



**DESARROLLO DE UN HELADO ARTESANAL SUPLEMENTADO CON
PROBIÓTICOS.**

Estudiante

Angie Cecilia Pantoja Fajardo

Directora

Deyci Rocio Rodríguez Cordero

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar por el título de

**MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ DC.
NOVIEMBRE 2019**

**DESARROLLO DE UN HELADO ARTESANAL SUPLEMENTADO CON
PROBIÓTICOS**

Presentado por

Angie Cecilia Pantoja Fajardo

Deyci Rocio Rodríguez Cordero

DIRECTORA

Ana Karina Carrascal Camacho

PAR EVALUADOR

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N°13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

GRADECIMIENTOS

A Dios por darme fortaleza y ser mi guía durante este camino. A mis padres, por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por ser uno de los motivos para salir adelante y ser mejor persona. A mis hermanos, Catalina, Fernando y Geraldine por estar en los momentos que más necesite ayuda al estar lejos de mis padres y darme ese apoyo y amor de hogar.

Agradezco mi directora de tesis Deyci Rodríguez, por confiar en mis ideas y ayudarme a forjar durante este proceso, el cual me ayudó para desarrollar mis destrezas, indagar y discutir en cada etapa de este proceso. Por darme la oportunidad de trabajar a su lado durante este proyecto.

A la Profesora Ana Karina Carrascal y al personal del Laboratorio de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana, que hicieron posible, que pudiera desarrollar mi proyecto de trabajo de grado.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. PROBLEMA.....	9
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. MARCO TEÓRICO.....	10
4.1.1 Materias primas e ingredientes:.....	11
4.1.1.1 Materia grasa	11
4.1.1.2 Sólidos lácteos no grasosos.....	11
4.1.1.3 Azúcar.....	11
4.2 Bacterias ácido-lácticas.....	12
4.2.1 <i>Lactobacillus</i>	12
4.2.2 <i>Bifidobacterium</i>	13
4.3 Probióticos.....	14
4.3.1 Mecanismos de un probiótico	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 General.....	19
5.2 Específicos.....	19
6. METODOLOGÍA.....	20
6.1 Preparación y estandarización de la cepa probiótica (Inoculo).....	20
6.2 Elaboración del helado con la adición del probiótico	20
6.3 Evaluación de la viabilidad del probiótico en el helado artesanal.....	21
6.4 Evaluación sensorial del prototipo artesanal con probióticos.....	22
6.5 Análisis estadístico.....	22
7. RESULTADOS.....	23
8. DISCUSIÓN.....	26
9. CONCLUSIONES	31

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos que son considerados como probióticos.	1
Tabla 2. Comportamiento de diferentes especies utilizadas como probióticos.....	4
Tabla 3. Descripción de algunos microorganismos, utilizados como probióticos	18
Tabla 4. Descripción, en gusto según escala asignada.	22
Tabla 5. Conteo de células en diferentes tiempos, con diferentes porcentajes de grasa.....	22
Tabla 6. Puntajes y promedios obtenidos de cada una de las muestras (helado con probiótico y sin probiótico) en los cuatro atributos evaluados.....	24
Tabla 7. Porcentajes obtenidos de cada atributo evaluado, en la escala, referente a excelente, bueno y neutral de las muestras de helado con y sin probiótico	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración del helado artesanal, suplementado con <i>B. bifidum</i>	21
Figura 2. Comportamiento del crecimiento de <i>B. bifidum</i> , en el tiempo de almacenamiento del producto	24
Figura 3. Prueba de correlación de los cuatro atributos evaluados	26
Figura 4. Comportamiento de la media en el recuento de bacterias respecto al tiempo	36

RESUMEN

El consumo por los alimentos que tienen beneficio sobre la salud ha aumentado en los últimos años. Por lo cual, en el mercado nace la necesidad de crear alimentos novedosos, para satisfacer esta exigencia. El helado es un alimento que cuenta con ventajas organolépticas y es consumido por gran parte de la población, al utilizar ésta matriz alimentaria para adicionar microorganismos vivos que, confieren beneficios para la salud, se está creando un producto novedoso y funcional para los consumidores. Este estudio tuvo como objetivo investigar la viabilidad y estabilidad de un cultivo probiótico comercial en un helado artesanal. Para este propósito, se realizó la matriz alimentaria, a la cual se le adicionó *Bifidobacterium bifidum* y se almacenó a temperatura de congelación de -10 °C, durante 30 días. Adicionalmente, para la formulación y activación de la cepa probiótica, se evaluaron dos porcentajes de grasa en la leche (10% y 25%), se definió para el desarrollo de la propuesta trabajar con 25 % la cual permitió mejor crecimiento del microorganismo. Para evaluar la viabilidad del microorganismo probiótico, se siguió la metodología de recuento en placa en medio Man Rogosa Sharpe (MRS), bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C, el recuento, se realizó cada 5 días durante 30 días de almacenamiento. Adicionalmente, se realizó un análisis sensorial del helado artesanal con probiótico, para observar su nivel de aceptación. Los resultados indicaron, que la cepa se mantuvo viable durante los 30 días evaluados, obteniéndose una concentración del microorganismo de 5.0 UL a los 5 días de ser evaluado. Posteriormente a este tiempo, se observa una reducción del organismo probiótico a los 10 y 15 días con valores de 3.3 UL y 2.2 UL respectivamente. Para ver el comportamiento de los datos del recuento del microorganismo se utilizó la prueba de Fisher. A partir de una prueba descriptiva por atributos se obtuvo que el helado fue en su mayoría aceptado por las 21 personas encuestadas.

Palabras claves: Probióticos, alimentos funcionales, helados, viabilidad, estabilidad.

1. INTRODUCCIÓN

En el mercado existen variedad de productos, incorporados con microorganismos probióticos, Soares et al., 2019 evaluó la viabilidad de cepas como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Bacillus*, con propiedades probióticas en diferentes matrices de alimentos, tales como queso crema, jugo de naranja y pan, mostrando su comportamiento respecto a la viabilidad a lo largo de su vida útil. Obteniéndose resultados en la viabilidad, la cual no se veía afectada respecto a la matriz alimentaria utilizada como vehículo de estos microorganismos, la diferencia radicaba en la cepa que se utilizaba, *Bacillus* mostró mayor viabilidad frente a *Bifobacterium* y *Lactobacillus*. Sin embargo, mientras se desarrollan alimentos probióticos, es importante la selección de un sistema alimentario adecuado para administrar probióticos. La introducción de producto artesanal, perteneciente a la gastronomía de la región de Nariño, con la formulación del helado de paila, el cual cuenta con ventajas favorables en sus características organolépticas adicional dentro de sus ingredientes se ofrecen propiedades nutricionales para el crecimiento del microorganismo probiótico. Dependiendo de los ingredientes utilizados, los helados se pueden clasificar en cuatro categorías, los que son hechos exclusivamente de productos lácteos, los que contienen grasa vegetal, los que son hechos a base de jugo de fruta con grasa de leche y sólidos de leche sin grasa. Por último, los que son hechos a base de agua, azúcar y concentrado de fruta. Los dos primeros tipos de helado representan aproximadamente la producción mundial total en un 80-90%. Los helados, desde el punto de vista estructural son alimentos complejos, los cuales pueden definirse como una espuma parcialmente congelada, que contienen un porcentaje de aire entre el 40- 50% en volumen, con adiciones de grasa en forma emulsionada y cristales de hielo dispersos en congelación [2].

Por lo tanto, para que el producto garantice que proporciona un contenido adecuado de microorganismos, las células deben sobrevivir en el proceso de congelación de almacenamiento, durante periodos de tiempo prolongados. Por lo cual, se habla de la viabilidad, la cual está limitada debido a los parámetros intrínsecos, tales como el potencial de óxido reducción, la vulnerabilidad de las bacterias en condiciones ácidas, procesos de agitación y los ingredientes de la mezcla. Además de esto, tampoco se debe afectar la calidad global del producto, tales como la saturación, velocidad de fusión y características sensoriales, éstas deben ser iguales o mejores en comparación con los helados convencionales. Esto significa que su viabilidad y actividad metabólica deben mantenerse en todos los pasos de las operaciones de procesamiento del

alimento, desde la producción hasta su ingesta por parte del consumidor, como la supervivencia en el tracto gastrointestinal [3].

Sobre lo mencionado anteriormente, es importante tener en cuenta que el número de células viables y activas por gramo o mililitro de producto alimenticio en el momento de consumo es el más crítico para los productos, ya que aquí se determina su eficacia. Por lo que es, importante mantener y asegurar una tasa alta de supervivencia de las bacterias probióticas durante la producción, como en la vida útil del producto, para de esta manera mantener la confianza del consumidor. Cabe resaltar que la concentración mínima de un probiótico para que produzca un resultado beneficioso para salud es de 10^6 células viables/ g-mL en el momento de ser consumido [4].

Partiendo de la definición probióticos “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud” (FAO, 2001), como son la actividad antimicrobiana, prevención y tratamiento de la diarrea, alivio de síntomas causados por la intolerancia a la lactosa, actividad anticancerígena y la estimulación del sistema inmunológico [3]. En efecto, como concepto de probióticos, son bacterias utilizadas para mejorar la salud en los humanos. Un ejemplo de estos microorganismos son los lactobacilos y las bifidobacterias, las cuales ayudan a mantener un equilibrio óptimo en el intestino. A medida que las personas envejecen, el número de estas bacterias “buenas” disminuye y hay un aumento en las poblaciones de microorganismos patógenos como *Clostridium*. Estudios han demostrado que *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, producen antibióticos y ácidos orgánicos como el ácido láctico y acético, que inhiben las bacterias Gram negativas. También algunas investigaciones han sugerido que los microorganismos probióticos juegan un papel importante en el metabolismo del colesterol, ayudando a disminuir significativamente el colesterol sérico en personas que ingirieron productos fermentados, los cuales tenían *L. acidophilus* y *B. bifidum* [6].

La preferencia alimentaria ha aumentado continuamente en el mundo a medida que el progreso científico, habla sobre la conexión entre la nutrición y la salud. Ciertamente, hoy en día los consumidores han creado una relación directa, entre los alimentos y la salud. Por lo cual la demanda de los consumidores, por alimentos saludables y los métodos de producción de estos han cambiado considerablemente. Por lo tanto, se buscan alimentos que no solo satisfagan una necesidad, sino que suministren nutrientes para el cuerpo humano, tendiendo efectos positivos en la salud física y mental, para así prevenir enfermedades. Es aquí, donde nace la brecha por la

creación de alimentos funcionales, este término se aplica generalmente a productos alimenticios que tienen efectos fisiológicos beneficiosos en el cuerpo. Según Dinkci *et al.*, 2019, un alimento se puede considerar funcional si se ha demostrado satisfactoriamente que afecta de manera beneficiosa una o más funciones objetivas en el cuerpo. Se han introducido 500 productos alimenticios probióticos en mercado global durante las últimas décadas. En consecuencia, es necesario tener conocimiento de las operaciones que se utilizan actualmente en un producto alimenticio específico y la influencia, positiva o negativa, sobre la supervivencia de los microorganismos que son utilizados como probióticos [7]. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad y concentración de un probiótico incorporado en un helado artesanal.

2. PROBLEMA

El helado de paila hace parte de la gastronomía Nariñense. La fabricación casera se hace en pailas de cobre. Esta tradición nació específicamente de las regiones de las altas montañas de este departamento, los indígenas extraían el hielo de los nevados Cumbal y Chiles. Estos bloques eran utilizados para la elaboración de este producto. A lo largo del tiempo se fue comercializando en la mayoría de las regiones y es tradicional encontrarlo los fines de semana alrededor de las plazas de los pueblos. En el año 1999, nace la idea de traer la formulación artesanal, a escala industrial, que no sólo se pueda consumir los fines de semana, sino que sea más factible encontrarlo en ciertos puntos de venta. La comercialización de este producto en una nueva presentación tuvo una gran demanda por parte de los consumidores de la mayoría de la región. Darle un valor agregado a este producto, utilizándolo como vehículo para la adición de probióticos, los cuales, según varios estudios han sido reportados que tienen algunos beneficios para la salud, al ser el helado un producto congelado es necesario evaluar que tan viable y estable, se mantiene el microorganismo utilizado como probiótico en el tiempo de almacenamiento.

3. JUSTIFICACIÓN

Al adicionar un probiótico en una matriz alimentaria diferente a los comúnmente disponibles en el mercado. El helado, específicamente el artesanal, proveniente de la región de Nariño, es atractivo para los consumidores, ya que cuenta con buenas características organolépticas y textura agradable, convirtiéndose en un producto que puede ser consumido por niños, adolescentes, adultos y ancianos. Al ser este un producto consumido por toda la población es necesario que además de satisfacer una necesidad de gusto, pueda también aportar beneficios a

la salud de las personas que lo consumen. Esto se podría lograr con la incorporación de microorganismos que actúen como probióticos, los cuales según estudios realizados previamente han sido reportados que tienen una variedad de beneficios para la salud. En otros países como España, Cuba, México, se ha reportado una amplia gama de estudios sobre helados con probióticos. Sin embargo, en Colombia las publicaciones en este tema no son abundantes, por ende, se busca realizar un helado el cual cuente en su formulación con la adición de un probiótico, que en un futuro pueda ser comercializado. Se ha elegido microorganismo probiótico *B. bifidum*. debido a que es una de las especies más estudiadas, por lo cual se encuentra información en cuanto a sus variables de crecimiento. Adicionalmente, ha sido reportado, como uno de los probióticos utilizados en matices alimentarias como yogures congelados, helados, panes, galletas, jugos de fruta pasteurizados, quesos, entre otros [9, 10, 11, 12].

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Helado:

El origen del helado se considera nació en China y luego se extendió por la India, a las culturas persas y después a Grecia y Roma. Sin embargo, aparece públicamente en los mercados de París en 1774, en New York y Pensilvania en 1774 y 1780. No obstante, quien realmente fundó la primera fábrica de helado fue Jacob Fussell en 1851, por esto es considerado el padre de esta industria. Según lo mencionado anteriormente, el helado es conocido como uno de los productos lácteos de mayor antigüedad. En 1913, la industria heladera, debido al auge que había manejado, logró obtener la patente del método de congelación por expansión directa y por ende se utilizó para la fabricación de los congeladores de helados [12]. El helado es un alimento valioso que contiene componentes que son altamente nutritivos para la salud humana, porque está compuesto de leche, que es una fuente de proteínas algunas vitaminas y minerales [13].

Por lo tanto, el helado es un complejo sistema congelado, el cual es elaborado de la mezcla de productos lácteos, con el porcentaje de grasa, sólidos no grasos deseados. Igualmente, con la suma de ingredientes como lo son el azúcar, sabor, color, estabilizante, trozos de frutas entre otros. Todos estos componentes son mezclados y tratados de manera adecuada constituyendo a la preparación de un helado que es conocido comúnmente como mezcla. Es un sistema coloidal que es caracterizado por ser termodinámicamente inestable [12, 13].

Sobre los helados cremosos, se consideran como postres lácteos congelados que dentro de su contenido incluye las grasas lácteas. La composición está regulada por la legislación de muchos países y varía ampliamente. Por ejemplo, en Estados Unidos, los helados deben tener niveles de grasa de 10% este aumenta dependiendo de si son helados premium o súper Premium 12% y 14% respectivamente. En Reino Unido, la grasa debe ser no menor al 5% y 2,5 % de sólidos de la leche. Frecuentemente se agregan diferentes aditivos y condimentos como nueces y chocolate, para crear variedad [14]. En Colombia, según la NTC 1239 de 2002 los porcentajes permitidos de grasa total, láctea 10-4%, vegetal 6%. Para sólidos de la leche 36- 27% [15].

4.1.1 Materias primas e ingredientes:

Dentro de su composición se encuentran los lípidos, agua, azúcar, saborizantes, colorantes, emulsionantes, estabilizantes, leche y minerales. Están separados por tres interfaces: sólidos-líquidos, sólido- aire, y aire- líquido. Cada uno de los componentes desempeñan un papel esencial, tanto en la elaboración, conservación y textura final del producto.

4.1.1.1 Materia grasa

La grasa de la leche es uno de los compuestos más importantes del helado, debido a su alto valor alimenticio, la atribución de este compuesto en lo que se refiere a textura, sabor, resistencia a derretirse y la estabilidad que le proporciona. Además, aumenta la viscosidad y no afecta el punto de congelación del helado. La grasa constituye aproximadamente el 10 al 15% en una mezcla de helado, esta puede ser de leche o vegetal. La grasa de leche se utiliza en forma de leche entera, crema, mantequilla o grasa de leche adherida y la vegetal puede ser de aceite de coco refinado o hidrogenado, de igual manera se puede utilizar aceite de semillas de palma [16]

4.1.1.2 Sólidos lácteos no grasos

Son proteínas como la caseína y sales minerales derivadas de la leche entera, desnatada, condensada, en polvo o suero en polvo. Estos tienen un alto valor nutricional, además, ayudan a estabilizar la estructura del helado, ya que, tienen un efecto emulsionante y aglutinante. El efecto mencionado anteriormente, tiene una influencia positiva en la distribución del aire en el helado durante el proceso de congelación, mejorando así la cremosidad [16].

4.1.1.3 Azúcar

Esta es añadida a la mezcla del helado para aumentar el contenido de sólidos y darle el nivel de dulzor que prefieren los consumidores. El porcentaje de este ingrediente en la mezcla esta entre

el 12 y 20%. La consistencia del helado también puede ser ajustada seleccionando diferentes tipos de azúcares. Estos pueden ser monosacáridos como la glucosa y dextrosa, disacáridos como sacarosa y lactosa, por último, los derivados del almidón, es decir el jarabe de glucosa y fructuosa [16].

4.2 Bacterias ácido-lácticas

El valor nutricional, las cualidades organolépticas y la vida útil de los alimentos aumenta con la fermentación. Las bacterias Gram positivas pertenecientes a este grupo son bacilos, cocos, cocabacilos, anaerobios facultativos, no formadoras de esporas, oxidasa y catalasa negativo [17]. En la actualidad se ha descubierto una variedad de bacterias ácido lácticas, sin embargo, los géneros pertenecientes a este grupo más reportados son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pedococcus*, *Propionobacterium* y *Bifidobacterium*. Se encuentran de manera natural o se agregan de manera deliberada como microorganismos indicadores en leche sin pasteurizar y en productos lácteos como quesos, yogures y leches fermentadas. Géneros como *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pedococcus*, se encuentran de manera común en material vegetal y se utilizan para la fabricación de productos vegetales fermentados, como salsa de soja. Además, las bacterias ácido-lácticas tienen uso en productos de origen cárnico como los cabanos o productos madurados, el efecto que tienen en estos productos es en el sabor, textura y su vida útil. Los alimentos tradicionales fermentados por este grupo de microorganismos han sido reconocidos como seguros, según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) [18].

4.2.1 *Lactobacillus*

Es uno de los más utilizados en la industria de alimentos y, en la actualidad. El crecimiento de estos se ve afecto por condiciones como el pH, temperatura, formulación de medios entre otros. También se ha reportado que el alimento al cual va a hacer adicionado puede influir en su desarrollo y funcionalidad. El género *Lactobacillus*, puede crecer en rangos de pH de ácido bajo a valores neutros y temperaturas de 2 a 53°C con un óptimo de 30-40°C y con rango de pH óptimo de 5.5 y 6.2. Sin embargo, para que el metabolismo y la actividad proteolítica sea exitosa cuando es adicionada a los alimentos depende de la especie de la cepa, de las posibles interacciones con otras bacterias y el pH de la matriz alimentaria. Además, la presencia de oxígeno y las temperaturas de fermentación y almacenamiento también afectan la viabilidad microbiana. El rango óptimo de desarrollo de los microorganismos depende de los parámetros

físicos y químicos del sustrato. Finalmente, para evaluar el crecimiento, es necesario conocer los sustratos aplicados para el crecimiento de la bacteria [19].

4.2.2 *Bifidobacterium*

Tissier en 1990 fue el primero en aislar una especie de *Bifidobacterium* (*Bacillus bifidus communis*) de heces de un bebe recién nacido. A menudo, estos microorganismos se incluyen en el grupo de las bacterias ácido-lácticas, a pesar de que son filogenéticamente distintas, Sin embargo, las Bifidobacterias producen ácido láctico como uno de sus productos finales en su metabolismo. La familia *Bifidobacteriaceae* incluye los géneros *Gardnerella* y *Bifidobacterium*, y pertenece a la clase phylum y cognominal de Actinobacteria, dentro de la cual forman un orden distinto: las Bifidobacteriales. Son bacterias heterofermentativas, no móviles, catalasa negativa, no producen CO₂, Gram positivas, tienen en su ADN un porcentaje de 42- 67% de GC. Su morfología son bacilos definidos o irregulares en forma de V o Y, asemejados a ramas. La mayoría de las especies son anaerobios obligados, pero especies como *B. psychraerophilum*, *B. scardovii* y *B. tsurumiense*, son capaces de tolerar el O₂ y crecer en condiciones aeróbicas. Las temperaturas máximas y mínimas son 25°C y 45°C respectivamente. Es importante mencionar que *B. psychraerophilum* puede crecer a 8°C y *B. thermacidophilum* puede crecer a 49.5 °C. Finalmente, con base al pH, para su crecimiento óptimo es 6.5- 7.0 [20].

Varias cepas del género *Bifidobacterium* han sido comercializadas y generalmente están disponibles en el mercado como componentes funcionales de las bebidas probióticas base de lácteos. La mayoría de este género son sacarolíticas y se cree, juegan un papel importante en la fermentación de carbohidratos en el colon. Se han reportado que pueden fermentar varias fuentes de carbono complejas, como la mucina gástrica, los xilo-oligosacáridos, los trans galacto oligosacáridos, pectina y otros oligosacáridos derivados de plantas. En general, las bacterias intestinales degradan carbohidratos poliméricos en oligosacáridos de bajo peso molecular, que posteriormente pueden degradarse en monosacáridos mediante una amplia gama de enzimas, como las β -galactosidasas. En el caso de *Bifidobacterium*, los monosacáridos se convierten en intermediarios de la vía Fructuosa 6- fosfato. También, hay formación de ácidos grasos de cadena corta y otros compuestos orgánicos, los cuales son beneficiosos para el huésped, ya que, el contenido de calorías en estas moléculas es alto. Son adsorbidos por los colonocitos y epatocitos, donde se metabolizan y son utilizados como fuente de energía y tienen la capacidad de inducir enzimas que promueven la restitución de la mucosa [20].

En la vía de fermentación de *Bifidobacterium*, se producen 3 moles de ácido acético y 2 moles de ácido láctico por dos moles de glucosa consumida. Generándose, una relación molar teórica de ácido acético– ácido láctico 3:2 [4]. El grupo "humano" de especies de bifidobacterias incluye principalmente las que se detectaron en el intestino o las heces de adultos o lactantes, e incluye *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium angula* [20].

De hecho, la cepa de *Bifidobacterium*, al igual que el de todas las cepas, se debe controlar la supervivencia de estos durante el procesamiento y el almacenamiento en los alimentos usados como vehículo. El número ideal establecido universalmente, los niveles de 10^6 UFC/g y 10^9 UFC/g son comúnmente aceptados. Adicional, de la supervivencia probiótica en el producto final, las características sensoriales se identifican como un factor importante para influir en la aceptación de los [21].

4.3 Probióticos

En 1908 Metchnikoff, consideraba que la longevidad de las personas se relacionada a la alta ingesta de productos lácteos fermentados, por lo cual sugirió los beneficios de las bacterias lácticas, debido a su asociación con los seres humanos. Sin embargo, la palabra probiótico en 1953 Kollath, fue el primero en introducir el termino "probiótico", la cual se deriva del idioma griego, que significa "para toda la vida". En 1965 Lilly y Stillwell, afirman que los probióticos son sustancias producidas por organismo que promueven el crecimiento de otros microorganismos [22]. Por ende, los probióticos ha sido definidos originalmente como microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos. En los últimos años está definición ha venido cambiando y han sido denominados como cultivos mono o mixtos de microorganismos vivos que, cuando se aplican a un hombre o animal, afecta de manera beneficiosa al huésped para mejorar la microbiota. En cuanto a la definición que se le asigna en relación con los alimentos, se consideran preparaciones viables en alimentos o suplementos dietéticos para mejorar la salud de los humanos y animales. Finalmente, según una definición de un grupo de trabajo 'Instituto Federal Alemán de Salud y Protección del Consumidor y Medicina Veterinaria' (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin-BgVV- actualmente el Instituto Federal de Evaluación de Riesgos, es decir, Bundesinstitut für

Risikobewertung, BfR). Se han reportado un número considerable de microorganismos, en la Tabla 1, se encuentran algunos géneros y especies que son considerados como probióticos [2].

Tabla 1. Microorganismos que son considerados como probióticos.

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Otros</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Enterococci</i>	<i>spp.</i>	<i>microorganismos</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Bacillus cereus var. Toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>		<i>B. bifidum</i>	<i>(boulardii)</i>
<i>L. delbrueckii spp.</i>			
<i>Bulgaricus</i>		<i>B. breve</i>	
<i>L. fermentum</i>		<i>B. infantis</i>	
<i>L. gallinarium</i>		<i>B. longum</i>	
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. helveticus</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. salivarius</i>			

Las cepas utilizadas como probióticos deben cumplir con características como la rápida fermentación de la leche sola o combinada con otras cepas; por ende, la multiplicación debe ser alta y debe tolerar el ácido láctico para mantener la viabilidad durante el almacenamiento del producto. En cuanto a las características sensoriales deben ser aceptables para los consumidores. Finalmente, tienen que sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal, en grandes cantidades. Además, de las características funcionales, también deben cumplir requisitos fisiológicos técnicos e “*in vitro*” [23].

Principales propiedades técnicas y de estabilidad con las que debe contar un probiótico.

- Capacidad de mantener la viabilidad verificada.
- Buen perfil de acidez.
- Mantenimiento de propiedades colonizadoras durante todo el procesamiento y almacenamiento.
- Identificación y combinación de cepas adecuadas.
- Estabilidad y ningún daño molecular y / o estructural siguiendo el método de preparación.
- Impacto de la formulación / producto probiótico final en los efectos funcionales.
- Capacidad de deformación y estabilidad de las características deseadas durante el procesamiento, el almacenamiento y el suministro.
- Viabilidad en poblaciones altas.
- Propiedades organolépticas y tecnológicas deseables cuando se incluyen en procesos industriales.

Viabilidad durante almacenamiento y supervivencia en el recorrido del tracto gastrointestinal de un probiótico

Para ejercer el efecto durante el recorrido gastrointestinal, el probiótico debe llegar en cantidades suficientes, dado que debe sobrevivir a condiciones como el pH del estómago, resistir la degradación de las enzimas hidrolíticas y las sales biliares en el intestino. Por esto, el objetivo es producir cepas con altas capacidades de reproducción, sea por fermentación del producto crudo o por producción de biomasa. La viabilidad y la actividad fisiológicas son importantes, debido a que los productos ofrecidos en los mercados, que cuentan con propiedades probióticas, deben cumplir con criterios mínimos de 10^6 y 10^7 UFC/mL, ya que, lo sugerido como dosis terapéutica mínima es de 10^8 y 10^9 células viables en total. Los alimentos que cuenten con probióticos dentro de sus ingredientes deben ser viables y mantener su actividad durante el tiempo establecido [2].

Parámetros por considerar al agregar probióticos en un alimento:

- Tipo de cepa a utilizar.
- Nivel de adición requerido para obtener un efecto fisiológico.
- Supervivencia al procesamiento del producto.

- Estabilidad durante el almacenamiento.
- Efecto sobre las propiedades sensoriales.
- Tratamientos térmicos.
- Exposición al oxígeno, peróxido de hidrógeno.
- Ambientes ácidos.
- Bacteriocina.

La selección de cepas es importante debido a que, esta debe cumplir con características tales como que cuenten con niveles de resistencia a los ácidos, para así soportar el estrés del ácido del estómago. Además de esto, debe soportar condiciones de almacenamiento durante periodos de tiempo prolongados. Existen condiciones que pueden ayudar a contrarrestar las desventajas que se presentan para las cepas dentro del producto, una de estas es la adición de factores que promueven el crecimiento, tales como el almidón y los oligosacáridos, modulación de las condiciones de empaque, como excluir el oxígeno, el uso de azúcares prebióticas como oligofructosas o inulina, para prevenir la acidificación. Otros métodos para aumentar la supervivencia de las cepas, métodos de procesamiento, terminar la fermentación a un pH más alto, bajar temperatura de almacenamiento a de 3-4 °C, aplicar presión hidrostática (200-300 MPa durante 10 min a temperatura ambiente) o choque térmico (58 °C durante 5 min) [24].

Las cepas reportadas que cumplen con dichas características son *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* o *Lactococcus lactus*, aportan a los productos fermentados buena textura, características sensoriales y buenas supervivencia cuando es almacenado en frío. En otras cepas como *L. acidophilus*, *L. lactis* y *L. paracasei* la fermentación se da de manera rápida a 30 °C como a 37 °C, tienen una alta viabilidad durante el almacenamiento a temperatura de refrigeración, dando como resultado productos con firmeza, cohesión y consistencia, cuando los cultivos son puros, algunos ejemplos se representan en la Tabla 2 [2] [9].

Tabla 2. Comportamiento de diferentes especies utilizadas como probióticos.

Microorganismos	Resistencia al		Resistencia a bajas
	azúcar	Resistencia al oxígeno	temperaturas
<i>Bifidobacterium</i>	R	R	R

<i>B. bifidum</i> (Bb12)	-	-	R
<i>B. infantis</i> (1912)	-	R	R
<i>B. lactis</i> (BLC-1)	-	-	R
<i>B. langum</i> (Bb-46)	S	S	S
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. acidophilus</i> (2401)	-	-	S
<i>L. acidophilus</i> (DD910)	-	-	R
<i>L. acidophilus</i> (La5)	R	R	S
<i>L. acidophilus</i> (L10)	-	-	R
<i>L. casei</i> (Lc 01)	R	R	R
<i>L. johnsoni</i> (La 1)	R	-	R
<i>L. paracasei</i> subesp <i>paracasei</i> (LCSI)	-	-	R

4.3.1 Mecanismos de un probiótico

Cuando tejidos como la musculatura intestinal y la circulación se ven afectados, se provoca una ineficiencia en la función gastrointestinal, debido a la disminución de la actividad de las enzimas digestivas. Esto, puede corregirse con la introducción de la microbiota intestinal. Sin embargo, al consumir especies que han sido reportadas como beneficiosas, se ha conseguido una mejora en la absorción de nutrientes, el suministro de sangre intestinal y el sistema nervioso entérico al regular la expresión de genes relevantes. En cuanto a las funciones de los componentes humorales y celulares del sistema inmunitario intestinal, requieren de la presencia de flora intestinal. De la misma forma las bacterias probióticas parecen tener actividades antiinflamatorias, ya que, aumenta la producción del factor de crecimiento transformante β y la interleucina 10 in vivo. Las citoquinas antiinflamatorias contrarrestan la permeabilidad intestinal y alergia a los alimentos. Igualmente, los probióticos mejoran la respuesta de IgA específicas para el intestino, en personas que son alérgicas a los alimentos, también tiene un papel protector contra las infecciones intestinales [2]. Sin embargo, estudios revelan que para cada especie, el mecanismo de estos varia. En la tabla 3, se representan algunos ejemplos de como estos actúan específicamente [25].

Tabla 3. Descripción de algunos microorganismos, utilizados como probióticos.

Especies	Naturaleza	Mecanismo
<i>Lactobacillus</i>	Gram-positivo, anaerobio facultativo o microaerofílico, en forma de barra.	Producción de enzimas que dirigen y metabolizan proteínas o carbohidratos, sintetizan complejo de vitamina B, vitamina K y facilitan la descomposición y las sales biliares.
<i>Bifidobacterium</i>	Gram positivo, no móvil, a menudo ramificados, anaerobio, en forma de varilla.	Metabolizan la lactosa, generan iones lácticos a partir de ácido láctico y síntesis de vitaminas. Fermentación de carbohidratos no digeribles y producen ácidos grasos de cadena corta.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Gram positivo, anaerobio facultativo, cocos en cadena.	Metabolizan la lactosa, mejoran la intolerancia a la lactosa y tienen actividad antimicrobiana.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la viabilidad y estabilidad de un probiótico comercial incorporado a una mezcla de helado artesanal.

5.2 Específicos

- Elaborar un helado artesanal a base de leche y nutrientes requeridos para adición del probiótico.
- Establecer la concentración del cultivo probiótico *Bifidobacterium bifidum*. en la mezcla de helado artesanal.
- Determinar la viabilidad y estabilidad del cultivo probiótico durante el tiempo de vida útil estimado para el helado.

6. METODOLOGÍA

6.1 Preparación y estandarización de la cepa probiótica (Inoculo)

La cepa *Bifidobacterium bifidum*, fue adquirida en DALTON BIOTECHNOLOGIE, del lote FE190846, donde su concentración era $\geq 8 \times 10^8$ UFC/g. En cuanto a sus propiedades microbiológicas, esta estaba libre de microorganismos como *Listeria*, *Salmonella*, Hongos y levaduras, *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus aureus*. A partir del probiótico liofilizado se evaluaron diferentes concentraciones, las cuales fueron adicionadas al producto, 0.022g, 0.1g para 1000mL y 250 mL, de mezcla de helado. Se realizó una reactivación de la cepa a 40°C durante 4 horas, en la mezcla de helado. Adicionalmente, se realizaron estandarizaciones del porcentaje de grasa (10% y 25%) mediante el cuadro de Pearson y se evaluó cuál de los dos porcentajes, generaba mayor densidad bacteriana. mediante microscopía. Finalmente, se evaluó el inoculó inicial mediante conteo en placa según la metodología descrita en el protocolo del Manual de métodos microbiológicos APHA [26].

6.2 Elaboración del helado con la adición del probiótico

Se prepararon diferentes volúmenes de helado (250 mL, 500mL y 1000 mL), con variación de diferentes concentraciones en los ingredientes. Para la elaboración del helado se utilizó productos comercialmente seguros, tales como base leche ultra pasteurizada comercial, con alto porcentaje en grasa, con un valor de solidos totales de (Grasa 8 g, Sodio 230 mg, Proteína 8g y Carbohidrato total 12 g), azúcar, crema de leche, esencia de vainilla, canela, banano, vainilla-caramelo y color, posteriormente se homogenizo. En seguida la mezcla se calentó a 40°C, para realizar la respectiva adición del cultivo probiótico (*B. Bifidum*). Se homogenizó y se mantuvo durante 4 horas en baño serológico a 40 °C. Pasadas las 4 horas se incorporó en moldes y se llevó a refrigeración -10°C.

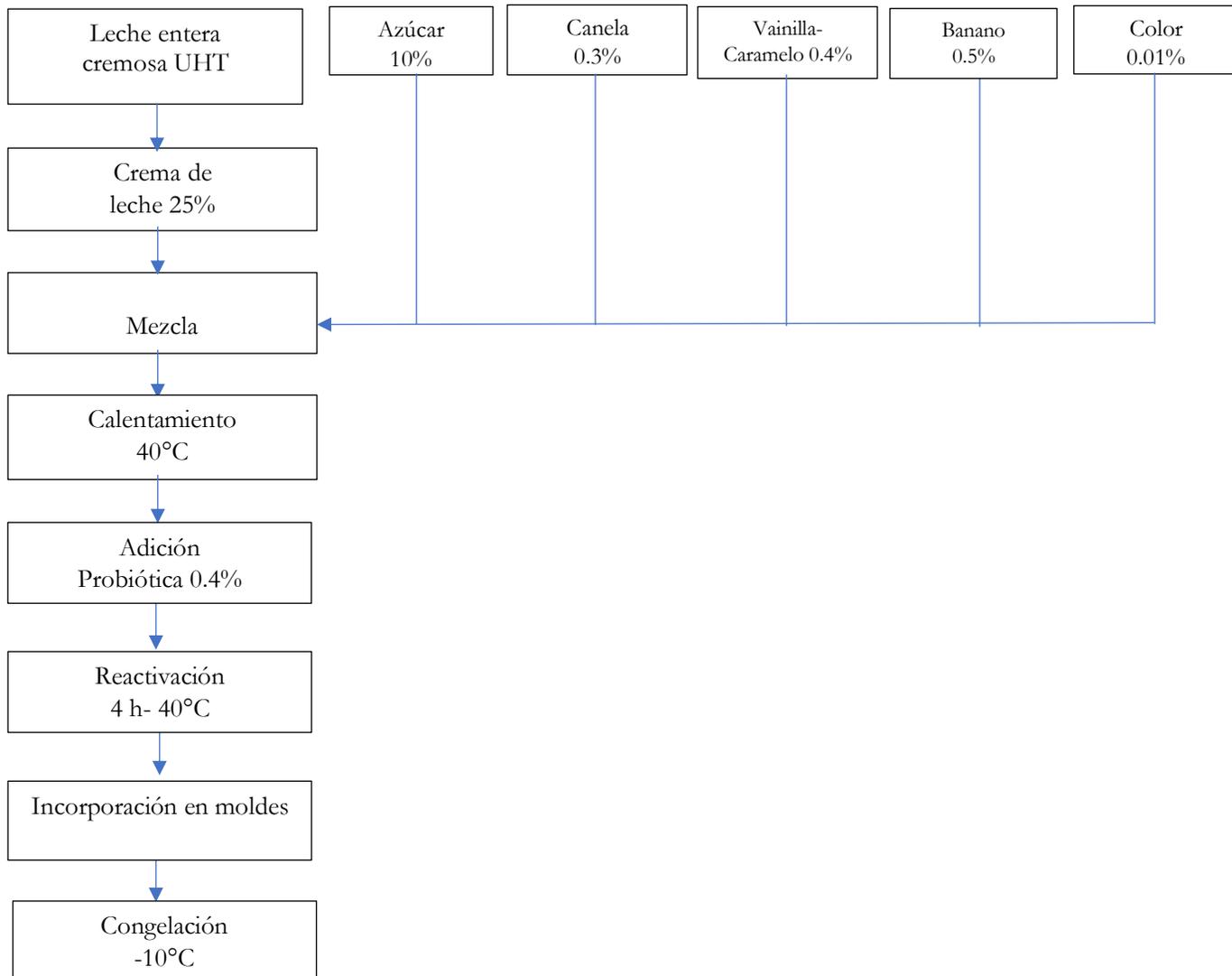


Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración del helado artesanal, suplementado con *B. bifidum*.

6.3 Evaluación de la viabilidad del probiótico en el helado artesanal

Para la determinación de la viabilidad del microorganismo utilizado como probiótico se realizaron recuentos en placa de bacterias viables después de la inoculación y congelación (-10°C), durante 30 días. El análisis se realizó cada 5 días, donde se descongeló las muestras a temperatura de refrigeración. Seguido a esto, se realizó diluciones en base 10, donde se tomaron 10 mL del producto descongelado y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada. Posteriormente, se hizo la siembra en profundidad, tomando 1 mL de cada dilución, se adicionó el medio MRS (OXOID®) fundido en cada caja de Petri y se incubó en condiciones anaeróbicas durante 2

días a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Es importante mencionar que se hizo recuento de células mediante coloración de Gram de la mezcla a los 20 min, 2 h y 4 h. Para la confirmación de las células observadas por microscopia, se sembró en medio MRS, las horas 2 y 4. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los recuentos de unidades formadoras de colonias se convirtieron a Log base 10, con el fin de linearizar los datos [1] [27].

6.4 Evaluación sensorial del prototipo artesanal con probióticos.

Durante el panel sensorial, se eligieron 21 panelistas entre hombres y mujeres. Las muestras, se dividieron en dos, la primera era referente del helado con adición de probiótico y la segunda sin adición de este. Las muestras se codificaron utilizando un número aleatorio de tres dígitos, se sirvieron en porciones (vasos pequeños de polietileno) y se dispusieron en platos de poliestireno expandido debidamente marcados, para evaluar atributos de sabor, textura, color y apariencia. Los cinco atributos se evaluaron mediante una escala de cinco puntos (Tabla 5) [28].

Tabla 4. Descripción, en gusto según escala asignada.

Escala	Descripción
1	No me gusta
2	Me disgusta mucho
3	Ni me gusta, ni me disgusta
4	Me gusta
5	Me gusta mucho

6.5 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante XLSTAT, en el cual se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA con un valor alfa de 0.05.

7. RESULTADOS

Para la elaboración e incorporación del probiótico se realizaron ensayos preliminares de estandarización de sus componentes, específicamente el porcentaje de grasa. En la **Tabla 5** Se evidencian los resultados obtenidos respecto a la evaluación de diferentes porcentajes de grasa (10% y 25%) en la mezcla de helado, en diferentes tiempos (20 minutos y 2 horas) se hizo conteo de células, en 5 campos y se realizó promedio de los campos contados. Obteniéndose valores mayores en porcentaje de grasa al 25% con 10.4 células, respecto a el 10% los valores fueron de 2.6 células a los 20 minutos de incubación.

Tabla 5. Conteo de células en diferentes tiempos, con diferentes porcentajes de grasa.

Tiempo	Porcentaje de grasa	
	25%	10%
20 min	10.4±7.4	2.6±0.5
2h	3.5±1	2±1

Evaluación de la viabilidad del probiótico incorporado en la matriz alimenticia

En la **Figura 2** se encuentran los resultados (Log UFC/mL) para los tiempos evaluados. Se puede observar que el cultivo inició a las 4 horas con 6.6 UL. A los cinco días después de la congelación se obtuvieron valores de 5.0 UL. En el día 10, los valores disminuyeron progresivamente 3.3 UL. A los 15 días 2.2 UL y en los días 20, 25 y 30 el microorganismo se mantuvo estable con valores de 1.1 UL 1.4 UL, 1.5 Log UFC/mL, respetivamente. La variación en el recuento del día 5, se presentó como el valor con mayor coeficiente de variación (0.707), con una variación del 70.7%.

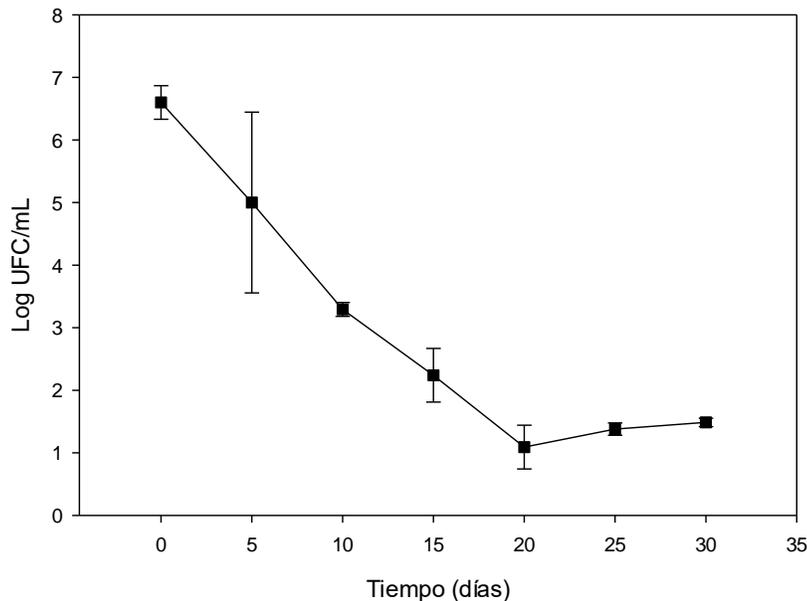


Figura 2. Comportamiento del crecimiento de *B. bifidum*, en el tiempo de almacenamiento del producto.

Asumiendo, supuestos necesarios para un análisis de varianza (ANOVA) se tiene que, dado el valor p asociado al estadístico, el nivel de significación del 5%, la información aportada por las variables explicativas (tiempo) es significativamente mejor que la que podría aportar únicamente la media. La variable del día 5 no es significativa (0.500) para el modelo que trata de presentar el comportamiento del recuento en función de valores en el tiempo. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los tamaños de las muestras son pequeñas, por lo cual se podría deducir que los resultados no son concluyentes. Finalmente, es necesario verificar los resultados en el día 5, dado que los datos de obtenidos del recuento en este día tienen valores estandarizados muy altos (0.35) y de distancia de Cook altos en la primera réplica.

Evaluación sensorial del prototipo artesanal con probióticos.

Para el análisis sensorial se encuestaron a 21 personas, que estaban en un rango de edad entre 18 a 23 años, estudiantes de microbiología de industrial de la Pontificia Universidad Javeriana, de la asignatura de Microbiología de Alimentos. De los 21 encuestados el 14%, eran hombres y el

86% mujeres. Los cuatro atributos se evaluaron mediante una escala de cinco puntos (Tabla 3) en una escala de Linkert.

Tabla 6. Puntajes y promedios obtenidos de cada una de las muestras (helado con probiótico y sin probiótico) en los cuatro atributos evaluados.

Atributo	Puntaje total		Promedio	
	Con Probiótico	Sin probiótico	Con probiótico	Sin probiótico
Sabor	88	97	4.2	4.6
Textura	85	90	4.0	4.3
Color	97	96	4.6	4.6
Apariencia	95	85	4.5	4.1

Al realizar, una prueba de correlación (con el coeficiente de kendall) se encontró en cuanto a la muestra con probiótico, que la correlación mas alta se presento entre las categorias sabor y textura, es decir que existe alta relación entre los parámetros, además siendo positiva lo que significa que a medida que crece la opinion postiva en el sabor la textura aumenta. Tambien se presenta un resultado similar entre la textura y el color. En general entre todos los parametros evaluados para los consumidores potenciales existe una alta correlación. El la **Figura 3A** se muestra lo mencionado anteriormente, cabe resaltar que no hay correlaciones negativas (rojo). En cuanto a los datos obtenidos del helado artesanal sin probiótico **4B**, se ve una mejor correlación entre los individuos, es decir que a medida que aumenta la apreciación en un parámetro crece en el otro. Las correlaciones están por encima de 0.8 (verde).

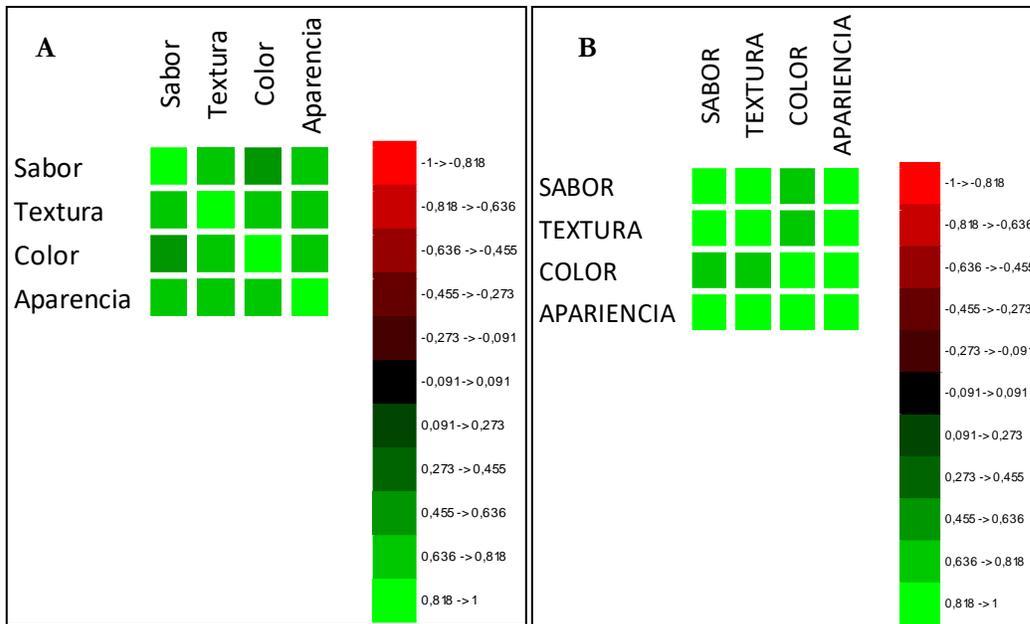


Figura 3. Prueba de correlación de los cuatro atributos evaluados. A) Muestra de helado con adición de probiótico. B) Helado sin probiótico.

8. DISCUSIÓN

La viabilidad, de las bacterias probióticas cuando son agregadas a una matriz alimentaria, particularmente en el helado, depende de varios factores, como el tipo de cultivo, concentración de esté, acidez, almacenamiento, preservantes, esencias y colorantes. En un estudio realizado por Dos Santos *et al.*, 2017 evaluaron una especie probiótica en un helado a base una fruta, en la cual una de sus características principales era la acidez. Al evaluar la viabilidad de este microorganismo en el producto, no se vio afectada. La explicación a esto estaba asociada a la temperatura de congelación, debido al bajo movimiento molecular del sistema que limitaba las interacciones entre las moléculas ácidas y las células bacterianas. Adicionalmente, mencionan que *Bifidobacterium* mediante enzimas oxidativas, podía realizar procesos de desintoxicación de H_2O_2 . Sumado a eso, la presencia de compuestos que actúan como crioprotectores de las células bacterianas, presentes en la leche como carbohidratos (lactosa y sacarosa), proteínas (caseína) y grasas [30]. No obstante, en los datos obtenidos experimental, la viabilidad del microorganismo utilizado como probiótico, se vio afectada en el proceso de congelación, obteniéndose valores de 3.3 Log UFC/mL después de 10 días de inoculación. Sin embargo, en un estudio realizado

por Vinderola *et al.*, 2019 mencionan que las células pueden entrar en un estado viable pero no cultivable, estando latentes y metabólicamente activas, en respuesta al estrés en el que se encuentran durante el procesamiento, la formulación y el almacenamiento. Se reportó que tres bacterias probióticas mostraron una reducción en el recuento en placa, pero pudieron mantener la actividad estereasa y la membrana citoplasmática intacta. Las células probióticas aparte de no cultivables estaban activas y tenían resistencia a condiciones de estrés, por lo cual esta información se podría contrastar con los datos reflejados en los días 20, 25 y 30, debido a que se presentó una pequeña variación de aumento en los recuentos bacterianos a los días 25 y 30.

Posiblemente, existieron otros causantes que inhibieron el crecimiento del microorganismo, tales como los compuestos de la mezcla de helado. La canela es un metabolito de la planta *Cinnamomum verum*, que contiene una mezcla compleja de compuestos volátiles y no volátiles. Sumado a estos, tiene compuestos bioactivos, como terpenos, terpenoides y fenoles. El cinamaldehído es el componente principal en el aceite de canela aislado de la corteza de la planta [32]. Las esencias o aceites de canela, ha sido utilizada industrialmente como aromatizante, tanto en la industria alimentaria como cosmética, antioxidante y como agente microbiano [33]. En cuanto, a su mecanismo a este interrumpe las paredes celulares bacterianas induciendo la fuga del citoplasma. Por otra parte, autores como Chuesiang *et al.*, 2019 afirman que la inhibición depende de la estructura de los microorganismos. Las bacterias Gram negativas son más resistentes a los aceites esenciales que las Gram positivas, debido a que su pared celular es hidrofílica, por lo cual se podría discutir, con los datos obtenidos experimentalmente, que este factor no fue uno de los más influyentes en la viabilidad de los microorganismos probióticos, debido a la composición de su pared celular.

De igual importancia, fue la leche utilizada para la preparación de la mezcla de helado ya que, al ser esta una leche comercial, ha sido sometida a procesos de ultra pasteurización, viéndose afectados los compuestos propios de la leche. Esto lo fundamentó un estudio realizado por Simon *et al.*, 2001 donde asociaron estos procesos UHT con la desnaturalización de las proteínas, debido al tratamiento térmico severo, particularmente la lactoglobulina (β -Lg), que interactúa, con la κ -caseína, disminuyendo así los nutrientes esenciales, para el desarrollo metabólico del microorganismo. Asimismo, los alimentos a base de leche cuentan con beneficios frente a otras matrices alimenticias ya que, dentro de su composición fisicoquímica, es rica en proteínas y lípidos, que actúa como una matriz protectora y esto favorece a la supervivencia de los probióticos, no solo en condiciones de almacenamiento, sino bajo condiciones adversas del

estómago. En los datos reportados por Panghal *et al.*, 2018 mencionan que las proteínas de la leche son útiles como una matriz transportadora, y puede actuar de manera eficaz en la protección de las células probióticas. Adicionalmente, mencionan que se ha encontrado que la viabilidad y la funcionalidad de las células, trabajan de acuerdo con un fenómeno llamado “adaptación cruzada”, que establece la preexposición a niveles subletales, lo que permite que las células se adapten a niveles más altos de estrés.

Adicionalmente, el proceso de congelación de un producto tiene efectos significativos en la cantidad de microorganismos probióticos. Una de las razones más importantes, es la tensión mecánica de los cristales de hielo que se forman en el medio externo o interno de las células, causando daño en la membrana celular y por ende origina la condensación de solutos en el medio extracelular e intracelular o la deshidratación de las células. Cabe mencionar que el tamaño de los cristales es otro de los factores limitantes, los cristales que se forman en procesos de congelación lenta causan mayor daño en las células debido a que se acumulan intracelularmente, generando ruptura de las membranas de las células bacterianas, este factor podría ser uno de los principales, causantes de disminuir la población microbiana del probiótico, ya que, al no trabajar con temperaturas de congelación industrializadas, el proceso de congelación se dio de manera más lenta debido a que se trabajó con temperaturas de -10°C a la hora de la congelación del producto, como lo demostró Dinkci *et al.*, 2019. Con lo mencionado anteriormente, se podrían contrastar los datos obtenidos en el día 15, donde la supervivencia de *B. bifidum* se redujo en un 34 %, respecto al inóculo.

El oxígeno disuelto, tiene un efecto negativo en la supervivencia y el crecimiento de las bacterias probióticas, ya que la mayoría de las especies son estrictamente anaerobias. Como es el caso de la cepa utilizada experimentalmente. Existen diferentes maneras en las que el oxígeno, afecta las células del probiótico, una de ellas es la toxicidad directa del oxígeno disuelto, durante el procesamiento y almacenamiento. Según Dinkci *et al.*, 2019 esto se considera como una de las razones principales de la reducción en el número de probióticos debido a que, la ausencia de la cadena de transporte de electrones en estas bacterias impide la reducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno. Sumado a esto, no cuentan con enzimas como la catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno y los niveles intracelulares de este, bloqueando así una de las enzimas esenciales como la fructosa 6 fosfofructocetolasa, la cual es requerida para el metabolismo de azúcares. En conclusión, la muerte celular es causada por la exposición de oxígeno debido a la formación y acumulación de metabolitos oxigénicos tóxicos como el peróxido de hidrógeno

(H₂O₂), anión superóxido (O²⁻), y el radical hidroxilo (OH[·]) en la célula. Sin embargo, en este mismo estudio, se muestra que existe una gran variación según la cepa y la especie. Siendo las bifidobacterias más sensibles al oxígeno que los lactobacilos. Además, mencionan que especies específicas del género *Bifidum*, como *B. bifidum* y *B. longum* su crecimiento fue inhibido por el alto contenido de oxígeno, generándose acumulación de peróxido de hidrógeno. La sensibilidad de estas bacterias al O₂ disminuye la eficiencia en la fermentación un estudio que fundamenta esta ineficiencia se basa en que las bifidobacterias no albergan genes que codifican el complejo enzimático reductor de ROS en sus genomas. Sin embargo, en su estudio descubrieron que *B. bifidum* induce la expresión de un sistema TrxR- Ahpc, el cual tiene respuesta a O₂ y es encargado de degradar H₂O₂ [29]. Adicionalmente, debido al procesos de congelación, el oxígeno queda retenido dentro de la matriz alimentaria, por lo cual, se podría exponer que los microorganismos probióticos no se mostraron afectados, según lo que se menciona inicialmente, algunas células estaban en estado latente, debido a la presencia de oxígeno en los procesos previos a la congelación.

Los probióticos no modifican las propiedades sensoriales de manera intensa, como si lo hacen los cultivos iniciadores a modo de los utilizados como cultivos iniciadores en la fabricación de yogur *Lactobacillus delbrueckii spp. Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que son homofermentativos productores de ácido láctico a partir del metabolismo de la lactosa. *Bifidobacterium* produce ácidos como el acético y el láctico en una proporción de 3:2 [20]. Se conoce que el ácido acético proporciona sabores fuertes que suelen ser desagradables e indeseables en los productos lácteos, por lo cual requieren del uso agentes aromatizantes, para minimizar o enmascara este sabor, que es comúnmente conocido como sabor probiótico. Sin embargo, los probióticos adicionados a una matriz alimentaria como es el helado, posiblemente no presenta problemas derivados del metabolismo microbiano, debido a que el producto es almacenado a bajas temperaturas (-10 °C), por lo que las reacciones bioquímicas de los probióticos se ven minimizadas [37]. A pesar, de lo mencionado anteriormente en la prueba realizada con respecto al análisis sensorial, un porcentaje de 48% votaron por les gustaba mucho más el sabor del helado el cual no tenía dentro de su formulación probiótico, un porcentaje 33% de los consumidores pudieron detectar un sabor en el producto con adición de probiótico inusual, con el de la mezcla control.

Por otro lado, los consumidores están acostumbrados a productos, los cuales dentro de sus características organolépticas cuentan contexturas cremosas. Al ser un helado artesanal, el cual

dentro de su formulación no tiene, conservantes ni espesantes, ni procesos de congelación tecnificados. Este tipo de atributo se pudo afectar, debido a procesos de recristalización, disminución de la aireación, cristalización de la lactosa o la pérdida de la durabilidad del producto, siendo la recristalización uno de los factores que más cambia la sensación gustativa del consumidor. Este fenómeno lo explican [38] mediante dos modelos: fusión y migración. La primera habla de la fusión de pequeños cristales adyacentes en uno grande. Lo cual se ve favorecido por el fenómeno de la formación de enlaces de hidrógeno a partir de moléculas de agua que se difunden entre los cristales. La migración, está asociada con la fusión de pequeños cristales de hielo, que es inducida por un aumento de la temperatura seguido de la congelación del agua derretida en la superficie de los cristales grandes. Este proceso es controlado con estabilizantes los cuales limitan la tasa de crecimiento de los cristales al desacelerar la migración del agua. Al no utilizar en el prototipo artesanal, preservantes posiblemente, la textura se vio afectada y los panelistas votaron 85 y 90 para la mezcla con y sin probiótico, respectivamente. Siendo, estos valores más bajos respecto a los otros atributos evaluados.

Como se puede ver en la apreciación sensorial, ninguna valoración fue negativa (1 o 2). En cuanto los parámetros en este caso de los helados sin probiótico se encontraron que hay mayor dispersión en las opiniones. Siendo el parámetro textura el que presenta una homogeneidad en la opinión. Como se ve en este caso sabor y textura las opiniones fueron exactamente iguales. En cuanto a la comparación de la población de helados con probióticos se tiene hay diferencias significativas entre los parámetros, el parámetro apariencia las opiniones fueron similares. En la categoría de (5) el helado sin probiótico se dio con mayor frecuencia en el helado sin probiótico excepto en la categoría de color.

Finalmente, se puede observar la correlación que se presentó entre los cuatro atributos evaluados. El sabor está relacionado altamente con la textura, al variar el sabor la apreciación en la textura también va a cambiar de manera positiva. De igual manera, se muestra la relación entre la textura y el color. Sin embargo, donde no se mostró relación fue entre sabor y textura, es decir si el sabor del producto varia, los puntajes en cuanto al color no van a cambiar.

9. CONCLUSIONES

- Se evaluó la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium bifidum* incorporado a un helado artesanal durante 30 días, así mismo se aplicó la evaluación sensorial para los principales atributos en comparación con un helado control sin probióticos.
- Se elaboró un helado artesanal siguiendo formulación artesanal con adición de grasa al 25% y se incorporó una cantidad estándar de probiótico para su posterior evaluación de estabilidad durante almacenamiento.
- Se estandarizó el inóculo de la cepa probiótica 0,04% y monitoreo su comportamiento durante almacenamiento por 30 días estableciendo que la concentración del probiótico se redujo drásticamente posterior a los 5 días de almacenamiento.
- El probiótico se mantuvo viable hasta los 30 días evaluados, sin embargo, se observó una reducción de 2 UL posterior a los 5 días de incubación. Adicionalmente en la evaluación sensorial se obtuvo aceptación del producto con probiótico en la población muestreada frente con el helado control sin probióticos.

RECOMENDACIONES

Para futuros estudios se recomienda, tener en cuenta aspectos dirigidos en cuanto a la concentración inicial de producto, la cual empiece en valores superiores a 6.6 UL. En cuanto al proceso de congelación tener en cuenta la temperatura de congelación, sean temperaturas industriales que este en valores de -20C. Finalmente, se recomienda que los tiempos de muestreo sean menores, para tener más robustez en los datos dirigidos al análisis estadístico y así mismo poder observar el comportamiento del microorganismo de forma más minuciosa.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Soares M, Martinez R, Pereira E, Balthazar C, Cruz A, Ranadheera S, Santana A. The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Research International*, 125:108542, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108542>
- [2] Faria J, Cruz A., & Shah P. Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health. *Hanppauge, N.Y.: Nova Science Publishers*, 2011.

- [3] Cruz A, Antunes A, Sousa A, Faria J, Saad S. Ice- cream Inc. as a probiotic food carrier. *Food research international*, 42(9): 12-1239, 2019. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.foodres.2009.03.020>
- [4] Mohammadi R, Mortazavian A, Khosroshavar R, Cruz A. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of microbiology*, 61 (3):411-424. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1007/s13213-010-0188-z>
- [5] Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization e FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria (Report of a joint FAO/ WHO expert consultation, Cordoba, Argentina).2001.
- [6] Hekmat S, Donald J & McMahon Mc. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*, 75(6): 1415-1422, 1992.
- [7] Dinkci N, Akdeniz V, Akalin S. Survival of probiotics in functional foods during shelf life. *Food Quality and Shelf life*, 201-233, 2019
- [8] Hernández A, Guerra Y, Pedroso Y, Pérez H. Desarrollo de un helado de leche con cultivos probióticos. *Tecnología Química*, 34(1):94-101,2014. <https://search-ebshost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=103624849&lang=es&sit e=eds-live>
- [9] Ramos G, Hernández E, Fernández S, Froto M, Vázquez L. Estrategias para mejorar la sobrevivencia de probióticos en un helado. *Ciencias Biológicas y de la salud*, 15(2),2012. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/viewFile/147/139>
- [10] Belgec V, Öksüz N. Artisan strawberry ice cream made with supplementation of *Lactococci* or *Lactobacillus acidophilus*. *Italian Journal of Food Science*, 19:403-401, 2017.
- [11] Fiol C, Prado D, Romero C, Laburu N, Mora M, Iñaki A. Introduction of a new family of ice creams. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 7:5-10,2017. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.ijgfs.2016.12.001>
- [12] Magariños H, Selaive S, Costa M, Flores M, Pizarro O. Viability of probiotic microorganisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb-12) in ice cream.

International. *Journal of Dairy Technology*, 60(2):128-134. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1111/j.1471-0307.2007.00307.x>

[13] Kurt A, Atalar I. Effects of quince seed on the rheological, structural and sensory characteristics of ice cream. *Food Hydrocolloids*, 82:186-195, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.011>

[14]Fernades R. Microbiology Handbook. Leatherhead: Royal Society of Chemistry. 2009 <https://search-ebSCOhost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=519450&lang=es&site=eds-live>

[15]ICONTEC. Norma Técnica Colombiana 1239. Helado y mezcla para Helados. 2002.

[16]Tetrapack. Dairy Processing Handbook: ICE CREAM. <https://dairyprocessinghandbook.com/chapter/ice-cream>

[17]Zhang H, Cai Y. Lactic Acid Bacteria. Fundamentals and practice. 2014. DOI 10.1007/978-94-017-8841-0

[18]Malik A, Erginkaya Z, Ahmad S, Erten H. Food procesing: strategies for quality assessment. *Food Engineering Series*. 2014. DOI 10.1007/978-1-4939-1378-7

[19]Costa M, Fonteles T, de Jesus A, Rodrigues S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimization and product stability. *Food Chemistry*, 139(1–4):261–266,2013. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.foodchem.2013.01.059>

[20]Pokusaeva K, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr*, 6(3):285-306,2011. doi:10.1007/s12263-010-0206-6

[21] Silva P, Bezerra M, Santos KMO, Correia RTP. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Sci Technol*, 62(1):452-457,2015. doi:10.1016/j.lwt.2014.02.055

[22] Vijaya Kumar B, Vijayendra SVN, Reddy OVS. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *J Food Sci Technol*. 2015;52(10):6112-6124. doi:10.1007/s13197-015-1795-2

- [23] Cano Roca, Carmen Lucia. Characterization of Commercial Probiotics: Antibiotic Resistance, Acid and Bile Resistance, and Prebiotic Utilization. *Journal Food Science and Technology*, 46, 2014. <http://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/46>
- [24] Mathipa M & Thantsha M. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathogens*, 9:1–17, 2017. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1186/s13099-017-0178-9>
- [25] Putta S, Yarla NS, Lakkappa DB, et al. *Probiotics: Supplements, Food, Pharmaceutical Industry*. Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/b978-0-12-814625-5.00002-9
- [26] Salfinger, Y., & Tortorello, M. L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHA Press, an imprint of American Public Health Association. Retrieved from. 2015 <https://search-ebSCOhost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/login.aspx?direct=true&db=cab&cat01040a&AN=pujbc.907455&lang=es&site=eds-live>
- [27] Öztürk Hİ, Demirci T, Akın N. Production of functional probiotic ice creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: The comparison of the prebiotic potentials on *Lactobacillus casei* 431 and functional characteristics. *LWT - Food Sci Technol*, 90:339-345,2018. doi:10.1016/j.lwt.2017.12.049
- [28] Da Cunha DT, Assunção Botelho RB, Ribeiro de Brito R, de Oliveira Pineli L de L, Stedefeldt E. Métodos para aplicar las pruebas de aceptación para la alimentación escolar: Validación de la tarjeta lúdica. *Rev Chil Nutr*, 40(4):357-363,2013. doi:10.4067/S0717-75182013000400005
- [29] dos Santos C, Hoffmann J, Zandoná G, Fiorentini Â, Rombaldi C, Chaves F. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. *LWT - Food Sci Technol*. 75:379-385, 2017. doi:10.1016/j.lwt.2016.09.011
- [30] Satoh T, Todoroki M, Kobayashi K, Niimura Y, Kawasaki S. Purified thioredoxin reductase from O₂-sensitive *Bifidobacterium bifidum* degrades H₂O₂ by interacting with alkyl hydroperoxide reductase. *Anaerobe*, 57:45-54,2019 doi:10.1016/j.anaerobe.2019.03.012

- [31]Vinderola G, Reinheimer J, Salminen S. The enumeration of probiotic issues : From unavailable standardised culture media to a recommended procedure ? *Int Dairy J*, 96:58-65, 2019. doi:10.1016/j.idairyj.2019.04.010
- [32]Huang Z, Jia S, Zhang L, Liu X, Luo Y. Inhibitory effects and membrane damage caused to fish spoilage bacteria by cinnamon bark (*Cinnamomum tamala*) oil. *Lwt*, 112:108195, 2019. doi:10.1016/j.lwt.2019.05.093
- [33]Simionato I, Domingues FC, Nerín C, Silva F. Encapsulation of cinnamon oil in cyclodextrin nanosponges and their potential use for antimicrobial food packaging. *Food Chem Toxicol*, 132:110647, 2019 doi:10.1016/j.fct.2019.110647
- [34]Chuesiang P, Siripatrawan U, Sanguandeeikul R, McClements DJ, McLandsborough L. Antimicrobial activity of PIT-fabricated cinnamon oil nanoemulsions: Effect of surfactant concentration on morphology of foodborne pathogens. *Food Control*, 98:405-411, 2019. doi:10.1016/j.foodcont.2018.11.024
- [35]Simon & Hansen A. Effect of Various Dairy Packaging Materials on the Shelf Life and Flavor of Ultrapasteurized Milk. *American Dairy Science Association*, 84:784-791, 2001.
- [36]Panghal A, Janghu S, Virkar K, Gat Y, Kumar V, Chhikara N. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Biosci*, 21:80-89,2018. doi:10.1016/j.fbio.2017.12.003
- [37] Soukoulis C, Lyroni E, Tzia C. Sensory profiling and hedonic judgement of probiotic ice cream as a function of hydrocolloids, yogurt and milk fat content. *LWT - Food Science and Technology*.43: 1351-1358, 2010. doi:10.1016/j.lwt.2010.05.006
- [38]Kozłowicz K, Góral M, Góral D, Pankiewicz U, Mielniczuk U. Effect of ice cream storage on the physicochemical proprieties and survival of probiotic bacteria supplemented with zinc ions. *LWT*, 116: 108562, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108562>

ANEXOS

El coeficiente de asimetría e Fisher muestra que en las primeras horas, el recuento presento una asimetría negativa (sesgo a la izquierda), es decir que la mayoría de las muestras tienen un porcentaje alto de recuento y esto cambio (sesgo a la derecha) a partir del día 5 donde se evidencia

que en la mayoría de los siguientes días de muestreo disminuyó sustancialmente. Lo anterior, se evidencia en la **Figura 4**. Adicionalmente se muestra el comportamiento de los valores, máximos mínimos y la media de los datos obtenidos experimentalmente. También se puede observar la variación de los recuentos. En el eje x, se encuentran los tiempos, referidos en horas, dos y cuatro, en cuanto a la reactivación de la cepa. Seguido a esto se muestran los tiempos de muestreo que fueron cada 5 días. Durante 30 días.

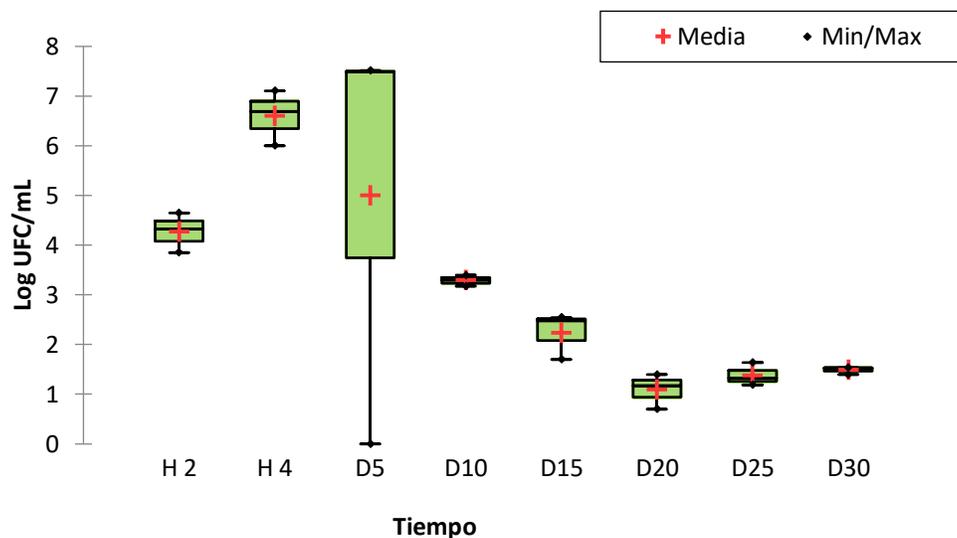


Figura 4. Comportamiento de la media en el recuento de bacterias respecto al tiempo.

Teniendo en cuenta que el valor máximo es 5 puntaje total de 105 y 4 puntaje final 84, entonces se tiene que en términos de color el 92% está en el rango buena en su valoración. Además, en promedio los puntajes están por encima de 4. Para una explicación mayor se tiene la siguiente Tabla 7. Al comparar los resultados del helado con probióticos hay diferencias en el sabor diferencia de 9 a favor del helado sin probióticos, en textura (5). En cuanto a la apariencia la diferencia (10) estuvo a favor del helado con probióticos y en cuanto al color no hay diferencias significativas. Como se puede ver en la apreciación sensorial, ninguna valoración fue negativa (1 o 2). En cuanto a la textura y color, las valoraciones fueron muy similares entre los encuestados, mientras que la diferencias fueron significativas diferentes entre los encuestados (no hay una opinión homogénea) en los apariencia y sabor según la prueba estadística.

Tabla 7. Porcentajes obtenidos de cada atributo evaluado, en la escala, referente a excelente, bueno y neutral de las muestras de helado con y sin probiótico.

Atributo	Escala					
	Excelente		Bueno		Neutral	
	Con P	Sin P	Con P	Sin P	Con P	Sin P
Sabor	33%	48%	52%	33%	14%	19%
Textura	38%	48%	29%	33%	33%	19%
Color	62%	57%	38%	43%	0%	0%
Apariencia	52%	52%	38%	33%	10%	14%

Referente utilizado como cuestionario, para el análisis sensorial del producto.

ESCALA	SABOR	TEXTURA	COLOR	APARIENCIA
				
				
				
				
				