and probiotics." *International Journal of Microbiology*, 85-101.
- Holzappel, W.H., Geisen, R. y Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins, and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 343-362.
- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A. y McClements, D.J. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 1-12.
- Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., H-Kittiku, A., y Maneerat, S. 2009. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. *Food Science & Technology*, 594-601.
- Iannitti, T., y Palmieri, B. 2010. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*, 1-25.
- Isolauri, Erika. 2004. Probiotics, Department of paediatrics, Turku University Central Hospital.
- Ivanov, I.I., y Littman, D.R. 2011. Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria." *Current opinion in Microbiology*, 106-114.

- Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar, S., Marchioni, E. y Sanz, Y. 2008. Resistance to Simulated Gastrointestinal Conditions and Adhesion to Mucus as Probiotic Criteria for *Bifidobacterium longum* Strains. *Current Microbiology*, 613-618.
- Jin, L., Hyun, S.Y., Kyu, W.C., Sejong, O., Sae, H.K., Taehoon, C., Bongjoon, K. y Kwang, Y.W. 2001. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. *International Journal of Food Microbiology*, 80-86.
- Kao, Y.T., Liu, Y.S. y Shyu, Y.T. 2007. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International*, 71–79.
- Khalf, M., Dabour, N., kheadr, E. y Fliss, I. 2010. Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. *Bioresource Technology*, 7966-7972.
- Kim, M.N., Nayoung, K., Hyup, S., Park, L., Soo, Y., Jin-Hyeok, H., Jin-Wook, K., Hyang, S., Ho, D. y Sung, J. 2008. The effects of probiotics on PPI-Triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter*, 261-268.
- Klayraung, S., Viernstein, H., Sirithunyalug, J. y Okonogi, S. 2010. Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated From Thai Traditional Food." *Science Pharmacology*, 485-503.
- Kwon, H.S., Yang, E.H., Yeon, S.W., Kang, B.H. y Kim, T.Y. 2004. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 267-275.
- Lan-Szu, C. y Bart, W. 1998. Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal Dairy Science*, 23-31.
- Lin, W.H., Yu B., Jang, S.H. y Tsen, H.Y. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 107-113.
- Liu, S.N., Han, Y. y Zhou, Z.J. 2011 . Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 1-9.
- Luckow, T., Sheehan, V., Fitzgerald, G. y Delahunty C. 2006. Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite*, 315-323.
- Mainville, I., Arcand, Y. y Farnworth, E.R. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Microbiology*, 287-296.

- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. y Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 189-199.
- Martín, R., Delgado, S., Maldonado, A., Jiménez, E., Olivares, M., Fernández, L., Sobrino, O.J. y Rodríguez, J.M. 2009. Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. *Journal of Dairy Research*, 418-425.
- Mathara J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Shin, H.K. y Holzapfel, W.H. 2008. Functional characteristics of Lactobacillus spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 57-64.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Inter American Institute for Cooperation on Agriculture. 2000. La Industria Procesadora de Frutas y Hortalizas en Colombia. En *Agroindustria y Competitividad*, 287-324. Ministerio de Salud de Colombia. "Resolución número 7992 ." 1991.
- Mishra, V. y Prasad, D.N. 2005. Application of in vitro methods for selection of Lactobacillus casei strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 109-115.
- Monroy, M .C., Castro, T., Fernández, F.J. y Mayorga, L.2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por Bacterias probióticas. *Contactos*, 63-72.
- Moussavi, M. y Adams, M.C. 2010. An In Vitro Study on Bacterial Growth Interactions and Intestinal Epithelial Cell Adhesion Characteristics of Probiotic combinations." *Current microbiology*, 327-335.
- Mullis, B. K., Faloona A. F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzimology*, 335-350
- Nualkaekul, S. y Charalampopoulos, D. 2011. Survival of Lactobacillus plantarum in model solution and fruit juices. *Food Microbiology*, 1-38.
- Nueno-Palop, C., y Narbad, A. 2011. Probiotic assessment of Enterococcus faecalis CP58 isolated from human gut. *International Journal of Food Microbiology*, 1-5.
- OMG. 2008. *Guía práctica: Probióticos y Prebióticos*. Organización Mundial de Gastroenterología.
- Ooi, L.G. y Liong, M.T. 2010. Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 2499-2522.

- Ortiz, A., Reuto, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., Gómez, D. y Quevedo-Hidalgo, B. 2008. Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro." *Universitas Scientiarum*, 138-148.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. y Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects." *International Dairy Journal*, 43-52.
- Pereira F.A.L, Maciel C.T. y Rodrigues, S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with lactobacillus casei. *Food Research International*, 1276-1283.
- Pineiro, M. y Stanton, C. 2007. Probiotic Bacteria: Legislative Framework—Requirements to Evidence Basis. *The Journal of Nutrition*, 850-853.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A. y Soccol, C.R. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 111-123.
- Reid, G. 2008. Probiotics and prebiotics - Progress and challenges. *International Dairy Journal*, 969-975.
- Reiff, C., y Denise, K. 2010. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International Journal of Medical Microbiology*, 25-33.
- Ripamonti, B., Rebucci, R., Stella, S., Baldi, A., Savoini, G., Bersani, C., Bertasi, B., Panteghini, C. y Cantoni, C. 2007. Screening and selection of lactic acid bacteria from calves designing a species-specific probiotic supplement. *Italian Journal Animal Science*, 350-352.
- Rivera, E.Y. y Gallardo, Y.N. 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 1-11.
- Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*, 396-402.
- Rondón, A.J., Samaniego, L.M., Boucourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M.J., Laurencio, M. y Pérez, M. 2008. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas lactobacillus procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 53-63.
- Ruiz, M.S., Martín A., Benito, M.J., Nevado, F.P. y Córdoba, M.G. 2008. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 715-721.
- Saarela, M., Alakomi, H.L., Puhakka, A. y Mättö, J. 2009. Effect of the fermentation pH on the storage stability of Lactobacillus rhamnosus preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *Journal of Applied Microbiology*, 1204-1212.

- Saarela, M., Alakomi, H.L., Mättö, J., Ahonen, M.H. y Tynkkynen, S. 2011. Acid tolerant mutants of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* with improved stability in fruit juice. *LWT- Food Science and Technology*, 1012-1018.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 111-123.
- Sablon, E., Contreras, B. y Vandamme, E.J. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria : mode of action, genetics and biosynthesis. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 21-60.
- Samot, J., Lebreton, J. y Badet, C. 2011. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Anaerobe*, 69-72.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N. y Traore, A.S. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 174-179.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T. y Willem M.V. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current opinion in biotechnology*, 204-211.
- Schillinger, U., y Lücke, F.K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 1901-1906.
- Shah, N.P., Ding, W.K., Fallourd, M.J. y Leyer, G. 2010. Improving the Stability of Probiotic Bacteria in Model Fruit Juices Using Vitamins and Antioxidants. *Journal of Food Science*, M278- M282.
- Sheehan, V.M., Ross, P. y Fitzgerald, G.F. 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 279-284.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. y Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. *Appetite*, 456-467.
- Slover, C., Danziger, L. 2008. *Lactobacillus*: A review. *Clinical Microbiology Newsletter*, 23-27.
- Song, T.S., Kim, J.Y., Kim, K.H., Jung, B.M., Yun, S.S. y Yoon, S.S. 2010. In vitro evaluation of probiotic lactic acid bacteria isolated from dairy and non-dairy environments. *Food Science Biotechnology*, 19-25.
- Sumeri, I., Arike, L., Stekolštšikova, J., Uusna, R., Adamberg, S., Adamber, K. y Paalme, T. 2010. Effect of stress pretreatment on survival of probiotic bacteria in gastrointestinal tract simulator. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 1925-1931.

- Szabo, N.J., Dolan, L.C., Burdock, G.A., Shibano, T., Sato, S.I., Suzuki, H., Uesugi, T., Yamahira, S., Toba, M. y Ueno, H. Safety evaluation of *Lactobacillus pentosus* strain b240. *Food and Chemical toxicology*, 251-258.
- Taheri, H., Tabandeh, F., Moravej, H., Zaghari, M., Shivazad, M. y Shariati, P. 2009. Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. *African Journal of Biotechnology*, 5833-5837.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C. y Holzapfel, W.H. 2009. Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 28-33.
- Tamekar, D.H. y Bhutada, S.A. 2010. An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. From milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Research in Science and Technology*, 82-88.
- Tilsala, T.A. y Alatossava, T. 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 49-56.
- Tursi, A., Brandimarte, G., Giorgetti, G.M., Elisei, W. y Aiello, F. 2008. Mesalazine and/or *Lactobacillus casei* in maintaining long-term remission of symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Hepatogastroenterology*, 916-920.
- Vicente, A.R., Manganaris, G.A., Sozzi, G.O. y Crisosto, C.H. 2009. Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. *Postharvest Handling: A Systems Approach*, 58-93.
- Vinderola, C. G., y Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 2003: 895-904.
- Wohlgemuth, S., Loh, G. y Blaut, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*, 3-10.
- Yan, B., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y. y ZhangYan, H. 2010. "Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products." *Food Control*, 695-701.
- Yingchun, Z., Zhang, L., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., Han, X., Li, J., Zhang, L. y Lin, Y. 2011. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological Research*, 27-31.
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E. y Hang, Y.D. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 1427-1430.

- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J. y Giraffa, G. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 1033-1040.
- Zamudio, K.L., y Zavaleta, A.I. 2003. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. *Ciencia e Investigación*, 30-35.
- Ziarno, M. y Zaręba, D. 2010. Viability of microflora of market fermented milk products in simulated conditions of conditions of gastric and duodenum. *ACTA*, 227-236.

10. ANEXOS

ANEXO 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ALIMENTOS UTILIZADOS COMO FUENTE DE AISLAMIENTO DE LAS BAL

Fuente de aislamiento	Características
Queso fresco	Producto solido fabricado a partir de leche liquida con adición de coagulantes.
Suero costeño	Producto de origen lácteo, cremoso, obtenido de crema de leche y leche; cultivado con bacterias ácido lácticas que le dan cualidades organolépticas especiales.
Achiras	Producto horneado del que sus ingredientes son; almidon de achira, queso, huevos, mantequilla y cuajada
Repollo "<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i>"	Planta comestible
Brocoli "<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>"	Planta comestible
Coliflor "<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>"	Planta comestible
Totumo	Fruto de la planta de totumo " <i>Crescentia cujetes</i> "
Arroz	Semilla de la planta " <i>Oryza sativa</i> "
Queso Paipa	Producto de origen lácteo, solido, semimaduro y con contenido medio de grasa
Queso crema	Producto de origen lácteo, cremoso mezcla de leche, nata y cultivos lácticos
Harina de maíz	Product que se obtienen de la molienda del grano del cereal.
Tomate de árbol	Fruto de la planta " <i>Solanum betaceum</i> "
Galleta de "cuca"	Producto horneado elaborado a partir de harina de trigo, miel, agua, aceite, levadura, colorantes y bicarbonato.
Almojábana	Producto horneado hecho de harina de maíz, queso campesino, mantequilla, huevo y azúcar.
Pera	Fruto del árbol de " <i>Pyrus communis L.</i> "
Manzana	Fruto del árbol de " <i>Malus sylvestris Mill.</i> "
Sidra	Fruto de la planta " <i>Cucurbita ficifolia</i> "
Papa criolla	Fruto de la planta " <i>Solanum phureja</i> "
Guanábana	Fruto d ela planta " <i>Annona muricata</i> "

ANEXO 2. FORMATO USADO PARA LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS JUGOS DE FRUTA.

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
ANÁLISIS SENSORIAL JUGOS CON ADICIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS**

Fecha: _____

Productos: Jugo de lulo (*Solanum quitense*), jugo de fresa (*Fragaria vesca*) y jugo de mango (*Mangifera indica*).

Pruebe por favor las muestras en el orden que se le dan, e indique su nivel de agrado con cada muestra, marcando el punto en la escala que mejor describe su sentir con el código de la muestra. Sus respuestas serán tratadas de forma confidencial y no serán utilizadas para otro propósito diferente al desarrollo del proyecto. De antemano, le agradecemos por su atención y tiempo.

Califique el sabor y apariencia de los jugos

Muy buena	4
Buena	3
Mala	2
Muy mala	1

CÓDIGO	SABOR (característico de la fruta)	APARIENCIA	OLOR
L145			
L150			
M145			
M150			
F145			
F150			

ANEXO 3. RESULTADOS ESTADÍSTICAS PARA LAS PRUEBAS FÍSICO QUÍMICAS

Anova Resultados de ácidos en el jugo de mango adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	0,02485	0,02485	8,26	0,009
Error	20	0,06021	0,00301		
Total	21	0,08506			

S = 0,05487 R-cuad. = 29,22% R-cuad.(ajustado) = 25,68%

Anova Resultados de ácidos en el jugo de fresa adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	0,002475	0,002475	4,90	0,039
Error	20	0,010105	0,000505		
Total	21	0,012579			

S = 0,02248 R-cuad. = 19,67% R-cuad.(ajustado) = 15,66%

Anova Resultados de acidez en el jugo de lulo adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	0,03617	0,03617	11,67	0,003
Error	20	0,06196	0,00310		
Total	21	0,09813			

S = 0,05566 R-cuad. = 36,86% R-cuad.(ajustado) = 33,70%

Anova Resultados de pH en el jugo de mango adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	0,5865	0,5865	15,22	0,001
Error	20	0,7707	0,0385		
Total	21	1,3572			

S = 0,1963 R-cuad. = 43,22% R-cuad.(ajustado) = 40,38%

Anova Resultados de pH en el jugo de fresa adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	0,2613	0,2613	14,85	0,001
Error	20	0,3519	0,0176		
Total	21	0,6132			

S = 0,1326 R-cuad. = 42,62% R-cuad.(ajustado) = 39,75%

Anova Resultados de pH en el jugo de lulo adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	8,7318	8,7318	176,00	0,000
Error	20	0,9922	0,0496		
Total	21	9,7240			

S = 0,2227 R-cuad. = 89,80% R-cuad.(ajustado) = 89,29%

Anova Resultados de °Brix en el jugo de mango adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	0,213	0,213	0,37	0,549
Error	20	11,463	0,573		
Total	21	11,677			

S = 0,7571 R-cuad. = 1,83% R-cuad.(ajustado) = 0,00%

Anova Resultados de °Brix en el jugo de fresa adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	0,098	0,098	0,15	0,706
Error	20	13,399	0,670		
Total	21	13,497			

S = 0,8185 R-cuad. = 0,72% R-cuad.(ajustado) = 0,00%

Anova Resultados de °Brix en el jugo de lulo adicionado con BAL y control

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	0,042	0,042	0,09	0,768
Error	20	9,536	0,477		
Total	21	9,579			

S = 0,6905 R-cuad. = 0,44% R-cuad.(ajustado) = 0,00%