



DEPARTAMENTO DE POSGRADOS

MAESTRIA EN GESTION DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

***“DESARROLLO DE UN HELADO FUNCIONAL CON ADICION DE
PREBIOTICOS Y BACTERIAS PROBIOTICAS”***

**TRABAJO DE GRADUACION PREVIO A LA OBTENCION DEL
TITULO “MAGISTER EN GESTION DE LA CALIDAD Y
SEGURIDAD ALIMENTARIA”**

AUTOR: LCDA. GABRIELA ALEXANDRA ZUÑIGA CARPIO

DIRECTOR: MGST. CLAUDIO SANCHEZ JAUREGUI

CUENCA-ECUADOR

2017

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, el pilar fundamental a lo largo de mi vida, a mi mamá por ser madre y padre a la vez, por estar presente en todo momento, ser mi apoyo incondicional y enseñarme a luchar por lo que quiero.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a dios por permitirme culminar una etapa más en vida, a mi director el Ing. Claudio Sánchez por todo el apoyo brindado para la culminación de este trabajo y al Proyecto “Alimentación nutrición y salud” el lugar en donde actualmente laboro, y a su directora la Dra. Silvana Donoso.

RESUMEN:

Desarrollar un helado con probiótico (*L. casei*) y prebiótico (Inulina). Utilizando leche cruda, materia grasa, azúcares, emulsionantes, reguladores de acidez, saborizante. Se elaboraron dos formulaciones (0.5 g y 1 g). Se realizó pruebas sensoriales y de tolerancia in vitro (Ácido clorhídrico, bilis y bacterias patógenas). Se obtuvo una viabilidad de 10^7 ufc/g durante 10 días. No existió cambios organolépticos. Las pruebas de tolerancia in vitro evidenciaron cierta disminución en el crecimiento bacteriano. *L. casei*, no se recomienda para esta matriz alimentaria. Se requieren más estudios in vivo de esta cepa. Es un producto rentable con un costo aproximadamente de \$0.70.

Palabras claves:

Probiótico, prebiótico, viabilidad, análisis sensorial.

ABSTRACT

The aim of this study is to develop an ice cream product with probiotic (*L. casei*) and prebiotic (Inulin) using raw milk, fat, sugars, emulsifiers, regulators of acidity, and flavoring. Two formulations (0.5 g and 1 g) were made. Sensory and tolerance tests were performed in vitro (hydrochloric acid, bile and pathogenic bacteria). A viability of 10⁷ CFU/g was obtained during 10 days. There were no organoleptic changes. In-vitro tolerance tests indicated some decrease in *L. casei* bacterial growth; which is not recommended for this food matrix. Further in-vivo studies of this strain are required. This is a profitable product with a cost of approximately \$ 0.70.

Keywords: Probiotic, Prebiotic, Viability, Sensory Analysis.


UNIVERSIDAD DEL
AZUAY
Dpto. Idiomas


Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

CONTENIDO	
RESUMEN:	ii
INTRODUCCION	1
CAPITULO 1	3
MARCO TEORICO	3
1.1 PREBIOTICOS.....	3
1.2 PROBIOTICOS	7
1.3 PROBIOTICOS Y PREBIOTICOS EN ALIMENTOS:	10
1.4 ENCAPSULACIÓN COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA SUPERVIVENCIA DE LOS PROBIÓTICOS.....	11
1.5 RELACIÓN PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS.....	12
CAPITULO 2	14
2.1MATERIALES Y METODOS	14
2.1 Materias primas	14
2.2 Producción de helado de leche con base probiótico y prebiótico.....	14
2.3 Análisis de control de las formulaciones.....	14
2.4 Análisis sensorial	15
CAPITULO 3	17
3.1 RESULTADOS	17
3.1 Viabilidad de probióticos.....	17
3.2 Análisis sensorial	18
3.3 Pruebas de tolerancia	20
CAPITULO 4	22
4.1 DISCUSION	22
CAPITULO 5	26
5.1 CONCLUSIONES	26
CAPITULO 6	27
6.1 RECOMENDACIONES	27
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	28
ANEXOS	31

Zuñiga Carpio Gabriela Alexandra

Trabajo de graduación

Ing. Claudio Sanchez

“DESARROLLO DE UN HELADO CON CONTENIDO PROBIOTICO Y PREBIOTICO”

INTRODUCCION

Durante la última década, la demanda de alimentos y bebidas que mejoran o tiene un efecto beneficioso sobre la salud humana ha incrementado a nivel mundial, así también el aumento de los costos sobre el cuidado de la salud, el aumento de la esperanza de vida y el deseo de una mayor calidad de vida han dado lugar a la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (Ozen, Pons y Tur, 2012). De este modo, estas enfermedades, las mismas que tienen como causa factores nutricionales implícitos, se ha convertido en un foco de interés tanto en la salud pública como en la investigación y la tecnología así lo indica (Olagnero *et al*, 2007). Por esta razón, los alimentos con contenido probiótico y prebiótico llamados simbióticos cuentan con más de 500 productos en el mercado mundial durante la última década y esta se está expandiendo continuamente (Tripathi y Giri, 2014), ya que juegan un papel importante, proporcionando un efecto beneficioso y siendo una valiosa herramienta para la salud al adicionar estos componentes a los alimentos habituales (Olagnero *et al*, 2007; Aguilera *et al*, 2007).

Actualmente, existe un creciente interés sobre este tema, así una revisión sistemática acerca del consumo de este tipo de alimentos a nivel mundial, indica que en países como Holanda, Suiza, Bélgica, Polonia y Finlandia, su consumo va desde 3.8 a 55.9%, siendo Suiza el país de mayor consumo (Ozen, Pons y Tur, 2012). En EEUU, el mercado de ventas crece a un ritmo del 15% anual y en algunos países como Holanda, una de cada cuatro personas consume estos productos habitualmente. Asimismo, en el mercado español existen cerca de 200 tipos de estos alimentos, y es probable que dentro de diez años se dupliquen (Aguilera *et al*, 2007).

Entre los productos simbióticos, en su mayoría, se encuentran productos lácteos (González-Herrera *et al*, 2015; Siro *et al*, 2008), su incorporación en los alimentos ayuda a reestablecer el equilibrio inmunitario, incluso constituyen una estrategia para evitar alergias alimentarias y ayudan a reponer déficits de determinadas sustancias en el organismo (Aguilera *et al*, 2007); así la elaboración de estos productos representa uno de los segmentos de mayor crecimiento dentro de la industria alimentaria llegando a convertirse en una de las más importantes áreas de investigación científica. Es por ello que, en la actualidad, se está realizando una fuerte inversión en el desarrollo de este tipo de alimentos, reflejándose este hecho en el aumento de su presencia en supermercados (Aguilera *et al*, 2007; Siro *et al*, 2008). Sin embargo, la población de América Latina, en general no tiene conocimiento sobre este tema, pero en áreas urbanizadas hay un consumidor cada vez más consciente de la relación existente entre su alimentación y las

consecuencias que puede tener para su salud, aumentando cada vez más la demanda de información y el consumo(Lajolo, 2002).

Debido a la tendencia actual de consumir estos productos(Montfort *et al*, 2013), cuya elección en gran parte se ve condicionada por el factor económico, el sabor, la comodidad y la simplicidad en la preparación culinaria(Aguilera *et al*, 2007), se considera de gran utilidad adicionar probióticos y prebióticos a alimentos como helados, pues es un producto muy consumido por la población en general, además de considerarse un buen vehículo para transmitir estos elementos(Montfort *et al*, 2013; Cruz *et al*, 2009). A pesar de que esta área ha atraído el interés por muchos años, la investigación es todavía insuficiente. En nuestro país no existe en el mercado una propuesta de helado a base de leche con estas características, por lo que el presente estudio pretende realizar una formulación de helado con probióticos y prebióticos, el cual contengan características que permitan favorecer a la salud y bienestar de la población.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 PREBIOTICOS

La definición de prebiótico fue propuesta por Gibson y Roberfroid en 1995 que aplicaron este término a sustancias no digeribles que promueven selectivamente el crecimiento y la actividad de un grupo de especies bacterianas beneficiosas para la salud (Gibson, Probert, *et al*, 2010; Fontecha *et al*, 2010).

El concepto de prebiótico se define por tres criterios esenciales:

1. Debe ser una sustancia no alterable, no hidrolizable, no digerida por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto (estómago e intestino delgado).
2. Debe ser un sustrato fermentable por un grupo o grupos de bacterias comensales del colon por ejemplo *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.
3. Su fermentación debe ser selectiva estimulando el crecimiento y/o la actividad de bacterias intestinales asociadas a efectos saludables para el anfitrión (Aguilera *et al*, 2007; Gibson, Scott, *et al*, 2010; Kolida, Tuohy y Gibson, 2002)

Estos tres criterios deben demostrarse por procedimientos científicos como requerimiento obligatorio para que una sustancia sea considerada como prebiótica. La **Tabla 1** indica una lista de sustancias que han sido propuestas como prebióticos con información disponible sobre los tres criterios mencionados.

Tabla 1. Sustancias propuestas como prebióticos

	Indigerible	Fermentable	Selectivo
Inulina	SI	SI	SI
Óligofruktosas	SI	SI	SI
Transgalacto-oligosacáridos	SI	SI	SI
Lactulosa	SI	SI	SI
Isomalto-oligosacáridos	En parte	SI	Probable
Lactosacarosa	ND	SI	Probable
Xilo-oligosacáridos	ND	SI	Probable
Oligosacáridos de soja	SI	SI	ND
Gluco-oligosacáridos	ND	ND	ND
Oligodextranos	ND	ND	ND
Ácido Glucónico	ND	ND	ND
Gentio-oligosacáridos	ND	ND	ND

Oligosacáridos de pectina	SI	ND	ND
Glucomanano	SI	ND	ND
Lactosa	NO	SI	NO
Hemicelulosa	SI	NO	NO
Almidón resistente	SI	SI	ND
Oligosacáridos de melibiosa	ND	ND	ND
N-Acetyl-chito-oligosacáridos	ND	ND	ND
Polidextrosa	ND	ND	ND
Alcohol-azúcares	Variable	ND	ND

ND, no ha sido demostrado
Fuente: (Gibson, Probert, *et al*, 2010)

1.1.1 TIPOS DE PREBIOTICOS:

Los prebióticos conocidos comúnmente son:

- Óligofruktosas
- Inulina
- Galactooligosacáridos
- Lactulosa

Óligofruktosas (OF): se obtiene mediante la hidrólisis enzimática parcial de la inulina, estos no son digeridos en el intestino delgado si no fermentados por la microflora humana intestinal a ácidos grasos de cadena corta. (Lozada; Guarner *et al*, 2001). Está presente de forma natural en muchos alimentos como trigo, cebollas, bananas, miel, ajo, y puerro. La OF también se puede aislar de la raíz de achicoria o se la puede sintetizar enzimáticamente a partir de la sacarosa. La fermentación de OF en el colon da lugar a un gran número de efectos fisiológicos como:

- Aumento del número de *Bifidumbacterium* en el colon
- Aumento de la absorción de calcio, magnesio, fosforo y hierro.
- Reducción de los niveles de lípidos y/o colesterol en la sangre(Ogueke *et al*, 2010)

Esta sustancia es mucho más soluble que la inulina y parecida al dulzor del azúcar (Guarner *et al*, 2011).

Inulina: es un producto tipo fructano que resiste al hidrolisis por parte de las enzimas digestivas, pero se fermentan en el colon, lo que le brinda la característica de no digerible. El aumento de la biomasa fecal y capacidad de retención de agua en las heces permite que mejore los hábitos intestinales, lo que le atribuye la característica de fibra dietética(Schneeman, 1999). Esta se

encuentra principalmente en el trigo, cebolla, plátano, ajo, puerro, banana, cebada, miel y espárrago. Entre las funciones fisiológicas e inmunológicas, las principales son las funciones gastrointestinales, como la modulación de la actividad del colon, que es cada vez más reconocido por jugar un papel esencial en el mantenimiento de la salud y bienestar, así como prevenir el riesgo de enfermedades que pueden ir desde diarrea o estreñimiento a enfermedades crónicas como síndrome del intestino irritable y cáncer (Roberfroid, 2005).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que es capaz de estimular el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y disminuir los niveles de bacterias potencialmente patogénicas (Gibson, Probert, *et al*, 2010). Se ha observado adicionalmente un incremento del 65% en la absorción de calcio y magnesio en el intestino grueso como consecuencia del consumo de inulina (Lozada, 2001).

Galactooligosacaridos: son compuestos de carácter prebiótico, se obtienen generalmente mediante transglucosilación durante la hidrólisis enzimática de lactosa, esta es hidrolizada o absorbida en el intestino delgado y fermentada en el colon proximal. Los más frecuentes de origen vegetal son la rafinosa, estaquiosa y verbascosa. Esta presentes principalmente en las legumbres (Fontecha *et al*, 2010; Guarner *et al*, 2011; Lozada, 2001).

Lactulosa: es un disacárido sintético derivado de la lactosa, es empleada para el tratamiento de la constipación y encefalopatía hepática. Es absorbida en el intestino delgado y fermentada rápidamente por la microflora del colon; tiene un efecto sobre la microflora humana al disminuir las poblaciones de microorganismos patógenos e incrementando aquellos beneficiosos (Gibson, Probert, *et al*, 2010; Guarner *et al*, 2011)

1.1.2 Probióticos y Prebióticos sobre la salud

Los prebióticos y probióticos participan en las siguientes funciones en todas las etapas de la vida:

- 1) Funciones metabólicas: Incremento de la absorción de calcio, regulación del metabolismo hepático de los lípidos, reduce el colesterol sérico, mejora el equilibrio de la microflora intestinal
- 2) Funciones defensivas: prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales y prevención de infecciones sistémicas por translocación bacteriana. (Aguilera *et al*, 2007).

1.1.3 Funciones metabólicas:

Incremento de la absorción de calcio: este se deriva de la fermentación colónica de algunos prebióticos (inulina, oligofruktosas y lactulosa), existen varios ensayos controlados en humanos que han confirmado esta propiedad de dichos prebióticos (Scholz-Ahrens *et al*, 2001). La respuesta es más intensa en aquellos individuos con niveles bajos de calcio. Los estudios de intervención en humanos han confirmado este efecto en mujeres adolescentes y también tras la menopausia. Los estudios a largo plazo demuestran que el efecto se mantiene mientras continúa la ingesta de prebióticos sobre todo tipo inulina (Aguilera *et al*, 2007).

Regulación del metabolismo hepático de los lípidos: la ingesta de prebióticos sobre todo tipo oligofruktosas y la inulina y de probióticos, se asocia a una disminución de triglicéridos y colesterol, debido a que la fermentación bacteriana produce ácidos grasos de cadena corta (Ooi y Liong, 2010). El exceso de triglicéridos en plasma está relacionado con el desarrollo de diabetes tipo 2 y de esteatosis hepática no alcohólica, lo que se denomina síndrome metabólico. Los estudios experimentales demuestran que la ingesta de inulina reduce la lipogénesis a partir de mono-sacáridos en el hígado así como revierte la esteatosis hepática no alcohólica (Aguilera *et al*, 2007).

Funciones gastrointestinales: la microbiota intestinal juega un papel importante en la prevención de infecciones. Las bacterias comensales que se desarrollan en las superficies mucosas evitan la invasión de gérmenes con potencial patógeno, así estudios clínicos han demostrado que la utilización de probióticos sobre todo del tipo de *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, tienen un efecto en la prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales. Estas bacterias, mediante la producción de ácido láctico crean un ambiente hostil produciendo una reducción del pH, además la secreción de algunas bacteriocinas como acidofilina inhiben el crecimiento de ciertas bacterias patógenas. In vitro se han obtenido resultados positivos en la inhibición de determinados patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Shigella sonnei*, por la presencia de bacterias probióticas, así también otros estudios indican que ciertos probióticos pueden prevenir la diarrea asociada al uso de antibióticos, así como diarreas agudas infantiles de origen nosocomial o adquiridas en la comunidad. Ensayos clínicos han demostrado que el consumo de *Lactobacillus casei* disminuye la duración de la diarrea y gastroenteritis por Rotavirus en niños. Por otro lado, el consumo de diversos prebióticos reduce la absorción de metales tóxicos e incrementan la biomasa y por tanto favorece la formación del bolo fecal. Esta propiedad que es común en diversos prebióticos es útil para la prevención y tratamiento del estreñimiento (Aguilera *et al*, 2007; Guarner *et al*, 2011; Narayan *et al*, 2010)

1.1.4 Funciones defensivas

Prevención de infecciones sistémicas por translocación bacteriana: Algunas especies de la flora intestinal tienen la capacidad de migrar a órganos extra intestinales, como ganglios linfáticos mesentéricos, hígado, páncreas, etc. Esta translocación bacteriana en cantidades discretas es un fenómeno fisiológico que conlleva al homeostasis adecuada del sistema inmune. Sin embargo, en condiciones clínicas vulnerables, como politraumatismos, quemaduras graves, pancreatitis agudas severas, pacientes sometidos a cirugía abdominal mayor (trasplantes), oclusión intestinal, fallo hepático y fallo multiorgánico, se desarrolla infecciones sistémicas como consecuencia negativa de esta translocación descontrolada.

Algunos ensayos clínicos indican la eficacia de la combinación de probióticos y prebióticos en la prevención de complicaciones infecciosas por translocación bacteriana (pancreatitis aguda grave y trasplante hepático) (Aguilera *et al*, 2007).

1.2 PROBIOTICOS

La palabra “Probiótico” es un término de origen griego que significa “a favor de la vida”. Este término se utiliza para definir a aquellos microorganismos, ya sean bacterias o levaduras (no han sido estudiadas a profundidad), que sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y que en cantidades adecuadas producen un efecto beneficioso para el huésped mediante la modulación de la fisiología de la mucosa y la inmunidad sistémica; así como también para mejorar el equilibrio nutricional proporcionando un mejor estado de salud y bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad (Naidu, Bidlack y Clemens, 1999; Joint, 2014; Aguilera *et al*, 2007).

Para la selección de un probiótico se debe considerar los siguientes criterios:

- 1) Presentar tolerancia a los ácidos y a las sales biliares
- 2) Presentar efecto antagónico contra bacterias patógenas
- 3) No actuar como patógenos oportunistas, aun cuando el huésped se encuentre inmunodeprimido
- 4) Estimular al sistema inmunológico mejorando la resistencia contra patógenos
- 5) Poder adherirse al intestino (Ross *et al*, 2005; Joint, 2014)

1.2.1 Microorganismos con efectos probióticos

Los efectos positivos de los probióticos dependen de la cepa bacteriana a utilizar, de la existencia de un tipo o más de bacterias, de su interacción, del tipo de producto en el que se incluyen, del tiempo de consumo del producto, de la genética propia del individuo, de la existencia o no de una patología, y de la dosis suministrada. (Aguilera *et al*, 2007)

La **Tabla 2** muestra una lista de microorganismos utilizados como probióticos siendo el *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, los probióticos más usados, estos se engloban dentro de las Bacterias ácido lácticas (BAL) por la capacidad que tiene de transformar hidratos de carbono en ácido láctico; sin embargo los *Lactobacillus* son considerados más resistentes que las *Bifidobacterium* pues estas requieren condiciones estrictas de anaerobiosis para sobrevivir (Ross *et al*, 2005).

Tabla 2. Microorganismos utilizados como probióticos

Género	Especie
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> <i>casei</i> <i>crispatus</i> <i>johnsonii</i> <i>lactis</i> <i>paracasei</i> <i>fermentum</i> <i>plantarum</i> <i>rhamnosus</i> <i>reuteri</i> <i>Salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i> <i>bifidum</i> <i>breve</i> <i>essensis</i> <i>infantis</i> <i>lactis</i> <i>longum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i> <i>faecium</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>boulardii</i>

Fuente: (Champagne, Gardner y Roy.2005)

Bifidobacterium

Son microorganismos anaerobios estrictos gram positivos, crecen a un pH de 4.5–8.5. Normalmente se encuentran predominantes en el colon y están presentes después del nacimiento. Producen la enzima B-galactosidasa que mejora la intolerancia a la lactosa y son antagónicas con E. Coli y Shigella. El aumento de la concentración de *Bifidobacterium* en la flora intestinal a su vez incrementa la conversión de carbohidratos a ácidos orgánicos (láctico y acético), además contribuye a regularizar el tránsito intestinal enlentecido mediante la estimulación del peristaltismo(Olagnero *et al*, 2007).

Lactobacillus

Son bacterias ácido-lácticas, bacilos o cocos gram positivos. Son microorganismos anaerobios y/o tolerantes a condiciones aerobias(Olagnero *et al*, 2007). De manera general, se considera que el pH óptimo de sobrevivencia de los *Lactobacillus* es de 5,5 a 6,0(Mohammadi *et al*, 2011).

Otra característica es su capacidad de adherirse a las mucosas (Olagnero *et al*, 2007). Los *Lactobacillus* son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo de 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Fernández y del Castillo, 2007).

Lactobacillus casei

Es una especie de bacteria anaerobia Gram positiva que se encuentra en el intestino y boca de los humanos. Esta bacteria productora de ácido láctico, es empleada en la industria láctea para la elaboración de alimentos probióticos. Se ha comprobado que esta especie en particular es muy resistente a rangos muy amplios de pH y temperatura. Se cree que mejora la digestión y tolerancia a la lactosa (Collins, Phillips y Zanoni, 1989).

1.2.2 Selección de los probióticos

La selección de los probióticos para la adición en los alimentos y la supervivencia de estos a nivel del tracto gastrointestinal es un tema considerado de gran interés, esta supervivencia está sujeta a diferentes variables que se nombrarán a continuación:

- Acidez gástrica
 - Tiempo de exposición al pH ácido de la mucosa gastrointestinal
 - Concentración y tiempo de exposición a la acción de las sales biliares
 - Otras propiedades inespecíficas propias de los microorganismos como tal y del huésped.
- (Aguilera *et al*, 2007)

Dosis y viabilidad

Con relación a la dosis, depende de la especie usada y del tipo de efecto buscado, según algunos autores es necesaria una cantidad de 10^7 ufc/g para que el probiótico conserve su función. (Aguilera *et al*, 2007; Mohammadi *et al*, 2011; Talwalkar y Kailasapathy, 2003), sin embargo otros autores indican que una cantidad a partir de 10^6 ufc/g en producto terminado es suficiente para considerar la funcionalidad del probiótico (Ramírez *et al*, 2012; Cruz *et al*, 2009)

Los probióticos deben mantener su carga microbiana desde la producción y almacenamiento del alimento hasta su ingesta. Es importante que los productos que contienen probióticos garanticen la ingesta del número de bacterias establecido durante la vida útil de producto (De Vrese y Schrezenmeir, 2008)

Es importante considerar que los probióticos durante su paso por el tracto digestivo continúan siendo metabólicamente activos, proporcionando beneficios para el consumidor, es así que varios estudios señalan que los probióticos no viables pueden ser inmunológicamente activos sin ser

necesario que las bacterias permanezcan viables al momento de ser ingeridas. Por lo tanto, podría ser suficiente que los probióticos crezcan bien durante las etapas iniciales de producción, pero no necesariamente deben tener una buena viabilidad durante el almacenamiento. (Aguilera *et al*, 2007; Saarela *et al*, 2000)

Para mejorar la viabilidad de los probióticos es importante considerar la selección de los géneros y especies con mayor tolerancia a la acidez, a la presencia de oxígeno, altas concentraciones de azúcares y a las bajas temperaturas (Montfort *et al*, 2013) como se indica en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Especies de probióticos resistentes a diferentes situaciones de estrés medio ambiental

Microorganismo	Resistencia a azúcar	Resistencia a oxígeno	Resistencia a bajas temperaturas
Bifidobacterium			
B. bifidum(Bb12)	R	R	R
B. infantis(1912)	-	-	R
B. lactis(BLC-1)	-	R	R
B. lactis(DD920)	-	-	R
B. longum(Bb-46)	S	S	S
Lactobacillus			
L. acidophilus (2401)	-	-	S
L. acidophilus (DD910)	-	-	R
L. acidophilus(La5)	R	R	S
L. acidophilus(L10)	-	-	R
L. casei (Lc01)	R	R	R
L. johnsoni(La1)	R	-	R
L. paracasei subesp. Paracasei(LCSI)	-	-	R

R: resiste S: sensible - : no determinado
Fuente: (Montfort *et al*, 2013)

Para la sobrevivencia de los probióticos uno de los factores que más influye es la acidez. Por lo tanto la viabilidad de estas bacterias en el caso del helado es mayor cuando se agregan solas, que cuando también son agregadas con cultivos iniciadores (Cruz *et al*, 2009).

1.3 PROBIOTICOS Y PREBIOTICOS EN ALIMENTOS:

A nivel mundial la mayoría de consumidores tienen mayor conciencia sobre los aspectos de salud y enfermedad, por lo tanto tienen mayor interés en el consumo de productos alimenticios que les

ayuden a prevenir y/o mejorar enfermedades lo que ha provocado una mayor tendencia por el consumo de este tipo de alimentos (Naidu, Bidlack y Clemens, 1999; Phillips y Rimmer, 2013).

Es así que el desarrollo de estrategias dietéticas puede ser utilizado para mejorar la salud y el bienestar del huésped, reduciendo la aparición de varias enfermedades (Roberfroid, 2005).

Como una de estas estrategias está el desarrollo de alimentos que contengan probióticos y prebióticos ya que se ha visto los múltiples beneficios que estos conllevan, como la estimulación selectivamente del crecimiento de bacterias potencialmente beneficiosas para la salud. (Roberfroid, 2005; Saarela *et al*, 2000; Akalın y Erişir, 2008).

En el caso de la industria de alimentos la Inulina tienen diferentes aplicaciones, puede ser utilizada como sustitutivo del azúcar y grasas, agente texturizante y/o estabilizador de espuma y emulsiones; Por este motivo son ampliamente utilizados en jaleas, postres aireados, mousses, helados y productos de panadería (Olagnero *et al*, 2007; Cocchi y Lazzarini, 2014). En el caso de postres congelados mejora la textura, permite un descenso en el punto de congelación, actúa como sustituto de azúcares y grasas, y permite un sinergismo con edulcorantes (Madrigal y Sangronis, 2007)

La leche y productos lácteos son considerados como un vehículo óptimo para incorporación de prebióticos y / o probióticos beneficiosos para la salud humana (Cocchi y Lazzarini, 2014; Champagne, Gardner y Roy, 2005), la presencia de estos probióticos en los productos alimenticios no debe afectar la calidad del producto y las propiedades sensoriales. Su uso está siendo cada vez más generalizado así por ejemplo el mercado Japonés probablemente sea el más avanzado, sin embargo también su uso es significativo en América, Europa, Asia y Australia (Naidu, Bidlack y Clemens, 1999).

En el caso específico del helado, existen varios estudios que demuestran la factibilidad de utilizar estos productos como vehículo de probióticos, ya que contiene proteínas de la leche, grasa y lactosa, además la adición de probióticos y prebióticos le proporciona la ventaja de ser funcional (Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei y Savani, 2005; Cruz *et al*, 2009; Di Criscio *et al*, 2010)

1.4 ENCAPSULACIÓN COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA SUPERVIVENCIA DE LOS PROBIÓTICOS

Una estrategia para proteger a los probióticos es la encapsulación o barrera física semipermeable, que los proteja del oxígeno, pH, tensiones mecánicas, bajas temperaturas y otras situaciones de estrés. Sin embargo el objetivo no es sólo proteger las células contra el medio ambiente adverso, sino también permitir su liberación en un estado viable y metabólicamente activo en el intestino (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2003; Burgain *et al*, 2011).

La técnica de encapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con variadas aplicaciones (Pasin, Azón y Garriga, 2012). Para su elaboración se utilizan algunos polímeros de tipo alimenticio, como proteínas, lípidos y carbohidratos; en el caso de las proteínas específicamente del suero lácteo tienen la capacidad de actuar como amortiguador de pH y crear zonas anóxicas dentro de la capsula (Krasaekoopt, Bhandari y Deeth, 2003). La viabilidad de las células probióticas encapsuladas depende de las propiedades fisicoquímicas de las cápsulas, así como el tipo y la concentración del material de recubrimiento, el tamaño de partícula, el número de células inicial y las cepas bacterianas son algunos parámetros importantes de considerar (Burgain *et al*, 2011)

Un desafío importante para la encapsulación probiótica es reducir el tamaño de partícula ya que puede afectar negativamente a las propiedades sensoriales del producto. En aplicaciones de laboratorio, el método elegido es generalmente emulsificación, pero esta técnica presenta desventajas para aplicaciones alimentarias por muchas razones. La presencia de aceite residual en la superficie de la cápsula es perjudicial para la textura y las propiedades organolépticas del producto. La presencia de aceite residual dificulta la incorporación de cápsulas en productos dietéticos y el aceite residual, surfactante o emulsionante puede ser tóxico para las células probióticas (Burgain *et al*, 2011)

Entre las ventajas de la encapsulación está la protección contra bacteriófagos, aumento de la sobrevivencia y del tiempo de vida útil (Burgain *et al*, 2011), sin embargo un estudio demostró que no había diferencia significativa entre la supervivencia de las bacterias probióticas encapsuladas y las células libres. En el caso específico del helado la protección de las células libres puede deberse al alto contenido total de sólidos que hacen que el helado sea un alimento adecuado para suministrar células vivas probióticas al consumidor (Kailasapathy y Sultana, 2003)

Aunque los resultados son prometedores a escala de laboratorio, las tecnologías utilizadas presentan dificultades para aumentar la escala pues se enfrentan a muchos desafíos para su aplicación a escala industrial, pues se deben mejorar los desafíos tecnológicos para obtener microcápsulas con las mejores propiedades (Burgain *et al*, 2011)

1.5 RELACIÓN PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS

El papel positivo de las bacterias probióticas en la salud humana se debe a propiedades específicas tales como la producción de bacteriocinas que limitan el crecimiento de bacterias patógenas, mediante la producción de ácidos orgánicos tales como ácido láctico y acético que, al disminuir el pH intestinal, combaten las actividades de estas bacterias (Cocchi y Lazzarini, 2014). Estos probióticos al combinarse con prebióticos que representan un sustrato preferencial para bacterias beneficiosas para la salud como los *Lactobacillus* y las *Bifidobacterium* mejoran la

viabilidad de estos microorganismos estimulando de forma selectiva su crecimiento y/o la actividad metabólica de un número limitado de cepas de la microflora intestinal nativa (Olagnero *et al*, 2007; Saarela *et al*, 2000), así lo indica un estudio en donde La supervivencia de las bacterias probióticas fue mayor en las muestras suplementadas con prebiótico (inulina)(Akin, Akin y Kirmaci, 2007).

Además los prebióticos podrían brindar cierta protección a los probióticos ante ácidos gástricos, enzimas gástricas, y bilis presentes en el tracto gastrointestinal(Thantsha, Mamvura y Booyens, 2012)

Es importante señalar que tanto los probióticos como los prebióticos no compiten con los antimicrobianos como agentes terapéuticos, pero pueden reducir los trastornos intestinales, entre ellos los que comúnmente son causados por el uso de antibióticos(Lozada, 2001).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en la planta piloto de lácteos de la Facultad de Ciencias Químicas, en el laboratorio de microbiología de la misma facultad de la Universidad de Cuenca. Además, ciertos análisis fueron realizados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad del Azuay.

2.1 Materias primas

Las materias primas que se utilizaron para la elaboración del helado fueron: leche entera cruda con un 3.2% de grasa, 2.9% de proteína y 0.6% de acidez, materia grasa (crema de leche), azúcares (sacarosa, glucosa), mono y diglicéridos de ácidos grasos (E471), citrato de sodio, politrifosfato de sodio, betagalactosidasa, esencia de coco, bacteria probiótica *Lactobacillus casei* en presentación granulada proveniente de Descalzi y aprobado como probiótico, y como prebiótico Inulina proveniente de Química Suiza.

2.2 Producción de helado de leche con base probiótico y prebiótico.

Para la elaboración del helado sabor a coco, se utilizó como base 3 litros leche cruda, esta cantidad fue establecida debido a la capacidad del equipo, materia grasa(30%), reguladores de acidez(0.1%) y prebiótico(5%), esta mezcla se calentó hasta llegar a 45°C, a esta temperatura se adiciono el emulsionante(0.05%), después se bajó la temperatura hasta 40°C para adicionar la betagalactosidasa(0.2%), después se adicionaron los azúcares(23%) y toda esta mezcla fue pasteurizada a 85°C por 15 minutos , después de este tiempo se bajó la temperatura hasta 40°C en donde se inoculo el probiótico (una formulación con 0.5 g y otra formulación con 1 g), se dejó reposar a esta temperatura durante 30 min y luego se dejó madurar a 4°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se agregó 15 ml de esencia de coco y se inició el batido, este fue realizado en una batidora con capacidad para 3 litros de leche (VITAMIX), para su posterior envasado y almacenamiento a -18°C. **(Anexo 4)**

2.3 Análisis de control de las formulaciones

Los análisis de control realizados fueron: medición del pH mediante del potenciómetro, viabilidad de los microorganismos probióticos mediante el método de diluciones seriadas y siembra por duplicado en caja Petri en medio agar-MRS, estas placas se incubaron a 37°C durante 72 horas, esto se lo realizo para ambas mezclas de helado. Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. A la mezcla de helado que tuvo mejor viabilidad del probiótico se realizó pruebas de tolerancia in vitro al Ácido clorhídrico, a un pH 2 y un pH 3, los cuales simulan las condiciones gástricas del estómago, tolerancia a bilis, la siembra se lo realizo en caldo brilla y tolerancia a bacterias

patógenas (*Listeria*, *S. aureus*, *Salmonella*) estos análisis se realizaron en el Laboratorio de microbiología de la Universidad del Azuay.

2.4 Análisis sensorial

Con la finalidad de evaluar posibles cambios que puedan alterar la calidad del helado tras ser adicionado microorganismo probiótico y un prebiótico, se llevó a cabo un análisis sensorial.

Para la evaluación sensorial se realizaron pruebas afectivas las cuales permiten medir estados psicológicos del consumidor además es el método que utiliza la medida de la reacción humana como elemento indirecto para evaluar el producto.

El análisis evaluó el grado de preferencia y de aceptabilidad del helado con mejor viabilidad, mediante la participación de 30 panelistas. Muchas veces se confunden el término preferencia con aceptabilidad, sin embargo, son dos términos diferentes. Aceptabilidad se refiere al grado de gusto o disgusto de una persona sobre un producto. Mientras que preferencia se refiere a la elección de un producto entre un conjunto de alternativas.

Para realizar la evaluación sensorial, se tomó en consideración los siguientes principios de buenas prácticas. Los cuales indican que existen tres aspectos básicos que se recomiendan controlar al momento de realizar la evaluación sensorial con el fin de obtener información más confiable:

a.- Las instalaciones o ambiente de trabajo:

- El color de las paredes y del ambiente debe ser de color blanco o blanco hueso.
- La iluminación debe ser de preferencia luz natural
- Debe existir buena ventilación.
- Las áreas de prueba deben estar libres de olores y de ruidos molestos
- Las áreas de prueba deben estar libres de potenciales distracciones.

b.- La muestra o alimento:

- La muestra debe ser servida a la temperatura normal de consumo.
- La cantidad de muestra a servir debe ser la suficiente para poder evaluar todos los atributos
- Los contenedores de la muestra deben ser transparentes.

- Los contenedores de la muestra deben ser del mismo tamaño. Los panelistas no deben conocer la identidad del producto.
- Luego de cada prueba tomar agua para limpiar el paladar.

c.- Los panelistas:

Los panelistas antes de catar un producto deben cumplir con ciertos requisitos, con el objetivo que no existan interferencias para detectar las características a evaluar, para esto las instrucciones dadas fueron las mismas a todos los panelistas, antes de iniciar la prueba. Para esto se puede tener una guía pre-diseñada y leerla siempre que se inicie una sesión, de esta manera se tiene la información impartida estandarizada a todos los panelistas. “Guía de panelistas” (**Anexo 1**) (Liria y María, 2007)

Se mostraron tres formulaciones de helado: A.- Helado sin prebiótico ni probiótico, B.- Helado con prebiótico, pero sin probiótico, C.- Helado con probiótico y prebiótico. Los mismos que fueron etiquetados con las letras A, B, C respectivamente para que los panelistas no identifiquen cada tipo de helado, por otro lado, se realizó grupos pequeños para evitar desorden.

Antes de comenzar la catación se les explico a los panelistas los requisitos que se deben cumplir otorgándoles la “Guía de panelistas”, luego se les dio las encuestas a llenar previo a la catación, se les explicó cómo hacerlo tanto para la prueba de aceptabilidad y la de preferencia, dándole a cada producto la respectiva calificación según lo mencionado anteriormente.

Pruebas de preferencia. Cada panelista asignó un orden de preferencia a las diferentes formulaciones usando las categorías 1 para la formulación menos preferida, 2 para la siguiente y 3 para la más preferida. (**Anexo 2**)

Pruebas de aceptabilidad. Se presentaron las tres diferentes muestras de forma aleatoria y cada panelista evaluó los siguientes parámetros: textura, sabor y color.

Los panelistas evaluaron las diferentes muestras codificadas, indicando cuanto les agrada cada muestra, en una escala de 4 puntos que va desde “Me gusta mucho” hasta “Me disgusta” (**Anexo 3**).

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Viabilidad de probióticos

La viabilidad del probiótico dependió de la cantidad a inocularse; el conteo de colonias se realizó a las 72 horas después de la siembra. Se realizó dos formulaciones, en la primera con 0.5 de bacteria probiótica en donde el pH se mantuvo a 6.62 ± 3 y existió crecimiento, sin embargo esta cantidad no fue suficiente para llegar al óptimo y considerarse viable, por otro lado la segunda formulación aquella con 1 gm de *L. casei* se puede observar en la **(Figura 1)** que fue la que mejor viabilidad obtuvo, pues al existir una variación del pH hubo un crecimiento óptimo de $1.1 \cdot 10^7$ y $1 \cdot 10^7$ ufc/g, manteniéndose viable el probiótico desde el día 5 de almacenamiento con $1.1 \cdot 10^7$ ufc/g hasta el día 15 con $1 \cdot 10^7$ ufc/g a partir de este día hasta el día 25 en donde hubo un aumento de pH y este al no ser el óptimo para el crecimiento de este tipo de probiótico existió una reducción en la viabilidad como se observa en la **(Figura 2)**

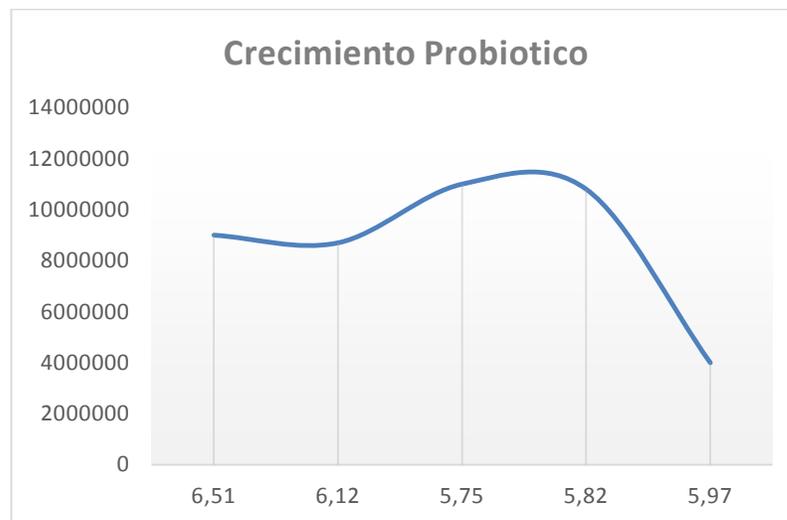


Figura 1. Crecimiento Probiótico

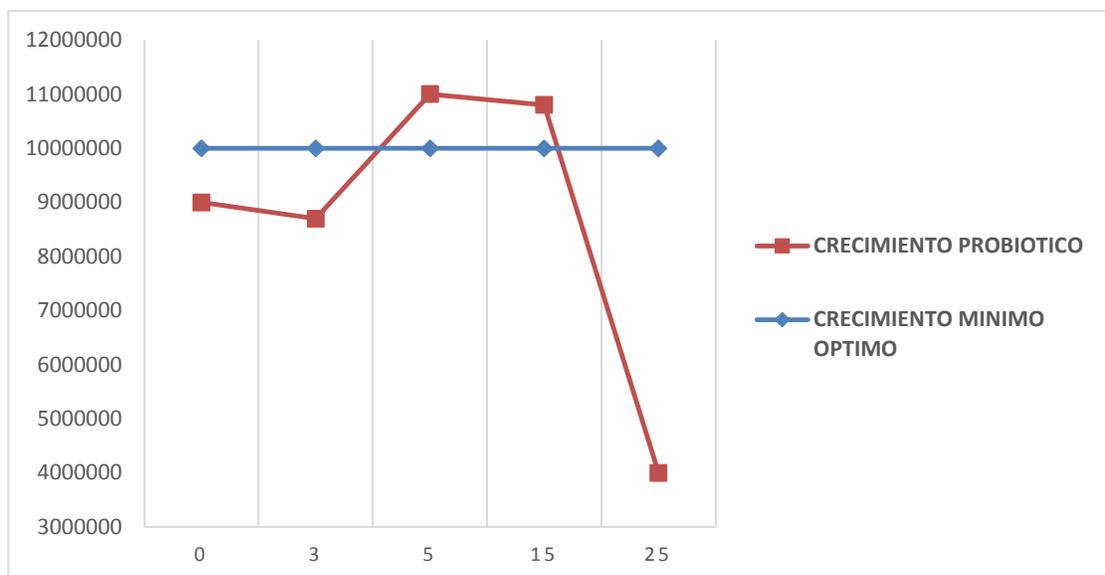


Figura 2. Crecimiento probiótico vs Crecimiento mínimo óptimo

3.2 Análisis sensorial

Se evaluaron preferencia, así como aceptabilidad tanto en color, textura y sabor, después de los 15 días de almacenamiento.

Pruebas de preferencia

La mayoría de panelistas tuvieron preferencia por la muestra de helado con contenido probiótico y prebiótico, pues para la categoría “más preferida” un 57% más de panelistas prefirió esta, sobre la muestra de helado con prebiótico, pero sin probiótico, y un 27% más sobre la muestra sin probiótico ni prebiótico. **(Figura 3)**. De la igual manera revela al calcular el promedio ponderado de la escala hedónica alcanzando un valor de 3 que indica una mayor preferencia para la muestra la muestra C. **(Tabla 4)**

Tabla 4. Promedio ponderado

	PREFERENCIA		
	A	B	C
1	14	11	4
2	10	34	14
3	33	6	57
TOTAL	57	51	75
PROMEDIO PONDERADO	1,9	1,7	2,5

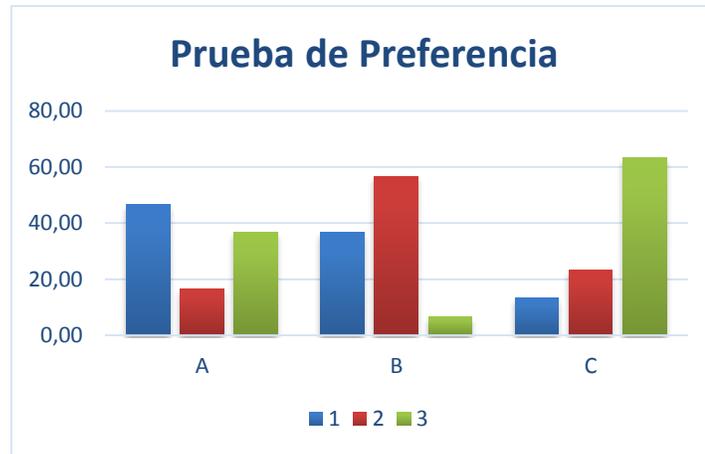


Figura 3. Resultados obtenidos de la ficha de evaluación para preferencia

Pruebas de aceptabilidad

Se analizaron tres parámetros textura, sabor y color, a su vez para cada una de ellas se evaluaron cuatro categorías “Me gusta mucho” “Me gusta poco” “Ni me gusta ni me disgusta” “Me disgusta”.

En cuanto a la textura las tres muestras obtuvieron un mayor porcentaje en la categoría “Ni me gusta ni me disgusta” con un promedio de 46% (**Figura 4**), Para el sabor la muestra C es la que mayor porcentaje tuvo en la categoría “Me gusta mucho” con un 34% más que la muestra A, y un 30% que la muestra B (**Figura 5**). Así mismo lo demostró el promedio ponderado de la escala hedónica alcanzando el valor 2 en textura que equivale a la categoría “Ni me gusta ni me disgusta”, mientras que para el sabor el mayor puntaje en esta escala obtuvo la categoría “Me gusta poco” con el puntaje 3 para la muestra C (**Tabla 6**). En cuanto al color las tres muestras de helado (A, B, C) presentaron un alto porcentaje en “Me gusta mucho” de parte de los 30 panelistas.

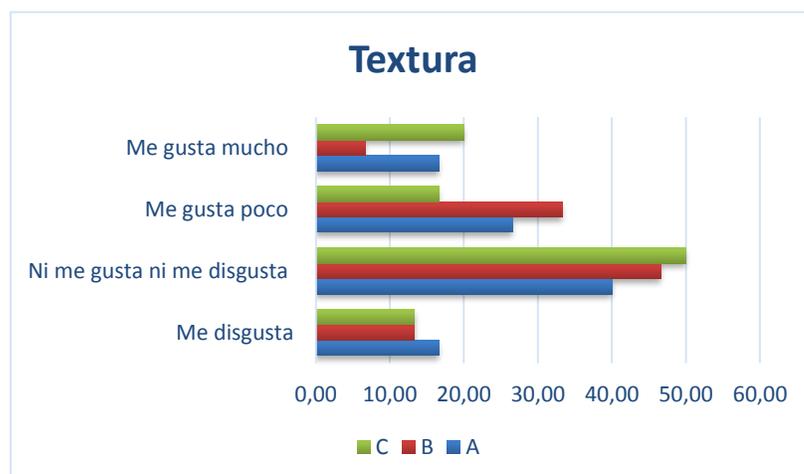


Figura 4. Resultados obtenidos de la ficha de evaluación de aceptabilidad para la prueba de textura



Figura 5. Resultados obtenidos de la ficha de evaluación de aceptabilidad para la prueba de sabor

Tabla 5. Promedio ponderado

	Textura			Sabor		
	A	B	C	A	B	C
Me disgusta	5	4	4	8	10	2
Ni me gusta ni me disgusta	24	28	30	36	12	10
Me gusta poco	24	30	15	3	27	27
Me gusta mucho	20	8	24	16	20	56
Total	73	70	73	63	69	95
PROMEDIO PONDERADO	2,43	2,33	2,43	2,1	2,30	3,17

3.3 Pruebas de tolerancia

Tolerancia a bilis

Se utilizó caldo brilla, con la dosificación probada de probiótico a los 15 días de almacenamiento, hubo una disminución en el crecimiento microbiano de 3 ciclos logarítmicos, sin embargo, existió tolerancia a pesar de no llegar al número de bacterias para que se considere funcional. **(Tabla 7)**

Tolerancia a Ácido clorhídrico

La comparación de los recuentos bacterianos para las dos pruebas a diferente pH se indica en la **(Tabla 7)** en donde el nivel de pH del jugo gástrico simulado tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad probiótico. A pesar que a ambos pH hubo una disminución en el crecimiento microbiano de 4 logaritmos, la sobrevivencia fue mayor a un pH 3 en comparación con pH 2

Tabla 6. Pruebas de tolerancia

Análisis	Unidades	Método	Resultado
Tolerancia a la bilis	ufc/ml	Placa Petrifilm	$4 \cdot 10^3$
Tolerancia a HCL (pH 2)	ufc/ml	Placa Petrifilm	$3 \cdot 10^2$
Tolerancia a HCL (pH 3)	ufc/ml	Placa Petrifilm	$52 \cdot 10^2$

Inhibición a bacterias patógenas

Las pruebas realizadas fueron frente a *Listeria*, *S. aureus* y *Salmonella*. No se presentó inhibición frente a *Listeria*, *S. aureus*, a diferencia de *Salmonella* la cual presentó una actividad inhibitoria con un halo de inhibición de 10 mm lo que demuestra que debido a las bacteriocinas que producen las BAL, inhibe el crecimiento de ciertas bacterias patógenas in vitro (**Tabla 8**)

Tabla 7. Tolerancia de bacterias patógenas

	DIAMETRO DE DISCO	DIAMETRO DE HALO
<i>SALMONELLA</i>	6 mm	10 mm
<i>LISTERIA</i>	no presentaron inhibición	
<i>S. AUREUS</i>	no presentaron inhibición	

CAPITULO IV

DISCUSION

Se conoce que los productos lácteos son excelentes vehículos para probióticos y prebióticos (Gabriela Ramos-Clamont *et al*, 2012; Cocchi y Lazzarini, 2014), sin embargo, los datos de haberse probado en helados son escasos. Es por ello que en este estudio se elaboró un Helado con contenido probiótico y prebiótico, pues aquí en el Ecuador no existe información acerca del tema, y este estudio es un precedente para futuras investigaciones.

Al seleccionar un cultivo probiótico para ser utilizado como un complemento dietético, se debe considerar ciertos factores entre ellos, la dosis a inocular, el ácido, la resistencia a la bilis y a las bacterias patógenas, ya que las células microbianas tienen que superar la barrera del estómago y sobrevivir en el ambiente intestinal (Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei y Corti, 2005).

En el caso de la cantidad a ser inoculada, esta variará en función de la cepa y del efecto deseado para la salud (Champagne, Gardner y Roy, 2005). La eficacia de los productos alimenticios probióticos depende del número de células viables y activas por gramo o mililitro de los productos en el momento del consumo (Tripathi y Giri, 2014), así pues existen diferentes autores que indican variaciones en la dosis recomendada para que el probiótico ejerza su función como tal; la Federación Internacional de Lácteos recomienda que un mínimo de 10^7 ufc/g estén vivos en el momento en que se consume el alimento (Gabriela Ramos-Clamont *et al*, 2012), la Guía de la Organización mundial de Gastroenterología indica que 10^9 ufc pero que algunos productos han demostrado ser eficaces a niveles más bajos, mientras que otros requieren cantidades mayores (Guarner *et al*, 2011), otros estudios consideran que con el consumo entre 10^6 y 10^7 ufc/g produce un efecto benéfico para la salud (Talwalkar y Kailasapathy, 2003; Tripathi y Giri, 2014; Jayamanne y Adams, 2006). Tomado como referencia los datos encontrados para este estudio se consideró una dosis de 10^7 ufc/g en producto terminado. De cualquier manera ciertos autores indican que no es posible establecer una dosis general para los probióticos; pues la dosificación tiene que estar basada en estudios humanos y que muestren beneficio sobre la salud (Guarner *et al*, 2011).

El género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las comúnmente utilizadas como probióticos, sin embargo, los *Lactobacillus* debido a que son anaerobios facultativos son más resistentes que las *Bifidobacterium* que requieren condiciones estrictas de anaerobiosis para sobrevivir (Ross *et al*, 2005; Mortazavian, Mohammadi y Sohrabvandi, 2012). A pesar que las especies que han sido inoculadas con mayor frecuencia a los helados son *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii* y *L. rhamnosus* GG (Cruz *et al*, 2009), para este estudio se optó por la utilización de *L. casei* debido a que es resistente a azúcar, oxígeno y a bajas temperaturas (Gabriela Ramos-Clamont *et al*, 2012; Tripathi y Giri, 2014; Cruz *et al*, 2009).

En este estudio se observó una vida útil del producto de 10 días con viabilidad del probiótico de 10^7 ufc/g, valor que se considera efectivo para ser producto probiótico según lo mencionado anteriormente; sin embargo este tiempo de vida útil es menor a otros estudios que si bien no desarrollan helado de crema con *L. casei* como probiótico específico, utilizan el género *Lactobacillus* como es el caso de *L rhamnosus*GG incorporados en helado de crema donde se mantuvieron viables durante un año de almacenamiento, sin presentar cambios negativos sobre las características del producto (Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei y Corti, 2005). Una investigación indica que al utilizar *L. plantarum* LB/103-1-5, *L. casei*, y *L. acidophilus* se obtuvo una mejor viabilidad con *L. plantarum* y *L. casei* (Hernández-Monzón *et al*, 2014). Otro estudio con la utilización de *B. lactis* BB-12 y *L. acidophilus* LA-5 determinó disminuciones poblacionales significativas después del proceso de batido (Corrales, Henderson y Morales, 2007). Otro artículo señala que en la utilización de *L rhamnosus*GG aquel helado que tuvo mayor cantidad de grasas obtuvo una mejor viabilidad, sin embargo a los 14 días de almacenamiento existieron pérdidas pero no fueron significativas (Alamprese, Foschino, Rossi, Pompei y Corti, 2005). Otro estudio indica que al utilizar *L. acidophilus*, existió una disminución de los recuentos bacterianos de $1,5 \cdot 10^8$ a $4 \cdot 10^6$, después de 17 semanas de almacenamiento a -29°C (Mohammadi *et al*, 2011). Si bien la viabilidad de cultivos probióticos en los estudios señalados se mantienen por largos periodos de almacenamiento, no ocurre lo mismo en este estudio, ya que la supervivencia va a depender de las características de la matriz alimentaria, la cepa utilizada, las interacciones entre microorganismos seleccionados, la acidez final del producto, la producción de peróxido de hidrógeno a través de la actividad bacteriana así como la tecnología de producción, la temperatura del almacenamiento, el tiempo de almacenamiento y la formulación del producto, también de factores como el frío, el cual retarda la acción metabólica de las células vivas, haciendo que estas entren en un estado de latencia (Mortazavian, Mohammadi y Sohrabvandi, 2012; Mohammadi *et al*, 2011; Cruz *et al*, 2009; Sagdic *et al*, 2012). Así pues un estudio informa que en productos lácteos como yogur y postres lácteos congelados existe una baja viabilidad de probióticos debido a la concentración de ácido láctico y ácido acético, bajo pH, la presencia de peróxido de hidrógeno y el alto contenido de oxígeno (Burgain *et al*, 2011).

Una investigación ha revelado que, a pesar de que los recuentos de células probióticas disminuyan significativamente durante el almacenamiento, la etapa de batido y congelación del producto tienen un mayor efecto sobre la pérdida de viabilidad; además se señala que una congelación lenta produce cristales de hielo más grandes que afectan directamente la membrana celular de los microorganismos, produciendo la muerte, mientras que la congelación rápida contribuye al buen mantenimiento de las poblaciones de estos microorganismos en el producto (Hernández-Monzón *et al*, 2014; Mohammadi *et al*, 2011; Mortazavian, Mohammadi y Sohrabvandi, 2012), de cualquier manera la resistencia de los probióticos al daño por congelación difiere entre las cepas probióticas (Mohammadi *et al*, 2011).

La temperatura de almacenamiento de los productos probióticos también afecta su viabilidad, pues muchas bacterias ácido lácticas muestran una fase estacionaria con poco crecimiento, pero también sufren una rápida pérdida de viabilidad celular si se almacenan a temperaturas inferiores a 20 °C (Cruz *et al*, 2009), sin embargo la temperatura de almacenamiento de este estudio y los demás estudios anteriores fueron por debajo de esta temperatura.

Con relación al análisis sensorial algunos autores indican que los cultivos probióticos no modifican las propiedades sensoriales de los productos a los que se añaden (Champagne, Gardner y Roy, 2005; Cruz *et al*, 2009), y así se pudo observar en este estudio que en general el producto no presentó cambios en las características organolépticas, obteniendo buena aceptación por los panelistas con una calificación de “Me gusta mucho”, pues el pH de este helado no fermentado da al producto una ventaja sobre el sabor, ya que no presenta mayor acidez; así también indica un estudio en donde la utilización de *L. plantarum* obtuvo mejor aceptación por parte de los consumidores que *L. acidophilus*, debido a la acidez tan elevada del *L. acidophilus* que le transmitió al helado un sabor acentuado a leche fermentada y por tanto la tendencia al rechazo por parte de los consumidores (Hernández-Monzón *et al*, 2014), de igual manera otro estudio demostró que al utilizar *L. acidophilus* en el helado, afectó notablemente las propiedades sensoriales del producto (Abghari, Sheikh-Zeinoddin y Soleimani-Zad, 2011); no siendo así en un estudio que al utilizar *L. acidophilus* y *B. lactis* no existió ninguna diferencia con respecto al sabor, siendo aceptado por los panelistas ambos tipos (Corrales, Henderson y Morales, 2007).

Hallazgos similares a este estudio, indica aquel en donde se utilizó *L. casei* y este obtuvo una mejor aceptabilidad en cuanto a sabor y homogeneidad con relación a *L. rhamnosus* (Di Criscio *et al*, 2010).

Debido a que la eficacia de los microorganismos probióticos depende de que lleguen vivos y sean capaces de adherirse a la mucosa a través de su paso por el tracto gastrointestinal, además de ser capaces de resistir ambientes adversos durante su elaboración y durante la vida útil del producto, se realizaron pruebas de tolerancia *in vitro*; si bien no existe suficiente información con *L. casei* específicamente, se ha tomado la utilización del género *Lactobacillus*.

En este estudio al realizar tolerancia a Ácido clorhídrico existió una disminución de la población a un pH 3 durante 120 horas de incubación, esta disminución considerable también se puede observar en otros estudios con *Lactobacillus* como es el caso de un estudio en donde se probó tolerancia de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* a un pH 2,5 existiendo una menor tolerancia del primer probiótico (Abghari, Sheikh-Zeinoddin y Soleimani-Zad, 2011). Es importante mencionar que la evaluación *in vitro* de la tolerancia al ácido de las bacterias probióticas puede no reproducir un buen desempeño del comportamiento *in vivo*, ya que la correlación entre ellos es deficiente (Cruz *et al*, 2009).

Con relación de resistencia a la bilis, en este estudio existió una disminución de la población bacteriana a las 120 horas de incubación, esta reducción considerable es también cercana a lo observado en un estudio el cual indica que Las cepas de *B. lactis* fueron especialmente susceptibles a las sales biliares y se informó una disminución de más de 4 ciclos log, algo similar ocurrió con *L. acidophilus* sometido a condiciones de ensayo similares(Da Silva *et al*, 2015), de igual manera reporta otro estudio donde la resistencia a la bilis del *L. acidophilus* parece ser más susceptible (Abghari, Sheikh-Zeinoddin y Soleimanian-Zad, 2011). Uno de los posibles mecanismos por los cuales la bilis afecta a las células probióticas sería a través de los efectos dañinos de la membrana y / o alterando la estabilidad celular, a pesar de esto, la tolerancia a la bilis es una característica específica de la cepa y, por lo tanto, no puede generalizarse. Además, la concentración de ácido biliar varía de una persona a otra y, en general, los ensayos experimentales no son capaces de simular la composición biliar exacta encontrada en humanos(Da Silva *et al*, 2015; Abghari, Sheikh-Zeinoddin y Soleimanian-Zad, 2011).

La capacidad de generar sustancias antimicrobianas juega un rol significativo en la habilidad de los probióticos para competir con los microorganismos residentes a lo largo del tracto intestinal y modificarlo beneficiosamente, como se demostró en este estudio que el ácido láctico y las bacteriocinas producidas por las BAL crean un ambiente hostil que inhibe el crecimiento de algunas bacterias patógenas como la Salmonella, esto es corroborado con una investigación que demuestra que los cultivos de *Lactobacillus* presentan una importante actividad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos como Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Yersinia pseudotuberculosis y Shigella sonnei(Bustamante y Alvarad, 2015).

Sin embargo existe ciertas menciones que indican que a bajas temperaturas y por periodos largos de tiempo se sometieron ciertas muestras a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal demostrando que las cepas más resistentes fueron *L. casei* y *B. lactis*(Homayouni *et al*, 2008; Montfort *et al*, 2013)

Esta diferencia en los resultados obtenidos parece atribuirse a la variabilidad de las cepas y especies, a la condición de crecimiento, a la naturaleza del medio de suspensión y al estado de congelación y descongelación que afectan la membrana citoplasmática de los *Lactobacillus* (Cruz *et al*, 2009; Mohammadi *et al*, 2011).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En este contexto, nuestros hallazgos pueden ser de interés, ya que exponemos que los cultivos probióticos no modifican las características sensoriales de los helados y ese ha demostrado que existe la posibilidad de fabricar un helado probiótico no fermentado con buena aceptación sensorial, pero priorizando que *L. casei* a pesar de ser una cepa resiste a factores de estrés altos, no es la más recomendable para helado, pues la viabilidad en esta matriz alimentaria es menor. La investigación in vivo de los efectos de los helados simbióticos valdría la pena

Sería mejor utilizar la técnica de micro encapsulamiento para preservar por mayor tiempo la viabilidad de las bacterias probióticas pues se ha demostrado que esta técnica protege a las células probióticas de factores ambientales perjudiciales tales como pH bajo y alta acidez y sales biliares,

Los retos actuales para desarrollar helados funcionales tienen que ver con dos aspectos: el mantenimiento de la calidad del producto terminado, midiendo propiedades físicas del producto y aceptabilidad del consumidor; así como la viabilidad de los microorganismos probióticos. Establecer un apropiado proceso de producción podrá ser la base para nuevas estrategias de control con la finalidad de asegurar la viabilidad del producto probiótico, pues se conoce que el mercado mundial indica un crecimiento significativo para los próximos 5 años.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

El lanzamiento de helados complementados con cultivos probióticos debe ir acompañado de campañas educativas encaminadas a alentar el consumo más constante por parte de la población y mostrarles los múltiples beneficios que aporta este tipo de productos.

Se requiere estudios adicionales sobre la elección de una cepa más resistente o el uso de técnicas para aumentar la resistencia de las cepas como es el caso de encapsulación. Los fabricantes y los organismos reguladores deberían considerar estos hechos cuando se usan términos de alimentos funcionales en el etiquetado de cualquier alimento que contenga probióticos

Además, es importante confirmar si, después de largos períodos de almacenamiento, los cultivos probióticos todavía pueden conferir los mismos beneficios para la salud ya observados en otros alimentos con tiempos de conservación más cortos y temperaturas de almacenamiento más altas, como yogures y leches fermentadas.

Se recomiendan más estudios in vivo con productos probióticos, pues las características a nivel del tracto gastrointestinal difieren de una persona a otra.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abghari, Ali, Mahmoud Sheikh-Zeinoddin, and Sabihe Soleimanian-Zad. "Nonfermented Ice Cream as a Carrier for Lactobacillus Acidophilus and Lactobacillus Rhamnosus." *International Journal of Food Science & Technology* 46.1 (2011): 84-92. Print.
- Aguilera, CM, et al. "Alimentos Funcionales. Aproximación a Una Nueva Alimentación." *Coordinadores: Barberá JM, Marcos A. Ed: Dirección General de Salud Pública y Alimentación* (2007). Print.
- Akalın, AS, and D Erişir. "Effects of Inulin and Oligofructose on the Rheological Characteristics and Probiotic Culture Survival in Low-Fat Probiotic Ice Cream." *Journal of food science* 73.4 (2008): M184-M88. Print.
- Akın, MB, MS Akın, and Z Kırmaç. "Effects of Inulin and Sugar Levels on the Viability of Yogurt and Probiotic Bacteria and the Physical and Sensory Characteristics in Probiotic Ice-Cream." *Food chemistry* 104.1 (2007): 93-99. Print.
- Alamprese, Cristina, et al. "Effects of Lactobacillus Rhamnosus Gg Addition in Ice Cream." *International journal of dairy technology* 58.4 (2005): 200-06. Print.
- . "Survival of Lactobacillus Johnsonii La1 and Influence of Its Addition in Retail-Manufactured Ice Cream Produced with Different Sugar and Fat Concentrations." *International Dairy Journal* 12.2 (2002): 201-08. Print.
- Burgain, J, et al. "Encapsulation of Probiotic Living Cells: From Laboratory Scale to Industrial Applications." *Journal of Food Engineering* 104.4 (2011): 467-83. Print.
- Bustamante, Giovana, and Pedro Alvarad. "Efecto Del Sobrenadante Del Cultivo De Lactobacillus Sp. Sobre El Crecimiento De Staphylococcus Aureus, Salmonella Typhi Y Salmonella Enteritidis." *Revista REBIOLEST* 3.1 (2015): 33-41. Print.
- Champagne, Claude P, Nancy J Gardner, and Denis Roy. "Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods." *Critical reviews in food science and nutrition* 45.1 (2005): 61-84. Print.
- Cocchi, Andrea, and Roberto Lazzarini. "Ice Cream with a Low Sugar Content Comprising Prebiotics Partly or Totally Fermented by Probiotics and Method for Making the Ice Cream." Google Patents, 2014. Print.
- Collins, Matthew D, Brian A Phillips, and Paolo Zanoni. "Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of Lactobacillus Casei, Lactobacillus Paracasei Sp. Nov., Subsp. Paracasei and Subsp. Tolerans, and Lactobacillus Rhamnosus Sp. Nov., Comb. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 39.2 (1989): 105-08. Print.
- Corrales, Alejandro, Marjorie Henderson, and Ileana Morales. "Sobrevivencia De Microorganismos Probióticos Lactobacillus Ácidophilus Y Bifidobacterium Lactis En Helado Batido." *Revista Chilena de Nutrición* 34.2 (2007): 0. Print.
- Cruz, Adriano G, et al. "Ice-Cream as a Probiotic Food Carrier." *Food Research International* 42.9 (2009): 1233-39. Print.
- Da Silva, Priscilla Diniz Lima, et al. "Potentially Probiotic Ice Cream from Goat's Milk: Characterization and Cell Viability During Processing, Storage and Simulated Gastrointestinal Conditions." *LWT-Food Science and Technology* 62.1 (2015): 452-57. Print.
- De Vrese, Michael, and J Schrezenmeir. "Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics." *Food Biotechnology*. Springer, 2008. 1-66. Print.

- Di Criscio, T, et al. "Production of Functional Probiotic, Prebiotic, and Synbiotic Ice Creams." *Journal of dairy science* 93.10 (2010): 4555-64. Print.
- Fernández, Luz María Samaniego, and Maryla Sosa del Castillo. *Lactobacillus Spp: Importantes Promotores De Actividad Probiótica, Antimicrobiana Y Bioconservadora*. Editorial Universitaria, 2007. Print.
- Fontecha, F Javier, et al. "Avances En La Investigación De La Alimentación Funcional." (2010). Print.
- Gabriela Ramos-Clamont, Montfort, et al. "Estrategias Para Mejorar La Sobrevivencia De Probioticos En Helados." *Noviembre 2012 XV, Nmero 2*. Print.
- Gibson, Glenn R, et al. "Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics." *Nutrition research reviews* 17.02 (2004): 259-75. Print.
- . "Dietary Prebiotics: Current Status and New Definition." *Food Sci Technol Bull Funct Foods* 7 (2010): 1-19. Print.
- González-Herrera, Silvia Marina, et al. "Inulin in Food Products: Prebiotic and Functional Ingredient." *British Food Journal* 117.1 (2015): 371-87. Print.
- Guarner, Francisco, et al. "Probióticos Y Prebióticos." *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos* (2011): 1-29. Print.
- Hernández-Monzón, C Aldo, et al. "Desarrollo De Un Helado De Leche Con Cultivos Probióticos." *Tecnología Química* 34.1 (2014): 94-101. Print.
- Homayouni, A, et al. "Growth and Survival of Some Probiotic Strains in Simulated Ice Cream Conditions." *Journal of Applied Sciences* 8 (2008): 379-82. Print.
- Jayamanne, VS, and MR Adams. "Determination of Survival, Identity and Stress Resistance of Probiotic Bifidobacteria in Bio-Yoghurts." *Letters in applied microbiology* 42.3 (2006): 189-94. Print.
- Joint, FAO. "Who Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002." *Accessed August 31* (2014): 20152015. Print.
- Kailasapathy, Kasipathy, and Khalida Sultana. "Survival and [Beta]-D-Galactosidase Activity of Encapsulated and Free Lactobacillus Acidophilus and Bifidobacterium Lactis in Ice-Cream." *Australian journal of dairy technology* 58.3 (2003): 223. Print.
- Kolida, S, K Tuohy, and GR Gibson. "Prebiotic Effects of Inulin and Oligofructose." *British Journal of Nutrition* 87.S2 (2002): S193-S97. Print.
- Krasaekoopt, Wunwisa, Bhesh Bhandari, and Hilton Deeth. "Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt." *International Dairy Journal* 13.1 (2003): 3-13. Print.
- Lajolo, Franco M. "Functional Foods: Latin American Perspectives." *British journal of nutrition* 88.S2 (2002): S145-S50. Print.
- Liria, Mr, and R María. "Guía Para La Evaluación Sensorial De Alimentos." *Cali: CIAT* (2007). Print.
- Lozada, Adelfo Escalante. "El Potencial De La Manipulación De La Flora Intestinal Por Medios Dietéticos Sobre La Salud Humana." *Enferm. Infec. Microbiol* 21.3 (2001): 106-14. Print.
- Madrigal, Lorena, and Elba Sangronis. "La Inulina Y Derivados Como Ingredientes Claves En Alimentos Funcionales." *Archivos latinoamericanos de nutrición* 57.4 (2007): 387. Print.
- Mohammadi, Reza, et al. "Probiotic Ice Cream: Viability of Probiotic Bacteria and Sensory Properties." *Annals of microbiology* 61.3 (2011): 411-24. Print.
- Montfort, Gabriela Ramos-Clamont, et al. "Estrategias Para Mejorar La Sobrevivencia De Probióticos En Helados." *BIOtecnia* 15.2 (2013): 31-38. Print.

- Mortazavian, Amir Mohammad, Reza Mohammadi, and Sara Sohrabvandi. *Delivery of Probiotic Microorganisms into Gastrointestinal Tract by Food Products*. INTECH Open Access Publisher, 2012. Print.
- Naidu, AS, WR Bidlack, and RA Clemens. "Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (Lab)." *Critical reviews in food science and nutrition* 39.1 (1999): 13-126. Print.
- Narayan, Sujatha S, et al. "Probiotics: Current Trends in the Treatment of Diarrhoea." *Hong Kong Med J* 16.3 (2010): 213-18. Print.
- Ogueke, CC, et al. "Probiotics and Prebiotics: Unfolding Prospects for Better Human Health." *Pakistan Journal of Nutrition* 9.9 (2010): 833-43. Print.
- Olagnero, Gabriela, et al. "Alimentos Funcionales: Fibra, Prebióticos, Probióticos Y Simbióticos." *Diaeta* 25.121 (2007): 20-33. Print.
- Ooi, Lay-Gaik, and Min-Tze Liong. "Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings." *International journal of molecular sciences* 11.6 (2010): 2499-522. Print.
- Ozen, Asli E, Antoni Pons, and Josep A Tur. "Worldwide Consumption of Functional Foods: A Systematic Review." *Nutrition Reviews* 70.8 (2012): 472-81. Print.
- Pasin, Bryshila Lupo, CG Azón, and AM Garriga. "Microencapsulación Con Alginato En Alimentos. Técnicas Y Aplicaciones." *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3.1 (2012): 130-51. Print.
- Phillips, Melissa M, and Catherine A Rimmer. "Functional Foods and Dietary Supplements." *Analytical and bioanalytical chemistry* 405.13 (2013): 4323. Print.
- Ramírez, JE González, et al. "Estado Del Arte Y Avances En La Elaboración De Helados." *Tlatemoani*.11 (2012). Print.
- Roberfroid, Marcel B. "Introducing Inulin-Type Fructans." *British Journal of Nutrition* 93.S1 (2005): S13-S25. Print.
- Ross, RP, et al. "Overcoming the Technological Hurdles in the Development of Probiotic Foods." *Journal of Applied Microbiology* 98.6 (2005): 1410-17. Print.
- Saarela, Maria, et al. "Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological Properties." *Journal of biotechnology* 84.3 (2000): 197-215. Print.
- Sagdic, Osman, et al. "Interaction between Some Phenolic Compounds and Probiotic Bacterium in Functional Ice Cream Production." *Food and Bioprocess Technology* 5.8 (2012): 2964-71. Print.
- Schneeman, Barbara O. "Fiber, Inulin and Oligofructose: Similarities and Differences." *The Journal of nutrition* 129.7 (1999): 1424S-27s. Print.
- Scholz-Ahrens, Katharina E, et al. "Effects of Prebiotics on Mineral Metabolism." *The American journal of clinical nutrition* 73.2 (2001): 459s-64s. Print.
- Siro, Istvan, et al. "Functional Food. Product Development, Marketing and Consumer Acceptance—a Review." *Appetite* 51.3 (2008): 456-67. Print.
- Talwalkar, A, and K Kailasapathy. "Effect of Microencapsulation on Oxygen Toxicity in Probiotic Bacteria." *Australian Journal of Dairy Technology* 58.1 (2003): 36. Print.
- Thantsha, MS, CI Mamvura, and J Booyens. *Probiotics-What They Are, Their Benefits and Challenges*. INTECH Open Access Publisher, 2012. Print.
- Tripathi, MK, and SK Giri. "Probiotic Functional Foods: Survival of Probiotics During Processing and Storage." *Journal of functional foods* 9 (2014): 225-41. Print.

ANEXOS

ANEXO 1

Guía de panelistas para el Análisis Sensorial

- Estar en buena condición física y mental.
- Conocer antes de empezar la ficha de registro para evitar confusiones.
- Percibir el aroma inmediatamente después de abrir la muestra para distinguir el olor con mayor claridad.
- Probar suficiente de la muestra para asegurar de degustar adecuadamente el producto.
- Prestar atención a la secuencia de los productos presentados, empezar por el de mano izquierda y continuar por el de la derecha. No cambiarlos de posición para evitar confusión en el llenado del formulario.
- Enjuagarse la boca al cambiar el producto que se está degustando y cada vez que lo requiera.
- Concentrarse en la prueba y bloquear otras distracciones.
- No ser demasiado crítico, no sobre-juzgar un producto.
- No cambiar su manera de pensar.
- Revisar los puntajes asignados a los productos, para estar seguros de la evaluación realizada.
- Ser honesto con usted mismo en la evaluación.
- No fumar, beber o comer por lo menos 30 minutos antes de su participación.
- No usar perfume, loción de afeitar, jabones perfumados y lociones de mano, pues se puede confundir los resultados, sobre todo cuando se está evaluando el olor de un producto.
- La evaluación sensorial es un trabajo serio por lo tanto se deben evitar bromas y egos

ANEXO 2

Prueba de evaluación					
Nombre de la prueba: Preferencia				Fecha	
1.- Datos de identificación					
Edad					
Sexo					
Fuma					
Toma medicamentos					
A qué hora fue su última comida					
2.- Indicaciones antes de la degustación					
<p>Por favor enjuague su boca con agua antes de empezar. Por favor pruebe las tres muestras de helado presentados. Usted puede beber agua tanto como desee. Asigne un orden de preferencia usando las siguientes categorías:</p>					
1= Menos preferida, 3= Mas preferida					
Producto A		Producto B		Producto C	
Orden de preferencia		Orden de preferencia		Orden de preferencia	
Gracias por su participación					

ANEXO 3

Prueba de evaluación					
Nombre de la prueba: Aceptabilidad				Fecha:	
1.- Datos de identificación					
Edad					
Sexo					
Fuma					
Toma de medicamentos					
A qué hora fue su última comida					
2.- Indicaciones antes de la degustación					
<p>Observe y pruebe cada muestra de helado, de izquierda a derecha. Indique el grado que le gusta o le desagrada. Marcando con una X a lado de la palabra que elija, según la columna del código</p>					
TEXTURA					
Muestra: A		Muestra: B		Muestra: C	
Me gusta mucho		Me gusta mucho		Me gusta mucho	
Me gusta poco		Me gusta poco		Me gusta poco	
Ni me gusta ni me disgusta		Ni me gusta ni me disgusta		Ni me gusta ni me disgusta	
Me disgusta		Me disgusta		Me disgusta	
SABOR					
Muestra: A		Muestra: B		Muestra: C	
Me gusta mucho		Me gusta mucho		Me gusta mucho	
Me gusta poco		Me gusta poco		Me gusta poco	
Ni me gusta ni me disgusta		Ni me gusta ni me disgusta		Ni me gusta ni me disgusta	
Me disgusta		Me disgusta		Me disgusta	
COLOR					
Muestra: A		Muestra: B		Muestra: C	
Me gusta mucho		Me gusta mucho		Me gusta mucho	
Me gusta poco		Me gusta poco		Me gusta poco	
Ni me gusta ni me disgusta		Ni me gusta ni me disgusta		Ni me gusta ni me disgusta	
Me disgusta		Me disgusta		Me disgusta	
Gracias por su participación					

Anexo 4

HELADO PROBIOTICO

